

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**TESE**

**Caracterização de Transportadores Envolvidos na Remobilização do  
Nitrato Armazenado no Vacúolo em Arroz**

**Erika da Costa Fernandes**

**2021**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FITOTECNIA**

**CARACTERIZAÇÃO DE TRANSPORTADORES ENVOLVIDOS NA  
REMOBILIZAÇÃO DE NITRATO ARMazenado NO VACÚOLO EM  
ARROZ**

**ERIKA DA COSTA FERNANDES**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Manlio Silvestre Fernandes**

*e Coorientação do Professor*  
**Leandro Azevedo Santos**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutora em  
Fitotecnia**, no Programa de Pós-  
Graduação em Fitotecnia, Área de  
Concentração Fisiologia da Produção.

Seropédica, RJ  
Outubro de 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F363c Fernandes, Erika da Costa, 1991-  
Caracterização de Transportadores Envolvidos na  
Remobilização do Nitrato Armazenado no Vacúolo em  
Arroz / Erika da Costa Fernandes. - Seropédica, 2021.  
102 f.: il.

Orientador: Manlio Silvestre Fernandes.  
Coorientador: Leandro Azevedo Santos.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em  
Fitotecnia, 2021.

1. Eficiência de Uso de Nitrogênio. 2. Oryza  
Sativa. 3. Acúmulo de nitrato. 4. Proteínas de  
transporte. 5. Transporte no tonoplasto. I.  
Fernandes, Manlio Silvestre, 1939-, orient. II.  
Santos, Leandro Azevedo, 1981-, coorient. III  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. IV. Título.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**



**HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO Nº 7 / 2022 - DeptFITO (12.28.01.00.00.32)**

**Nº do Protocolo: 23083.033174/2022-03**

**Seropédica-RJ, 31 de maio de 2022.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**ERIKA DA COSTA FERNANDES**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Fitotecnia**, no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Fisiologia da Produção.

TESE APROVADA EM 29/10/2021

**Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020**, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

---

Manlio Silvestre Fernandes. Ph.D. UFRRJ

(Orientador)

---

José Ivo Baldani. PhD. Embrapa

(Titular)

---

Luc Felicianus Marie Rouws. PhD. Embrapa

(Titular)

---

Marilene Hilma dos Santos. PhD. UFRRJ

(Titular)

---

Rafaela Eloi de Almeida Alves. Dra. IFsuldeMinas

(Titular)

**(Assinado digitalmente em 31/05/2022 16:20 )**  
MARILENE HILMA DOS SANTOS  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptG (12.28.01.00.00.50)  
Matrícula: 2147409

**(Assinado digitalmente em 01/06/2022 12:07 )**  
MANLIO SILVESTRE FERNANDES  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 002.180.573-34

**(Assinado digitalmente em 31/05/2022 16:11 )**  
JOSÉ IVO BALDANI  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 538.864.458-87

**(Assinado digitalmente em 31/05/2022 16:11 )**  
LUC FELICIANUS MARIE ROUWS  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 014.563.806-56

**(Assinado digitalmente em 31/05/2022 15:40 )**

RAFAELA ELOI DE ALMEIDA ALVES

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 056.399.397-96

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **7**, ano: **2022**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO**, data de emissão: **31/05/2022** e o código de verificação: **c7a9b2f0b1**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proporcionar chegar onde jamais imaginei.

À minha mãe por me trazer a este mundo e ensinar que tudo é possível àquele que crê e corre atrás. Aos meus irmãos João e Rafael e cunhadas por todo apoio e incentivo nesta jornada.

Ao meu querido companheiro Wilton Jordan pelo incentivo a alcançar meus objetivos, apoio nas intermináveis análises, paciência nos surtos de ansiedade e companheirismo. Te amo.

Ao professor Manlio Silvestre Fernandes pela oportunidade de termos trabalhado juntos, pela orientação e aprendizados fornecidos durante o período de doutoramento, sobretudo no período de distanciamento social causado pela pandemia de COVID-19.

Ao professor Dr. Leandro Azevedo Santos pela paciência, orientação e conhecimentos fornecidos durante este trabalho de pesquisa.

Ao professor Dr. Carlos Alberto Bucher por todos os conselhos, colaboração e ensinamentos.

Ao pesquisador Dr. Luc Rows pela disponibilidade, assistência e contribuição fornecida na etapa de microscopia confocal.

Aos colegas Thamara, Carlos Antônio, Fernando (Zezão), Alessandra, Michele, Julio, Rosimar, por todo apoio neste processo.

Aos colegas de Laboratório, Renan, Brisa, Erinaldo, Cassia, Marcus, Leilson, Andressa, André, Rafael, Sabrina, Rodolfo, Juan Sebastian, Marcela, pela amizade, ajuda e convívio.

Aos estagiários e bolsistas Maria Eduarda, Thainá, Bernardo, Aline, Juliana, Letícia, Pedro, Nilson por toda ajuda durante as análises e experimento, pelas conversas e aprendizados, por me tornarem uma professora melhor e me ensinarem a cada dia.

Aos membros da banca Dr. José Ivo Baldani, Dra. Marilene Hilma dos Santos e Rafaela Eloi de Almeida Alves, pelas contribuições e disponibilidade em participar como membros avaliadores deste trabalho de tese;

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia e sua coordenação e o Departamento de Solos pela estrutura e apoio para realização do trabalho.

À UFRRJ, pela formação de excelência que me proporcionou.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ pela concessão da bolsa e financiamento para o desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

À UFRRJ, FAPERJ pelo apoio ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## BIOGRAFIA

Erika da Costa Fernandes, nascida em Caraguatatuba-São Paulo em 29 de julho de 1991, cursou até o sétimo ano do Ensino Fundamental no Colégio Municipal Iolanda Vellutini em Pindamonhangaba-SP, aos doze anos mudou-se para Seropédica-RJ onde cursou o oitavo ano na Escola municipal Santa Sofia e o nono ano no CIEP 155 Maria Joaquina de Oliveira. Em 2006 iniciou o Ensino Médio Formação de Professores no Colégio Estadual Presidente Rodrigues Alves em Paracambi-RJ passando ao Ensino Médio Científico no ano seguinte. Em 2009, ingressou no curso de graduação em Agronomia da UFRRJ. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica da FAPERJ por três anos sob Orientação do professor Dr. Valdir Diola (*in memoriam*) no Laboratório de Melhoramento de Plantas (LBMP) por quatro anos, onde ganhou seu primeiro prêmio pelos trabalhos com melhoramento convencional e marcadores moleculares em cana de açúcar. Em 2013 foi bolsista do Programa Ciência Sem Fronteiras da CAPES realizando intercâmbio durante um ano na Università di Bologna onde participou do projeto EURO root sob orientação do pesquisador Dr. Silvio Salvi. Foi bolsista de apoio técnico em 2014 no LBMP sob orientação do professor Dr. Maurício Ballesteiro Pereira. Em agosto de 2015 ingressou no mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa, desenvolvendo trabalhos relacionados ao melhoramento genético de Pinhão-Manso sob Orientação do Dr. Luiz Antônio dos Santos Dias. Em agosto de 2017 ingressou no doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRRJ, sob orientação do Prof. Ph.D. Manlio Silvestre Fernandes, identificando e caracterizando genes envolvidos no acúmulo e remobilização de nitrato a partir dos vacúolos buscando estudar e melhorar a eficiência de uso e absorção de nitrogênio em arroz.

## RESUMO GERAL

FERNANDES, Erika da Costa. **Caracterização de Transportadores envolvidos na Remobilização de Nitrato armazenado no vacúolo em Arroz**. 2021. 102p Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

O acúmulo de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) nos vacúolos celulares é uma estratégia de extrema importância para suprir o nitrogênio (N) necessário ao desenvolvimento da planta devido as variações de disponibilidade no solo. O transporte desse íon pelo tonoplasto é mediado por proteínas transportadoras específicas, ainda pouco conhecidas. A identificação dessas proteínas permite esclarecer o processo de acúmulo e remobilização de  $\text{NO}_3^-$  e delinear estratégias visando aumentar a eficiência do uso de N. O objetivo deste trabalho foi a identificação de genes que codificam proteínas transportadoras responsáveis pela remobilização do  $\text{NO}_3^-$  acumulado no vacúolo em arroz. Inicialmente sequências de aminoácidos potencialmente codificantes de proteínas de transporte de  $\text{NO}_3^-$  expressas no vacúolo foram reunidas e realizada uma análise filogenética. Em seguida avaliou-se a resposta de expressão destas proteínas frente ao flush de  $\text{NO}_3^-$  em um experimento com plantas de arroz (var. Manteiga) em solução nutritiva de Hoagland com 5 mM de N- $\text{NO}_3^-$  por 30 dias, sob um período de supressão de N por 72 horas, seguido do ressurgimento do fornecimento de N. Posteriormente, os genes *OsNPF7.8* e *OsNPF5.13* foram clonados inseridos em vetor de superexpressão e realizou-se a transformação genética de plantas de arroz (var. Nipponbare) via *A. tumefaciens*. Dois experimentos foram realizados semelhantes ao inicial com modificação no tempo de cultivo e nas coletas: as linhagens *OsNPF7.8* foram cultivadas em dose constante por 20 dias e submetidas a 72h de supressão seguido pelo ressurgimento do fornecimento de  $\text{NO}_3^-$  realizando coletas após a supressão e 24h após o ressurgimento. As linhagens *OsNPF5.13* foram cultivadas em dose constante por 24 dias e submetidas a supressão de N realizando coletas 24 e 96 h após a supressão. Um total de 71 genes foram utilizados na criação da árvore filogenética que evidenciou a diferenciação entre as sequências codificantes de canais de cloreto (CLC), transportadores de alta afinidade (NRT2) e de baixa afinidade (NPF) com a separação de 8 grupos. Dentre os transportadores de baixa afinidade o grupo III reuniu genes da família NPF5 caracterizadas como atuantes no efluxo de  $\text{NO}_3^-$  a partir do vacúolo em *A. thaliana*, e o grupo IV genes NPF7 com genes caracterizados como atuantes no influxo de  $\text{NO}_3^-$  para o vacúolo em arroz. A análise de expressão demonstrou que os genes *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.15*, *OsNPF5.16sp1* e *OsNF5.17* apresentaram indução de transcrição em resposta a supressão do fornecimento de  $\text{NO}_3^-$  na solução associado ao aumento dos teores de  $\text{NO}_3^-$  na planta e da atividade da enzima nitrato redutase (NR), indicando relação com o efluxo de nitrato a partir do vacúolo. Por outro lado, o gene *OsNPF7.8* apresentou maior resposta ao período de ressurgimento relacionando-o ao influxo do íon. A superexpressão do gene *OsNPF5.13* resultou em maior atividade da NR, aumento dos teores de amônio, N-amino e açúcares solúveis demonstrando um aumento da estabilidade da assimilação de N. Enquanto as linhagens superexpressando o gene *OsNPF7.8* apresentaram aumento dos teores de  $\text{NO}_3^-$  na raiz e da atividade da NR, além de aumento dos teores de amônio e N-amino nas folhas, demonstrando alterações no influxo de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes.

**Palavras-chave:** proteínas de transporte de baixa afinidade, NPF, *Oryza sativa*, transportadores tonoplasto.

## GENERAL ABSTRACT

FERNANDES, Erika da Costa. **Characterization of transport proteins involved in the Remobilization of Nitrate accumulated in vacuole of Rice.** 2021. 102p Thesis (Doctor of Science in Plant Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

The uptake and remobilization of nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) in cells vacuoles is an extremely important strategy for nitrogen (N) supply to plant development due to variations in soil availability. The transport of this ion across the tonoplast is mediated by specific transport proteins still poorly understood. The identification of these proteins allows to elucidate  $\text{NO}_3^-$  accumulation process and outline strategies in order to increase the use efficiency of N. The aim of this study was to identify genes that encode transport proteins responsible for remobilization of  $\text{NO}_3^-$  accumulated in the vacuole in rice. Amino acid sequences potentially coding for  $\text{NO}_3^-$  transport proteins expressed in vacuole were selected from gene bank and a phylogenetic analysis performed. The relative expression response of these proteins against the  $\text{NO}_3^-$  flush was evaluated in an experiment with rice plants (var. Manteiga) in Hoagland nutrient solution with 5 mM N- $\text{NO}_3^-$  for 30 days, the plants were subjected to N suppression for 72 hours, followed by resupply of N. The genes *OsNPF7.8* and *OsNPF5.13* were cloned, inserted into an overexpression vector and the genetic transformation of rice plants (var. Nipponbare) was performed via *A. tumefaciens*. Two more experiments were carried out similar to the initial with modification in cultivation time and harvest: *OsNPF7.8* strains were cultivated in constant dose for 20 days and submitted to 72h of suppression followed by the resupply of the  $\text{NO}_3^-$  harvesting after the suppression and 24h after resupply. The strains *OsNPF5.13* were cultivated at constant dose for 24 days and submitted to N suppression, performing sample collections 24 and 96h after suppression. A total of 71 genes were used in the phylogenetic tree that showed differentiation between the coding sequences of chloride channels (CLC), high affinity (NRT2) and low affinity (NPF) transporters with separation of 8 groups. Among the low affinity transporters, group III clustered sequences of the NPF5 family characterized as responsible of  $\text{NO}_3^-$  efflux from the vacuole in *A. thaliana* and group IV show NPF7 genes mostly characterized as acting in  $\text{NO}_3^-$  influx to vacuole in rice. The expression analysis showed that *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.15*, *OsNPF5.16sp1* and *OsNF5.17* genes presented transcription induction in response to  $\text{NO}_3^-$  suppression associated with the increase of  $\text{NO}_3^-$  levels in plant and nitrate reductase (NR) activity, it indicates a relationship with nitrate efflux from the vacuole. On the other hand, the *OsNPF7.8* gene showed greater response to resupply period, relating to ion influx. The overexpression of *OsNPF5.13* gene had higher NR activity, increased ammonium, N-amino and soluble sugar contents, demonstrating an increase in the stability of N assimilation. While overexpression of *OsNPF7.8* gene showed increased  $\text{NO}_3^-$  content in the root and NR activity, as well as increased ammonium and N-amino content in leaves, demonstrating changes in influx of  $\text{NO}_3^-$  in the roots.

**Key words:** Low affinity transporter, NPF, *Oryza sativa*, tonoplast transporters.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema ilustrativo da condução do experimento para verificar diferenças nos padrões de expressão dos genes envolvidos na absorção e remobilização do nitrato, durante um período de ausência seguido do ressuprimento com  $N-NO_3^-$ . ..... 18
- Figura 2:** Árvore filogenética contendo o alinhamento de sequências de aminoácidos de 71 genes codificantes de proteínas transportadoras de nitrato pertencentes a diferentes famílias, sendo 56 de arroz (*O. sativa*) e 15 de *A. thaliana*, que apresentam possível localização de expressão na membrana do vacúolo. A árvore foi criada utilizando método Neighbor-Joining utilizando a opção pair-wise deletion e 2000 repetições de “Bootstrap”. As cores em destaque ilustram os componentes de cada grupo formado. .... 21
- Figura 3:** Estrutura dos genes codificantes de transportadores de nitrato pertencentes a família NPF de transportadores de baixa afinidade potencialmente atuantes no tonoplasto em arroz. 23
- Figura 4:** Perfil de expressão *in silico* dos genes selecionados avaliados ao longo do desenvolvimento vegetativo realizado por meio de informações disponibilizadas no banco de dados RICEXPLO. A seta preta indica o tecido da bainha. .... 24
- Figura 5:** Parâmetros fitotécnicos de desenvolvimento das plântulas de arroz (var. Manteiga), cultivadas em solução nutritiva com fornecimento de 5mM de  $N-NO_3^-$  antes, durante e após um período de supressão de nitrogênio por 72 horas. O tempo zero representa o cultivo com suprimento constante de 5mM de  $N-NO_3^-$  até os 30 dias após a germinação (DAG). As barras representam desvio padrão da média. .... 25
- Figura 6:** Resultados da análise do metabolismo vegetal em plantas de arroz (var. Manteiga). A) atividade da enzima nitrato redutase; B) atividade da enzima Glutamina Sintetase; C) teores de  $NO_3^-$ ; D) teores de  $NH_4^+$ ; E) teores de açúcares solúveis; F) teores de aminoácidos livres (N-amino); G) relação N-amino/açúcares solúveis; H) teores de N-total na planta durante os períodos de supressão (0-72h) e ressuprimento (73-160h) de nitrogênio na forma de  $N-NO_3^-$  a concentração de 5mM. O tempo zero representa o cultivo com suprimento constante de 5mM de  $N-NO_3^-$  até os 30 dias após a germinação (DAG). As barras representam desvio padrão da média. .... 26
- Figura 7:** Efeito da supressão do fornecimento de nitrogênio por 72 horas seguido do ressuprimento de 5mM de  $N-NO_3^-$  sobre a expressão relativa dos genes transportadores de nitrato da família NPF putativos para efluxo/ influxo no vacúolo avaliados no tecido da bainha de plantas de arroz (var. Manteiga), sendo: A) *OsNPF5.12*; B) *OsNPF5.13*; C) *OsNPF5.14*; D) *OsNPF5.15*; E) *OsNPF5.16sp1*; F) *OsNPF5.16sp2*; G) *OsNPF5.16sp3*; H) *OsNPF5.17*; I) *OsNPF7.2*; J) *OsNPF7.3*; K) *OsNPF7.1sp1*; L) *OsNPF7.1sp2*; M) *OsNPF7.4sp1*; N) *OsNPF7.4sp2*; P) *OsNPF7.7sp1*; O) *OsNPF7.7sp2*; Q) *OsNPF5.9*; R) *OsNPF7.8*. O gene da *Ubiquitina-OsUBQ5* utilizado como controle endógeno para as reações de RT-PCR e o tempo zero utilizado como padrão interno de expressão, representando o cultivo com suprimento constante de 5mM de  $N-NO_3^-$ . Barras representam desvio padrão da média. (Continua...) .... 31
- Figura 8:** Nível de resposta de expressão dos genes de transportadores da família NPF putativos para efluxo de nitrato do vacúolo em comparação ao gene de referência *Ubiquitina (OsUBQ5)* de forma padronizada. .... 32
- Figura 9:** Representação esquemática das reações realizadas com o sistema gateway de clonagem para obtenção dos vetores de expressão com o gene selecionado fusionado à proteína de fluorescência GFP. .... 40

- Figura 10:** Esquema ilustrativo dos vetores de entrada obtidos a partir da reação BP, a serem utilizados na reação de recombinação LR para formação do clone de expressão. Kan<sup>®</sup> - resistência ao antibiótico Canamicina; attL1 e attL2 – sítios de recombinação. SacI, EcoRV, SmaI, BamHI, NcoI, AvaI, PstI – sítios de cortes por enzimas de restrição; M13 – primers universais para sequenciamento. ....42
- Figura 11:** Esquema ilustrativo dos vetores de expressão obtidos após a reação LR, para superexpressão dos genes fusionados com a proteína de fluorescência GFP..... 44
- Figura 12:** Esquema ilustrativo do sistema de condução do experimento conduzido em câmara de crescimento utilizando plantas de arroz das linhagens 1, 4 e 15 (#1, #4 e #15) transformadas com a construção *P35S:OsNPF7.8:GFP* com diferentes níveis de expressão do transportador *OsNPF7.8* e plantas do tipo selvagem (WT). DAG: dias após a germinação. ....48
- Figura 13:** Esquema ilustrativo do sistema de condução do experimento conduzido em câmara de crescimento utilizando plantas de arroz das linhagens 12, 21 e 29 (#12, #21 e #29) transformadas com a construção *P35S:OsNPF5.13:GFP* com diferentes níveis de expressão do transportador *OsNPF5.13* e plantas do tipo selvagem (WT). DAG: dias após a germinação..49
- Figura 14:** Primeira e segunda reação de amplificação-PCR para clonagem dos genes de interesse *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.16*, *OsNPF5.17* e *OsNPF7.8*. A) primeira reação para amplificação do fragmento inteiro. B) segunda reação de PCR para restrição do fragmento aos códons de iniciação e terminação com fusão de metade do sítio de recombinação Gateway (*attB*). Gel de agarose 1%, corado com GelRed<sup>®</sup> e marcador de 1kb Avati. .... 53
- Figura 15:** Gel de agarose contendo os produtos da digestão por enzimas de restrição das construções contendo o gene de interesse no vetor pDONR221 para criar o vetor doador dos genes *OsNPF7.8*, *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.15* e *OsNPF5.16*. Gel de agarose 1%, corado com GelRed<sup>®</sup> e marcador de 1kb..... 53
- Figura 16:** Gel de agarose dos produtos de digestão com enzimas de restrição das construções contendo o vetor pK7FWG2 fusionado aos genes de interesse *OsNPF7.8*, *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13* e *OsNPF5.15* com a proteína GFP. Gel de agarose 1%, corado com GelRed<sup>®</sup> e marcador de 1kb. .... 54
- Figura 17:** Produto das reações de PCR das colônias com as construções do vetor *pK7FWG2* com os genes de interesse *OsNPF7.8*, *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13* e *OsNPF5.15* fusionados a proteína GFP. Gel de agarose 1%, corado com GelRed<sup>®</sup> e marcador de 100pb. .... 54
- Figura 18:** Protoplastos obtidos no desenvolvimento do protocolo de extração a partir de folhas de plântulas arroz com 11 dias após a germinação e tentativa de transformação genética com fusão de proteína de fluorescência GFP. A) e B) imagem de microscópio ótico com objetiva 40x; C) filtro de luz vermelha, demonstrando fluorescência natural dos protoplastos; D) célula sob incidência do filtro de luz azul; E) campo claro. F) filtros mesclados..... 55
- Figura 19:** Protoplastos extraídos a partir de calos embriogênicos de arroz transformados com a construção *P35S:OsNPF5.12:GFP*. A e E) Filtro de luz vermelha, demonstrando fluorescência natural do protoplastos. B e F) Expressão da proteína *OsNPF5.12-GFP* em protoplastos de calo de arroz. C e G) campo claro. D e H) Filtros mesclados. .... 56
- Figura 20:** Protoplastos extraídos a partir de calos embriogênicos de arroz transformados com a construção *P35S:OsNPF7.8:GFP*. A) Filtro de luz vermelha e fluorescência natural do protoplastos. B) Expressão da proteína *OsNPF7.8-GFP* em protoplastos de calo de arroz. C) campo claro. D) Filtros mesclados. .... 56

**Figura 21:** Protoplastos extraídos a partir de calos embriogênicos de arroz transformados com a construção *P35S:OsNPF5.15:GFP*. A) Filtro de luz vermelha e fluorescência natural do protoplastos. B) Expressão da proteína *OsNPF5.15-GFP* em protoplastos de calo de arroz. C) campo claro. D) Filtros mesclados. ....57

**Figura 22:** Etapas da transformação genética de plantas de arroz mediada por *A. tumefaciens* buscando a obtenção de linhagens superexpressando os genes *OsNPF7.8* e *OsNPF5.13* e *OsNPF5.15* fusionados à proteína GFP. A) Calos embriogênicos de arroz (var. Nipponbare) em meio N6DH (meio de seleção) contendo antibióticos Canamicina e Timentin logo após a inoculação com *A. tumefaciens*; B) Calos em meio de seleção após 2 semanas a serem transferidos para o meio de regeneração de parte aérea (REIII); C) Formação de plântulas após 2 semanas em meio de regeneração; D) Transferência das Plântulas para meio de indução de raízes (HF) em tubos de ensaio; E) Transferência das plantas regeneradas (linhagens) para substrato e aclimatação em mini-estufa adaptada; F) Linhagens transferidas para vasos para cultivo até o final de ciclo e produção de sementes da geração T1. ....57

**Figura 23:** Etapa de regeneração de plantas do método de transformação genética via *A. tumefaciens*, meio de regeneração (REIII) contendo antibióticos Canamicina e Timentin. Em destaque plantas regeneradas que não produziram pigmentos, albinas. ....58

**Figura 24:** Análise de expressão relativa em folha das linhagens T1 de arroz (var. Nipponbare) obtidas na transformação de plantas via *A. tumefaciens* visando a superexpressão dos genes *OsNPF7.8* e *OsNPF5.13* e em folhas de plantas não transformadas (WT), cultivadas em vasos de 7L contendo Chernossolo sob adubação recomendada de 60 kgN/ha. ....59

**Figura 25:** Expressão gênica relativa em linhagens de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* linhagens #1, #4, #15 obtidas pela transformação via *Agrobacterium tumefaciens* na segunda geração após transformação e planta do tipo selvagem (WT), cultivadas por 20 dias em solução nutritiva de Hoagland; Arnon (1950) com 5 mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e submetidas a privação de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 72 horas. As barras representam erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05). Todos os níveis de expressão foram normalizados quanto aos controles endógenos *OsUBC5* e *OsActin2*. ....60

**Figura 26:** Valores de massa fresca, comprimento de raiz e parte aérea de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* linhagens #1, #4, #15 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 72h, sendo tempo zero as plantas coletadas imediatamente após esse tempo e 24 horas após o ressuprimento de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (5,0 mM). As barras representam erro padrão das médias de quatro repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05). ....61

**Figura 27:** Valor de pH e depleção das concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> na solução nutritiva durante o cultivo de plantas de arroz da (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* linhagens #1, #4, #15 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento de 5,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> após 72 horas de privação de N. Barras representam o desvio padrão das médias. ....62

**Figura 28** Teores de nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) em raiz, bainha e folha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* linhagens #1, #4, #15 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 72h, sendo tempo zero as plantas coletadas imediatamente após esse tempo e 24 horas após o ressuprimento de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (5,0 mM). As barras representam erro padrão das médias de quatro repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05). ....63

**Figura 29:** Atividade da enzima Nitrato Redutase em raiz e folha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* linhagens #1, #4, #15 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 72h, sendo tempo zero as plantas coletadas imediatamente após esse tempo e 24 horas após o ressuprimento de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (5,0 mM). As barras representam erro padrão das médias de quatro repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05)...... 64

**Figura 30:** Teores de amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) em folha, raiz e bainha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* linhagens #1, #4, #15 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 72h, sendo tempo zero as plantas coletadas imediatamente após esse tempo e 24 horas após o ressuprimento de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (5,0 mM). As barras representam erro padrão das médias de quatro repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05)...... 64

**Figura 31:** Teores de N-amino e açúcares solúveis em folha, raiz e bainha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* linhagens #1, #4, #15 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 72h, sendo tempo zero as plantas coletadas imediatamente após esse tempo e 24 horas após o ressuprimento de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (5,0 mM). As barras representam erro padrão das médias de quatro repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05)...... 65

**Figura 32:** Massa seca total (g.vaso<sup>-1</sup>), comprimento médio de perfilhos, número de perfilhos e de panículas por vaso de plantas do tipo selvagem (WT, var. Nipponbare) e linhagens #1, #4, #15 superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* no final do ciclo. As barras representam o erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05)...... 66

**Figura 33:** Peso de 100 grãos cheios (g), massa de grãos, número de grãos por vaso de planta do tipo selvagem (WT, var. Nipponbare) e linhagens #1, #4, #15 superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* no final do ciclo. As barras representam o erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05)...... 66

**Figura 34:** Expressão gênica relativa de linhagens de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13*, linhagens #12, #21, #29, obtidas pela transformação via *A. tumefaciens* e cultivadas até a segunda geração e planta do tipo selvagem (WT), sob fornecimento constante de 5mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> coletadas aos 24 DAG (tempo zero). As barras representam erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05). Todos os níveis de expressão foram normalizados quanto aos controles endógenos *Ubiquitina (OsUBQ5)* e *Actina2 (OsActin2)*...... 67

**Figura 35:** Valores de massa fresca de raiz, folha e bainha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13* linhagens #12, #21, #29 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 24 e 96h, sendo considerado tempo zero as plantas coletadas 72h após a troca da solução nutritiva com 5mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As barras representam erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05)...... 68

**Figura 36:** Comprimento radicular, de parte aérea e relação raiz/parte aérea de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13* linhagens #12, #21, #29 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 24 e 96h, sendo considerado tempo zero as plantas coletadas 72h após a troca da solução nutritiva com 5mM de

N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As barras representam erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05)..... 68

**Figura 37:** Plantas selvagens da variedade Nipponbare (WT), linhagens mutantes 12, 21 e 29 (#12, #21 e #29 plantas transformadas superexpressando o gene *OsNPF5.13*) submetidas a dose constante de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> até os 24 dias após a germinação, considerado tempo zero. Barras representam 5 cm..... 69

**Figura 38:** Teores de nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) em raiz, bainha e folha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13* linhagens #12, #21, #29 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 24 e 96h, sendo considerado tempo zero as plantas coletadas 72h após a troca da solução nutritiva com 5mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As barras representam erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05)..... 69

**Figura 39:** Atividade da enzima Nitrato Redutase em raiz, folha e bainha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13* linhagens #12, #21, #29 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 24 e 96h, sendo considerado tempo zero as plantas coletadas 72h após a troca da solução nutritiva com 5mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As barras representam erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05)..... 70

**Figura 40:** Teores de amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) em folha, raiz e bainha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13* linhagens #12, #21, #29 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 24 e 96h, sendo considerado tempo zero as plantas coletadas 72h após a troca da solução nutritiva com 5mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As barras representam erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05)..... 71

**Figura 41:** Teores de N-amino em folha, raiz e bainha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13* linhagens #12, #21, #29 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 24 e 96h, sendo considerado tempo zero as plantas coletadas 72h após a troca da solução nutritiva com 5mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As barras representam erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05)..... 71

**Figura 42:** Teores de açúcares solúveis em folha, raiz e bainha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13* linhagens #12, #21, #29 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 24 e 96h, sendo considerado tempo zero as plantas coletadas 72h após a troca da solução nutritiva com 5mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As barras representam erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05)..... 72

**Figura 43:** Massa seca total (g.vaso<sup>-1</sup>), comprimento médio de perfilhos, número de perfilhos e de panículas por vaso de planta do tipo selvagem (WT, var. Nipponbare) e linhagens #12, #21, #29 superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13* no final do ciclo. As barras representam o erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05)..... 73

**Figura 44:** Peso de 100 grãos cheios (g), massa de grãos, número de de grãos por vaso de planta não transformada (WT, var. Nipponbare) e linhagens #12, #21, #29 superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13* no final do ciclo. As barras representam o erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05)..... 73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequências dos primers utilizados na PCR em tempo real para análise da expressão dos genes selecionados. Continua. ....	17
<b>Tabela 2:</b> Análise de correlação entre as médias da expressão relativa, teores de nutrientes e atividade de enzimas atuantes na assimilação de N durante o período de supressão de $\text{NO}_3^-$ . 28	
<b>Tabela 3:</b> Sequência dos primers utilizados para amplificação das sequências dos genes selecionados da família NPF para estudo da localização subcelular e superexpressão em plantas de arroz. ....	41
<b>Tabela 4:</b> Sequência de primers utilizados no sequenciamento dos vetores de entrada obtidos da reação BP com os genes de transportadores de nitrato. ....	43
<b>Tabela 5:</b> Sequências dos <i>primers</i> utilizados na PCR em tempo real para confirmação da superexpressão na primeira geração das linhagens de arroz obtidas pela transformação genética via <i>A. tumefaciens</i> . ....	47
<b>Tabela 6:</b> Complexidade dos genes de transportadores NPF selecionados para estudo de localização subcelular e superexpressão em plantas de arroz. ....	52
<b>Tabela 7:</b> Número de linhagens obtidas da transformação genética via <i>A. tumefaciens</i> buscando a superexpressão dos genes transportadores de nitrato. ....	59
<b>Tabela 8:</b> Parâmetros cinéticos ( $V_{\text{máx}}$ e $K_m$ ) da absorção de $\text{NO}_3^-$ de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de nitrato <i>OsNPF7.8</i> linhagens #1, #4 e #15 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento de $\text{N-NO}_3^-$ (5,0 mM) após 72 horas de privação de N. ....	62

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
	2.1 Arroz – Cereal de Importância Mundial .....	4
	2.2 Custo da Aplicação de Fertilizantes Nitrogenados em Arroz.....	5
	2.3 Eficiência no Uso de Nitrogênio em Arroz .....	6
	2.4 Transporte de Nitrogênio .....	7
	2.5 Transportadores de Baixa Afinidade de Nitrato .....	8
	2.6 Transportadores Atuantes no Vacúolo.....	9
	<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>11</b>
	<b>ANÁLISE <i>IN SILICO</i> E EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSPORTADORES DE NITRATO DA FAMÍLIA NPF EM ARROZ</b> .....	<b>11</b>
	<b>RESUMO</b> .....	<b>12</b>
	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>13</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
	2.1 Identificação dos Genes <i>NPF</i> e Análise Filogenética.....	16
	2.2 Estrutura e Perfil de Expressão <i>In Silico</i> dos Genes Potenciais .....	16
	2.3 Desenho dos <i>Primers</i> para Avaliar Expressão Gênica .....	16
	2.4 Caracterização da Expressão Gênica .....	17
	2.5 Análise da Atividade da Enzima Nitrato Redutase (NR) e Glutamina Sintetase (GS).18	
	2.6 Quantificação dos Teores de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , N-Amino Livre e Açúcares Solúveis e N-Total em Tecido Vegetal .....	18
	2.7 Extração e Quantificação do RNA Total e Síntese de cDNA.....	19
	2.8 PCR em Tempo Real .....	19
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>21</b>
	3.1 Análise Filogenética e Identificação dos Genes Potenciais.....	21
	3.2 Metabolismo Vegetal e Expressão dos Genes Potenciais.....	24
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>33</b>
	<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>34</b>
	<b>SUPEREXPRESSÃO DOS GENES <i>OsNPF5.12</i>, <i>OsNPF5.13</i>, <i>OsNPF5.15</i> E <i>OsNPF7.8</i> EM ARROZ E AVALIAÇÃO DA ATUAÇÃO NO METABOLISMO DE NITROGÊNIO.</b>	<b>34</b>
	<b>RESUMO</b> .....	<b>35</b>
	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>36</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
	2.1 Seleção dos Genes-Alvo para Estudo .....	39
	2.1.1 Amplificação dos genes de interesse e sistema de clonagem Gateway®.....	39
	2.1.2 Reação BP – obtenção dos vetores de entrada.....	41
	2.1.3 Preparo de Células competentes para eletroporação (DH5α e DB3.1).....	43
	2.1.4 Reação LR – obtenção dos vetores destino <i>pK7FWG2:NPF:GFP</i> .....	43
	2.2 Obtenção de Plantas Transformadas com Superexpressão dos Genes .....	44
	2.2.1 Preparação e transformação de células de <i>A. tumefaciens</i> competentes.....	44
	2.2.2 Transformação Genética de calos de Arroz.....	45
	2.2.3 Confirmação das plantas mutantes transformadas.....	47
	2.2.4 Efeito da Superexpressão do transportador <i>OsNPF7.8</i> no metabolismo de N e avaliação dos parâmetros cinéticos envolvidos na absorção de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	47
	2.2.5 Efeito da Superexpressão do transportador <i>OsNPF5.13</i> no metabolismo de N....	48

2.2.6	Extração de protoplastos de parte aérea de plântulas de arroz .....	49
2.2.7	Análise fenotípica e de produção das linhagens superexpressando os genes <i>OsNPF7.8</i> e <i>OsNPF5.13</i> . .....	50
2.3	Localização Subcelular das Proteínas Fusionadas ao GFP .....	50
2.3.1	Transformação dos protoplastos .....	50
2.3.2	Extração de protoplastos de calos embriogênicos transformados .....	50
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
3.1	Clonagem dos Genes e Construção dos Vetores de Superexpressão com GFP .....	52
3.2	Extração de Protoplastos e Localização Subcelular .....	54
3.3	Transformação Genética de Arroz com as Construções para Superexpressão .....	57
3.4	Efeito da Superexpressão do Gene <i>OsNPF7.8</i> no Metabolismo de N e Absorção de $\text{NO}_3^-$ .....	60
3.5	Efeito da Superexpressão do Gene <i>OsNPF5.13</i> no Metabolismo de N.....	66
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>74</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das culturas de cereais com maior importância econômica e social do mundo. Membro da família *Poaceae*, é uma planta diploide com  $2n=24$  cromossomos. Com genoma relativamente pequeno (430 Mb), apresenta extenso conteúdo de sequências disponibilizadas nos últimos anos, tanto para variedades domesticadas como para genótipos selvagens. Em razão disso, o arroz está entre as plantas cultivadas com melhor anotação gênica sendo uma planta modelo para análises de genoma funcional em monocotiledôneas (HE, et al. 2016).

Com o crescimento populacional avançando, com a estimativa de atingir 10 bilhões de pessoas até 2050 (FAO, 2020), a meta das pesquisas é encontrar soluções para alcançar produtividades cada vez maiores, com menor uso de fertilizantes, pesticidas e maior aproveitamento das áreas cultivadas (JAGANATHAN, et al. 2018)

O nitrogênio é o macronutriente requerido em maior quantidade pela planta, e o seu fornecimento, frequentemente resulta em melhor desenvolvimento e maior produtividade. Componente de biomoléculas vitais como aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas e importantes constituintes celulares, incluindo membranas e hormônios vegetais (SOUZA; FERNANDES, 2018). Apesar de ser um dos principais constituintes da atmosfera, representando 78% dos gases, encontra-se na forma de nitrogênio molecular ( $N_2$ ) que por ser uma molécula altamente estável e inerte, não está disponível para absorção direta pela planta.

Nos solos o nitrogênio é disponibilizado em grande parte por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (VITOUSEK, et al. 2013). Esse processo é realizado por microrganismos que apresentam um complexo enzimático cujo principal constituinte é a enzima nitrogenase, tornando-os capazes de captar o  $N_2$  e convertê-lo a amônia ( $NH_3$ ) (REIS, et al. 2018). Outra forma em que se encontra disponível é em compostos orgânicos provenientes da mineralização da matéria orgânica no solo. Uma pequena parte do nitrogênio do solo é proveniente de descargas elétricas na atmosfera que geram óxidos de nitrogênio ou do arraste ocasionado pelas chuvas.

Contudo, há uma elevada escassez deste nutriente em solos tropicais, principalmente devido aos processos de perda como a lixiviação, desnitrificação e a volatilização. A eficiência do uso de nitrogênio nos sistemas agrícolas é muito baixa, estando sujeito a perdas de até 70% do N total aplicado para o ambiente (COSKUN, et al. 2017). Pesquisadores apontam que o consumo de N pode ultrapassar 50 mil Mt por ano até 2050 e o crescimento populacional requisitará um aumento de 100 a 110% na produtividade de alimentos (TILMAN, et al. 2011). Um consumo deste nível pode ocasionar emissões globais de  $CO_2$  de 3Gt por ano e impactos ambientais que podem alterar todo ecossistema.

Mediante essa preocupação com o meio ambiente, a agenda 2030 liderada pela Organização das Nações Unidas busca desde 2016 unir o mundo para melhorar a vida das pessoas em todos os lugares, determinando 17 objetivos a serem alcançados. Dentre eles, o segundo prevê acabar com a fome, melhorar a nutrição, alcançar a segurança alimentar e promover a agricultura sustentável, compreendendo como metas dobrar a produtividade agrícola, garantir sistemas sustentáveis de produção de alimentos e implementar práticas agrícolas resilientes que aumentem a produtividade ajudando a manter os ecossistemas, com capacidade de adaptação às mudanças climáticas e que melhorem progressivamente a qualidade da terra e do solo (ONU, 2021).

Uma das estratégias que podem auxiliar a alcançar esse objetivo é a busca de cultivares mais eficientes no uso e absorção de nitrogênio (EUN e EU<sub>p</sub>N) (BUCHER, et al. 2014). A absorção do nitrato pelas células das raízes vegetais ocorre por meio de proteínas

transportadoras, geralmente do tipo simporte, que são capazes de carrear um íon de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) juntamente com dois prótons ( $\text{H}^+$ ) para o interior da célula. Estes transportadores são classificados como transportadores de alta afinidade, quando atuam em concentrações menores que 1mM e de baixa afinidade quando atuam em concentrações  $>1,0\text{mM}$  (SOUZA; FERNANDES, 2018). Os transportadores de nitrato apresentam duas famílias principais e foram mais estudados na planta modelo *Arabidopsis thaliana* (LÉLAN, et al. 2014). A família NRT2 de transportadores de alta afinidade é constituída por nove genes em *A. thaliana* e por quatro genes em arroz até o presente momento. A família NPF, anteriormente denominada NRT1, é composta por 59 genes caracterizados em *A. thaliana* e aproximadamente 90 em arroz (TSAY, et al. 2007; LÉLAN, et al. 2014).

A absorção de formas amoniacais pelas células das raízes vegetais ocorre a favor do gradiente de potencial eletroquímico, via transportadores uniporte ou canais e a assimilação do amônio em glutamina e glutamato pelas enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase (GS-GOGAT) requer menor disponibilidade de poder redutor (KRONZUCKER, et al. 2000; HOLZSCHUH, et al. 2009). O nitrato, por sua vez, quando absorvido pode seguir por duas vias principais: i) assimilação, onde é reduzido a nitrito e a amônio por meio da atividade das enzimas nitrato redutase e nitrito redutase (NR e NiR respectivamente) para em seguida ser assimilado pela GS e GOGAT; ou ii) estoque, com armazenamento no vacúolo celular podendo ser reduzido em outro momento (SOUZA; FERNANDES, 2018). O acúmulo de nitrato pode ser favorecido por diversos fatores como desbalanço na eficiência de absorção (DU, et al., 2008; LIANG; ZHANG, 2020), disponibilidade de água (QIU, et al. 2014), entre outros. De todo o nitrato absorvido, estima-se que cerca de 52 a 53% pode ser compartimentalizado no vacúolo (KRONZUCKER, et al. 2000). Em razão disso, este mecanismo exerce grande importância na melhoria da eficiência de uso do N pela planta e evita perdas no solo.

Entretanto, o mecanismo de influxo/absorção e efluxo/remobilização do nitrato armazenado no vacúolo ainda não foi completamente elucidado. Recentemente, em *A. thaliana* os genes *NPF5.11*, *NPF5.12* e *NPF5.16* foram localizados no tonoplasto e caracterizados como transportadores responsáveis pelo efluxo do nitrato do vacúolo (HE, et al. 2017). Em arroz, o gene *OsNPF7.2* foi identificado com localização no tonoplasto e relacionado com o influxo de nitrato no vacúolo (HU, et al., 2016). Entretanto, o mecanismo de efluxo do nitrato a partir do vacúolo em arroz ainda é desconhecido, assim como os genes envolvidos neste processo.

Desta forma este trabalho é baseado nas seguintes hipóteses: (i) o processo de absorção (influxo) e remobilização (efluxo) do nitrato no vacúolo é realizado por proteínas de transporte diferentes das proteínas localizadas na membrana plasmática; (ii) essas proteínas de transporte pertencem à família NPF de transportadores de baixa afinidade; (iii) a regulação do influxo e do efluxo do nitrato na membrana do vacúolo é realizada por transportadores diferentes; (iv) há variação na expressão dos genes de transportadores de nitrato quando as plantas são submetidas à condições de ausência e ressurgimento de nitrogênio.

Em razão disso, o objetivo geral deste trabalho é identificar e caracterizar genes que codificam proteínas transportadoras responsáveis pela remobilização do nitrogênio na forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) armazenado no vacúolo em plantas de Arroz.

Com base neste objetivo, foram realizadas duas abordagens, apresentadas em dois capítulos:

- ✓ Capítulo I: Análise *in silico* e expressão gênica de transportadores de nitrato da família NPF em arroz.
- ✓ Capítulo II: Obtenção de mutantes superexpressando os genes *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.15* e *OsNPF7.8* em plantas de arroz e avaliação da sua atuação na remobilização de nitrato a partir do vacúolo.

O objetivo geral do capítulo I é identificar genes que codificam proteínas transportadoras responsáveis pela remobilização do  $\text{NO}_3^-$  acumulado no vacúolo em arroz. Compreendendo como objetivos específicos: (i) identificar genes que codificam proteínas de transporte de baixa afinidade da família NPF; (ii) avaliar a expressão destes genes durante um período de privação de N e selecionar aqueles com provável função de remobilização do nitrato do vacúolo para o citossol; (iii) caracterizar alterações no metabolismo de plantas de arroz submetidas ao período de supressão de nitrogênio.

O objetivo geral do capítulo II é avaliar a contribuição dos genes *OsNPF5.12*, *OsNPF5.15*, *OsNPF5.13* e *OsNPF7.8* no processo de absorção, acúmulo e remobilização do nitrato armazenado nos vacúolos e no metabolismo de nitrogênio em arroz. Esse objetivo pode ser desmembrado nos seguintes objetivos específicos: (i) obter plantas geneticamente transformadas apresentando a superexpressão dos genes *OsNPF5.12*, *OsNPF5.15*, *OsNPF5.13* e *OsNPF7.8*; (ii) localizar as proteínas maduras codificadas por esses genes em nível subcelular; (iii) avaliar as alterações no metabolismo de N e na absorção e acúmulo de  $\text{NO}_3^-$ , nas plantas transformadas, quando cultivadas em diferentes níveis de  $\text{NO}_3^-$ ; (iv) identificar como estes genes podem afetar a produtividade em plantas de arroz.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Arroz – Cereal de Importância Mundial

O arroz (*Oryza sativa*) é um cereal da família *Poaceae* que apresenta grande importância econômica, social e cultural. É uma cultura essencial para manutenção da segurança alimentar e nutricional, por ser um elemento básico, componente do hábito alimentar de mais da metade da população mundial (CONAB, 2020; FENG, et al. 2015).

É considerada uma espécie modelo para estudos genômicos e funcionais em monocotiledôneas, por ser uma espécie diploide ( $2n=24$ ), autógama e por apresentar o menor genoma dentre as monocotiledôneas (430 Mb) que corresponde a 1/5 do genoma do milho (COHEN, 2019; HE, et al. 2016). Dispõe de protocolos bem definidos e de fácil aplicação para transformação genética, seja por meio de cultura de tecidos ou em protoplastos (HE, et al. 2016). Essas características explicam porque o arroz, foi a primeira monocotiledônea a ter o genoma completamente sequenciado. Esse genoma está atualmente disponível com genes anotados e bibliotecas funcionais no banco de dados *Rice Genome Annotation Project* (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) (KAWAHARA, et al. 2013; JAIN, et al. 2019).

O Brasil ocupa a décima posição entre os maiores produtores de arroz do mundo, ficando atrás apenas de países asiáticos, como a China, Índia e Indonésia, que são os maiores produtores (FAO, 2020). A estimativa da produção brasileira de grãos na safra 2019/2020 foi de 250,5 milhões de toneladas, representando um aumento de 3,5% em relação à safra anterior. Para o ano 2021 prevê-se a produção de 11,1 milhões de toneladas de arroz, um volume 6,5% superior que a safra anterior. Os principais estados produtores são Rio grande do Sul, Santa Catarina, Mato Grosso e Tocantins (CONAB, 2020).

A produtividade do arroz nos últimos anos tem se mantido crescente mesmo com uma redução na área plantada. Desde a safra de 2010/2011 a área plantada de arroz no Brasil passou de 2,8 milhões de hectares para 1,66 milhões de hectares na safra de 2019/2020, que corresponde a uma redução de 40% da área plantada (CONAB, 2021). No período de 1975 a 2017 a produtividade de arroz aumentou em 315% (EMBRAPA, 2018). Uma das causas da redução na área plantada é a diminuição do espaçamento praticado no cultivo em sequeiro (CONAB, 2019). Por outro lado, o aumento da produtividade por área reflete a qualidade das diferentes variedades de arroz cultivadas no Brasil, juntamente com a utilização de pacotes tecnológicos melhores e o manejo de solo e adubação de forma adequada.

O consumo de arroz no Brasil é de 10,8 milhões de toneladas, com previsão de exportação de 1,1 milhões de toneladas e importação de aproximadamente mil toneladas (CONAB, 2021). Para suprir toda essa demanda é de extrema importância que o cultivo seja bem planejado a fim de alcançar maiores produtividades com menor custo.

O cultivo de arroz no Brasil é realizado em dois ecossistemas: o de várzeas e o de terras altas. O sistema de várzea compreende o principal sistema de cultivo de arroz do país, denominado de irrigado por inundação. Neste sistema as plantas desenvolvem estratégias que permitem o desenvolvimento radicular em condições anaeróbias, como a produção de aerênquima. O sistema de terras altas, também chamado de cultivo em sequeiro é caracterizado pela condição aeróbica de desenvolvimento do sistema radicular. Este sistema tem crescido nos últimos anos devido ao menor uso de insumos e requisição por água. O cultivo em sistema irrigado exige maior investimento inicial com preparo do solo, além de mais conhecimento do produtor quanto ao manejo, adubação, sementes, entre outros. Enquanto o sistema sequeiro apresenta menor custo inicial e menor necessidade de insumos (ROLÃO; ROSA; NETO, 2019). A área plantada para cultivo de arroz na safra 2019/20 correspondente ao sistema de várzeas irrigado foi de 77,9% (1298,9 mil hectares) enquanto o cultivo em condição de sequeiro foi

22,1% (366,9 mil hectares). Os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, que são os principais produtores, utilizam o sistema irrigado extensivo. Na safra de 2019/20 a produtividade de arroz irrigado foi de 7.913 kg/ha enquanto no sistema de sequeiro foi 2.468 kg/ha. Dos 11,1 milhões de toneladas de arroz previstos para safra de 2019/2020 10,2 milhões de toneladas são em áreas de cultivo irrigado e 0,9 milhões em sequeiro (CONAB, 2021).

É importante ressaltar a elevada tolerância do arroz a condições de elevada acidez do solo, de forma que ele é cultivado em regiões de primeiro cultivo (RIBEIRO, et al. 2018). Outra questão relevante é o monitoramento da rizicultura quanto as emissões de gases de efeito estufa (GEE) devido as condições diferenciadas de cultivo, em sistema irrigado por inundação. Segundo dados da FAO (2020), a emissão de GEE pelo cultivo de arroz no Brasil tem reduzido quase 50% nos últimos anos. Esta redução pode estar diretamente relacionada com o aumento do cultivo em sistemas de terras altas ou sequeiro.

As emissões de GEE também estão relacionadas com a aplicação de fertilizantes nitrogenados, devido a emissão de óxido nitroso no processo de perda por desnitrificação. No Brasil o principal componente das emissões de GEE são derivados da adubação nitrogenada devido a aplicação de doses excessivas de N (GUELFI, 2017).

## **2.2 Custo da Aplicação de Fertilizantes Nitrogenados em Arroz**

O custo de produção é formado pelo conjunto de operações e insumos necessários para implementação de um cultivo. Para isso é preciso considerar a área a ser plantada e seus atributos (clima, solo, localização, disponibilidade de água e análise química do solo), a cultura desejada e sua adequação às condições existentes e o tipo de manejo (mecanizado, plantio direto e colheita mecânica ou manual). Em seguida, é realizado o levantamento de custos para cada etapa. Dessa forma, o delineamento do cultivo e determinação do custo de produção é uma etapa primordial para a implantação da cultura, por ser o norteador para os lucros.

De todos os gastos, a adubação nitrogenada compõe a maior fração de custo de produção do cultivo de arroz (GUELFI, 2017). No Brasil, os fertilizantes correspondem a 22,95% em média, dos custos variáveis e em cultivos de arroz sequeiro essa porcentagem tende a ser ainda maior (CONAB, 2016). A recomendação de adubação nitrogenada no cultivo de arroz varia de 60 a 150 kg/ha e é determinada com base na produtividade que se deseja alcançar e na análise do solo a ser cultivado (FREIRE, et al. 2013; YUNFENG, et al. 2019).

Porém, o N é o nutriente que mais sofre com perdas no solo, seja por lixiviação, volatilização ou como resultado do processo de desnitrificação (MILLER, et al. 2007). Desta forma, além de prejuízos ao meio ambiente, a aplicação de doses excessivas de N também ocasiona aumento no custo de produção. Em função disso, a avaliação dos conteúdos de nutrientes disponíveis nos solos é indispensável para um delineamento correto da adubação nitrogenada, para que esta seja eficiente e na determinação dos pacotes tecnológicos a serem utilizados no cultivo.

Em comparação entre sistemas irrigado e de sequeiro no Mato Grosso, a aplicação de fertilizantes no sistema irrigado correspondeu a 19% do custo (R\$ 978,88 do custo total R\$ 5.113,00) contra 25% no sistema sequeiro (R\$1.121,90 de R\$ 4.510,23), considerando a adubação nitrogenada com ureia no primeiro sistema e ureia seguida de NPK (5-25-15) no segundo (ROLÃO; ROSA; NETO, 2019). Embora o sistema irrigado apresente, em geral, maior custo de produção em comparação ao sistema de sequeiro, o sistema irrigado apresenta maiores produtividades o que reflete em melhor custo de produção na relação Receita/Custo (ROLÃO; ROSA; NETO, 2019; CONAB, 2016).

Segundo o IFAG (2019) o custo de produção para arroz de sequeiro compreende gastos de até 42% com fertilizantes NPK (4-30-10). Entretanto há uma grande variação nesta porcentagem de acordo com a região e a tecnologia aplicada. O custo de produção para

implementação de um cultivo de arroz em sistema de terras altas (sequeiro) em Goiás foi de R\$ 2.430,57 por hectare para obtenção de 58 sacas/ha utilizando a cultivar BRS Primavera. Deste valor, 34,8% corresponderam a adubação com ureia (170 kg ureia/ha = 76,5 kg N/ha) e NPK 05-20-30 (R\$ 280,00 e 607,95, respectivamente) (RIBEIRO, et al. 2018). Uma comparação buscando a inserção da cultivar de sequeiro BRS Sertaneja em detrimento da cultivar BRS Primavera, identificou gastos com fertilizantes entre 24 e 25% e demonstrou que a nova tecnologia da cultivar BRS sertaneja possibilitou um aumento de 960kg/ha na produtividade com um custo 32% menor (SILVA; WANDER, 2014).

Diante da elevada participação (15 a 42%) da aplicação de fertilizantes nitrogenados no custo de produção da cultura de arroz, é imprescindível que haja o desenvolvimento de estratégias que aumentem a eficácia da aplicação de fertilizantes ou a utilização de cultivares mais eficientes no uso e na absorção de nitrogênio para alcançar produtividades cada vez maiores com um cultivo mais sustentável.

### **2.3 Eficiência no Uso de Nitrogênio em Arroz**

A eficiência de uso de nitrogênio (EUN) pode ser definida como a relação entre a produtividade de grãos por unidade de N disponível no solo, incluindo aquele aplicado na forma de fertilizantes nitrogenados e pode ser dividida em dois componentes: eficiência de absorção (EU<sub>p</sub>N) e eficiência de utilização (EU<sub>t</sub>N) (HAN, et al. 2015). A eficiência de absorção está relacionada a capacidade da planta em transportar o N disponível na solução do solo para o interior das células. Enquanto a eficiência de utilização corresponde a capacidade de assimilação e transporte entre células da raiz para parte aérea mediante a necessidade.

A EUN envolve inúmeros fatores bióticos, abióticos, bioquímicos, fisiológicos e moleculares, externos e internos, além da disponibilidade de nitrogênio. Os fatores internos são relacionados ao genótipo da planta, como a fotossíntese, absorção de nutrientes, transporte e remobilização de íons, carboidratos e proteínas, que formam um complexo de características quantitativas (SOUZA; FERNANDES, 2018). Entre os fatores externos temos a eficiência agrônômica da adubação nitrogenada que está relacionada a fatores abióticos como as condições de solo, clima, mas que também é influenciada pelas práticas de manejo como a época de aplicação, métodos utilizados e os tipos de fertilizantes aplicados (WAMSER; MUNDSTOCK, 2007).

A adaptação a condições de baixa disponibilidade de N é uma característica altamente desejável em plantas para um sistema sustentável. Diante disso, há dois grandes desafios que influem na EUN: o desenvolvimento de variedades mais eficientes no uso e absorção de N e a criação de tecnologias que permitam melhor aproveitamento dos fertilizantes nitrogenados aplicados, reduzindo as perdas desse nutriente para o ambiente.

O desenvolvimento de variedades com maior eficiência no uso e na absorção de nutrientes é altamente crucial para a manutenção das produtividades globais (JEWEL, et al. 2019). Devido à elevada complexidade desta característica é importante definir estratégias que possibilitem explorar a variabilidade genotípica e fenotípica das bases genéticas que controlam a EUN e assim, identificar alguns dos componentes chave de rendimento para o melhoramento assistido por marcadores.

A deficiência de N afeta negativamente o índice de área foliar, taxa de crescimento, peso das plantas, enchimento dos grãos e de espiguetas por panícula (WEI, et al. 2012). Em razão disso, uma das formas de avaliação da EUN e da eficiência de absorção de N (EU<sub>p</sub>N) em plantas de arroz é a utilização de características fenotípicas relacionadas ao rendimento e produtividade sob diferentes doses de fertilizante nitrogenado. As doses geralmente são divididas em alta e baixa de acordo com a aplicação recomendada. Alguns trabalhos associam ainda, a aplicação de outros nutrientes junto com o fertilizante nitrogenado (JEWEL, et al. 2019).

A avaliação de 15 variedades locais do Maranhão e quatro cultivares melhoradas em dois níveis de nitrogênio (sem suplementação com 0,07 g N/planta no plantio e com suplementação foliar de 0,035 g N/planta) identificou diferenças significativas tanto na EUN quanto na EUpN, sendo as variedades Revenda, Cana Roxa, Ligeiro Vermelho, IAC-899 e IAC-1278 mais eficientes no uso do nitrogênio (JUNIOR, et al. 1997).

Os efeitos da adubação na EUN e produtividade de arroz foi avaliado durante 35 anos por Yunfeng e colaboradores (2019), com base na relação entre a quantidade de N absorvido pela planta e o nitrogênio total aplicado no solo, foi identificada maior EUN quando aplicado N na forma de fertilizantes orgânicos do que utilizando os fertilizantes minerais, mas, a aplicação combinada dos dois tipos, apresentou maiores produtividades do que a aplicação isolada (YUNFENG, et al. 2019).

As características de produtividade de arroz geralmente avaliadas no campo são: número de perfilhos (NP), número efetivo de panículas (PN), número de espiguetas por panículas (SPP), número de espiguetas por m<sup>2</sup> (SN), peso de grãos (GW), porcentagem de enchimento de grãos (GF), peso de mil grãos (SPM), produtividade de grãos (PG), produtividade relativa de biomassa (PB), peso das plantas (PP), comprimento radicular (CR) e conteúdo de clorofilas (CC) (WANG, et al. 2018). O estudo dessas características assim como o perfil de expressão de genes relacionados em plantas eficientes ou que apresentem maior desempenho em condições de baixa fertilidade, pode fornecer grandes informações sobre os mecanismos envolvidos na maior eficiência de N.

## 2.4 Transporte de Nitrogênio

O nitrogênio pode ser absorvido em forma de aminoácidos, peptídeos e formas orgânicas complexas. Porém, a absorção ocorre predominantemente na forma de íons como nitrato e amônio (SOUZA; FERNANDES, 2018).

A concentração de íons no interior e exterior da célula é controlada por um gradiente de potencial eletroquímico ocasionado pelo potencial elétrico da membrana plasmática e pela atividade de um complexo proteico denominado bomba de prótons ou P-H<sup>+</sup>ATP-ase (SOUZA; FERNANDES, 2018). Este sistema hidrolisa moléculas de ATP liberando energia e bombeando prótons (H<sup>+</sup>) através das membranas biológicas, originando um potencial eletroquímico (SANTI, et al. 2003). Este gradiente de potencial favorece a entrada de íons na célula. Em razão disso a absorção de amônio ocorre de forma passiva, por meio de transportadores uniporte da família AMTs (*Ammonium Transporters*). Entretanto, a absorção de ânions, como o nitrato dependem da força próton motriz, caracterizando um transporte ativo, sendo transportado juntamente com prótons para o interior da célula por transportadores do tipo simporte que levam para dentro da célula um íon de nitrato juntamente com dois prótons (SOUZA; FERNANDES, 2018).

Após a absorção pela célula, o amônio é diretamente incorporado em aminoácidos, por meio de reações enzimáticas que envolvem as enzimas glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintetase (GOGAT). Por outro lado, o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), após ser absorvido, passa por um processo de redução à nitrito (NO<sub>2</sub>) por meio da atividade da enzima nitrato redutase com uso de dois elétrons fornecidos por moléculas NADH ou NADPH. Em seguida o nitrito é reduzido à amônio pela enzima nitrito redutase com transferência de seis elétrons no cloroplasto, para enfim ser assimilado em aminoácidos de forma semelhante ao amônio via GS e GOGAT. O nitrito é tóxico às plantas, então após a redução do nitrato, o nitrito precisa ser reduzido rapidamente pelas células. O processo de absorção e assimilação de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> é energeticamente caro e pode dispendar cerca de 25% da energia total da planta (COUSINS; BLOOM, 2004; ASENSIO; RACHMILEVITCH; BLOOM, 2015).

O nitrato absorvido pela célula também pode ser acumulado nos vacúolos. Segundo Kronzucker, et al. (2000) aproximadamente 52 a 53% do nitrato absorvido pode ser encontrado compartimentalizado e armazenado no vacúolo. Há uma tendência de acúmulo do nitrato no vacúolo quando este se encontra em elevadas concentrações no meio extracelular, sendo transportado para fora do vacúolo para ser assimilado quando essas concentrações são reduzidas, ou em condições de deficiência do nutriente, o que demonstra que o vacúolo é de grande importância na eficiência do uso do nitrogênio (MIGOCKA, et al. 2013; HU, et al. 2016).

As concentrações de nitrato e amônio na solução do solo podem variar desde quantidades ínfimas, menores que 100µM até mais de 10mM. Em razão disto, as raízes das plantas possuem sistemas de absorção de íons que apresentam diferentes níveis de afinidade pelo substrato, caracterizando-os em dois tipos principais: os de alta afinidade e os de baixa afinidade. Transportadores são denominados de alta afinidade (*High Affinity Transporter System* – HATS) quando são capazes de realizar o transporte em condições onde a concentração de nitrogênio no solo está entre 1µM a 1mM, atuando em condições de baixa disponibilidade do íon na solução do solo. Por outro lado os transportadores de baixa afinidade (*Low Affinity Transporter System* - LATS) atuam em concentrações de nitrogênio maiores que 1mM, apresentam cinética de absorção linear (CRAWFORD; GLASS, 1998) e são genes constitutivamente expressos (MILLER, et al. 2007; DECHORGNAT, et al. 2011).

## 2.5 Transportadores de Baixa Afinidade de Nitrato

Estudos com nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) têm demonstrado que esse íon além de nutriente, também é um sinal para o metabolismo vegetal (SANTI, et al. 2003). A presença do nitrato no solo induz na planta a expressão de genes responsáveis pelo seu transporte e assimilação (MIGOCKA, et al. 2013), mas há evidências de que o nitrato provoque mudanças na expressão de mais de 1000 genes em *A. thaliana* (DEBOUBA; DGUIMI; GHORBEL, 2013).

A absorção de nitrato pela célula é realizada por proteínas transportadoras da família NPF - *Nitrate Transporter 1/Peptide Transporter*, conhecida anteriormente como NRT1 e por proteínas da família NRT2 (LÉLAN et al., 2014). A família NRT2 é responsável pelo transporte de alta afinidade de nitrato, enquanto a família NPF realiza um transporte de baixa afinidade, excetuando o gene *AtNPF6.3* (antigo *AtNRT1.1*) que faz um transporte de dupla-afinidade (LIU; TSAY, 2003).

Em Arabidopsis, onde a maioria dos genes e suas funções já foram caracterizados, identificou-se sete genes da família NRT2 e 53 NPF (TSAY, et al. 2007). No genoma do arroz foram identificados cerca de 93 genes da família NPF subdivididos entre 8 subfamílias (*NPF1-NPF8*) e cinco da família NRT2 (VON WITTGENSTEIN, et al. 2014; LÉLAN, et al. 2014; ZHAO, et al. 2010). Recentemente foram identificados 331 genes pertencentes à família NPF em trigo que formam 113 grupos homólogos e também foram subdivididos em oito subfamílias (WANG, et al. 2020).

Em animais e microrganismos os transportadores NPF costumam apresentar alto nível de especificidade de substrato, realizando o transporte especialmente de di/tripeptídios. Por outro lado, em plantas apresentam baixa seletividade, podendo transportar desde nitrato, nitrito, até mesmo aminoácidos, glucosinolato e fitormônios como ácido abscísico, entre outros (KANNO, et al. 2012; FANG, et al. 2017; WEN e KAISER, 2018). O estudo de localização de expressão subcelular e caracterização dessas proteínas tem sido amplamente realizado em busca de compreender mecanismos que possam auxiliar no melhoramento da eficiência do uso de nitrogênio e consequentemente reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados (HU, et al. 2020).

Até o momento a função de apenas 11 genes da família NPF foram caracterizados em arroz. O transportador codificado pelo gene *OsNPF6.3* (antigo *NRT1.1*) foi o primeiro gene a

ser clonado, localizado na membrana plasmática e identificado como responsável pela absorção do íon a partir do solo e pela translocação bidirecional das raízes para a parte aérea (HUANG, et al. 1996; HO, et al. 2009; KROUK, et al. 2010). O gene *OsNPF2.2* codifica uma proteína transportadora responsável pela remobilização do nitrato da raiz para a parte aérea, descarregando o nitrato a partir do xilema, enquanto a proteína codificada pelo gene *OsNPF2.4* atua no transporte de longa distância, sua localização de expressão é na epiderme e no cilindro central da raiz, folhas e grãos (LI, et al. 2015; XIA, et al. 2015). Por outro lado, a alteração nos níveis de expressão dos genes *OsNPF8.20* (antigo *OsPTR9*) e *OsNPF6.5* (antigo *OsNRT1.1B*) alteraram a absorção dos íons  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ , o número de panículas e a produtividade dos grãos (FANG, et al. 2012; HU, et al. 2015). O gene *OsNPF4.11* ainda não foi completamente caracterizado, entretanto a superexpressão do gene demonstrou um acúmulo da concentração de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes que prejudicou o desenvolvimento das plantas (ARRUDA, et al. 2018).

## 2.6 Transportadores Atuantes no Vacúolo

O acúmulo de íons e pequenas moléculas no vacúolo desempenham importante papel na regulação osmótica da célula e na reserva de nitrogênio para a planta (MILLER, et al. 2007; KANT; BI; ROTHSTEIN, 2011). Entretanto, a caracterização de transportadores com expressão localizada na membrana do vacúolo (tonoplasto) ainda é escassa e poucos transportadores de nitrato foram identificados até a presente data (HE, et al. 2017; HUANG, et al. 2019). A caracterização de transportadores responsáveis pelo acúmulo e remobilização de moléculas a partir do vacúolo é uma importante estratégia para compreender a dinâmica da movimentação dos nutrientes estocados nas plantas, permitindo delinear estratégias para manipulação destes estoques visando maior eficiência nos cultivos (HU, et al. 2020).

Os primeiros genes que codificam para proteínas transportadoras atuantes no transporte de íons no tonoplasto foram identificados em plantas de *Arabidopsis*, por ser uma planta modelo para estudos genômicos. O gene *AtCLCa*, pertencente à família CLC que codifica principalmente proteínas atuantes como canais de cloreto, foi o primeiro transportador caracterizado como responsável pelo acúmulo de nitrato no vacúolo. Este gene codifica uma proteína transportadora específica do tipo antiporte, que carrega 2 moléculas de  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  para dentro do vacúolo (DE ANGELI, et al. 2006). Posteriormente, o transportador de alta afinidade codificado pelo gene *AtNRT2.7* foi identificado como transportador de nitrato localizado no tonoplasto com expressão exclusiva em sementes, desempenhando importante papel na regulação da germinação através da manipulação do acúmulo de nitrato no vacúolo (CHOPIN, et al. 2007).

Em arroz apenas três genes tiveram a expressão de suas proteínas localizadas na membrana do vacúolo até o momento e quando superexpressos todos eles evidenciaram um aumento do número de panículas e no enchimento dos grãos (WANG, et al. 2018; FANG, et al. 2017; HUANG, et al. 2018). O gene *OsNPF7.2* codifica um transportador de baixa afinidade de nitrato, com localização no vacúolo. O silenciamento do gene em plantas de arroz resultou em redução do crescimento, mesmo sob altas concentrações de  $\text{NO}_3^-$ , indicando a importância deste gene no acúmulo de nitrato no vacúolo (HU, et al. 2016). O gene *OsNPF7.3* (antigo *OsNRT1.5*) codifica outra proteína transportadora que foi recentemente localizada no vacúolo. Estudos preliminares sugeriam seu papel no transporte de di/tripeptídeos (OUYANG, et al. 2010). Posteriormente foi descoberto que a superexpressão deste gene melhorava o crescimento da planta (FAN, et al. 2014). Apenas recentemente foi revelado que sua expressão é induzida por nitrogênio orgânico e que há acúmulo de aminoácidos nas bainhas de plantas com este gene silenciado, enquanto que, em plantas superexpressando este gene, há acúmulo na raiz e nas folhas, comprovando o papel fundamental deste gene no acúmulo e na translocação de

aminoácidos entre a raiz e a folha. Outro ponto importante é que a superexpressão do gene *OsNPF7.3* aumentou o número de panículas e de grãos cheios por planta (FANG, et al. 2017).

O gene *OsNPF7.7* codifica duas isoformas de proteínas derivadas de *splicing* alternativo e ambas afetam o acúmulo de nitrogênio e o desenvolvimento da planta. Entretanto, as duas isoformas apresentam localização subcelular de expressão diferentes e ocasionam alterações diversas no metabolismo. A isoforma *OsNPF7.7sp1* teve expressão localizada na membrana plasmática e a superexpressão do gene promoveu o aumento no influxo e da concentração de  $\text{NO}_3^-$  na raiz. Por outro lado, a isoforma *OsNPF7.7sp2* foi localizada na membrana vacuolar e poderia influenciar no influxo e na concentração de  $\text{NH}_4^+$  na raiz (HUANG, et al. 2018).

Os genes *OsNPF7.1* e *OsNPF7.4* evidenciaram ação determinante no brotamento de gemas axilares e conseqüentemente o número de perfilhos em arroz. A superexpressão do *OsNPF7.1* resultou em aumento da biomassa das plântulas mutantes, do número de perfilhos e número de grãos cheios. Resultado oposto foi identificado nas plântulas com o gene *OsNPF7.4* superexpresso, que evidenciaram aumento de aminoácidos na parte aérea e inibição da produção de biomassa nas plântulas. Tal antagonismo foi confirmado em plântulas com o gene *OsNPF7.4* nocauteado via CRISPR/Cas9, visto que as plântulas mutantes apresentaram aumento no número de perfilhos, número de grãos cheios e produtividade de grãos. Ambos os genes são regulados por fontes exógenas de N e participam da alocação de N das raízes para as folhas, influenciando o crescimento e desenvolvimento das plantas de arroz (HUANG, et al. 2019).

Quanto ao efluxo do nitrato a partir do vacúolo, apenas em *A. thaliana*, três transportadores da família NPF, *AtNPF5.11*, *AtNPF5.12* e *AtNPF5.16*, foram caracterizados como responsáveis pela remobilização de nitrato a partir do vacúolo (HE, et al. 2017). Há evidências de que a proteína codificada pelo gene *AtCLCb*, com expressão localizada no tonoplasto esteja envolvido no efluxo do nitrato, entretanto, quando plântulas mutantes com o gene knock-out não demonstraram alterações no metabolismo ou no acúmulo de nitrato (VON DER FECHT-BARTENBACH, et al. 2010)

Estudos mais aprofundados são necessários para fundamentar a caracterização destes transportadores, elucidando o mecanismo de absorção e o funcionamento deste sistema bem como sua importância na eficiência do uso de nitrogênio.

# **CAPÍTULO I**

## **ANÁLISE *IN SILICO* E EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSPORTADORES DE NITRATO DA FAMÍLIA NPF EM ARROZ**

## RESUMO

FERNANDES, Erika da Costa. **Análise *In Silico* e Expressão Gênica de Transportadores de Nitrato da Família NPF em Arroz**. 2021. 102p Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

A absorção e remobilização do nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) nos vacúolos das células exerce grande importância no suprimento de nitrogênio (N) necessário ao desenvolvimento da planta em condições de escassez. Entretanto, pouco se sabe sobre as proteínas transportadoras que realizam estes processos. O objetivo deste trabalho foi a identificação de genes que codificam proteínas transportadoras responsáveis pela remobilização do  $\text{NO}_3^-$  acumulado no vacúolo em arroz. Foram selecionadas 71 sequências de aminoácidos codificantes de proteínas transportadoras de  $\text{NO}_3^-$  da família de baixa afinidade (NPF) potencialmente expressas no vacúolo nos bancos de dados de arroz e de *A. thaliana* para análise filogenética. Em seguida avaliou-se a resposta de expressão destas proteínas frente ao flush de  $\text{NO}_3^-$  com plantas de arroz (var. Manteiga) em solução nutritiva de Hoagland com 5 mM de N- $\text{NO}_3^-$  por 30 dias. As plantas foram submetidas a um período de supressão de N por 72 horas, seguido pelo ressuprimento do fornecimento de N. Durante o período de supressão foram coletadas amostras de tecido a cada 24 horas e após o ressuprimento foram feitas coletas de amostras após 4, 8, 24 e 72 horas. A análise filogenética identificou a formação de oito grupos que diferenciaram as famílias de canais de cloreto (CLC), transportadores de alta afinidade (NRT2) e de baixa afinidade (NPF). Dentre os transportadores de baixa afinidade os genes da família NPF5 de arroz se agruparam juntamente com os genes de *A. thaliana* caracterizados como responsáveis pelo efluxo de  $\text{NO}_3^-$  no vacúolo, esta proximidade pode estar relacionada a analogia de função. A análise de expressão relativa demonstrou aumento de transcritos dos genes *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.15*, *OsNPF5.16sp1* e *OsNF5.17* em resposta a supressão do fornecimento de N. A análise dos teores de frações solúveis e metabolismo de N no material vegetal coletado evidenciou aumento dos teores de  $\text{NO}_3^-$  e da atividade das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase 24 horas após a supressão em linha com o aumento da expressão destes genes, corroborando com a possível atuação no efluxo de  $\text{NO}_3^-$  a partir do vacúolo. Os genes *OsNPF7.1*, *OsNPF7.2*, *OsNPF7.7* e *OsNPF7.8* apresentaram maior resposta no período de ressuprimento indicando sua atuação no influxo de  $\text{NO}_3^-$  para o vacúolo. Deste grupo apenas o gene *OsNPF7.8* ainda não foi caracterizado, mas os resultados apresentados apontam sua atuação no influxo.

**Palavras-chave:** transporte de nitrato, *Oryza sativa*, transportadores de tonoplasto, acúmulo de nitrato.

## ABSTRACT

FERNANDES, Erika da Costa. **In silico characterization and gene expression of nitrate transport proteins from NPF family in Rice**. 2021. 102p Thesis (Doctor of Science in Plant Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) uptake and remobilization in vacuoles of plant cells plays an important role in nitrogen (N) supply for plant development in conditions of starvation. However, transport proteins that carry out these pathways still unknown. The aim of this study was to identify genes that encode transport proteins responsible by remobilization of  $\text{NO}_3^-$  accumulated in the rice vacuole. A total of 71 amino acid sequences encoding low-affinity  $\text{NO}_3^-$  transporter (NPF family) potentially expressed in the vacuoles of rice and *A. thaliana* were selected from databases for phylogenetic analysis. Relative expression response of these sequences was evaluated against  $\text{NO}_3^-$  flush in rice plants (var. Manteiga) cultivated in Hoagland's nutrient solution with 5 mM N- $\text{NO}_3^-$  for 30 days, at that time plants were subjected to 72 hours of N suppression, followed by N resupply. The plants were harvested every 24 hours during the suppression period and at resupply after 4, 8, 24 and 72 hours. Phylogenetic analysis identified the formation of eight groups that differentiated the families of chloride channels (CLC), high-affinity (NRT2) and low-affinity (NPF) transporters. Among the low affinity transporters, group III gathered genes from the rice NPF5 family together with genes from *A. thaliana* characterized as responsible for the efflux of  $\text{NO}_3^-$  in the vacuole, this proximity may be related to function homology while group IV gathered genes NPF7 of which act on the influx of nitrate into the vacuole. Phylogenetic analysis clustered into eight groups that differentiated the families of chloride channels (CLC), high-affinity (NRT2) and low-affinity (NPF) transporters. Among the low affinity transporters, group III bring together genes from the *OsNPF5* family grouped with genes from *A. thaliana* characterized as responsible for  $\text{NO}_3^-$  efflux from the vacuole, this proximity may be related to function homology while group IV gathered genes NPF7 of which act on the influx of nitrate into the vacuole. The analysis of relative expression showed transcription induction of genes *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.15*, *OsNPF5.16sp1* and *OsNF5.17* in response to suppression of N supply. The plants showed an increase in  $\text{NO}_3^-$  content, nitrate reductase and glutamine synthetase activity 24 hours after the suppression, in line with the increased expression of these genes, indicating the possible role in the efflux of  $\text{NO}_3^-$  from the vacuole. The genes *OsNPF7.1*, *OsNPF7.2*, *OsNPF7.7* and *OsNPF7.8* showed greater response in the resupply period, indicating their role in the influx of  $\text{NO}_3^-$  to vacuole, from this group only *OsNPF7.8* gene has not been characterized yet, but according to the results presented indicate its role in the influx. Data from this study was used were used as subsidies to do the characterization of *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.15* and *OsNPF7.8* genes in rice.

**Keywords:** Nitrate transport, *Oryza sativa*, tonoplast transporters, nitrate uptake.

# 1 INTRODUÇÃO

O arroz é considerado uma espécie modelo para estudos genômicos e funcionais em monocotiledôneas, devido à grande disponibilidade de sequências genômicas de diferentes variedades cultivadas nos últimos anos (HE, et al. 2016), tornando-a uma das espécies com melhor anotação gênica, sendo a primeira monocotiledônea a ter o genoma completamente sequenciado e disponível (KAWAHARA, et al. 2013). O cultivo de arroz depende do consumo elevado de fertilizantes nitrogenados. A dose recomendada de adubação varia de 60 a 150 kg N/ha e é determinada com base na produtividade que se deseja alcançar e na análise do solo a ser cultivado (FREIRE, et al. 2013; WANG, et al. 2018; YUNFENG, et al. 2019).

A eficiência de uso do nitrogênio (EUN) nos sistemas agrícolas é muito baixa, estando sujeita a perdas de até 70% de todo nitrogênio (N) aplicado, ocasionando danos ao meio ambiente (COSKUN, et al. 2017). A deficiência de nitrogênio afeta negativamente o índice de área foliar, taxa de crescimento, peso das plantas, enchimento dos grãos e número de espiguetas por panícula (WEI, et al. 2012).

Uma estratégia que vem sendo desenvolvida para melhorar a EUN é o estudo de proteínas transportadoras buscando aprimorar a eficiência de absorção de nitrogênio. O nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) é uma das formas de N mais disponíveis para absorção pelas plantas em solos aerados. Em condições de abundância na solução do solo o nitrato pode ser armazenado nos vacúolos e exportado dos mesmos quando necessário (HU, et al. 2016). O vacúolo celular desempenha importante função na EUN, visto que 52-53% do N absorvido pode ser compartimentalizado no vacúolo (KRONZUCKER, et al. 2000).

O estado do Maranhão, no Brasil, apresenta uma ampla diversidade de variedades crioulas de arroz que têm despertado interesse no melhoramento genético devido sua capacidade produtiva e elevada EUN (ARAÚJO, et al. 2015; SANTOS, et al. 2011). O incremento na EUN nas variedades dessa região pode estar relacionado com a adaptação dessas plantas à condição de *flush* de nutrientes, ou seja, a alta disponibilidade de íons na solução do solo seguido por longos períodos de baixa disponibilidade ocasionado pelo regime sazonal de chuvas (SOUZA, et al. 1998). A variedade Manteiga é uma variedade crioula de cultivo preferencial em sistema sequeiro de produção no Maranhão. Esta variedade tem demonstrado elevada eficiência de uso de nitrogênio, apresentando melhor crescimento em condições de baixa disponibilidade de  $\text{N-NO}_3^-$ , maior atividade de transportadores de alta afinidade de  $\text{NO}_3^-$  e maior capacidade de acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes quando comparado a outras variedades, incluindo a variedade comercial melhorada IAC-47 (SANTOS, et al. 2003; ARAÚJO, et al. 2015). Estas características a tornam uma variedade ideal para o estudo de acúmulo e remobilização de  $\text{NO}_3^-$  nos vacúolos.

A absorção do  $\text{NO}_3^-$  nas células, é mediada por transportadores do tipo simporte ( $2\text{H}^+/1\text{NO}_3^-$ ). Esses transportadores são classificados em alta afinidade, família NRT (*Nitrate Transporter*), responsável pelo transporte quando a concentração de  $\text{NO}_3^-$  no solo encontra-se menor que 1mM e baixa afinidade, família NPF (*Nitrate Peptide Transporter Family*), atuando quando a concentração de  $\text{NO}_3^-$  no solo é maior que 1mM (LÉLAN, et al. 2014). No genoma de arroz foram identificados 93 genes relacionados a essa família, entretanto poucos genes foram caracterizados até o momento e a maioria das proteínas que foram localizadas são encontradas na membrana plasmática. Apenas três genes *OsNPF7.2*, *OsNPF7.3* e *OsNPF7.7* (*splices 1 e 2*) tiveram suas proteínas identificadas com localização na membrana do vacúolo. O gene *OsNPF7.3* (antigo *NRT1.5*) codifica uma proteína transportadora que atua no transporte de di/tripeptídeos de glicina e histidina (OUYANG, et al. 2010) e a expressão desse gene é induzida pela presença de N orgânico no solo (FANG, et al. 2017). O gene *OsNPF7.2* está envolvido no influxo de nitrato para o vacúolo em plantas de arroz e o silenciamento deste gene

promoveu a redução do crescimento das plantas (HU, et al. 2016). O gene *OsNPF7.7* apresenta duas isoformas e ambas afetam o acúmulo de nitrogênio e o desenvolvimento da planta. Entretanto, as proteínas codificadas pelas duas isoformas atuam em locais diferentes na célula. A proteína *OsNPF7.7sp1* está localizada na membrana plasmática e sua superexpressão promove o influxo e aumento da concentração de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes da planta, enquanto a isoforma *OsNPF7.7sp2* é encontrada na membrana vacuolar e sua superexpressão influencia na concentração de  $\text{NH}_4^+$  nas raízes (HUANG, et al. 2018).

Contudo, ainda não há informações sobre os genes e as proteínas envolvidos no efluxo, ou remobilização do  $\text{NO}_3^-$  a partir do vacúolo em arroz, mas a identificação destas proteínas é o ponto chave para a EUN (MILLER, et al. 2007). Em *A. thaliana* apenas três genes da família NPF, *AtNPF5.11*, *AtNPF5.12* e *AtNPF5.16*, foram identificados como atuantes no efluxo de  $\text{NO}_3^-$  a partir do vacúolo, modulando suas concentrações entre a raiz e a parte aérea (HE, et al. 2017).

Diante do exposto, este capítulo se baseia nas seguintes hipóteses: (i) O transporte de  $\text{NO}_3^-$  de curta distância, do citosol para o vacúolo (influxo) e vice-versa (efluxo), é realizado por proteínas de transporte específicas diferentes daquelas localizadas na membrana plasmática; (ii) essas proteínas de transporte são pertencentes à família NPF de transportadores de baixa afinidade; (iii) a regulação do influxo e do efluxo do nitrato na membrana do vacúolo é realizada por transportadores diferentes; (iv) há variação na expressão dos genes de transportadores de nitrato quando as plantas são submetidas à condições de ausência de nitrogênio. Com isso, o objetivo deste trabalho foi a identificação de genes que codificam proteínas transportadoras responsáveis pela remobilização do  $\text{NO}_3^-$  acumulado no vacúolo em arroz.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Identificação dos Genes *NPF* e Análise Filogenética

Foram obtidas sequências de aminoácidos de proteínas transportadoras de nitrato pertencentes a família de baixa afinidade (NPF) renomeadas por LÉRAN, et al. (2014), nos bancos de dados disponíveis para Arroz - *Rice Genome Annotation Project* – RGAP ([rice.plantbiology.msu.edu/](http://rice.plantbiology.msu.edu/)) e para a planta modelo *A. thaliana*, *The Arabidopsis Information Resource* – TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>).

Apenas sequências potencialmente codificantes de transportadores atuantes no vacúolo e que não apresentavam caracterização completa foram utilizadas para análise filogenética e de expressão gênica. Para complementar a análise foram utilizadas sequências de outros transportadores que apresentam expressão localizada no vacúolo. As sequências foram então, confrontadas nos bancos de dados do genbank, utilizando a ferramenta BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a fim de confirmar a identidade.

A análise filogenética foi realizada por meio do alinhamento múltiplo das Sequências de proteínas e a árvore filogenética foi gerada utilizando o método *Neighbor-Joining* (NJ) (SAITOU E NEI, 1987). Os valores de “*Bootstrap*” (FELSENSTEIN, 1985) foram calculados com a porcentagem de 2000 repetições, com o auxílio do programa MEGA (*Multi Evolutionary Genomic Analysis*) versão 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

### 2.2 Estrutura e Perfil de Expressão *In Silico* dos Genes Potenciais

De acordo com os resultados da análise filogenética foram selecionadas sequências com maior similaridade àquelas das proteínas transportadoras com localização de expressão no tonoplasto e atuantes no efluxo ou influxo de nitrato. Foi realizada uma análise da estrutura dos genes potenciais, identificando a existência e localização de *introns* e *exons*. Para isso foram utilizadas as sequências completas do DNA genômico (CDS) e as sequências de aminoácidos da transcrita correspondente de cada gene utilizando a ferramenta online *Gene Structure Display Server* (GSDS) (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>).

Em seguida foi realizado um estudo do perfil de expressão *in silico* dos genes selecionados utilizando dados disponibilizados em bibliotecas com avaliações em tecidos específicos de diferentes estágios de desenvolvimento do banco de dados de Arroz RICEXPRO (<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/GGEP/index.php>). Os dados de expressão foram selecionados utilizando o *Accession Number* do gene e foi criado um gráfico do tipo *heatmap* com base no agrupamento da distância de correlação e na ligação completa de cada gene com o *heatmap.2* no pacote "gplots" do programa R disponível no site (<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/GGEP/select-heatmap-locus.php>).

### 2.3 Desenho dos *Primers* para Avaliar Expressão Gênica

Para avaliar a expressão dos genes potenciais selecionados no item 2.2 foram desenhados *primers* (Tabela 1) com o auxílio da ferramenta *Primer-BLAST* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A especificidade dos *primers* foi analisada por meio do alinhamento das sequências nos bancos de dados NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> e RGAP, <http://rice.plantbiology.msu.edu> e experimentalmente ao final da reação de PCR durante a curva de dissociação.

**Tabela 1.** Sequências dos *primers* utilizados na PCR em tempo real para análise da expressão dos genes selecionados. Continua.

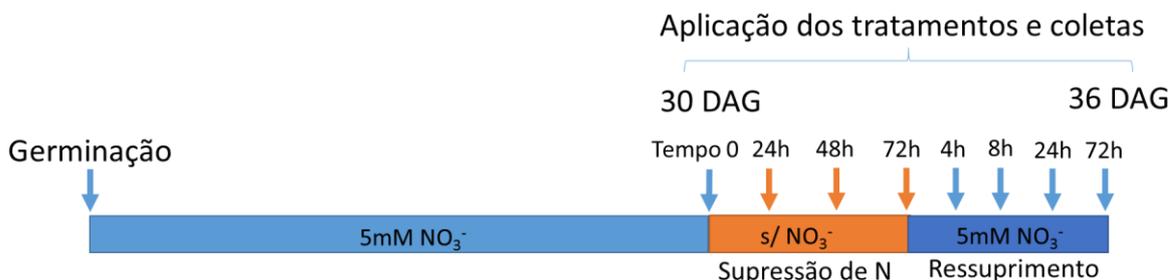
<b>Influxo</b>				
<b>Gene</b>	<b>Accession Number</b>	<b>Foward (5'-3')</b>	<b>Reverse (5'-3')</b>	<b>Produto (pb)</b>
<i>OsNPF7.1sp1</i>	<i>LOC_Os07g41250</i>	TAGTCGCGCAACCTTACCTC	AGACTCCGTTGCTACTTGCT	99
<i>OsNPF7.1sp2</i>	<i>LOC_Os07g41250</i>	GGAGTTCTTCCACGGTCAGG	CGAGCTGAAGTAGTTGCCGA	94
<i>OsNPF7.3</i>	<i>LOC_Os04g50950</i>	CGGACAACCTCAACGAAGGA	CGACCAGCTTACCCTGTAG	117
<i>OsNPF7.4sp1</i>	<i>LOC_Os04g50940</i>	TTCTTCTGGGTCATGTCCGGC	GACACGACCGTCTTACCTT	89
<i>OsNPF7.4sp2</i>	<i>LOC_Os04g50940</i>	CCCAAACCTTTGAACTTGATCTGC	GCACTCGAATCCTAGCACCA	130
<i>OsNPF7.7sp1</i>	<i>LOC_Os10g42870</i>	CTTGGAGCCTTCTTGGCTGA	AGGACATGAGCTCCCATTGC	150
<i>OsNPF7.7sp2</i>	<i>LOC_Os10g42870</i>	TGTCCACAAACAAACAGGGGT	TAGAGCGCGGTGAAGAAGAC	136
<i>OsNPF7.8</i>	<i>LOC_Os10g42900</i>	GGAGTTCTTCTACGGCGAGG	CGAGTTGACGTAGAAGCCGA	94
<b>Efluxo</b>				
<i>OsNPF5.9</i>	<i>LOC_Os03g60850</i>	GTTCGGCAAGGACCTGAACA	TGGCGATGACCACGTAGAAG	98
<i>OsNPF5.12</i>	<i>LOC_Os05g35594</i>	GCTTCCTCATCTCGGCCATC	GCGGCAAGAAGCAGGTAGAA	112
<i>OsNPF5.13</i>	<i>LOC_Os01g65100</i>	GTTCGCCAACCAACCTCAACC	CAACCGTTGTGAGGAACCTT	138
<i>OsNPF5.14</i>	<i>LOC_Os01g65110</i>	CCTTCTTCTTCTTCGCGG	ACACGCAGATGCCATCATCA	102
<i>OsNPF5.15</i>	<i>LOC_Os05g35650</i>	TCTCCAACAACCTCAACCGC	TACTTGAACGTGACGGCGAA	109
<i>OsNPF5.16sp3</i>	<i>LOC_Os01g65200</i>	TGGTGGACAATCCTGAAGCC	GCAGGCCAACCAATTGTGAAC	102
<i>OsNPF5.16sp2</i>	<i>LOC_Os01g65100</i>	TATGCAATGAAACCACCCGC	TGCTTGGGTGCAGTGAAGAT	108
<i>OsNPF5.16sp1</i>	<i>LOC_Os01g65100</i>	GCAACCTGCCTGATTTACGC	GTGATACCGCGAGGGTCTT	115
<i>OsNPF5.17</i>	<i>LOC_Os01g65210</i>	TCTTGCACCGGAAGAGTCAT	TCGTGGAACCTGGTCTGCAC	141
<i>eEF1-<math>\alpha</math></i>	<i>LOC_Os03g08020</i>	TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT	GACTTCCTTACAGATTTCATC GTAA	121
<i>OsUBQ5</i>	<i>LOC_Os01g22490</i>	ACCACTTCGACCGCCACTACT	ACGCCTAAGCCTGCTGGTT	105

## 2.4 Caracterização da Expressão Gênica

A fim de caracterizar a expressão dos genes candidatos foi realizado um experimento em câmara de crescimento com plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade Manteiga. O cultivo foi realizado no Departamento de Solos da UFRRJ utilizando fotoperíodo de 14h/10h (luz/escuro) com luminosidade de 200  $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (fluxo de fótons fotossintéticos), umidade relativa do ar de 70% e temperatura 28°C/24°C (diurna/noturna).

As sementes de arroz foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos e depois lavadas várias vezes com água destilada. Em seguida elas foram transferidas para folhas de gaze posicionadas na superfície de água destilada contida em potes de 700 mL. Seis dias após a germinação, a água dos potes foi substituída por solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950) modificada com ¼ da força iônica (1.5 mM K, 0.25 mM P, 0.5 mM Mg, 1.0 mM Ca, 0.5 mM S, 2.72  $\mu\text{M}$  Cl, 11.57  $\mu\text{M}$  B, 2.25  $\mu\text{M}$  Fe, 0.075  $\mu\text{M}$  Cu, 0.025  $\mu\text{M}$  Mo, 2.72  $\mu\text{M}$  Mn e 0.2  $\mu\text{M}$  Zn), sendo fornecido 5 mM de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  como fonte de N. O pH da solução foi ajustado para 5,5 utilizando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diluído. Passados mais cinco dias as plantas foram distribuídas em vasos de 0,7 L, alocando quatro plantas por vaso suspensas em discos de isopor fixadas com espuma estéril, contendo solução nutritiva a ½ força iônica. Um total de 40 vasos (40 repetições) foram montados. A partir de então a solução foi trocada a cada três dias.

Aos 30 dias após a germinação foi realizada a primeira coleta, que foi caracterizado como tempo zero, em cada ponto de coleta foram utilizados 5 vasos, considerados 5 repetições. Em seguida, a solução nutritiva dos demais vasos foi substituída por uma solução nutritiva sem fornecimento de nitrogênio, realizando três coletas sucessivas a cada 24h, este período foi caracterizado como período de supressão. Após 72h a solução nutritiva foi substituída, retornando com a solução inicial e reestabelecendo o fornecimento de nitrogênio com 5 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  seguindo com coletas nos tempos 4, 8, 24 e 72 horas após o início do período de ressurgimento (Figura 1).



**Figura 1:** Esquema ilustrativo da condução do experimento para verificar diferenças nos padrões de expressão dos genes envolvidos na absorção e remobilização do nitrato, durante um período de ausência seguido do ressurgimento com  $\text{N-NO}_3^-$ .

Em cada coleta as plantas foram separadas em folha, bainha e raiz, as quais foram pesadas para determinação da massa fresca. Cada parte da planta foi cortada em pedaços de ~0,5 cm e particionada para extração de RNA total, proteínas totais, frações solúveis ( $\text{N-NO}_3^-$ ,  $\text{N-NH}_4^+$ , N-amino livre e açúcares solúveis), determinação da atividade da enzima nitrato redutase e o restante utilizado na quantificação dos teores de N-total. As amostras retiradas para extração de RNA total e de proteínas totais foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer  $-80^\circ\text{C}$ . A extração das frações solúveis e determinação da atividade da nitrato redutase foram realizadas imediatamente.

## 2.5 Análise da Atividade da Enzima Nitrato Redutase (NR) e Glutamina Sintetase (GS)

Para determinar a atividade da NR, amostras de 0,2 gramas de material de cada parte da planta (raiz, bainha e folha) foram colocadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução incubadora ( $25 \text{ mM L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,4,  $25 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ ,  $30 \text{ mL L}^{-1}$  n-propanol) e mantidas no escuro à  $30^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Após este período foi retirada uma alíquota de 0,2 mL de cada amostra para determinação da atividade enzimática por método colorimétrico descrito por Jaworski (1971).

A atividade da Glutamina Sintetase (GS) foi obtida realizando a extração de proteínas, a partir das amostras de tecido da raiz, bainha e folha maceradas em N-líquido e homogeneizadas em tampão de extração (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1,0 mM EDTA, 1,5% polivinilpirrolidona (PVPP), 10 mM dithiothreitol (DTT), 30% glicerol e 1 mM phenilmethylsulfonil fluoridíio (PMSF)) na proporção 3:1 (tampão: amostra) centrifugado a  $14.000 \times g$  durante 30 min. O sobrenadante (extrato proteico) foi utilizado para determinação do conteúdo de proteínas como descrito por Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão. Em seguida foi realizada a atividade como descrito por Farden e Robertsen (1980).

## 2.6 Quantificação dos Teores de $\text{N-NH}_4^+$ , $\text{N-NO}_3^-$ , N-Amino Livre e Açúcares Solúveis e N-Total em Tecido Vegetal

Amostras de 0,5 grama de massa fresca foram trituradas em etanol 80%, em seguida particionadas com clorofórmio (FERNANDES, 1984). A parte da fração solúvel obtida foi utilizada para a determinação dos teores de N-amino livre (YEMM; COCKING; RICKETTS, 1955),  $N-NH_4^+$  (FELKER, 1977),  $N-NO_3^-$  (MIRANDA, et al., 2001) e açúcares solúveis (YEMM; WILLIS, 1954).

O restante do material vegetal fresco foi seco em estufa, moído visando homogeneizar as amostras e foram separados 0,2g de cada parte alocadas em tubos de ensaio de 100 mL que prosseguiram para digestão sulfúrica em blocos digestores. Após a digestão as amostras foram destiladas e tituladas para análise de N-total (TEDESCO, et al. 1982).

## 2.7 Extração e Quantificação do RNA Total e Síntese de cDNA

O RNA total foi extraído segundo Gao, et al. (2001) com modificações descritas por Sperandio, et al. (2011). As amostras coletadas de folha, bainha e raiz foram maceradas com nitrogênio líquido e homogeneizadas por 10 minutos com 1000  $\mu$ L de tampão NTES (0,2 M Tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0; 0,3 M NaCl; 2% SDS) e 800 $\mu$ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Os tubos foram centrifugados a 18000 x g por 30 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos.

Em seguida foi adicionado 1 volume de isopropanol e 0,1 volume de NaOAc 2M pH 4,8, incubado a -80°C por 30 minutos e centrifugado à 18000 x g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e adicionados 500 $\mu$ l de etanol 70% sendo centrifugado novamente a 18000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso com 500 $\mu$ l de  $H_2O_{DEPC}$  e então adicionado 500 $\mu$ l de LiCl 4M. Os tubos foram acondicionados em gelo e mantidos em geladeira *overnight* (aproximadamente 16 horas).

Os tubos foram centrifugados a 18000 x g por 20 minutos a 4°C para recuperar o pellet de RNA total, ressuspenso com 450 $\mu$ l de  $H_2O_{DEPC}$  e 50 $\mu$ l de NaOAc 2M pH 4,8. Adicionou-se 1000 $\mu$ L de etanol absoluto gelado, homogeneizado e incubado a -80°C por 30 minutos. Em seguida o material foi centrifugado a 18000 x g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e adicionado 500 $\mu$ l de etanol 70% então centrifugou-se novamente a 18000 x g por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi gentilmente retirado do tubo e o pellet ressuspenso com 30 $\mu$ l de TE 1X (Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 1mM pH 8,0). O RNA foi estocado em freezer -80°C para posterior análise. A quantificação do RNA total foi realizada em Nanodrop (*Thermo Scientific*) e a qualidade determinada em eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com Gel-Red.

As amostras foram então tratadas com DNase utilizando o Kit “*Amplification Grade DNase P*” da Sigma. Para cada 1 $\mu$ g de RNA total tratado, foi utilizado 1 $\mu$ l de tampão de reação (10x), 1 $\mu$ l da enzima *DNase I* (1U/  $\mu$ L) e água para volume total de 10 $\mu$ l de reação. As amostras foram incubadas em termociclador por 25°C por 15 minutos. Adicionado 1 $\mu$ l da solução de parada para cada 1 $\mu$ g de RNA tratado e incubado em termociclador a 70°C por 10 minutos para inativação da enzima DNase.

A síntese de cDNA foi realizada com o kit “*High Capacity RNA-to-cDNA Kit*” da *Life Technologies* de acordo com as especificações do fabricante, em Termociclador com a seguinte programação: 37°C por 60 minutos e 95°C por 5 minutos.

## 2.8 PCR em Tempo Real

As reações de qPCR em tempo real foram realizadas, utilizando o kit “*5x HOT FIREPol EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis Biodyne)*” de acordo com as recomendações do fabricante no equipamento “*StepOne Plus Real-Time PCR System*” (*Applied Biosystems*). Cada

reação foi realizada da seguinte maneira: doze minutos a 95°C, quarenta ciclos de amplificação com 95°C por 15 segundos, 60°C por 20 segundos e 72°C por 20 segundos, finalmente a curva de dissociação com aumento de temperatura de 0,3°C de 60°C até 95°C para verificar a especificidade da reação.

Para identificar os melhores genes de referência foi realizado um teste inicial com os genes codificantes da Ubiquitina 5 (*OsUBQ5*) e Fator de Alongamento 1-alfa (*OsEF-1 $\alpha$* ) (JAIN et al., 2006), visando identificar o gene que propiciou o melhor padrão de expressão invariável, sendo utilizado como referência na análise de expressão.

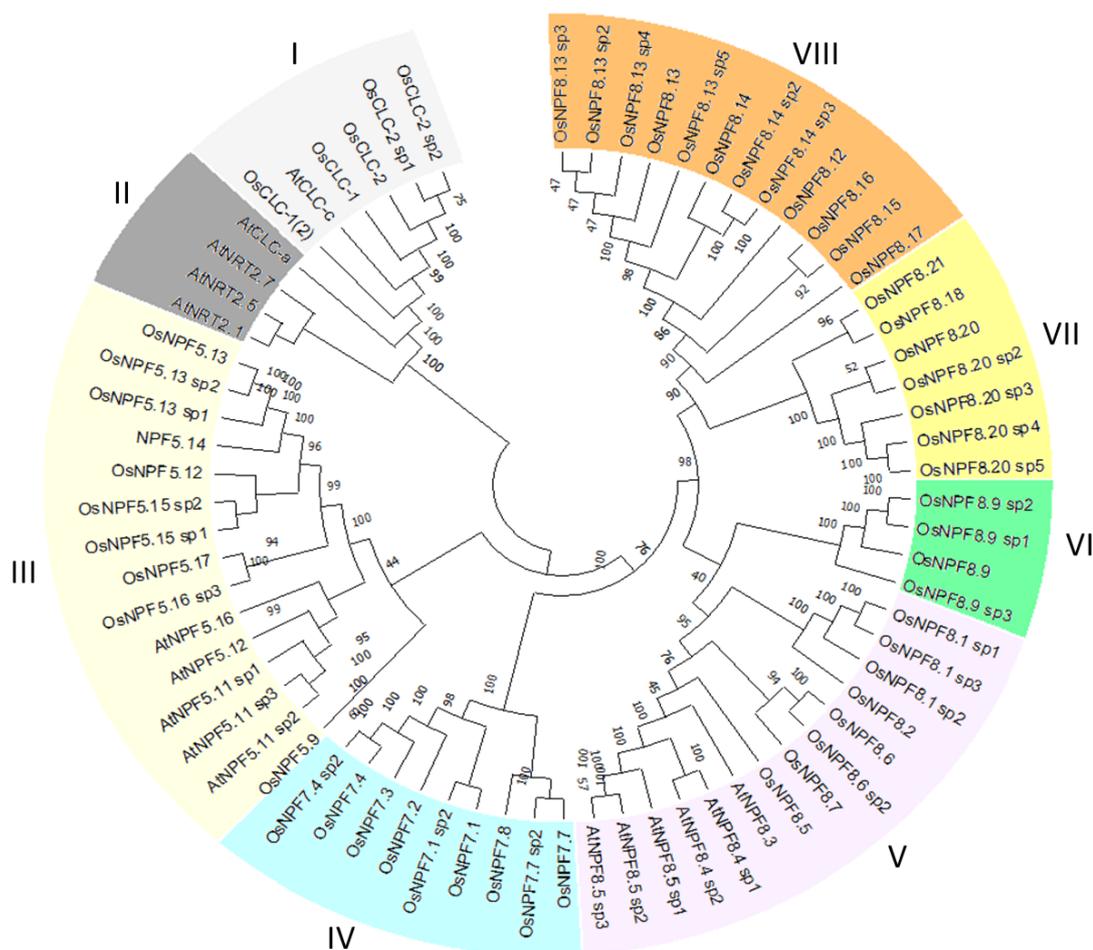
Os cálculos de expressão foram realizados de acordo com Livak e Schmittgen (2001) para todos os *primers* que apresentaram alta eficiência de amplificação, usando o tratamento do tempo zero como controle, a partir dos valores de  $C_T$  (*Cycle Threshold*, ciclo limite) obtidos na reação de PCR em tempo real. A construção dos gráficos foi realizada utilizando o programa Sigmaplot 10.0.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análise Filogenética e Identificação dos Genes Potenciais

Para identificar os possíveis genes que codificam transportadores de  $\text{NO}_3^-$  envolvidos na remobilização a partir do vacúolo foram examinadas todas as 146 seqüências de proteínas da família de transportadores NPF de Arroz e da planta modelo *A. thaliana*. Diante da elevada variedade de genes foram selecionadas seqüências com indicação de localização de expressão no vacúolo.

Uma árvore filogenética construída com as sequências dos 71 genes codificantes de proteínas NPF, sendo 15 genes de *A. thaliana* já caracterizados funcionalmente como atuantes no transporte de  $\text{NO}_3^-$  e com localização subcelular no vacúolo e 56 de arroz, mostrou a presença de oito grupos (Figura 2). O primeiro grupo (I) foi formado por genes codificantes de canais de cloreto, o segundo (II) reuniu genes de *A. thaliana* codificantes de transportadores de alta afinidade NRT2, demonstrando que há diferenciação entre estes e os demais transportadores.



**Figura 2:** Árvore filogenética contendo o alinhamento de seqüências de aminoácidos de 71 genes codificantes de proteínas transportadoras de nitrato pertencentes a diferentes famílias, sendo 56 de arroz (*O. sativa*) e 15 de *A. thaliana*, que apresentam possível localização de expressão na membrana do vacúolo. A árvore foi criada utilizando método *Neighbor-Joining* utilizando a opção *pair-wise deletion* e 2000 repetições de “*Bootstrap*”. As cores em destaque ilustram os componentes de cada grupo formado.

O grupo III (Figura 2) reuniu as sequências dos transportadores *AtNPF5.11*, *AtNPF5.12* e *AtNPF5.16* que foram caracterizados funcionalmente como responsáveis pelo efluxo de nitrato do vacúolo em *A. thaliana* e agrupou com genes *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.14*, *OsNPF5.15*, *OsNPF5.16* e *OsNPF5.17* de arroz caracterizando possível similaridade funcional entre esses genes com os descritos em *A. thaliana*. Entretanto, a localização de expressão das proteínas codificadas por esses genes e sua atuação no metabolismo de arroz ainda não foram identificadas.

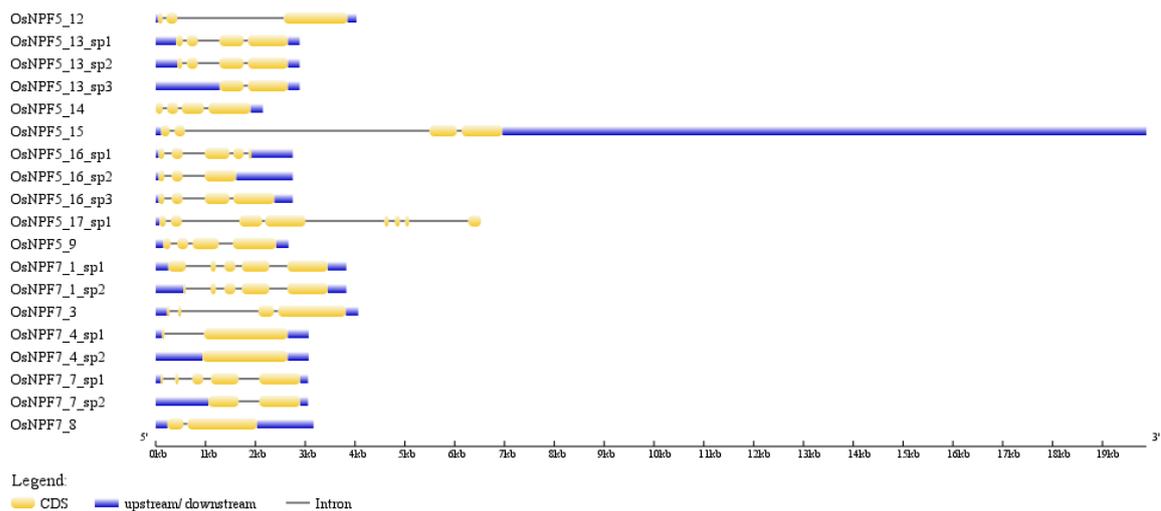
Estudos de similaridade funcional entre genes que codificam para transportadores em diferentes espécies de plantas têm sido aplicados em arroz (OUYANG, et al. 2010; FAN, et al. 2014), pepino (WU, et al. 2014; HU, et al. 2020), trigo (WANG, et al. 2020) e milho (WEN, et al. 2017). O agrupamento de genes que apresentam analogia de função entre proteínas das duas espécies foi observada neste trabalho, no grupo I (Figura 2) reunindo genes codificantes para canais de cloreto de arroz (*OsCLC1* e *OsCLC2*) e de *A. thaliana* (*AtCLCa* e *AtCLCc*). A família das proteínas CLC de *A. thaliana* foi caracterizada como atuante no transporte de nitrato para o vacúolo atuando como *antiporters* ( $2\text{NO}_3^- / \text{H}^+$ ) (DE ANGELI et al., 2006). *Antiporters* são proteínas capazes de realizar o transporte de uma ou mais moléculas em direções opostas e ao mesmo tempo através da membrana fosfolipídica, como a membrana plasmática e o tonoplasto (FERROL, 2021). A função e localização de expressão subcelular semelhante à dessas proteínas CLC de *A. thaliana* foi identificada em arroz (NAKAMURA, et al. 2006).

Apenas 11 genes da família NPF foram caracterizados até o momento em Arroz, dentre eles está a família NPF7 que está agrupada no grupo IV (Figura 2). Esta família tem despertado interesse dos pesquisadores devido a evidências de sua localização na membrana do vacúolo e relação com o aumento da produtividade de grãos.

O grupo VI e VII reuniu os genes *OsNPF8.9* e *OsNPF8.20* e seus diferentes *splicing*. O gene *OsNPF8.9* (antigo *OsNRT1.1*) foi o primeiro gene funcionalmente caracterizado como transportador de baixa afinidade com  $\text{Km} \sim 9,0\text{mM NO}_3^-$  e expresso constitutivamente na camada mais externa do tecido radicular, epiderme e pelos radiculares (LIN, et al. 2000). Linhagens com o gene *OsNPF8.20* (antigo *OsPTR9*) silenciado apresentaram redução da eficiência do uso do nitrogênio em plantas de arroz, afetando a absorção de amônio, reduzindo a produtividade dos grãos e o crescimento das plantas (FANG, et al. 2012). Na análise filogenética este último apresentou analogia também com os genes *OsNPF8.18* e *OsNPF8.21*.

Os grupos V e VIII foram formados por genes da família NPF de arroz que ainda não foram caracterizados funcionalmente, não havendo informações sobre sua atuação.

Buscando transportadores com possível envolvimento na remobilização de nitrato no vacúolo os genes reunidos nos subgrupos III e IV foram examinados quanto ao tamanho, complexidade e disponibilidade de perfil de expressão nos bancos de dados. Evidenciamos elevada complexidade nos genes da família NPF (Figura 3) sendo, em sua maioria, genes extensos com tamanho variando entre 2 a 20kb, com amplas regiões não codificantes e ocorrência de diferentes isoformas. A presença dessas variações pode estar diretamente relacionada com as diversas funções relatadas nesta família, entretanto, estudos que considerem essas formas alternativas ainda são pouco explorados.

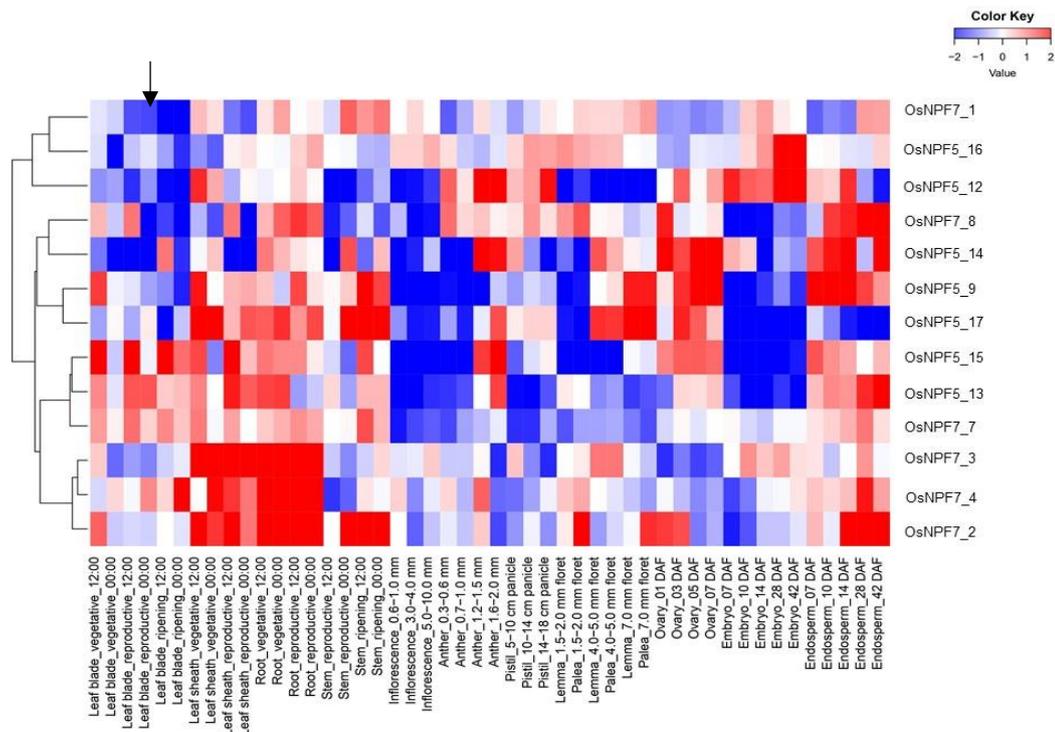


**Figura 3:** Estrutura dos genes codificantes de transportadores de nitrato pertencentes a família NPF de transportadores de baixa afinidade potencialmente atuantes no tonoplasto em arroz.

Dentre os genes avaliados o *OsNPF5.15* é o mais extenso com ~20kb, porém é o que apresenta maior região não codificante (*íntrons* e regiões 5' e 3' não transcrita). Os genes *OsNPF5.13*, *OsNPF5.16*, *OsNPF7.1*, *OsNPF7.4* e *OsNPF7.7* apresentaram formas alternativas do gene, originadas devido a eventos pós transcricionais de *splicing* alternativo. O *splicing* alternativo é um dos eventos que mais contribui para a diversidade genética dos eucariotos e é uma das formas de enriquecer as funções dos genes (GRAVELEY, 2001). Estudos recentes apontam que este fenômeno é muito comum em plantas, ocorrendo principalmente em resposta a mudanças climáticas (CHENG e TU, 2018).

A elevada complexidade dos genes e ocorrência de variações pode indicar diferenças na atuação desses genes e também no endereçamento das proteínas alterando assim os locais de expressão. A presença ou ausência de um *íntron* ou éxon pode acarretar na modificação no direcionamento da proteína de transporte para membrana plasmática, enquanto as outras isoformas são direcionadas ao vacúolo, ou vice-versa. O gene *OsNPF7.7* é um exemplo que diferentes isoformas podem ter localização e função diferenciada. A isoforma *OsNPF7.7sp1* foi localizada na membrana plasmática e sua superexpressão em plantas de arroz promoveu o influxo e acumulação de nitrato nas raízes, enquanto a isoforma *OsNPF7.7sp2* localizada no vacúolo demonstrou aumento no conteúdo de amônio (HUANG, et al. 2018).

O perfil de expressão *in-silico* (Figura 4) não possibilitou a diferenciação entre *splicings*, mas é possível observar o padrão de expressão dos genes em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento. De forma geral, os genes avaliados apresentam maior expressão nos tecidos da raiz e bainha tanto na fase vegetativa quanto reprodutiva da planta, onde observamos maior intensidade no *heatmap*.



**Figura 4:** Perfil de expressão *in silico* dos genes selecionados avaliados ao longo do desenvolvimento vegetativo realizado por meio de informações disponibilizadas no banco de dados RICEXPLO. A seta preta indica o tecido da bainha.

O tecido da bainha em estágio vegetativo (indicado com seta preta), apresentou expressão positiva e elevada para a maioria dos genes. O tecido da bainha em arroz é um órgão de grande importância para o acúmulo e remobilização de nitrogênio (SANTOS, et al. 2011; SANTOS, et al. 2007). Como o intuito do trabalho é avaliar o processo de acúmulo e remobilização de  $\text{NO}_3^-$ , este tecido foi priorizado no estudo da expressão relativa dos genes em resposta ao fornecimento de nitrato na solução nutritiva.

Ao realizarem análise filogenética de transportadores NPF Huang, et al (2019) identificaram semelhanças no tamanho e número de *exons* das isoformas dos genes *OsNPF7.1* (antigo *OsPTR4*) e *OsNPF7.4* (antigo *OsPTR5*), entretanto os autores se surpreenderam quando estes genes se distanciaram na análise filogenética. Resultados semelhantes foram encontrados tanto na análise filogenética realizada com as sequências de aminoácidos disponíveis nos bancos de dados de arroz (Figura 2), quanto na análise do perfil de expressão destes genes (Figura 4) corroborando com os apresentados pelos autores. Esse resultado reforça a complexidade dos genes de transportadores em arroz e a importância de realizar estudos de caracterização.

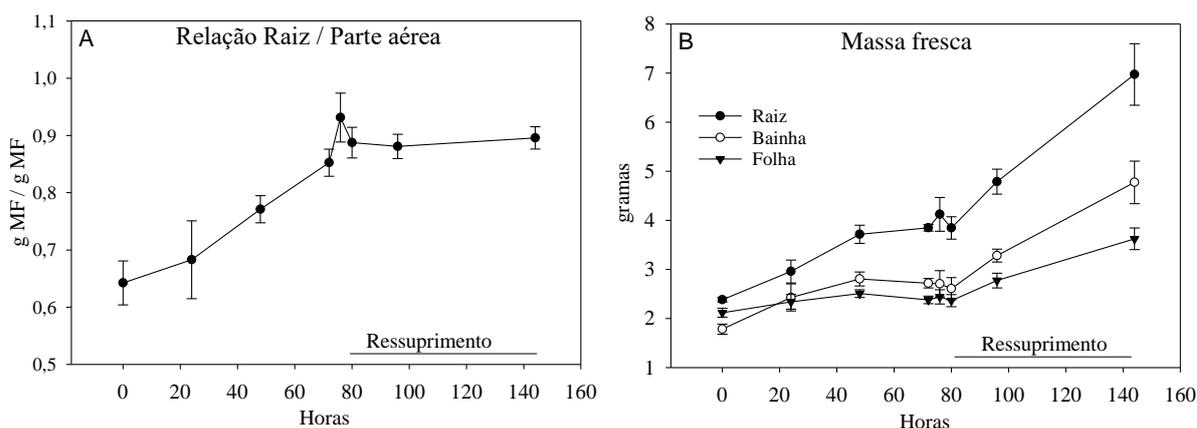
### 3.2 Metabolismo Vegetal e Expressão dos Genes Potenciais

Para observar a absorção e movimentação do nitrato no interior da célula e a diferenciação dos níveis de expressão dos genes em cada momento foi realizado um experimento de supressão e ressurgimento de nitrogênio utilizando como fonte nitrato de cálcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ).

Inicialmente as plantas foram cultivadas até os 30 dias após a germinação em solução nutritiva com suprimento constante de uma dose elevada de nitrogênio (5mM de  $\text{N-NO}_3^-$ ). O final desse período de crescimento foi considerado tempo zero (Figura 5), e neste ponto o desenvolvimento das plântulas encontra-se balanceado (raiz, folha e bainha). A partir de então,

as plantas foram submetidas a um período de supressão do fornecimento de N por 72 horas, onde observamos o aumento no crescimento radicular em relação a bainha e folhas (Figura 5 B) o que causou o aumento da relação raiz/parte aérea no mesmo período (Figura 5A).

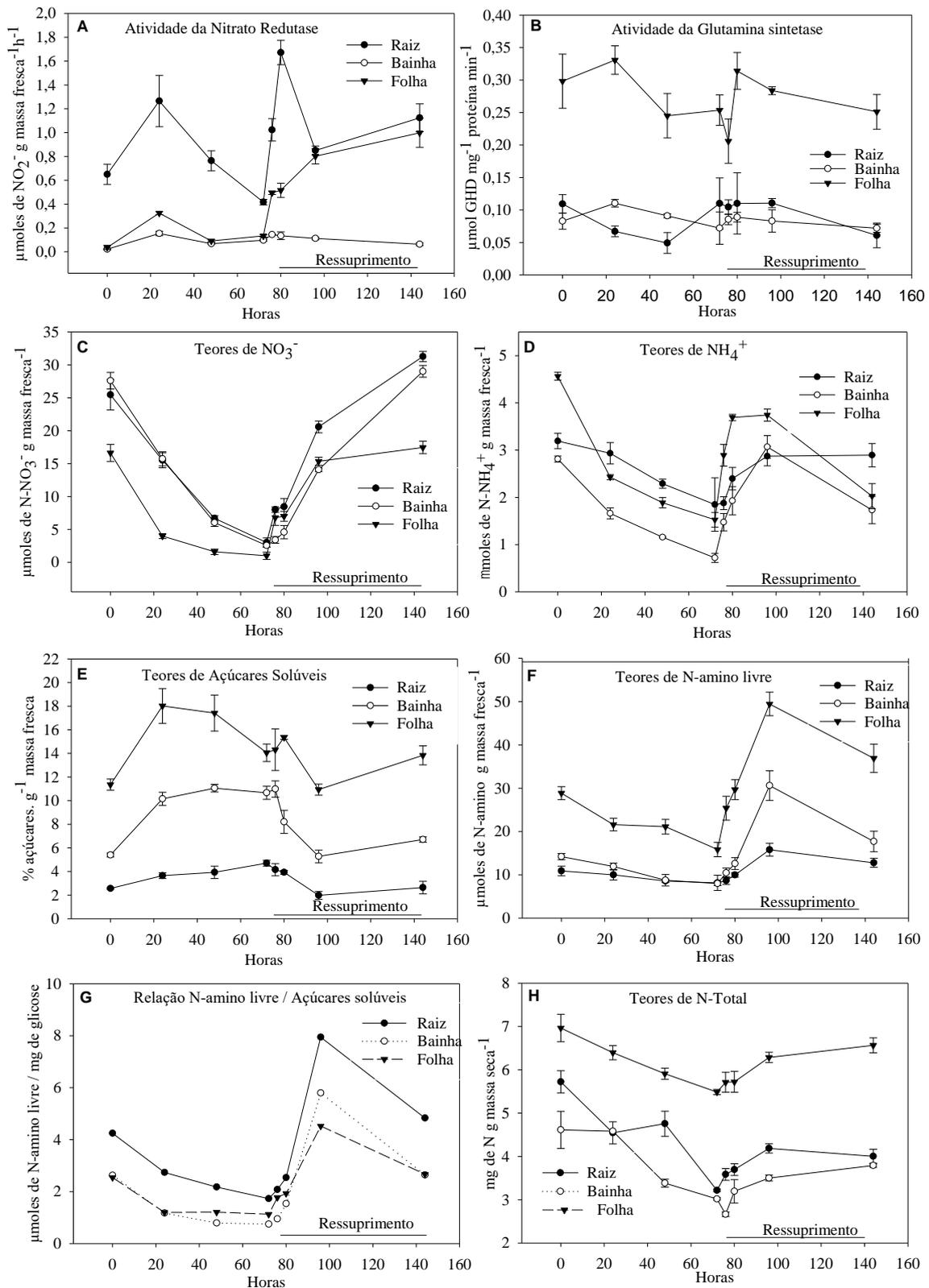
A ausência de nitrogênio na solução nutritiva desencadeia uma resposta de crescimento radicular, de forma que a planta possa explorar mais profundamente o substrato em busca de nutrientes. Souza e Fernandes (2018) também observaram a expansão do sistema radicular, com o intuito de ampliar a área de captação de N em plantas de arroz submetidas a um período de supressão de N. O investimento no crescimento do sistema radicular frente a uma leve limitação de N também foi relatado por Araya, et al. (2015) e Nacry, et al. (2013). Com o ressuprimento do fornecimento de N, após 4 horas, as folhas e bainha retomam o crescimento, até um estado normalizado que se mantém até o fim a observação, resultando em aumento da massa fresca (Figura 5 B).



**Figura 5:** Parâmetros fitotécnicos de desenvolvimento das plântulas de arroz (var. Manteiga), cultivadas em solução nutritiva com fornecimento de 5mM de  $N-NO_3^-$  antes, durante e após um período de supressão de nitrogênio por 72 horas. O tempo zero representa o cultivo com suprimento constante de 5mM de  $N-NO_3^-$  até os 30 dias após a germinação (DAG). As barras representam desvio padrão da média.

O fornecimento de uma dose elevada de nitrato (5mM) em solução nutritiva favoreceu o acúmulo do íon nos tecidos que observamos no tempo zero (Figura 6C).

A variedade Manteiga é uma variedade tradicional do estado do Maranhão que apresenta elevada eficiência de uso de nitrogênio e teores elevados de proteína no grão (SOUZA; STARK; FERNANDES, 1998; SANTOS, et al., 2003; ARAÚJO; SOUZA; FERNANDES, 2003). Santos, et al. (2003) e Chapeta, et al. (2020) evidenciaram alta capacidade de acúmulo de nitrato nos tecidos dessa variedade em condições de baixa disponibilidade e maior adaptação a baixos níveis de nitrato no solo, corroborando com os altos teores de  $NO_3^-$  encontrados neste trabalho tornando-a adequada para o estudo de transportadores envolvidos no processo de acúmulo e remobilização de  $NO_3^-$  dos vacúolos.



**Figura 6:** Resultados da análise do metabolismo vegetal em plantas de arroz (var. Manteiga). A) atividade da enzima nitrato redutase; B) atividade da enzima Glutamina Sintetase; C) teores de  $\text{NO}_3^-$ ; D) teores de  $\text{NH}_4^+$ ; E) teores de açúcares solúveis; F) teores de aminoácidos livres (N-amino); G) relação N-amino/açúcares solúveis; H) teores de N-total na planta durante os períodos de supressão (0-72h) e ressuprimento (73-160h) de nitrogênio na forma de  $\text{N-NO}_3^-$  a concentração de 5mM. O tempo zero

representa o cultivo com suprimento constante de 5mM de  $\text{N-NO}_3^-$  até os 30 dias após a germinação (DAG). As barras representam desvio padrão da média.

Os teores de  $\text{NO}_3^-$  em cada órgão (raiz, bainha e folha) apresentaram redução durante os três períodos de supressão do fornecimento de  $\text{NO}_3^-$  na solução (24, 48 e 72h, Figura 6C), portanto, isso sugere que cada órgão consumiu o próprio nitrogênio armazenado, sem que houvesse remobilização a partir de outros órgãos. Comportamento semelhante foi observado nos teores de amônio e aminoácidos livres (N-amino) apresentando redução durante o período de supressão de N (Figura 6D e F). Contudo, nos teores de açúcares solúveis houve um aumento ao longo das 72h de supressão (Figura 6E), demonstrando a redução da assimilação do nitrogênio.

A relação N-amino/ açúcares solúveis (Figura 6G) resultou em uma correlação negativa, demonstrando uma redução na assimilação de  $\text{NH}_4^+$  em esqueletos de carbono durante o período de supressão. Com o fornecimento de  $\text{NO}_3^-$  na solução durante o ressurgimento há uma inversão dessa relação refletida no aumento dos teores de N-amino marcando a retomada da assimilação. Segundo Fernandes (1978) na presença de  $\text{NH}_4^+$  ocorre um intenso processo de mobilização de esqueletos de carbono que é colocado em forma de amidas sinalizando a assimilação de N.

O crescimento da relação N-amino/açúcares solúveis caracteriza uma resposta à supressão do fornecimento de nitrogênio às plantas, que pode estar relacionada à preparação da planta para suportar um período de estresse. Comportamento que apresenta redução 72 horas após o ressurgimento (144 horas na Figura 6G), indicando retorno à normalidade.

O aumento dos teores de açúcares no tecido da bainha perdura até as 4h após o ressurgimento apoiando a hipótese de que a bainha é um órgão que exerce função de reserva de nutrientes. Outro fator que fornece suporte a esta hipótese são as atividades das enzimas Nitrato Redutase (NR) e Glutamina sintetase (GS) que permanecem muito baixas, no tecido da bainha durante todos os períodos analisados (Figura 6A e B). É importante notar que tanto a atividade da NR quanto da GS apresentaram um pico de atividade 24 horas após o início da supressão de N, sendo NR na raiz e GS na folha, o que demonstra a presença de nitrato na célula, mesmo não havendo suprimento deste na solução nutritiva, refletindo a remobilização do  $\text{NO}_3^-$  que se encontrava armazenado nos vacúolos. Esse mecanismo de distribuição de curta distância, do citosol para os vacúolos celulares, como estratégia de acúmulo de nitrato foi inicialmente relatado por Fernandes (1974), o qual evidenciou a existência de um mecanismo de sequestro de  $\text{NO}_3^-$  do “pool” metabólico referente as concentrações disponíveis no citosol para o “pool” substrato referindo-se ao íon armazenado nos vacúolos.

Posteriormente Santos, et al. (2009) observaram o acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  nas bainhas de diferentes variedades locais de arroz apontando esse comportamento como uma possível estratégia de estocagem de N nesse órgão para uso posterior em caso de demanda metabólica. Os elevados teores de  $\text{NO}_3^-$  e açúcares solúveis aliado aos baixos teores de amônio e baixa atividade das enzimas NR e GS no tecido da bainha demonstrado nesse trabalho reforçam a função de reserva desse tecido. Resultados semelhantes aos aqui expostos foram obtidos por Santos, et al. (2005 e 2011) avaliando plantas de arroz da variedade Piauí e IAC-47 relacionando os teores de  $\text{NO}_3^-$  mais elevados e a baixa atividade da NR e GS ao acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  nas bainhas.

Outro ponto interessante é a rápida resposta da atividade da NR 4 horas após o ressurgimento com o pico de atividade às 8 horas (80 horas na Figura 6A) enquanto para GS essa resposta é visualizada apenas após 8 horas (80 horas na Figura 6B). Esse comportamento corrobora com a dependência do fornecimento do substrato ( $\text{NO}_3^-$ ) na solução com o tempo necessário para transcrição do gene e atividade da enzima NR no citosol.

Os teores de N-total apresentaram poucas variações, sendo a maior alteração encontrada na bainha, com uma redução acentuada nos períodos de supressão, mantendo-se reduzida

mesmo após o período de ressuprimento quando comparado aos teores existentes no tempo zero (Figura 6H).

A análise de expressão gênica buscou identificar possíveis relações destes genes no processo de remobilização de nitrato. Dessa forma, era esperado que genes possivelmente atuantes no efluxo de  $\text{NO}_3^-$  do vacúolo apresentassem aumento nos níveis de expressão nas primeiras 72 horas, ou seja, durante o período de supressão de N. E o contrário para os genes relacionados ao influxo, apresentando resposta após esse tempo, no período de ressuprimento. Devido o tecido da bainha ser responsável pela maior atividade de acúmulo/remobilização de  $\text{NO}_3^-$  e a expressão *in silico* (Figura 4) demonstrar expressão de todos os genes selecionados, esse tecido foi utilizado para realização da análise.

Os genes *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.15*, *OsNPF5.16sp1* e *OsNPF5.17* reunidos no grupo III (Figura 2) apresentaram aumento de transcrição em resposta a supressão do fornecimento do nitrogênio (N), com picos de resposta 24 horas após a supressão (sem N) (Figura 7A, C, G, B, e H respectivamente). Neste mesmo tempo observou-se o pico de atividade das enzimas NR e GS e redução dos teores de  $\text{NO}_3^-$  nos tecidos (Figura 6A, B e C respectivamente) indicando possível atuação das proteínas codificadas por estes genes no efluxo de nitrato a partir do vacúolo celular.

A expressão dos genes *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.15*, apresentou correlação positiva significativa com a atividade da GS e os conteúdos de nitrato (Tabela 2). Este resultado dá suporte a hipótese de atuação destes genes no efluxo de nitrato a partir do vacúolo para o citosol, em concordância com os dados reportados pelos seus homólogos em *A. thaliana* (HE, et al. 2017).

**Tabela 2:** Análise de correlação entre as médias da expressão relativa, teores de nutrientes e atividade de enzimas atuantes na assimilação de N durante o período de supressão de  $\text{NO}_3^-$ .

Expressão gênica	MF	NR	GS	Açúcares	N total	N amino	Amônio	Nitrato
<i>OsNPF5.12</i>	-0.34 <sup>ns</sup>	0.65 <sup>ns</sup>	0.74 <sup>*</sup>	-0.57 <sup>ns</sup>	0.32 <sup>ns</sup>	0.77 <sup>*</sup>	0.67 <sup>ns</sup>	0.60 <sup>ns</sup>
<i>OsNPF5.13</i>	-0.54 <sup>ns</sup>	0.32 <sup>ns</sup>	0.93 <sup>**</sup>	-0.78 <sup>*</sup>	0.60 <sup>ns</sup>	0.80 <sup>**</sup>	0.88 <sup>**</sup>	0.79 <sup>*</sup>
<i>OsNPF5.15</i>	-0.78 <sup>*</sup>	0.20 <sup>ns</sup>	0.74 <sup>*</sup>	-0.81 <sup>**</sup>	0.86 <sup>**</sup>	0.88 <sup>**</sup>	0.80 <sup>*</sup>	0.83 <sup>**</sup>
<i>OsNPF5.16sp1</i>	-0.63 <sup>ns</sup>	0.07 <sup>ns</sup>	0.63 <sup>ns</sup>	-0.69 <sup>ns</sup>	0.69 <sup>ns</sup>	0.63 <sup>ns</sup>	0.63 <sup>ns</sup>	0.70 <sup>ns</sup>
<i>OsNPF5.17</i>	-0.84 <sup>**</sup>	-0.34 <sup>ns</sup>	0.45 <sup>ns</sup>	-0.69 <sup>ns</sup>	0.89 <sup>**</sup>	0.47 <sup>ns</sup>	0.66 <sup>ns</sup>	0.69 <sup>ns</sup>

\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , ns: não significativo, MS: massa fresca, NR: nitrato redutase, GS: glutamina sintetase.

Por outro lado, os genes reunidos no grupo IV (Figura 2), *OsNPF7.1sp1*, *OsNPF7.1sp2*, *OsNPF7.2*, *OsNPF7.3*, *OsNPF7.4sp1*, *OsNPF7.4sp2*, *OsNPF7.7sp1*, *OsNPF7.7sp2*, *OsNPF7.8* e *OsNPF5.9* aumentaram os transcritos em resposta a presença de  $\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva com picos de resposta 24 horas após o ressuprimento (96 horas na Figura 7 K, L, I, J, M, N, O, P, Q e R respectivamente) relacionando-os ao influxo de nitrato nas células.

A subfamília *OsNPF7* tem atraído bastante atenção de pesquisadores por demonstrar importante atuação na produtividade de arroz e no influxo de nitrato para o vacúolo. Os resultados publicados até o momento estão de acordo com a indução da transcrição destes genes mediante o aumento dos teores de  $\text{NO}_3^-$  nos tecidos em resposta ao ressuprimento, encontrado neste trabalho. O gene *OsNPF7.2* (antigo *NRT1.8*) foi caracterizado como transportador atuante no influxo de nitrato para o vacúolo em arroz (HU, et al. 2016), como visto no ressuprimento (Figura 7I). O gene *OsNPF7.3* (antigo *OsPTR6* ou *NRT1.5*) foi caracterizado como um transportador de peptídeos, induzido pela presença de N e localizado no vacúolo (OUYANG, et al., 2010), corroborando com os resultados demonstrados neste trabalho (Figura 7J). A atuação deste gene no influxo ainda não foi comprovada, entretanto, sua superexpressão

ocasionou alterações no transporte de amônio aumentando a expressão dos transportadores e da atividade da GS, além de alterar o crescimento das plantas e o número de panículas (FAN, et al. 2014; FANG, et al. 2017).

As isoformas do gene *OsNPF7.7* despertaram interesse por apresentarem localização subcelular diferenciada. A análise da expressão das duas isoformas na bainha identificou uma rápida resposta de *OsNPF7.7sp2* ao ressuprimento de nitrato (Figura 7P), o que corrobora com sua localização no vacúolo (HUANG, et al. 2018). Por outro lado, *OsNPF7.7sp1* apresentou aumento de transcritos mais tardio apenas após 8h (Figura 7O).

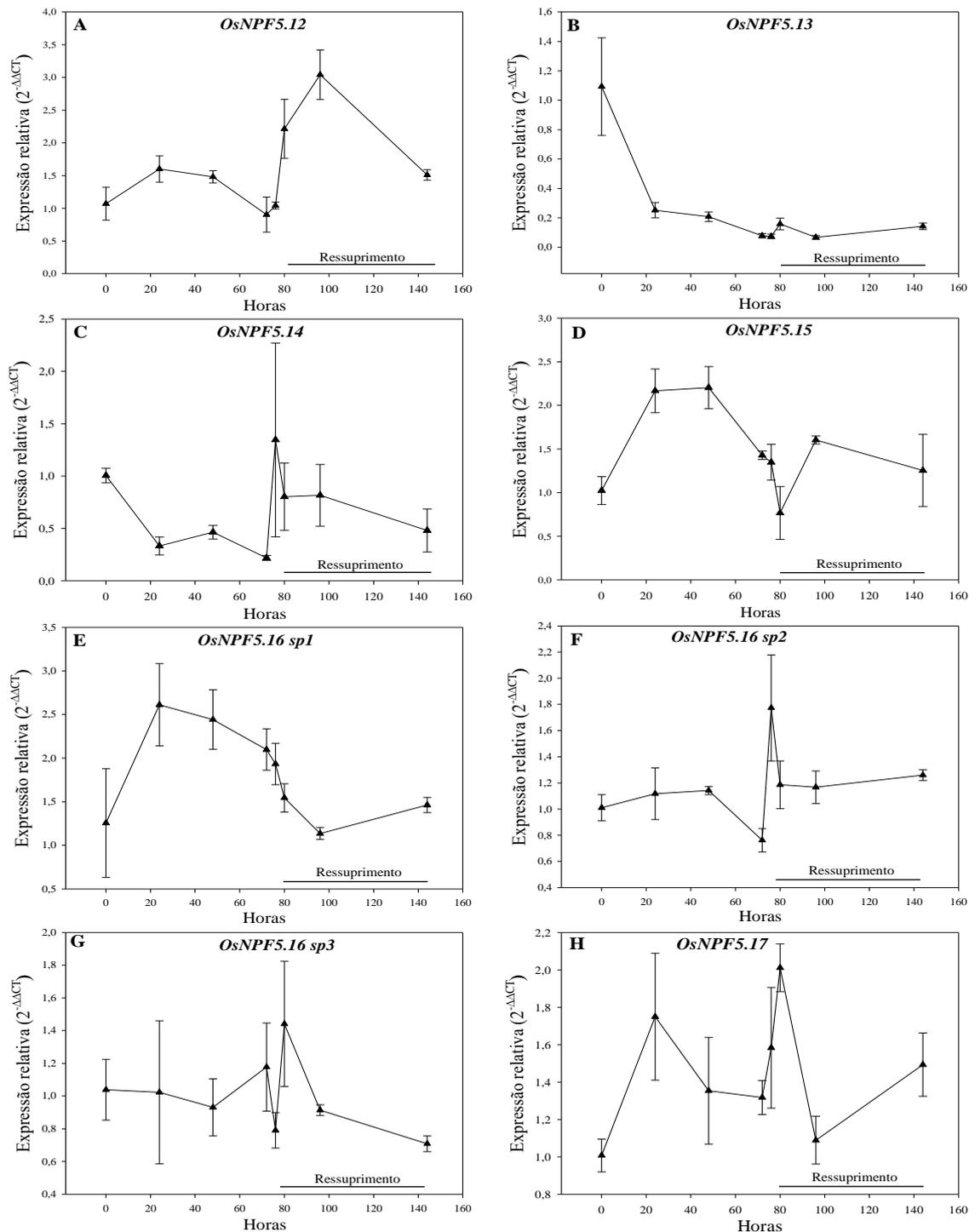
Os genes *OsNPF7.1* (antigo *OsPTR4*) e *OsNPF7.4* (antigo *OsPTR5*) ainda não tiveram sua expressão localizada na célula, entretanto, o estudo de suas isoformas demonstraram diferenças na estrutura das proteínas e nos níveis de expressão de cada isoforma, sendo *OsNPF7.1sp1* mais expresso no estágio reprodutivo, enquanto a expressão do *OsNPF7.1sp2* foi maior no estágio vegetativo (HUANG, et al., 2019). Os níveis de expressão encontrados pelos autores foram semelhantes aos encontrados neste trabalho (Figura 7K e L) e corroboram com o perfil de expressão *in-silico* obtido no banco de dados RICEXPRESS (Figura 4).

Dentre os genes da família *OsNPF7* reunidos no grupo IV, apenas o gene *OsNPF7.8* ainda não foi estudado, mas a proximidade e a analogia entre estes genes podem representar semelhanças quanto a localização e atuação no influxo de nitrato no vacúolo.

Interessantemente os genes *OsNPF5.15* e *OsNPF5.12* além de responderem ao período de supressão, na ausência de nitrato, também apresentaram aumento na transcrição durante o ressuprimento, formando um segundo pico 24 horas após o reestabelecer do  $\text{NO}_3^-$  em solução (Figura 7A e D).

A análise das diferentes isoformas dos genes apresentaram respostas diferentes aos períodos de supressão e ressuprimento. O gene *OsNPF5.16sp2* e *sp3* apresentaram comportamento antagônico, enquanto *OsNPF5.16sp2* apresentou um rápido pico de resposta ao ressuprimento, 4 horas após a troca de solução (Figura 7F), *OsNPF5.16sp3* teve resposta somente após 8 horas e ao final do período de avaliação os níveis de transcritos diminuíram (Figura 7G). Esta resposta pode estar relacionada a duas situações: a baixa ocorrência dessas isoformas na célula o que contribui para uma maior barra de erro, ou a possibilidade de mudança de função ou localização da proteína devido às alterações em sua estrutura. Comportamento semelhante foi observado para os genes *OsNPF7.7sp1*, *OsNPF7.7sp2*, *OsNPF7.1sp1* e *OsNPF7.1sp2* (Figura 7O, P, K, L).

Ao final das observações os níveis de expressão dos genes retornaram a um patamar semelhante ao identificado no tempo zero, isso indica que as alterações encontradas foram, de fato, estimuladas pela supressão e fornecimento de  $\text{NO}_3^-$  aplicada.



**Figura 7:** Efeito da supressão do fornecimento de nitrogênio por 72 horas seguido do ressuprimento de 5mM de  $N-NO_3^-$  sobre a expressão relativa dos genes transportadores de nitrato da família NPF putativos para efluxo/ influxo no vacúolo avaliados no tecido da bainha de plantas de arroz (var. Manteiga), sendo: A) *OsNPF5.12*; B) *OsNPF5.13*; C) *OsNPF5.14*; D) *OsNPF5.15*; E) *OsNPF5.16sp1*; F) *OsNPF5.16sp2*; G) *OsNPF5.16sp3*; H) *OsNPF5.17*; I) *OsNPF7.2*; J) *OsNPF7.3*; K) *OsNPF7.1sp1*; L) *OsNPF7.1sp2*; M) *OsNPF7.4sp1*; N) *OsNPF7.4sp2*; P) *OsNPF7.7sp1*; O) *OsNPF7.7sp2*; Q) *OsNPF5.9*; R) *OsNPF7.8*. O gene da *Ubiquitina-OsUBQ5* utilizado como controle endógeno para as reações de RT-PCR e o tempo zero utilizado como padrão interno de expressão, representando o cultivo com suprimento constante de 5mM de  $N-NO_3^-$ . Barras representam desvio padrão da média. (Continua...)

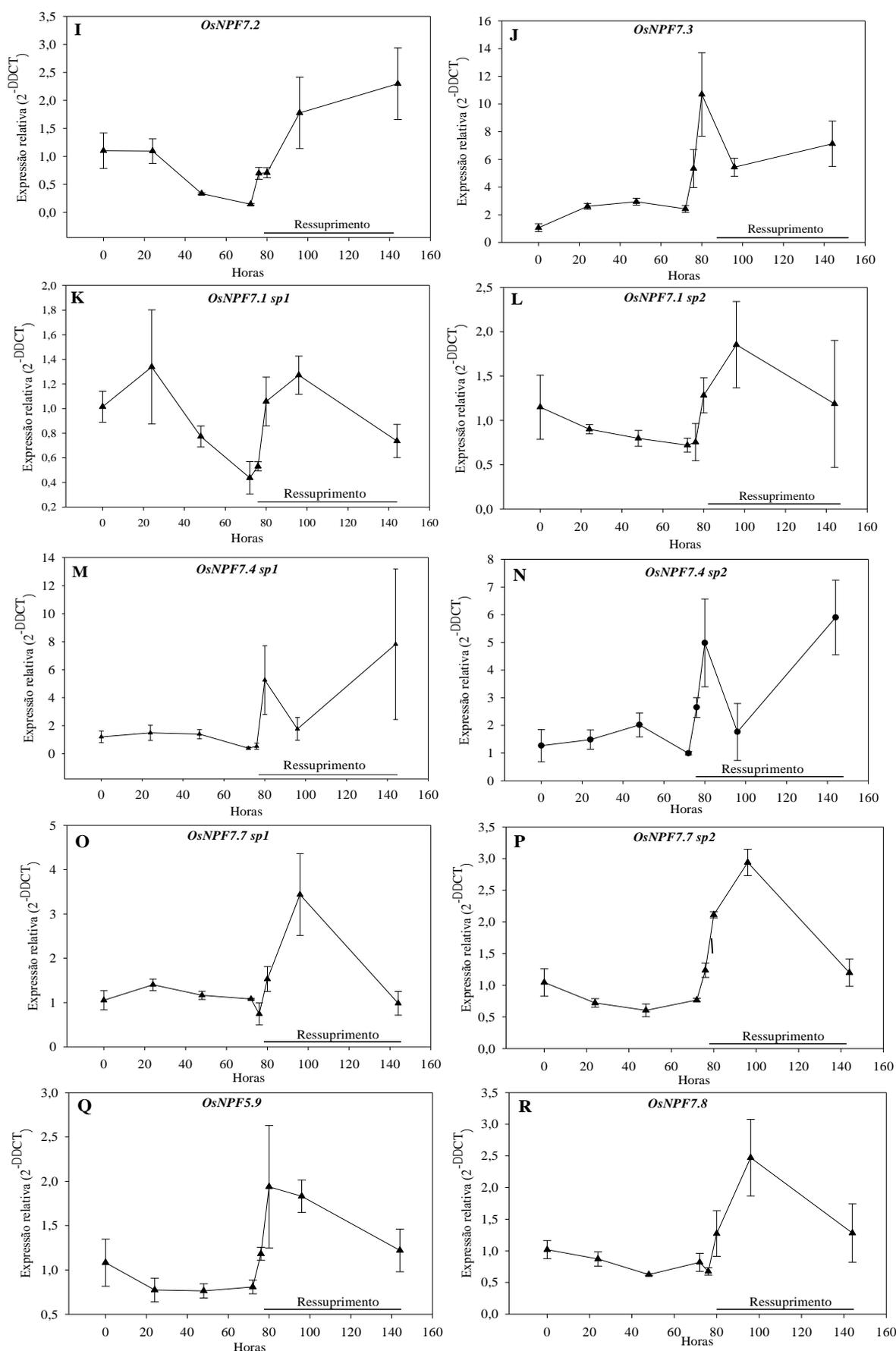
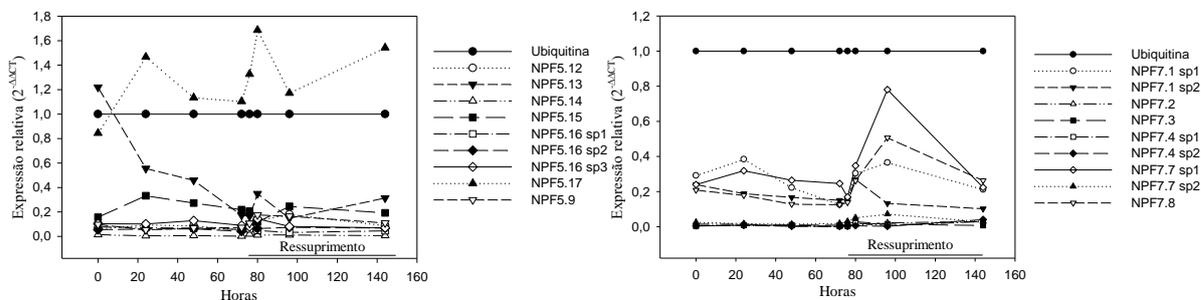


Figura 7: Continuação.

A fim de associar os níveis de transcritos dos genes a sua atuação no metabolismo do  $\text{NO}_3^-$  foi realizada uma comparação entre os níveis de expressão dos transportadores e o controle endógeno utilizado (*Ubiquitina-OsUBQ5*). Os controles endógenos são genes constitutivos e altamente expressos na célula, por isso são considerados padrões nas análises de expressão gênica (JAIN, et al. 2006). O gene *OsNPF5.17* foi o único que apresentou nível de resposta de transcrição superior ao controle endógeno indicando que este gene pode estar relacionado a um papel importante na célula, havendo produção elevada de transcritos em resposta aos tratamentos aplicados (Figura 8).



**Figura 8:** Nível de resposta de expressão dos genes de transportadores da família NPF putativos para efluxo de nitrato do vacúolo em comparação ao gene de referência *Ubiquitina (OsUBQ5)* de forma padronizada.

O gene *OsNPF5.13* no tempo zero apresentou resposta acima do controle endógeno, apesar desse comportamento não ter se mantido com a aplicação dos tratamentos demonstrou um nível de resposta maior que os demais. Os genes *OsNPF7.2*, *OsNPF7.8* e *ONPF7.7sp2* apresentaram elevação acentuada de transcritos estimulada pelo ressuprimento de nitrato na solução nutritiva mesmo quando comparada ao controle endógeno, confirmando o estímulo desses genes na presença do íon nitrato em solução. Entretanto, estes e os demais apresentaram nível de resposta de expressão menor que o gene de referência utilizado (Figura 8).

A menor expressão da maioria dos genes analisados em comparação aos níveis do controle endógeno encontrado não quer dizer que o gene não seja importante no transporte de  $\text{NO}_3^-$ . Várias hipóteses podem estar relacionadas a esta ocorrência, sendo a primeira que estes transportadores apresentam expressão relativa menor no tecido estudado (bainha) corroborando com Hu, et al. (2016) mas contrariando a hipótese deste como tecido de reserva e os dados de expressão disponíveis nos bancos de dados (Figura 4). Outra opção é que os genes putativos de transportadores de nitrato podem não apresentar expressão relativa maior que o controle endógeno escolhido. Há também a possibilidade da ocorrência de diferentes níveis de resposta de cada isoforma que podem ser ativadas em momentos distintos ou até mesmo modificar a função do gene como reportado por Huang, et al. (2019). Estes dados reforçam a necessidade de estudos mais aprofundados buscando fundamentar a atuação destes genes.

## 4 CONCLUSÕES

Os genes *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.15*, *OsNPF5.16* e *OsNPF5.17* demonstraram um aumento expressivo de transcritos em resposta ao período de supressão de nitrato em solução nutritiva, associado ao aumento da atividade da enzima nitrato redutase, glutamina sintetase e dos teores de nitrato no mesmo momento o que evidencia o possível envolvimento com o efluxo do íon a partir do vacúolo.

O gene *OsNPF7.8* apresentou maior proximidade com os genes *OsNPF7.1sp1*, *OsNPF7.1sp2*, *OsNPF7.2*, *OsNPF7.3*, *OsNPF7.7sp1*, *OsNPF7.7sp2* já caracterizados como responsáveis pelo influxo e acúmulo de nitrato no vacúolo. A análise de expressão deste gene demonstrou aumento nos transcritos em resposta ao ressuprimento do íon em solução, corroborando para uma possível analogia de função.

## CAPÍTULO II

### **SUPEREXPRESSÃO DOS GENES *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.15* E *OsNPF7.8* EM ARROZ E AVALIAÇÃO DA ATUAÇÃO NO METABOLISMO DE NITROGÊNIO.**

## RESUMO

FERNANDES, Erika da Costa. **Superexpressão dos genes *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.15* e *OsNPF7.8* em arroz e avaliação da atuação no metabolismo de nitrogênio.** 2021. 102p Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

O acúmulo e remobilização de íons e pequenas moléculas nos vacúolos celulares é um mecanismo de extrema importância para as plantas. Entretanto pouco se conhece sobre as proteínas responsáveis por esse transporte no tonoplasto. O objetivo deste trabalho foi avaliar a contribuição dos genes *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.15* e *OsNPF7.8* no processo de absorção, acúmulo e remobilização do nitrato dos vacúolos e no metabolismo de nitrogênio em arroz. Foi realizada a clonagem dos genes, fusão com proteína de fluorescência GFP, inserção no vetor *pK7FWG2* e transformação de calos embriogênicos de arroz (var. Manteiga e Nippombare) via *A. tumefaciens*. Com as linhagens *OsNPF7.8* foi realizado um experimento em solução nutritiva a fim de avaliar o acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  fornecendo alta dose (5mM) de N- $\text{NO}_3^-$  e submetendo as plantas a um período de supressão de N por 72 horas seguida pelo ressuprimento com a dose inicial. Para as linhagens *OsNPF5.13* o experimento buscou avaliar a atuação do gene na remobilização de  $\text{NO}_3^-$ . Assim as plântulas foram cultivadas em solução nutritiva fornecendo alta dose (5mM) de N- $\text{NO}_3^-$  até os 24 dias após a germinação, em seguida a solução foi trocada por uma sem fornecimento de  $\text{NO}_3^-$  realizando coletas após 24 e 96 horas de supressão. Buscando identificar a localização subcelular dos transportadores foram obtidos protoplastos dos calos embriogênicos transformados visualizados em microscopia confocal. A localização subcelular realizada foi inconclusiva, entretanto, os dados obtidos apontam para localização do gene *OsNPF5.15* no vacúolo. Um total de 41 linhagens foram obtidas, a análise de expressão dos genes nas linhagens transformadas permitiu a confirmação da superexpressão em apenas uma linhagem *OsNPF5.15*, duas linhagens *OsNPF5.12*, quatro linhagens *OsNPF7.8* e quatro linhagens *OsNPF5.13*. As linhagens obtidas com as construções dos genes *OsNPF5.12* e *OsNPF5.15* demonstraram elevada dormência de sementes, impossibilitando a continuação do estudo. As linhagens superexpressando o gene *OsNPF7.8* apresentaram aumento dos teores de  $\text{NO}_3^-$  na raiz e da atividade da NR, além de aumento dos teores de amônio e N-amino nas folhas, demonstrando alterações no influxo de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes. Por outro lado, nas linhagens superexpressando o gene *OsNPF5.13* houve maior atividade da NR, aumento dos teores de amônio, N-amino e açúcares solúveis confirmando um aumento da estabilidade da assimilação de N.

**Palavras-chave:** transportador, nitrogênio, nitrato, baixa afinidade

## ABSTRACT

FERNANDES, Erika da Costa. **Overexpression of the *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.15* and *OsNPF7.8* genes in rice plants and evaluation of their role in nitrate remobilization.** 2021. 102p Thesis (Doctor of Science in Plant Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

The accumulation and remobilization of ions and small molecules in cell vacuoles is an extremely important mechanism for plants. However, there is a lack of knowledges about the proteins responsible for this transport in tonoplast. The aim of this study was evaluating the contribution of *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.15* and *OsNPF7.8* genes in the process of absorption, accumulation and remobilization of nitrate from vacuoles and in metabolism nitrogen in rice. Gene cloning, fusion with GFP fluorescence protein, insertion into pK7FWG2 vector and transformation of embryogenic rice calli (var. Manteiga and Nippombare) via *A. tumefaciens* were performed. With *OsNPF7.8* strains an experiment was carried out in nutrient solution to evaluate the accumulation of  $\text{NO}_3^-$  providing a high dose (5mM) of N- $\text{NO}_3^-$  and subjecting plants to a period of N suppression for 72 hours followed by resupply with the initial dose. To *OsNPF5.13* strains, the experiment sought to evaluate the role of gene in remobilization of  $\text{NO}_3^-$  so seedlings were cultivated in nutrient solution providing a high dose (5mM) of N- $\text{NO}_3^-$  up to 24 days after germination, then solution was exchanged for one without  $\text{NO}_3^-$  supply performing collections after 24 and 96 hours of suppression. Searching for subcelular localization, protoplasts of transformed embryogenic calli were obtained and visualized in confocal microscopy. But that results inconclusive, however the data obtained point to the location of the *OsNPF5.15* gene in the vacuole. A total of 41 strains was obtained, gene expression analysis in the transformed strains confirm the overexpression in one *OsNPF5.15* strain, two *OsNPF5.12* strains, four *OsNPF7.8* strains and three *OsNPF5.13* strains. The lines obtained for *OsNPF5.12* and *OsNPF5.15* genes showed high seed dormancy, thus they cannot be used to evaluate N metabolism. The *OsNPF7.8* strains showed increased  $\text{NO}_3^-$  content in the root and NR activity, in addition to high ammonium and N-amino content in leaves, demonstrating changes of  $\text{NO}_3^-$  influx into roots. On the other hand, the *OsNPF5.13* strains showed higher NR activity, increased ammonium, N-amino and soluble sugar contents, demonstrating an increase in the stability of N assimilation.

**Keywords:** transporter, nitrogen, tonoplast, low affinity.

## 1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é o macronutriente que mais limita a produtividade em plantas cultivadas (SOUZA; FERNANDES, 2018). Entretanto, o N é um elemento muito móvel nos solos, ocasionando baixa disponibilidade em solos tropicais e elevada ocorrência de perdas para a atmosfera e o lençol freático. A eficiência de uso do N (EUN) nos sistemas agrícolas é muito baixa, estando sujeito a perdas de até 70% da adubação nitrogenada aplicada (COSKUN, et al. 2017). Compreender os mecanismos envolvidos no processo de absorção do nitrogênio pelas plantas é uma estratégia que pode auxiliar a minimizar essas perdas, buscando formas de aumentar a eficiência de captação do nitrogênio do solo, evitando a exposição prolongada aos processos de perda e, desta forma, reduzindo os custos de produção da cultura do arroz (HIREL; KRAPP, 2020; FAGERIA; DOS SANTOS; CUTRIM, 2007).

O estudo de genes que codificam para transportadores atuantes no acúmulo e remobilização de  $\text{NO}_3^-$  localizados no vacúolo celular tem demonstrado resultados promissores com aumento da produtividade de grãos em arroz (HUANG, et al. 2018). De Angeli, et al. (2006) demonstraram a atuação das proteínas transportadoras *AtCLCa* no transporte de  $\text{NO}_3^-$  para os vacúolos de forma que linhagens mutantes silenciando o gene apresentaram redução de 50% no acúmulo do íon. O gene *OsNPF7.3* (antigo *OsPTR6* ou *NRT1.5*) é um transportador de peptídios, induzido pela presença de N orgânico cuja superexpressão alterou o transporte de amônio, aumentou o crescimento das plantas e o número de panículas em 6,5% (OUYANG, et al. 2010; FAN, et al. 2014; FANG, et al. 2017). O gene *OsNPF7.2* foi caracterizado como transportador de influxo de nitrato para o vacúolo e atua na regulação positiva da produtividade dos grãos, aumentando em ~60% o número de grãos cheios (HU, et al. 2016; WANG, et al. 2018). A superexpressão das isoformas do gene *OsNPF7.7* demonstrou um aumento de até 80% no número de panículas com 40% a mais de grãos cheios por planta (HUANG, et al. 2018). Os genes *OsNPF7.1* e *OsNPF7.4*, apesar de ainda não terem sido localizados, quando supreexpressos aumentaram as concentrações de nitrato nas células, entretanto demonstraram efeitos contrastantes na produtividade de forma que o gene *OsNPF7.1* aumentou o perfilhamento e a biomassa das sementes enquanto mutantes do gene *OsNPF7.4* apresentaram redução da biomassa das plantas (HUANG, et al. 2019). O gene *OsNPF7.8* apresentou elevada similaridade com os genes *OsNPF7.1*, *OsNPF7.2*, *OsNPF7.3*, *OsNPF7.4* e *OsNPF7.7* na análise filogenética (Capítulo I, item 3.1), entretanto ainda não há informações sobre a atuação deste gene em plantas de arroz.

Apesar das recentes descobertas ainda não há informações de genes que atuem na remobilização do nitrato a partir do vacúolo em arroz. Até o momento apenas os genes *AtNPF5.11*, *AtNPF5.12* e *AtNPF5.16* de *A. thaliana* tiveram a localização de expressão determinada na membrana do vacúolo e identificados como atuantes no efluxo do  $\text{NO}_3^-$  a partir do vacúolo, de forma que a alteração na expressão desses genes alterou as concentrações do íon entre os tecidos da raiz e parte aérea (HE, et al. 2017). A análise filogenética dos transportadores da família NPF de arroz demonstrou elevada similaridade entre esses genes de *A. thaliana* com os genes *OsNPF5.12*, *OsNPF5.15*, *OsNPF5.13* de arroz. E o estudo da expressão gênica demonstrou aumento de transcritos em resposta a um período de supressão de nitrato em solução nutritiva o que indica a atuação desses genes no efluxo de nitrato a partir do vacúolo (Capítulo I, item 3.1).

Em razão disso, neste capítulo são testadas as seguintes hipóteses: (i) As proteínas transportadoras de  $\text{NO}_3^-$  codificadas pelos genes *OsNPF5.12*, *OsNPF5.15*, *OsNPF5.13* e *OsNPF7.8* se localizam na membrana do vacúolo; (ii) o gene *OsNPF7.8* atua no influxo de nitrato no vacúolo em plantas de arroz, de forma que a superexpressão deste gene promove o acúmulo deste íon nas linhagens, (iii) o gene *OsNPF5.13* atua no efluxo de  $\text{NO}_3^-$  a partir do

vacúolo, de modo que linhagens superexpressando este gene demonstram maior remobilização ou menor acúmulo do íon.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a contribuição dos transportadores codificados pelos genes *OsNPF5.12*, *OsNPF5.15*, *OsNPF5.13* e *OsNPF7.8* no processo de acúmulo e remobilização do nitrato armazenado nos vacúolos e no metabolismo de nitrogênio em arroz. Podem ser distinguidos os seguintes objetivos específicos: (i) identificar a localização dessas proteínas em nível subcelular; (ii) Obter plantas transformadas superexpressando os genes *OsNPF5.13* e *OsNPF7.8*; (iii) Avaliar as alterações no metabolismo de N, absorção e acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  nas plantas transformadas cultivadas em diferentes níveis de N; (iv) identificar como estes genes podem afetar a produtividade em plantas de arroz.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Seleção dos Genes-Alvo para Estudo

A análise filogenética e de expressão gênica realizadas no capítulo um permitiram selecionar genes que potencialmente estariam envolvidos na remobilização de nitrato a partir do vacúolo em arroz. Dessa forma, os genes *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.15*, *OsNPF5.16* e *OsNPF5.17* demonstraram possível envolvimento com o efluxo do íon a partir do vacúolo, enquanto o gene *OsNPF7.8* apresentou maior proximidade com os genes caracterizados como responsáveis pelo influxo.

A fim de identificar o envolvimento dos genes *OsNPF5.12*, *OsNPF5.15*, *OsNPF5.13* e *OsNPF7.8* no metabolismo de nitrogênio e a localização subcelular de expressão da proteína de transporte foi realizada a construção de um vetor fusionando o gene do transportador à proteína repórter GFP utilizando a tecnologia Gateway. Posteriormente, este vetor foi utilizado na transformação de protoplastos para localização subcelular e na transformação de plantas de Arroz via *Agrobacterium tumefaciens*.

#### 2.1.1 Amplificação dos genes de interesse e sistema de clonagem Gateway®

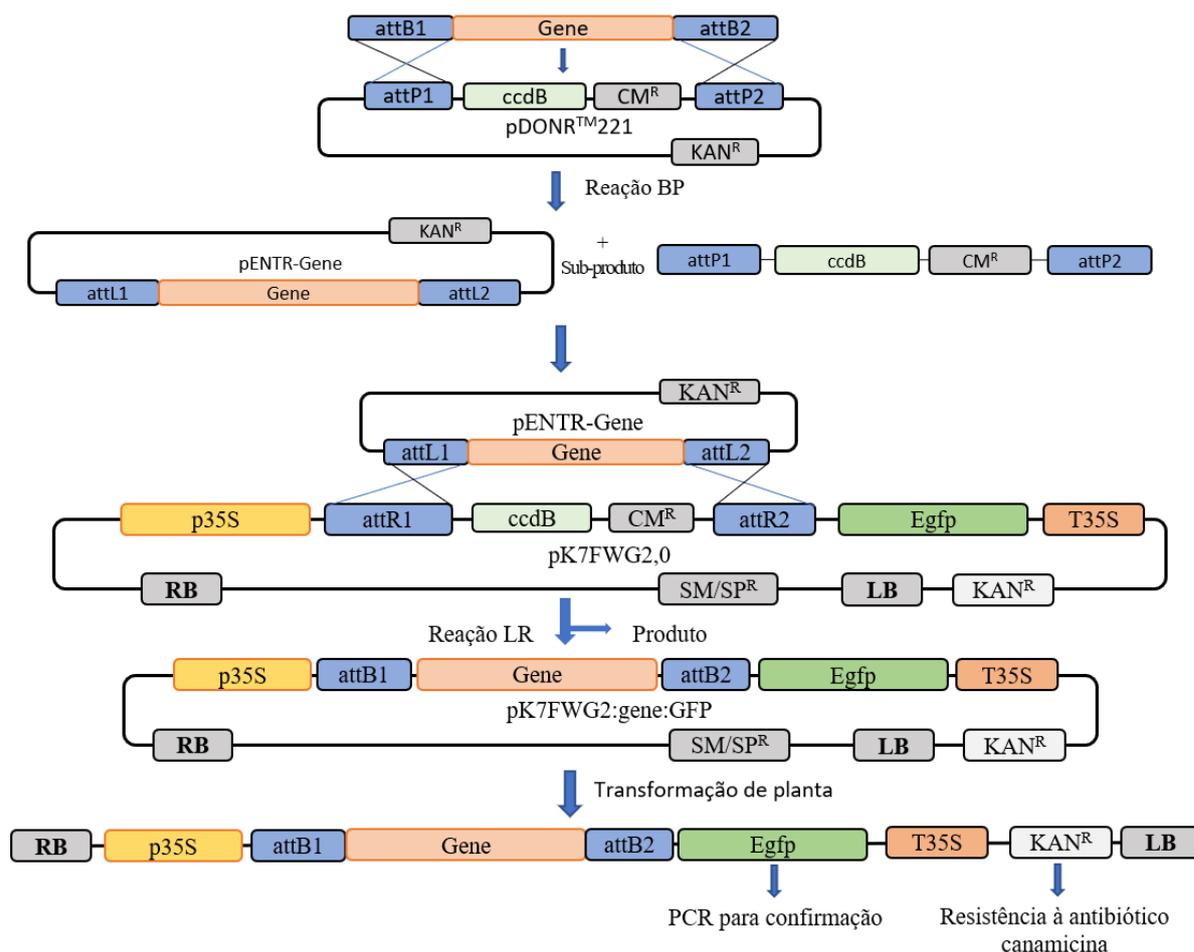
A tecnologia *Gateway* desenvolvida pela Invitrogen®, é um método de clonagem baseado no sistema sítio-específico de recombinação do bacteriófago lambda ( $\lambda$ ) em *E. coli*. Nele fragmentos de DNA flanqueados por sítios de recombinação (*att*), podem ser transferidos em vetores que apresentam sítios compatíveis (*attB* x *attP* ou *attL* x *attR*). Esta técnica permite a integração do gene de interesse flanqueado pelos sítios *attB*<sub>1</sub> e *B*<sub>2</sub> em um vetor doador, que neste caso foi utilizado o pDONR™221 originando o vetor de entrada requerido na reação *Gateway*® (Figura 9).

Assim, para amplificação dos genes inteiros foram desenhados *primers* híbridos específicos que anelam próximo à região do códon de iniciação (*primer forward*) e de terminação (*primer reverse*) adicionando à extremidade metade do adaptador do sítio de recombinação *attB1* e *attB2*.

Apesar de ser considerada espécie referência em estudos genômicos, o arroz apresenta elevada complexidade no genoma com alto conteúdo de GC e abundância de *introns*. Isto, aliado ao tamanho elevado dos genes selecionados (Figura 3), tornou necessária amplificação a partir da transcrita correspondente (cDNA) do mRNA.

Sementes de Arroz da variedade Manteiga foram germinadas e cultivadas em câmara de crescimento por 20 dias em solução nutritiva, como descrito no item 2.4 do capítulo 1. Após esse tempo, as plântulas foram coletadas separando-as em raiz e parte aérea e extraiu-se o RNA total segundo o protocolo descrito no item 2.7 do capítulo 1. Em seguida foi feito o tratamento com DNase utilizando o Kit “*Amplification Grade DNase I*” da Sigma (item 2.7 do capítulo 1).

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit “*SuperScript™ III First-Strand Synthesis System*” da Invitrogen™, que permite a síntese da primeira fita de cDNA com fragmentos de até 12kb, possibilitando a obtenção de fragmentos maiores do RNA total.



**Figura 9:** Representação esquemática das reações realizadas com o sistema gateway de clonagem para obtenção dos vetores de expressão com o gene selecionado fusionado à proteína de fluorescência GFP.

Para a maioria dos genes não foi possível selecionar um *primer* específico para o gene de interesse próximo ao códon de iniciação com propriedades adequadas. Então, foi desenhado um *primer* específico para o gene com anelamento na região 3'UTR (anterior ao códon de iniciação) e outro *primer* próximo ao códon de terminação e com adaptador. Foram necessárias 3 reações de PCR para amplificação do fragmento completo correspondente ao gene com os adaptadores. Na primeira reação (reação 1) utilizou-se a amostra de cDNA extraída da raiz, o *primer* que anela em uma região anterior ao códon de iniciação (*Foward F1*) e o outro na região posterior ao códon de terminação inserindo metade do sítio de recombinação *attB2* CAAGAAAGCTGGGT (*Reverse R*) (Tabela 3).

Na segunda reação foi realizada uma *Nested PCR*, ou seja, utilizou-se uma alíquota de 0,5 µL da reação 1, o *primer Foward 2* que anela no códon de iniciação com a metade do adaptador *attB1* AAAAAAGCAGGCT e o *primer reverse* utilizado na reação anterior.

A terceira reação foi realizada para completar o sítio de recombinação da tecnologia *Gateway* utilizando como *primer* a própria sequência dos sítios *attB1* (GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT) e *attB2* (GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT) e 0,5 µL da reação 2.

As reações de PCR foram realizadas com uma DNA polimerase de alta fidelidade *Invitrogen™ Platinum™ SuperFi™ DNA Polymerase*. A reação foi realizada com a seguinte composição: tampão de amplificação *SuperFi™ 1X*, solução *GC enhancer SuperFi™ 1X*, dNTP 0,2mM cada, *primers* 0,5µM cada, *SuperFi™ DNA polimerase* 0,02U e amostra de

cDNA 50ng. A primeira reação prosseguiu com a seguinte programação: desnaturação a 98°C por 2 min seguido por 25 ciclos de 10 seg de desnaturação a 98°C, 10 seg de anelamento na temperatura específica do *primer* e 1min de extensão a 72°C e um ciclo de extensão final a 72°C por 5 min para todos os genes. A segunda e terceira reação prosseguiram com as mesmas condições da primeira, exceto pela redução do número de ciclos para 15.

**Tabela 3:** Sequência dos *primers* utilizados para amplificação das sequências dos genes selecionados da família NPF para estudo da localização subcelular e superexpressão em plantas de arroz.

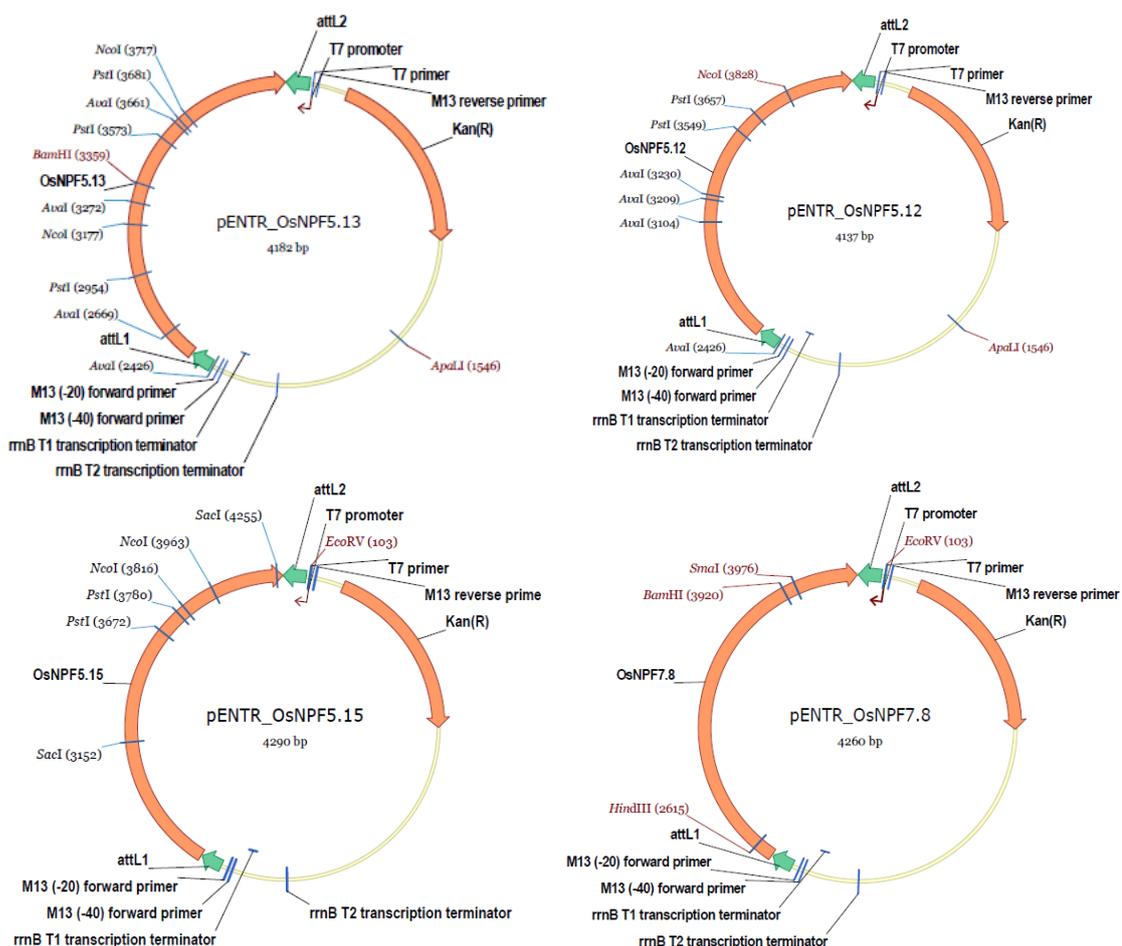
Gene	Primer	1ª reação (5'-3')	TM	2ª reação (5'-3')	TM
<i>OsNPF</i> 5.12	F	CTCCGAATCAGTACCCCTTCCAC	61	<u>AAAAAAGCAGGCTAT</u> ATGGCGTC GGGCTCCACC	61
	R	<u>CAAGAAAGCTGGGTATTGAACAT</u> CGACAACCTTTCTCCT		<u>CAAGAAAGCTGGGTATTGAACATC</u> GACAACCTTTCTCCT	
<i>OsNPF</i> 5.13	F	GCCAGTGATCCACCAGAGAC	57	<u>AAAAAAGCAGGCTAT</u> ATGGCCAG CCACGCCGTCA	57
	R	<u>CAAGAAAGCTGGGTACATGACAT</u> CACAACCGT		<u>CAAGAAAGCTGGGTACATGACAT</u> CACAACCGT	
<i>OsNPF</i> 5.15	F	GCTGCGGCTAGTTGTGTGCG	59	<u>AAAAAAGCAGGCTAT</u> ATGCCTTCC GGCTCCGACT	59
	R	<u>CAAGAAAGCTGGGTAACAGGACG</u> TAGAAGTTGCGAGGA		<u>CAAGAAAGCTGGGTAACAGGACG</u> TAGAAGTTGCGAGGA	
<i>OsNPF</i> 7.8	F	AGAAAGGTGGTGGTAGGGGA	61	<u>AAAAAAGCAGGCTTA</u> ATGAGCAT GAATAATATGAT	61
	R	TGGTAGTGGCTAGGGATGAGA		<u>CAAGAAAGCTGGGT</u> AGGGATGA GAAGAAGA	
<i>attB1</i>	F	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAG CAGGCT	55		
<i>attB2</i>	R	GGGACCACTTTGTACAAGAAAG CTGGGT	55		

**Nota:** sublinhado corresponde à metade da sequência do sítio de recombinação, letras coloridas são os códons de iniciação em F e terminação em R.

Após a primeira e a segunda etapa da PCR, o tamanho do fragmento e a qualidade da amplificação foram confirmados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed. Em seguida o produto da PCR foi purificado utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* da Promega®, a fim de remover o excesso ou dímeros de *primers* e possíveis amplificações inespecíficas que poderiam prejudicar o anelamento dos *primers* da próxima reação. Na última etapa, terceira reação, o produto da PCR foi submetido a uma eletroforese no sistema *E-Gel™ CloneWell™ II Agarose Gels* com *SYBR Safe*, 0.8% da *Thermo Scientific*, que realiza a purificação e retirada do fragmento correspondente ao gene de interesse.

### 2.1.2 Reação BP – obtenção dos vetores de entrada

Após a amplificação do gene de interesse com os sítios de recombinação *attB1* e *attB2* foi realizada a primeira etapa da clonagem, reação BP, responsável por unir os sítios *attB* dos fragmentos de interesse com os sítios *attP* do vetor doador pDONR221, para criação dos vetores de entrada pENTR (Figura 10).



**Figura 10:** Esquema ilustrativo dos vetores de entrada obtidos a partir da reação BP, a serem utilizados na reação de recombinação LR para formação do clone de expressão. Kan<sup>®</sup> - resistência ao antibiótico Canamicina; *attL1* e *attL2* – sítios de recombinação. *SacI*, *EcoRV*, *SmaI*, *BamHI*, *NcoI*, *AvaI*, *PstI* – sítios de cortes por enzimas de restrição; M13 – primers universais para sequenciamento.

Nesta parte foi utilizado o kit *Gateway™ BP Clonase™ II Enzyme mix (Invitrogen™)*, seguindo as orientações do fabricante. Em um microtubo de 1,5 mL, foram adicionados: 5 µL do produto amplificado e purificado (gene), contendo os sítios attB, 1 µL do vetor pDONR211, 2 µL do tampão de reação BP e 2 µL do mix de enzimas *BP clonase*. A mistura da reação foi homogeneizada vagarosamente por pipetagem e a reação ocorreu à temperatura ambiente *overnight*. Depois deste período a reação foi paralisada pelo tratamento com 1 µL de Proteinase K a 37°C durante 10 min.

Com os vetores de entrada obtidos na reação BP foi realizada a transformação de células competentes de *E. coli* (DH5α) visando a multiplicação dos vetores. Para isso, misturou-se a reação BP (2 µL), com 50 µL de células competentes de *E. coli*, que foi deixado em descanso no gelo por 5 min. Após este período a mistura foi submetida a eletroporação sob 1.700V, logo em seguida, misturada com 600 µL de meio SOC (2% tryptone, 0.5% extrato de levedura, 8.56mM de NaCl, 2,5mM de KCl, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 20mM de glucose). O meio foi mantido a 37°C por 1h em agitador orbital a 150 rpm para multiplicação celular. Para seleção das bactérias transformadas, 100 µL do caldo bacteriano foi riscado em meio LB contendo 50 µg. mL<sup>-1</sup> de Canamicina e mantido *overnight* a 37 °C. No dia seguinte foram selecionadas colônias isoladas repicadas em meio LB líquido, parte foi utilizada para extração dos vetores com o kit

*PureYield™ Plasmid Miniprep System Technical Bulletin* (Promega®) e parte foi estocada com glicerol 10% em freezer -80 °C.

Após a extração dos vetores, foram desenhados *primers* complementares que cobrissem a sequência do gene no vetor (Tabela 4). As amostras foram preparadas com 250 ug do vetor e 5 pg do *primer*, secas em *speed vacum* (Eppendorf) e enviadas para sequenciamento na empresa ACTGene – Análises Moleculares (<https://actgene.com.br/>).

**Tabela 4:** Sequência de *primers* utilizados no sequenciamento dos vetores de entrada obtidos da reação BP com os genes de transportadores de nitrato.

Nome do <i>primer</i>	Sequência (5'-3')
M13(-40)F	GTTTTCCAGTCACGAC
M13(-20)R	CAGGAAACAGCTATGAC
OsNPF5.12F1seq	GGCAAGTTTGCCGGTCTTC
OsNPF5.12F2seq	TTCCCGATATGGGCGACGTG
OsNPF5.13F1seq	TTCTACGTGTCGCTGTACCTG
OsNPF5.13F2seq	GTTCTTCACGAAGCAGGCG
OsNPF5.13R1seq	TTCTGGTCGAACCTGGTCGG
OsNPF7.8F2seq	ATGGACACGAGGGTGTTCGG
OsNPF7.8F1seq	TCTTCAGCTGGTTCTTCGGC
OsNPF7.8R1seq	GTTCTGCTCCACCCACGATA
OsNPF5.15F1seq	CTCGACCTTGATCTCCACCG
OsNPF5.15F2seq	TTCAGCACGGGAGTAGAGGA

### 2.1.3 Preparo de Células competentes para eletroporação (DH5α e DB3.1)

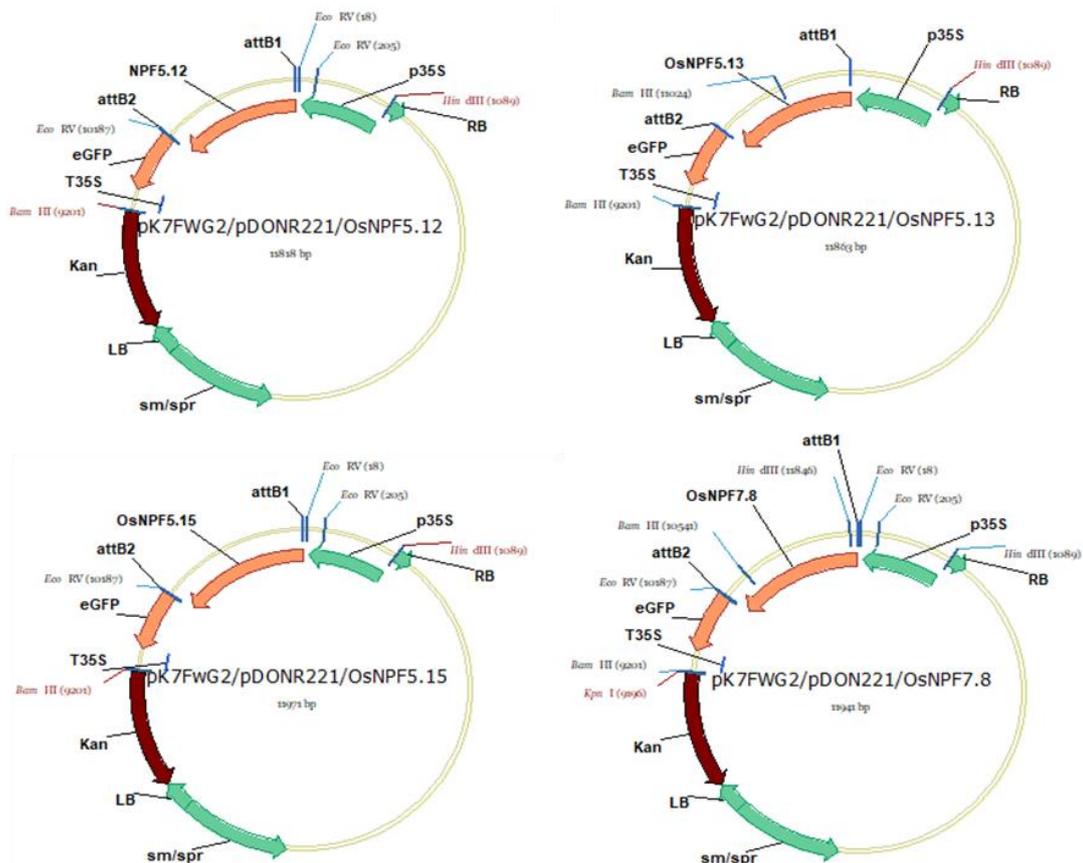
Células competentes *E. coli* (estirpe DH5α) são utilizadas para eletroporação e multiplicação dos vetores com as construções gênicas de interesse. Entretanto, quando é necessário multiplicar vetores doadores ou vetores de entrada vazios, ou seja, sem adição do gene de interesse, é necessária utilização de células competentes da estirpe DB3.1 que possui resistência ao gene *ccdb*, responsável pela morte da célula não transformada.

Para multiplicação das células competentes riscou-se uma placa contendo meio LB sólido que foi mantida *overnight* a 37 °C. Após esse tempo foi selecionada uma colônia isolada e repicada em 5 mL de meio LB líquido, mantido sob agitação constante a 150 rpm e 37 °C *overnight*. No dia seguinte 3 mL desta cultura fresca foi inoculada em 300 mL de meio LB líquido em erlenmeyer de 2 L e mantido em agitador orbital a 150 rpm em 37 °C até a cultura atingir DO<sub>600</sub> entre 0,5 e 0,8. Foram necessárias 6 horas de cultivo para alcançar este crescimento. Em seguida o volume total foi transferido para seis tubos falcon de 50 mL, as células foram precipitadas com centrifugação por 15 min. a 4000 x g e 4 °C, o sobrenadante foi descartado e procedeu-se a lavagem com água destilada estéril gelada, iniciando com um volume de 50 mL seguido pela centrifugação para retirada dos sais. O precipitado foi ressuspensão em 25 mL de água destilada, reunido em três tubos e centrifugado novamente. Então as células foram ressuspensas em 2 mL de glicerol 10% gelado, transferidas para um único tubo e centrifugadas novamente. Por fim o precipitado foi solubilizado em 550 µL de glicerol 10% gelado, particionado em alíquotas de 50 µL e mantido em freezer -80 °C para uso posterior.

### 2.1.4 Reação LR – obtenção dos vetores destino *pK7FWG2:NPF:GFP*

A reação de LR foi realizada utilizando o kit “Gateway LR Clonase II Plus Enzyme Mix” (Invitrogen). Em um microtubo de 1,5 mL foram adicionados: 12,5 fmoles do vetor *pENTR\_NPF?* (obtido na reação BP), e 25 fmoles do vetor de destino *pk7FWG2* (KARIMI, et al. 2002). O volume foi elevado para 8  $\mu$ L com TE 1X pH 8,0 (10 mM de Tris-Hcl + 1mM de EDTA) e adicionado 2  $\mu$ L do mix de enzimas. A mistura da reação foi homogeneizada vagarosamente por pipetagem e a reação ocorreu à temperatura ambiente durante a noite, sendo paralisada no dia seguinte com aplicação de 1  $\mu$ L de Proteinase K e submetido a 37°C durante 10 min.

A fim de caracterizar os clones obtidos (Figura 11) foi realizada a transformação de *E.coli* como descrito anteriormente para a reação BP (item 2.1.2). O volume total obtido após transformação foi plaqueado em meio LB contendo Espectinomicina (Sm) 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> e Estreptomicina (Sp) 20  $\mu$ g. mL<sup>-1</sup> para seleção das células transformadas com o vetor levando a construção gênica. A confirmação da clonagem foi feita por digestão dos plasmídeos com a enzima de restrição adequada a cada construção.



**Figura 11:** Esquema ilustrativo dos vetores de expressão obtidos após a reação LR, para superexpressão dos genes fusionados com a proteína de fluorescência GFP.

## 2.2 Obtenção de Plantas Transformadas com Superexpressão dos Genes

### 2.2.1 Preparação e transformação de células de *A. tumefaciens* competentes

O estoque de *A. tumefaciens* (estirpe LBA4404) foi riscado em meio YEB sólido (5 g/L de extrato de carne, 1 g/L de extrato de levedura, 1 g/L de peptona, 5 g/L de sacarose, 0,002 g/L de MgSO<sub>4</sub>, 1,5% ágar, pH 7,4) contendo Rifamicina (Rf) e incubado a 28° C por 48 horas.

Com ajuda da alça de platina flambada foi transferida uma colônia isolada para tubo falcon de 50 mL, contendo 3 mL de meio YEB com Rf, que foi incubado a 28° C sob agitação (150 rpm) por 48 horas. Pela manhã, 2 mL da cultura fresca foi inoculada em 50 mL de meio YEB contendo Rf em erlemeyer de 250 mL. A inoculação foi realizada a 28°C sob agitação de 150 rpm, até atingir uma DO<sub>600</sub> de aproximadamente 0,6. A cultura foi dividida em dois tubos falcon de 50 mL e incubada no gelo por 20 min. Em seguida, as células foram precipitadas a 1.000 xg por 5 min a 4° C, o sobrenadante foi descartado e o pellet resuspenso em 500 µL de solução contendo CaCl<sub>2</sub> a 20 mM e glicerol 10%. As células foram divididas em alíquotas de 100 µL, acondicionadas em microtubos estéreis de 1,5 mL e mantidas em freezer -80° C por até seis meses.

Para transformação de *A. tumefaciens* 1 µg da construção de interesse foi gentilmente misturada com 100 µL de células competentes de *Agrobacterium* e incubadas no gelo por 30 minutos. As células com os plasmídeos foram então congeladas em nitrogênio líquido por 5 minutos e em seguida submetidas a 37 °C em banho-maria por mais cinco minutos. Após esse tempo, foi adicionado 1 mL de meio YEB líquido (extrato de carne 5 g L<sup>-1</sup>, extrato de 1 g L<sup>-1</sup>, peptona 5 g L<sup>-1</sup>, sacarose 5 g L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 0,5 g L<sup>-1</sup>) e incubado em agitador orbital por duas horas a 28 °C. A cultura foi então plaqueada em meio YEB sólido contendo os antibióticos Rifamicina/Gentamicina (seleção da *Agrobacterium*) e Espectinomicina (Sm) (seleção da construção) e incubadas a 28 °C até o aparecimento de colônias (2 a 3 dias). As colônias crescidas foram confirmadas por PCR de colônia e estocadas em freezer - 80 °C em glicerol 15%.

## 2.2.2 Transformação Genética de calos de Arroz

A transformação de plantas de arroz foi realizada com base no protocolo de Toki, et al. (2006) com modificações. Foram descascadas e desinfestadas ~300 sementes de arroz da Nipponbare. As sementes foram lavadas em 40 mL de etanol (70%), por um minuto. Em seguida, foram realizadas duas lavagens de 15 min. cada, com hipoclorito de sódio (2,5%), onde a primeira recebeu Tween 20 (0,05%) e a segunda foi feita sem o detergente. O hipoclorito foi removido lavando com água estéril por seis vezes durante um minuto cada.

As sementes foram distribuídas em 12 placas de Petri com 25 sementes cada. Na primeira etapa as sementes passaram por um processo de indução de calos embriogênicos em meio de cultivo N6D (2,83mg/L KNO<sub>3</sub>, 463mg/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 185mg/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 166mg/L CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 400mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 37,3mg/L Na<sub>2</sub>EDTA, 27,8FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 4,4mg/L MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 1,5mg/L ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,8mg/L KI, 1,6mg/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 300mg/L Casaminoácidos, 2,0mg/L Glicina, 2,878mg/L L-prolina, 100mg/L myo-inositol, 0,5mg/L ácido nicotínico, 0,5mg/L Pyridoxine HCl, 1,0mg/L Thiamine HCl, 30g/L sacarose, 2mg/L 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid,) onde foram mantidas a 32°C por duas semanas para obtenção dos calos.

Após este período, foi realizada uma repicagem dos calos para novas placas contendo meio de cultivo N6D por três dias com o objetivo de aumentar a quantidade e a atividade dos calos embriogênicos. Durante este tempo a *Agrobacterium* transformada contendo a construção de interesse, foi plaqueada em meio AB (1g/L NH<sub>4</sub>Cl, 296mg/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 10mg/L CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1,3g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 3g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150mg/L KCl, 2,5FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 5g/L glicose).

Após os três dias, uma solução foi preparada a partir do cultivo recente de *A. tumefaciens*, com meio AMM (250mg/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 150mg/L CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 150mg/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 3g/L KCl, 40mg/L Fe<sub>2</sub>EDTA, 10mg/L MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 2,0mg/L ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,025mg/L CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,025mg/L CoCl<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,75mg/L KI, 3,0mg/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,25mg/L Na<sub>2</sub>MO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 500mg/L Casaminoácidos, 7,5mg/L Glicina, 176,7mg/L L-arginina, 900mg/L L-glutamina, 300mg/L L-ácido aspártico, 100mg/L myo-inositol, 1,0mg/L ácido nicotínico,

1,0mg/L Pyridoxine HCl, 10mg/L Thiamine HCl, 68,5g/L sacarose, 20mg/L 3', 5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone, 36g/L glicose) até obter uma densidade ótica (DO<sub>600</sub>) de 0,1.

Os calos foram então submersos na solução contendo *A. tumefaciens* e homogeneizados por inversão durante três minutos. Após este contato, os calos foram colocados sobre papel filtro para drenagem do excesso de bactéria, depois foram dispostos sobre o meio de co-cultivo N6-As (2,83mg/L KNO<sub>3</sub>, 463mg/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 185mg/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 166mg/L CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 400mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 37,3mg/L Na<sub>2</sub>EDTA, 27,8mg/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 4,4mg/L MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 1,5mg/L ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,8mg/L KI, 1,6mg/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 300mg/L Casaminoácidos, 2,0mg/L Glicina, 100mg/L myo-inositol, 0,5mg/L ácido nicotínico, 0,5mg/L Pyridoxine HCl, 1,0mg/L Thiamine HCl, 30g/L sacarose, 2mg/L 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid, 20mg/L 3', 5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone, 10g glicose) contendo papel filtro + 0,5 mL de meio AMM, onde permaneceram por quatro dias no escuro a 25°C.

Posteriormente, os calos foram retirados do meio de co-cultivo, lavados cinco vezes com água destilada estéril e mais três vezes com solução de timentim (150 mg/L) para eliminação da *A. tumefaciens*. Após essa etapa os calos foram transferidos para o meio de seleção N6DH (2,83mg/L KNO<sub>3</sub>, 463mg/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 185mg/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 166mg/L CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 400mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 37,3mg/L Na<sub>2</sub>EDTA, 27,8mg/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 4,4mg/L MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 1,5mg/L ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,8mg/L KI, 1,6mg/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 300mg/L Casaminoácidos, 2,0mg/L Glicina, 2,878mg/L L-prolina, 100mg/L myo-inositol, 0,5mg/L ácido nicotínico, 0,5mg/L Pyridoxine HCl, 1,0mg/L Thiamine HCl, 30g/L sacarose, 2mg/L 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid), onde permaneceram por duas semanas a 32°C com luz contínua. Além dos nutrientes, foram adicionados ao meio de seleção o antibiótico timentim (150 mg/L) para a completa eliminação da *A. tumefaciens* e Canamicina (50 mg/L) para eliminar os calos não transformados.

Os calos que apresentaram desenvolvimento vigoroso no meio de seleção foram transferidos para o meio de regeneração RE-III (1,9mg/L KNO<sub>3</sub>, 1,65mg/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 370mg/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 440mg/L CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 170mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 37,3mg/L Na<sub>2</sub>EDTA, 27,8mg/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 22,3mg/L MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 8,6mg/L ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,025mg/L CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,025mg/L CoCl<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,83mg/L KI, 6,2mg/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,25mg/L Na<sub>2</sub>MO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 2g/L Casaminoácidos, 2,0mg/L Glicina, 100mg/L myo-inositol, 0,5mg/L ácido nicotínico, 0,5mg/L Pyridoxine HCl, 1,0mg/L Thiamine HCl, 0,02mg/L 1-Naphthylacetic acid, 2,0mg/L cinetina, 30g/L sacarose, 30g/L sorbitol) por 14 dias, onde foi possível obter plântulas transformadas com poucas raízes.

As plântulas com cerca de três centímetros foram transferidas para meio de indução de raízes HF (1,9mg/L KNO<sub>3</sub>, 1,65mg/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 370mg/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 440mg/L CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 170mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 37,3mg/L Na<sub>2</sub>EDTA, 27,8mg/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 22,3mg/L MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 8,6mg/L ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,025mg/L CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,025mg/L CoCl<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,83mg/L KI, 6,2mg/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,25mg/L Na<sub>2</sub>MO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 2,0mg/L Glicina, 100mg/L myo-inositol, 0,5mg/L ácido nicotínico, 0,5mg/L Pyridoxine HCl, 1,0mg/L Thiamine HCl, 30g/L sacarose) onde permaneceram por mais três semanas até serem transferidas para copos de 300mL contendo substrato umedecido. Os copos foram cobertos com outro copo a fim de manter a temperatura e umidade controlada e levados para casa de vegetação. Após uma semana foi realizada aclimação das plantas com a retirada progressiva do copo superior e em duas semanas o desenvolvimento da raiz foi perceptível e as plantas transformadas foram transferidas para vasos de 7L contendo Chernossolo e cultivadas até o final do ciclo para obtenção de sementes.

Cada plântula regenerada no cultivo *in vitro* representou uma linhagem independente (L#1, L#2, L#3 e assim por diante), essas primeiras linhagens obtidas são denominadas geração (T1). A geração T1 foi então cultivada em casa de vegetação para a obtenção das sementes. Ao final do ciclo de cultivo cada linhagem separadamente deu origem às sementes da geração T2,

que passaram por processo de confirmação da transformação (seleção pela resistência a canamicina). As sementes foram secas em estufa a 37°C por sete dias e depois conservadas em geladeira a aproximadamente 4°C.

### 2.2.3 Confirmação das plantas mutantes transformadas

Para identificação da eficiência da superexpressão foi realizada extração de RNA total de amostras da folha 3 (2ª folha abaixo da folha bandeira) das linhagens T1 obtidas e comparadas com amostra de plantas não transformadas regeneradas de calos que não foram infectados com *Agrobacterium*. A extração do RNA total foi realizada de acordo com Sperandio, et al. (2011) com modificações descritas no item 2.7 (Capítulo I). O RNA foi tratado com DNaseI do Kit “*Amplification Grade DNase I*” da Sigma e o cDNA foi obtido com o kit “*High Capacity RNA-to-cDNA Kit*” da *Life Technologies* (metodologias descritas em detalhes no item 2.7 do Capítulo I).

A análise de expressão dos genes foi realizada por PCR em tempo real seguindo as orientações do fabricante descrito no item 2.8 (Capítulo I) e utilizando os *primers* indicados na Tabela 5.

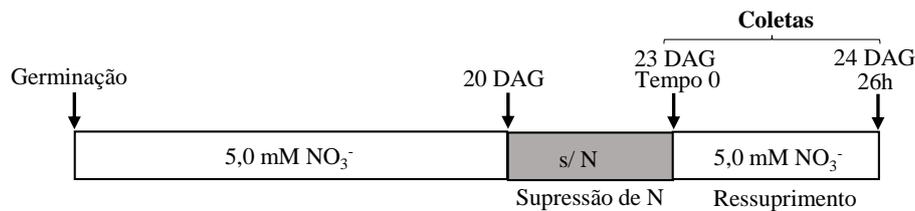
**Tabela 5:** Sequências dos *primers* utilizados na PCR em tempo real para confirmação da superexpressão na primeira geração das linhagens de arroz obtidas pela transformação genética via *A. tumefaciens*.

GENE	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Accession Number
<i>OsNPF7.8</i>	GGAGTTCCTCTACGGCGAGG	CGAGTTGACGTAGAAGCCGA	<i>LOC_Os10g42900.1</i>
<i>OsNPF5.13</i>	GTTCCGCAACAACCTCAACC	CAACCGTTGTGAGGAACCCT	<i>LOC_Os01g65100.3</i>
<i>eEF1-α</i>	TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT	GACTTCCTTCACGATTCATCGTAA	<i>LOC_Os03g08020</i>
<i>OsUBQ5</i>	ACCACTTCGACCGCCACTACT	ACGCCTAAGCCTGCTGGTT	<i>LOC_Os01g22490</i>
<i>OsACT2</i>	CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA	CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA	<i>LOC_Os10g36650</i>

### 2.2.4 Efeito da Superexpressão do transportador *OsNPF7.8* no metabolismo de N e avaliação dos parâmetros cinéticos envolvidos na absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

As sementes das linhagens (2ª geração-T2) de arroz transformadas superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* (L#1, L#4 e L#15) e tipo selvagem (WT) foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) durante 20 minutos, depois lavadas repetidas vezes em água destilada. Essas sementes foram acondicionadas sobre gaze em potes de 3,7 L e colocadas para germinar em água destilada na câmara de crescimento. Sete dias após a germinação as plantas foram transferidas para potes de 1 L, colocando quatro plantas por pote fixadas com espuma em discos de isopor e conduzidos em sistema hidropônico com solução de Hoagland; Arnon (1950) modificada a ½ FI com 5,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. A solução nutritiva foi trocada a cada três dias, aos 20 dias após a germinação (DAG), as plantas foram submetidas a uma solução sem N por 72 horas. Após este tempo os vasos foram então divididos em dois grupos: onde o primeiro foi coletado e o segundo recebeu solução contendo 5,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 12).

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento no Departamento de Solos da UFRRJ. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições de cada linhagem, totalizando 64 potes. As plantas foram submetidas a um fotoperíodo de 14h/10h (luz/escuro) com aproximadamente 200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de fótons fotossinteticamente ativo, umidade relativa do ar de 70% e temperatura de 28°C/26°C (dia/noite).



**Figura 12:** Esquema ilustrativo do sistema de condução do experimento conduzido em câmara de crescimento utilizando plantas de arroz das linhagens 1, 4 e 15 (#1, #4 e #15) transformadas com a construção *P35S:OsNPF7.8:GFP* com diferentes níveis de expressão do transportador *OsNPF7.8* e plantas do tipo selvagem (WT). DAG: dias após a germinação.

Para a obtenção dos parâmetros cinéticos, o pH e os níveis de  $N-NO_3^-$  na solução foram monitorados em intervalos de uma hora durante 26h. As amostras de solução nutritiva foram armazenadas em microtubos de 0,5 mL e o conteúdo de  $NO_3^-$  foi determinado pelo método proposto por Cataldo et al. (1975). Ao final do experimento o volume final da solução e a massa do sistema radicular foram determinados para o cálculo dos parâmetros cinéticos.

Os valores de  $V_{máx}$  e  $K_M$  foram estimados utilizando um processo gráfico-matemático proposto por Ruiz; Fernandes Filho (1992) com o software cineticawin1.0 desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa e disponível no site (<ftp://solos.ufv.br/cinetica>) em seguida submetidos à análise de variância e os valores médios comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, no programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

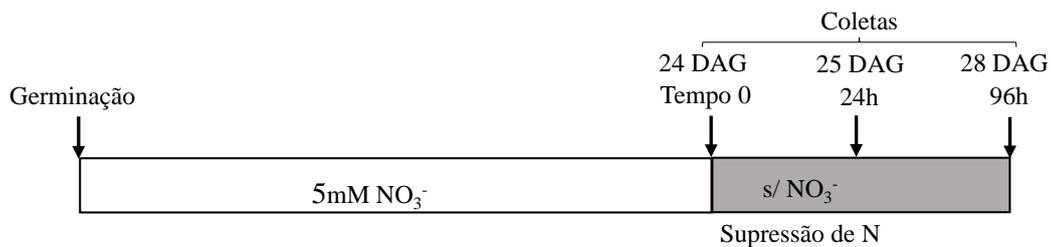
As plantas coletadas foram particionadas em raiz, bainha e folha, pesadas e separou-se uma amostra de raiz e folha que foi congelada em  $N_2$  líquido e armazenada a  $-80^\circ C$  para extração de RNA e análise de expressão gênica como descrito nos itens 2.7 e 2.8 do capítulo I. Uma amostra de 0,2g de raiz e folha foi destinada a análise da atividade da enzima nitrato redutase por método colorimétrico descrito por Jaworski (1971) e uma amostra de 0,25g foi destinada a análise das frações solúveis que foram extraídas por partição com clorofórmio de acordo com Fernandes (1984). O extrato obtido foi usado para determinação dos teores de N-amino livre,  $N-NH_4^+$ ,  $N-NO_3^-$  e açúcares solúveis utilizando os métodos descritos por Yemm; Cocking; Ricketts (1955), Felker (1977), Miranda, et al. (2001) e Yemm; Willis, (1954) respectivamente, como descrito no capítulo 1 item 2.6.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e os valores médios comparados pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade, no programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

### 2.2.5 Efeito da Superexpressão do transportador *OsNPF5.13* no metabolismo de N.

As sementes de arroz das linhagens transformadas (2ª geração-T2) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13* (L#12, L#21 e L#29) e tipo selvagem (WT) foram desinfestadas, germinadas e conduzidas em sistema hidropônico com solução de Hoagland; Arnon (1950) modificada a  $\frac{1}{2}$  FI com 5,0 mM de  $N-NO_3^-$  como descrito no item 2.2.4.

Aos 24 dias após a germinação (DAG), os vasos foram divididos em três grupos: o primeiro foi coletado e considerado tempo zero, as plantas dos outros dois grupos foram submetidas a uma solução sem fornecimento de N e então realizou-se coletas 24 e 96 horas após a troca, período de supressão de N (Figura 13).



**Figura 13:** Esquema ilustrativo do sistema de condução do experimento conduzido em câmara de crescimento utilizando plantas de arroz das linhagens 12, 21 e 29 (#12, #21 e #29) transformadas com a construção *P35S:OsNPF5.13:GFP* com diferentes níveis de expressão do transportador *OsNPF5.13* e plantas do tipo selvagem (WT). DAG: dias após a germinação.

As plantas foram particionadas em raiz, bainha e folha, pesadas e separou-se uma amostra de raiz e folha para extração de RNA e análise de expressão gênica como descrito no capítulo I itens 2.7 e 2.8. Uma amostra de 0,2g de raiz e folha foi destinada a análise da atividade da enzima nitrato redutase por método colorimétrico descrito por Jaworski (1971) e uma amostra de 0,25g foi destinada a análise das frações solúveis extraídas por partição com clorofórmio de acordo com Fernandes (1984). O extrato obtido foi usado para determinação dos teores de N-amino livre,  $N-NH_4^+$ ,  $N-NO_3^-$  e açúcares solúveis utilizando os métodos descritos por Yemm; Cocking; Ricketts (1955), Felker (1977), Miranda et al. (2001) e Yemm; Willis, (1954) respectivamente como descrito no capítulo 1 item 2.6.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e os valores médios comparados pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade, no programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

## 2.2.6 Extração de protoplastos de parte aérea de plântulas de arroz

As sementes de arroz da variedade Manteiga foram colocadas em estufa de circulação de ar a 45 °C por 1 hora, desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos, seguida por etanol 70% por 1 minuto e depois lavadas várias vezes com água destilada. Após a desinfecção, foram transferidas para potes com meio MS 1/2x e levadas para câmara de crescimento (BOD) com umidade relativa a 70% e temperatura 28°C com fotoperíodo 14 horas de luz e 10 de noite, até as plantas atingirem aproximadamente 20 cm de altura.

A extração dos protoplastos foi realizada segundo He, et al. (2016) e Yoo, Cho e Sheen, (2007) com adaptações. Utilizando uma lâmina de bisturi (n° 23) removeu-se as raízes de 20 plântulas de arroz com 10 dias após a germinação. Em seguida cortou-se o tecido da parte aérea em fatias de 0,5mm em placas de petri e adicionou-se 5 mL de solução D-manitol a 0.4M mantido sob agitação manual no escuro por 10 min. A solução foi removida cuidadosamente e os tecidos alocados em um tubo de ensaio contendo 5 mL de solução enzimática (1,5% celulase, 0,3% macerozyme, 0,4 M D-manitol, 2 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, 20 mM KCl, 10mM  $CaCl_2$ , 0,1% BSA, pH 5,7). Foi aplicado vácuo (-20kPa) com auxílio de uma bomba a vácuo, por 30 min para infiltração da solução enzimática, em seguida foi alocado em agitador orbital no escuro por 4 h com agitação gentil (60rpm). Amostras foram retiradas durante o período de incubação e preparou-se lâminas para conferir a liberação dos protoplastos.

Após esse tempo adicionou-se 5 mL de meio W5 (154 mM NaCl, 125 mM  $CaCl_2$ , 5 mM KCl, 2 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, pH 5,7 com KOH 1M) para ressuspender os tecidos e agitou-se gentilmente (80rpm) por 1h para liberar os protoplastos. A solução foi retirada cuidadosamente com a pipeta, e transferida para tubos falcon de 50 mL. Em seguida foi centrifugado a 1000 x g por 5 min a temperatura ambiente para coletar os protoplastos. O

sobrenadante foi removido sem alterar o pellet de protoplastos que foi ressuspensão em volume adequado de meio de suspensão (0.4 M manitol, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, pH 5,7) para obter a concentração de  $1.5-2.5 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>, que foi determinada em câmara de Neubauer.

### **2.2.7 Análise fenotípica e de produção das linhagens superexpressando os genes *OsNPF7.8* e *OsNPF5.13*.**

Um experimento foi realizado na casa de vegetação do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas com o intuito de avaliar a produção das linhagens na safra abril-agosto de 2021. Para isso, sementes de arroz das linhagens transformadas (2<sup>a</sup> geração - T2) superexpressando os transportadores de nitrato *OsNPF7.8* (L#1, L#4 e L#15), *OsNPF5.13* (L#12, L#21 e L#29) e do tipo selvagem (WT) foram desinfestadas e germinadas em água como descrito no item 2.2.4. Sete dias após a germinação (DAG) as plantas foram transferidas para vasos de 7 L contendo Chernossolo obtido de Pinheiral-RJ. Os vasos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições. A adubação foi realizada parcialmente aplicando o equivalente a 60 kg/ha de N (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), sendo metade aos 15 DAG e o restante 30 DAG.

Ao final do ciclo foram determinados os parâmetros fenotípicos: número de perfilhos, altura média dos perfilhos medida na folha bandeira e número de panículas. Em seguida as plantas foram coletadas separando parte aérea e panícula para determinação dos parâmetros de produção: número e peso de grãos cheios, chochos e total. Por fim, a parte aérea foi seca em estufa de circulação forçada de ar à 65°C para determinação da produção de massa seca.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e os valores médios comparados pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade, no programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

## **2.3 Localização Subcelular das Proteínas Fusionadas ao GFP**

### **2.3.1 Transformação dos protoplastos**

Para transformação dos protoplastos foram utilizados 2 µg do vetor de expressão (Figura 11) em 100 µL dos protoplastos ressuspensos e agitou-se gentilmente. Em seguida foi adicionado 100 µL de solução PEG 40% (40% (w/v) PEG 4000, 0.4 M D-mannitol, 100 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, pH 5.7) e homogeneizado gentilmente com a pipeta, utilizando ponteiros de 200 µL com a ponta cortada e incubado em temperatura ambiente por 20 min. Após esse tempo a amostra foi diluída em 1 mL de meio W5, agitada gentilmente e centrifugada a 100 x g por 3 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi então removido gentilmente, adicionou-se 1mL de meio W5 e incubou-se por 14 a 20h a 26 ou 28°C antes de detectar fluorescência. A fluorescência foi detectada em microscópio confocal.

### **2.3.2 Extração de protoplastos de calos embriogênicos transformados**

Tendo em vista a dificuldade com o rompimento dos protoplastos durante as centrifugações necessárias para transformação dos protoplastos descritas no item anterior, foi realizada a extração de protoplastos a partir de calos embriogênicos transformados via *A. tumefaciens*. A obtenção e transformação dos calos foi descrita nos itens 2.2.2 (Capítulo II).

Para a extração dos protoplastos, os calos resistentes à Canamicina foram retirados do meio de seleção, acondicionados em placas de petri contendo 1 mL de solução D-manitol a 0.4M e cortados em fatias finas (~0,5mm) com auxílio de uma lâmina gilete esterilizada. Os

calos cortados foram mantidos na solução por aproximadamente 10 min no escuro. Após esse tempo, a solução foi removida com auxílio de uma pipeta e o tecido foi transferido para tubos eppendorf de 2,0 mL e adicionou-se 1 mL de solução enzimática (1,5% celulase, 0,3% macerozyme, 0,4 M D-manitol, 2 mM 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid, 20 mM KCl, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1% BSA, pH 5,7). Foi aplicado vácuo (-20kPa) com auxílio de uma bomba a vácuo, por 30 min para infiltração da solução enzimática, em seguida foi alocado em agitador orbital no escuro por 4 h com agitação gentil (60rpm). Amostras foram retiradas durante o período de incubação e preparou-se lâminas para conferir a liberação dos protoplastos. Após esse tempo adicionou-se 1mL de meio W5 agitou-se o tubo e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo com uma pipeta com a ponteira cortada. As amostras foram pipetadas em lâminas de microscópio cobertas com lamínula e a fluorescência foi detectada em microscópio confocal.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Clonagem dos Genes e Construção dos Vetores de Superexpressão com GFP

A análise *in silico* da sequência dos genes de interesse mostrou que os mesmos apresentam elevada tendência de formar estruturas secundárias de enovelamento, de acordo com os valores negativos de energia da estrutura secundária das moléculas de RNA (

Tabela 6). O RNA é formado por uma fita simples de ribose acompanhadas de bases nitrogenadas (adenina, uracila, guanina e citosina) essas bases nitrogenadas estão ligadas umas as outras por ligações glicosídicas que formam estruturas secundárias de acordo com sua conformação originando a energia da estrutura secundária (MAXIMINIANO, 2017). Para que a sequência seja replicada ou transcrita essas ligações precisam ser quebradas pela enzima, de forma que quanto mais forte a energia da estrutura secundária maior a dificuldade da enzima para realizar a transcrição.

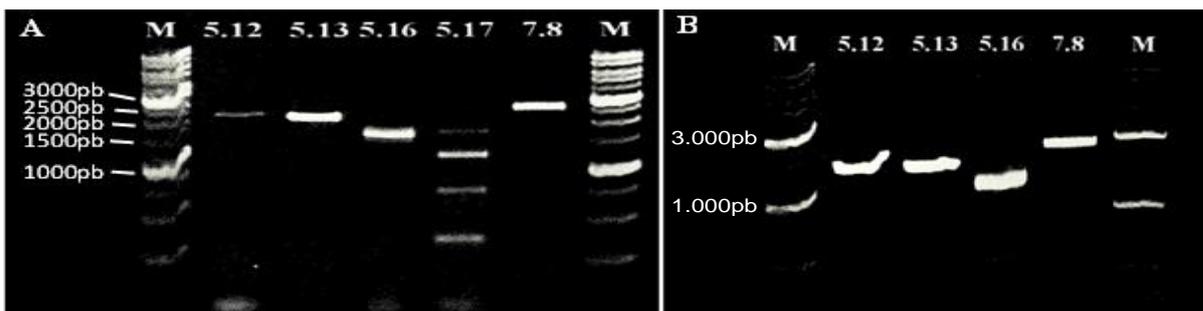
**Tabela 6:** Complexidade dos genes de transportadores NPF selecionados para estudo de localização subcelular e superexpressão em plantas de arroz.

Gene	Locus (RGAP/NCBI)	Length (pb)	%CG	Energia estrutura secundária (kcal/mol)
<i>OsNPF5.12</i>	LOC_Os05g35594.1/LOC4338880	1593	68,42	-803,3
<i>OsNPF5.13</i>	LOC_Os01g65100.3/LOC4324944	1700	67,11	-770,3
<i>OsNPF5.15</i>	LOC_Os05g35650.1/LOC4338881	1746	68,27	-846,9
<i>OsNPF5.16</i>	LOC_Os01g65200.3/LOC112937603	1086	53,95	-384,4
<i>OsNPF5.17</i>	LOC_Os01g65210.1/LOC9270493	2139	53,01	-801,2
<i>OsNPF7.8</i>	LOC_Os10g42900.1/LOC4349517	1716	65,79	-838,7

O arroz apresenta elevada complexidade genômica com genes extensos, compostos de elevado conteúdo de guanina (G) e citosina (C) e ampla variedade de genes derivados de *splicing* alternativo. De todos os 93 genes preditos da família de transportadores de baixa afinidade (*OsNPF*) de arroz, 18 genes estão sujeitos ao *splicing* alternativo com 36 isoformas diferentes de mRNA (HUANG, et al. 2019). Essas características aumentam a dificuldade da clonagem dos genes selecionados neste estudo, visto que apresentam todas essas complexidades (Figura 3, Capítulo I e

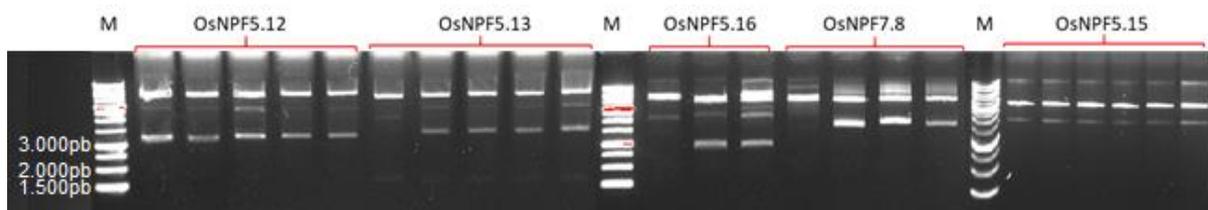
Tabela 6). Em razão disso, algumas medidas foram tomadas: escolheu-se trabalhar com apenas uma isoforma de cada gene, desenhando *primers* que fossem específicos para amplificar aquele fragmento e realizar a amplificação a partir da transcrito complementar (cDNA) do RNA mensageiro (RNAm).

A amplificação de todos os genes foi bem-sucedida (Figura 14). Todavia, para o gene *OsNPF5.17* não foi possível realizar a amplificação, pois o produto das reações de PCR teve muitos fragmentos inespecíficos.



**Figura 14:** Primeira e segunda reação de amplificação-PCR para clonagem dos genes de interesse *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.16*, *OsNPF5.17* e *OsNPF7.8*. A) primeira reação para amplificação do fragmento inteiro. B) segunda reação de PCR para restrição do fragmento aos códons de iniciação e terminação com fusão de metade do sítio de recombinação Gateway (*attB*). Gel de agarose 1%, corado com GelRed® e marcador de 1kb Avati.

Com o fragmento correspondente ao gene de interesse isolado e purificado, foi realizada a inserção no vetor doador pDONR221, por meio da reação de ligação do sítio B do fragmento de interesse ao sítio P do vetor doador pela metodologia *Gateway* de clonagem (Figura 10). Em seguida visando multiplicar o vetor com o gene foi realizada a transformação via eletroporação em *E. coli*. Foram obtidas cinco colônias com o vetor *pDONR221:OsNPF5.12*, cinco colônias com *pDONR221:OsNPF5.13*, três colônias de *pDONR221:OsNPF5.16*, quatro colônias com *pDONR221:OsNPF7.8* e seis colônias de *pDONR221:OsNPF5.15* (Figura 15). A correta amplificação e inserção do gene no vetor foi confirmada inicialmente por meio do uso de enzimas de restrição de corte único adequada para cada construção indicadas na Figura 10.

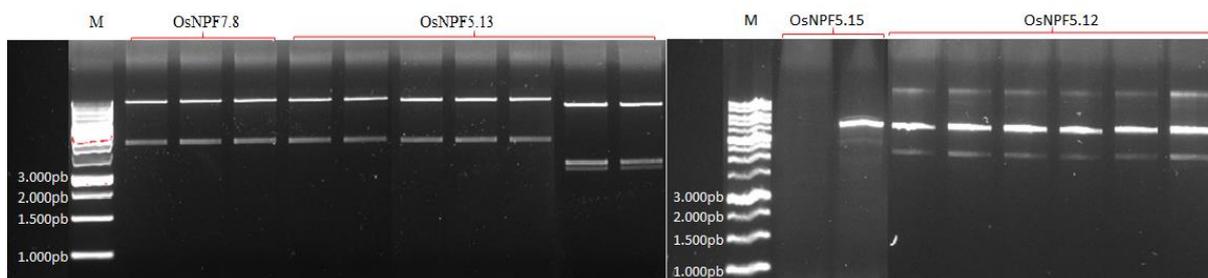


**Figura 15:** Gel de agarose contendo os produtos da digestão por enzimas de restrição das construções contendo o gene de interesse no vetor pDONR221 para criar o vetor doador dos genes *OsNPF7.8*, *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13*, *OsNPF5.15* e *OsNPF5.16*. Gel de agarose 1%, corado com GelRed® e marcador de 1kb.

Duas colônias de cada construção que apresentou restrição e liberação de fragmentos de tamanho esperado foram enviadas para sequenciamento. A análise dos resultados de cada sequência permitiu confirmar a construção dos vetores *pDONR221:OsNPF5.12*, *pDONR221:OsNPF5.13* e *pDONR221:OsNPF5.15*, *pDONR221:OsNPF7.8* com alinhamento completo de todas as bases. Para a construção *pDONR221:OsNPF5.16* foram obtidas três colônias, entretanto o resultado do sequenciamento não apresentou homologia completa com nenhum dos três *splicings* alternativos do gene disponível no banco de dados, ocorrendo amplificação incompleta do gene inviabilizando o uso dessa construção.

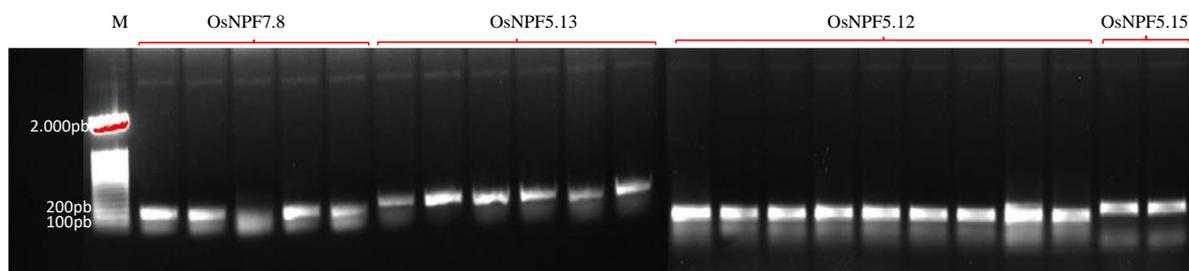
A segunda etapa do sistema *Gateway* consiste na fusão da construção do gene com a proteína de fluorescência GFP, unindo o vetor doador construído *pDONR221:gene* ao vetor *pK7FWG2* (Figura 11) formando a construção *p35S:gene:GFP* que foi multiplicada em células competentes de *E. coli*. Foram obtidas duas colônias com a construção *p35S:OsNPF7.8:GFP*, oito com o vetor *p35S:OsNPF5.13:GFP*, seis com o vetor *p35S:OsNPF5.12:GFP* e uma com

o vetor *p35S:OsNPF5.15:GFP* confirmadas por restrição com as enzimas *HindIII* e *BamHI* adequadas para as construções (Figura 16).



**Figura 16:** Gel de agarose dos produtos de digestão com enzimas de restrição das construções contendo o vetor pK7FWG2 fusionado aos genes de interesse *OsNPF7.8*, *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13* e *OsNPF5.15* com a proteína GFP. Gel de agarose 1%, corado com GelRed® e marcador de 1kb.

Em seguida, as construções inseridas em *A tumefaciens* estirpe LBA4404 e a confirmação da transformação foi feita por meio de PCR de colônia confirmando a eficiência da transformação, sendo três colônias utilizadas para transformar os calos embriogênicos de arroz (Figura 17).



**Figura 17:** Produto das reações de PCR das colônias com as construções do vetor pK7FWG2 com os genes de interesse *OsNPF7.8*, *OsNPF5.12*, *OsNPF5.13* e *OsNPF5.15* fusionados a proteína GFP. Gel de agarose 1%, corado com GelRed® e marcador de 100pb.

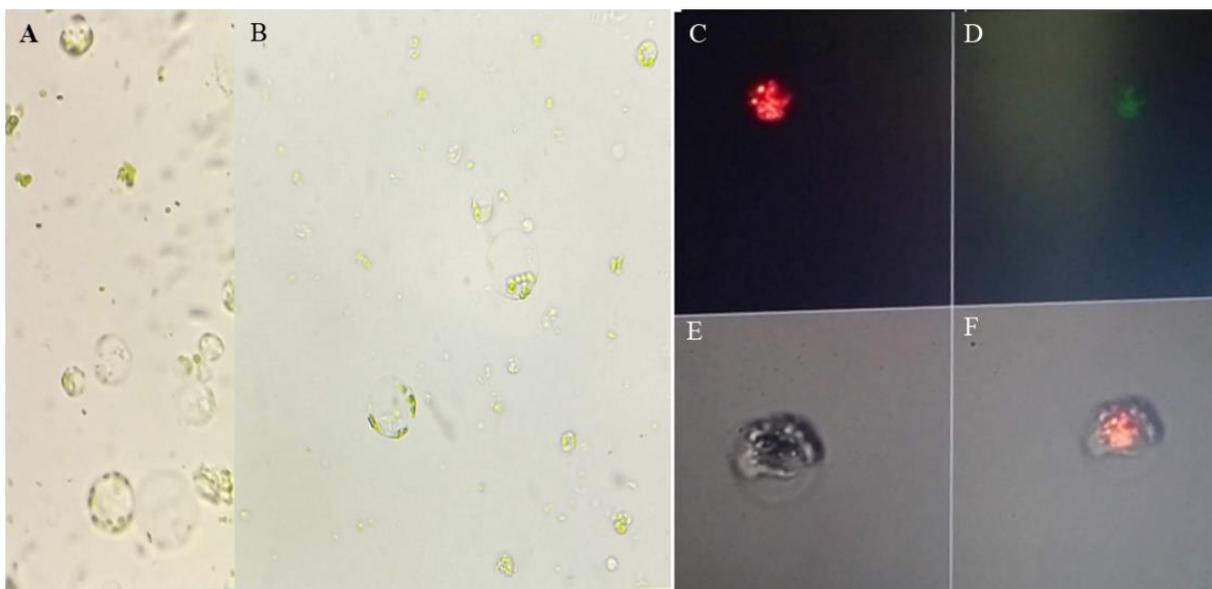
### 3.2 Extração de Protoplastos e Localização Subcelular

Protoplastos são células vegetais que tiveram a parede celular retirada devido a atuação de enzimas celulases, hemicelulases e pectinases. Por serem células vivas, com metabolismo ativo, os protoplastos são considerados ferramentas versáteis para experimentos baseados em células (SHAN, et al. 2019). A principal vantagem dos protoplastos é a possibilidade de inserir macromoléculas como DNA, RNA e proteínas diretamente através da membrana por meio de técnicas relativamente simples como o polietilenoglicol (PEG), eletroporação e micro injeção (YOO, CHO; SHEEN, 2007). Dessa forma, protoplastos são ideais para estudos de expressão gênica transiente e transformação transiente (ZHAO, et al. 2016).

Com o objetivo de realizar estudos de localização subcelular foi realizada a adaptação de protocolos para extração de protoplastos a partir de folhas e de calos embriogênicos de arroz. A extração de protoplastos de folhas foi bem sucedida e possibilitou a obtenção de elevado número de células por mililitro (mL) ( $\sim 1,2 \times 10^6$  protoplastos.mL<sup>-1</sup>) sendo possível identificar os compartimentos intracelulares, vacúolos e cloroplastos (Figura 18).

Entretanto, a transformação de protoplastos com os vetores contendo os genes fusionados à proteína de fluorescência GFP não resultou em células com emissão de sinal GFP e muitos protoplastos romperam durante o processo de transformação. Além disso, a extração

dos protoplastos a partir do tecido foliar contribuiu para elevada fluorescência natural proveniente dos cloroplastos (Figura 18).

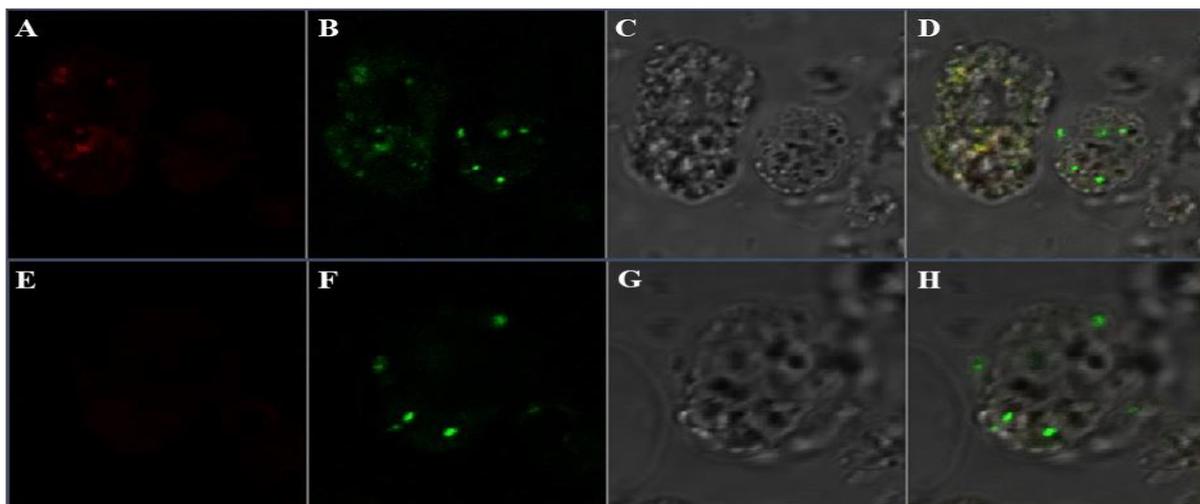


**Figura 18:** Protoplastos obtidos no desenvolvimento do protocolo de extração a partir de folhas de plântulas arroz com 11 dias após a germinação e tentativa de transformação genética com fusão de proteína de fluorescência GFP. A) e B) imagem de microscópio ótico com objetiva 40x; C) filtro de luz vermelha, demonstrando fluorescência natural dos protoplastos; D) célula sob incidência do filtro de luz azul; E) campo claro. F) filtros mesclados.

Buscando contornar esse entrave da transformação foram extraídos protoplastos a partir dos calos embriogênicos resistentes a Canamicina obtidos na transformação genética, resultando na visualização de protoplastos com menor emissão de fluorescência natural, visto que os calos não apresentam tecidos diferenciados em cloroplastos ou formação de pigmentos, o que facilitou a identificação do sinal GFP nas amostras (Figura 19).

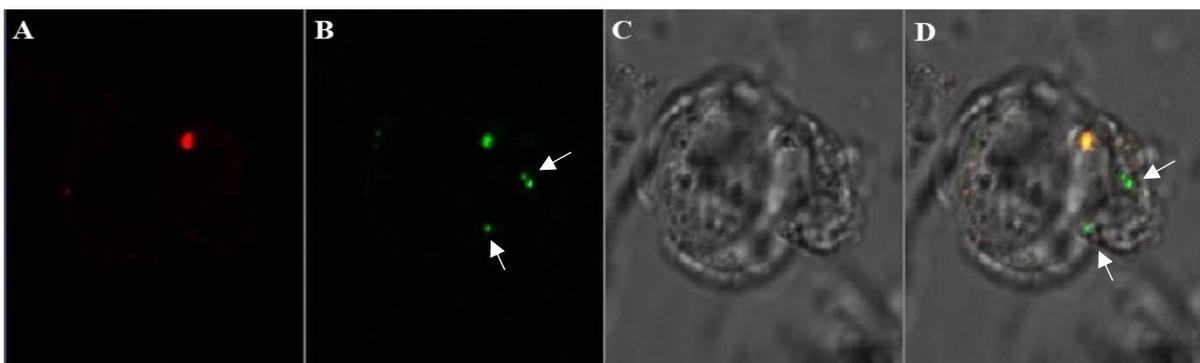
Foi possível identificar fluorescência correspondente a expressão do GFP nas amostras dos genes *OsNPF7.8* (Figura 20), *OsNPF5.12* (Figura 19) e *OsNPF5.15* (Figura 21). As amostras do gene *OsNPF5.13* tiveram uma baixa eficiência na extração de protoplastos, resultando na dificuldade de visualização de células transformadas.

Os protoplastos de calos transformados com a construção do gene *OsNPF5.12* demonstraram sinal de GFP aparentemente localizado no interior da célula (Figura 19). Entretanto, não foi possível obter uma imagem característica, onde predomina o vacúolo celular, como observamos na da amostra do gene *OsNPF5.15* (Figura 21). Situação semelhante à do gene *OsNPF5.12* foi observada para o gene *OsNPF7.8* (Figura 20) dificultando a determinação da localização subcelular.



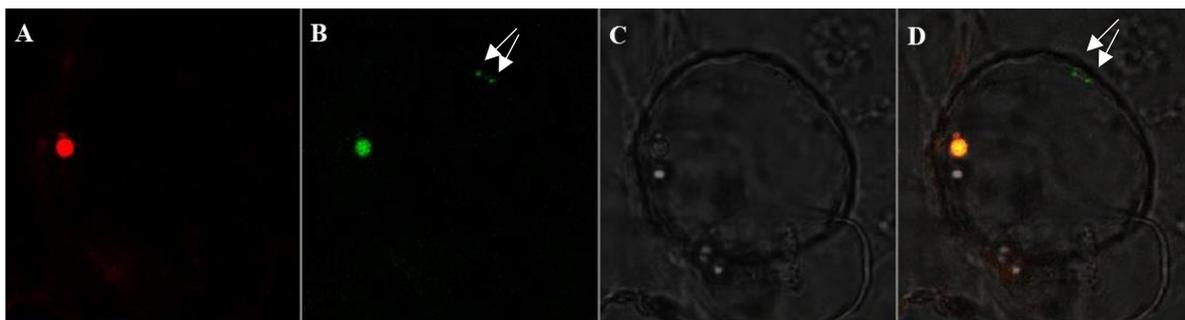
**Figura 19:** Protoplastos extraídos a partir de calos embriogênicos de arroz transformados com a construção *P35S:OsNPF5.12:GFP*. A e E) Filtro de luz vermelha, demonstrando fluorescência natural do protoplastos. B e F) Expressão da proteína *OsNPF5.12-GFP* em protoplastos de calo de arroz. C e G) campo claro. D e H) Filtros mesclados.

O sinal GFP identificado para todas as amostras foi menor que o esperado quando comparado aos resultados obtidos por Fang, et al. (2017), Hu, et al. (2016) e He, et al. (2016). A principal diferença entre estes trabalhos e os resultados obtidos é a transformação transiente direta dos protoplastos, o que teoricamente contribui para um maior número de cópias do gene dentro da célula e consequentemente maior sinal de fluorescência. A transformação permanente promove a superexpressão do gene, entretanto está sujeita aos controles endógenos de transcrição e tradução de proteínas o que pode contribuir para redução da expressão da proteína fusionada ao GFP.



**Figura 20:** Protoplastos extraídos a partir de calos embriogênicos de arroz transformados com a construção *P35S:OsNPF7.8:GFP*. A) Filtro de luz vermelha e fluorescência natural do protoplastos. B) Expressão da proteína *OsNPF7.8-GFP* em protoplastos de calo de arroz. C) campo claro. D) Filtros mesclados.

A amostra de protoplastos com a construção do gene *OsNPF5.15* foi a mais característica, é possível visualizar a célula e identificar a membrana plasmática e delimitação do vacúolo (Figura 21). O sinal de GFP identificado foi muito fraco, porém, é possível visualizar que os pontos de fluorescência se encontram na parte interna da célula (Figura 21 D) o que pode ser uma indicação de sua localização no vacúolo. Todavia, devido à baixa intensidade do GFP identificado não é possível realizar tal afirmativa.



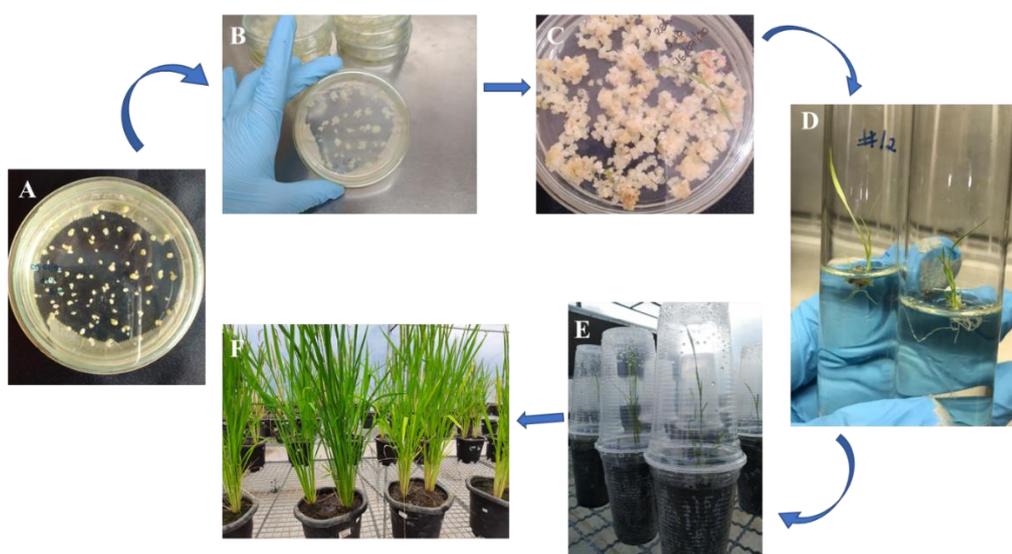
**Figura 21:** Protoplastos extraídos a partir de calos embriogênicos de arroz transformados com a construção *P35S:OsNPF5.15:GFP*. A) Filtro de luz vermelha e fluorescência natural do protoplastos. B) Expressão da proteína *OsNPF5.15-GFP* em protoplastos de calo de arroz. C) Campo claro. D) Filtros mesclados.

### 3.3 Transformação Genética de Arroz com as Construções para Superexpressão

A fim de caracterizar alterações no metabolismo de plantas de arroz provocadas pela superexpressão dos genes *OsNPF7.8* e *OsNPF5.13* foi realizada a transformação genética de plantas. O método escolhido para transferência do gene foi o método indireto, que utiliza *A. tumefaciens* para transferência do vetor a calos embriogênicos de Arroz.

A transformação via *A. tumefaciens* é um método de elevada eficiência e tem sido amplamente utilizada na engenharia genética de plantas buscando a inserção de genes (SABU; KHANAM; SUBITSHA, 2020; HIEI; ISHIDA; KOMARI, 2014; TOKI, et al. 2006).

O processo completo de transformação genética de plantas pode ser realizado em um período de 4 a 16 semanas, porém a eficiência de transformação em arroz ainda é variada entre 30 a 90% e há autores que a considerem elevada (LUU, et al. 2020; HIEI, et al. 2014; NISHIMURA; AICHI; MATSUOKA, 2007; TOKI, et al. 2006). De forma resumida, a transformação genética de plantas compreende as etapas de indução de calos, co-cultivo com *A. tumefaciens* transformada contendo a construção do gene desejado, seleção dos calos transformados, regeneração de parte aérea, indução de raízes e produção de sementes (Figura 22).



**Figura 22:** Etapas da transformação genética de plantas de arroz mediada por *A. tumefaciens* buscando a obtenção de linhagens superexpressando os genes *OsNPF7.8* e *OsNPF5.13* e *OsNPF5.15* fusionados à proteína GFP. A) Calos embriogênicos de arroz (var. Nipponbare) em

meio N6DH (meio de seleção) contendo antibióticos Canamicina e Timentin logo após a inoculação com *A. tumefaciens*; B) Calos em meio de seleção após 2 semanas a serem transferidos para o meio de regeneração de parte aérea (REIII); C) Formação de plântulas após 2 semanas em meio de regeneração; D) Transferência das Plântulas para meio de indução de raízes (HF) em tubos de ensaio; E) Transferência das plantas regeneradas (linhagens) para substrato e aclimatação em mini-estufa adaptada; F) Linhagens transferidas para vasos para cultivo até o final de ciclo e produção de sementes da geração T1.

Atualmente diversos protocolos estão disponíveis para transformação genética de arroz que diferem para cada gênero (*Indica* ou *Japonica*), variedade e método utilizado para indução de calos seja a partir de sementes maduras (TOKI, et al. 2006; NISHIMURA; AICHI; MATSUOKA, 2007; SAIKA; TOKI, 2010) ou embriões imaturos (HIEI; KOMARI, 2008; LUU, et al. 2020).

Apesar de ser uma técnica amplamente difundida, a primeira tentativa de transformação dos calos apresentou dificuldades na etapa de regeneração de plantas utilizando o antibiótico de seleção Canamicina, indicado para o vetor *PK7FWG2* (Figura 11), onde 95% das plantas regeneradas perderam a capacidade de produção de pigmentos conforme se desenvolviam ou regeneraram albinas (Figura 23). Com isso, essa primeira tentativa resultou em apenas uma linhagem resistente ao antibiótico e que chegou a produzir semente, a linhagem *OsNPF7.8#1*.



**Figura 23:** Etapa de regeneração de plantas do método de transformação genética via *A. tumefaciens*, meio de regeneração (REIII) contendo antibióticos Canamicina e Timentin. Em destaque plantas regeneradas que não produziram pigmentos, albinas.

A Canamicina é um antibiótico de seleção amplamente utilizado para seleção de linhagens transformadas em diferentes espécies de plantas como abacaxi (MA, et al. 2012), arroz (LUU, et al. 2020), trigo (RAZZAQ, et al. 2011) e milho (DU, et al. 2019). Há evidências da existência de níveis naturais de resistência a Canamicina em monocotiledôneas como o arroz, entretanto, diferentes autores relatam a eficiência desta na seleção de plantas transformadas (TWYMAN, et al. 2002; CAPLAN, et al. 1992; CHAKRABORTY, et al. 2016). O branqueamento da parte aérea e a dificuldade de regeneração de plantas utilizando Canamicina como antibiótico de seleção foi relatado por Ma, et al. (2012), encontrando 100% das plantas branqueadas em concentrações acima de 15mg/L de Canamicina no meio de regeneração para abacaxi. A concentração recomendada de Canamicina para seleção de plantas e empregada neste trabalho foi de 50mg/L. Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram

obtidos por Chakraborty, et al. (2014) onde a maioria das plantas obtidas foram albinas utilizando Canamicina (50mg/L) na regeneração de plantas transformadas de arroz.

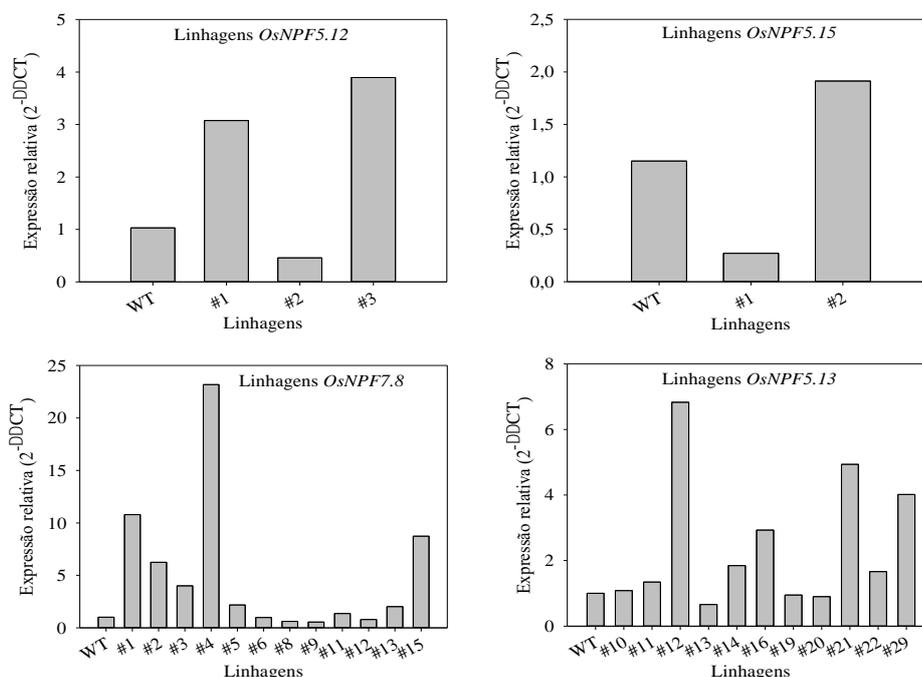
Devido as essas dificuldades encontradas, foi realizada uma segunda tentativa de transformação mantendo a seleção dos calos transformados em meio com Canamicina e alterando a etapa de regeneração das plantas, retirando o antibiótico do meio. Esta alteração permitiu obter um grande número de linhagens para cada construção (Tabela 7).

**Tabela 7:** Número de linhagens obtidas da transformação genética via *A. tumefaciens* buscando a superexpressão dos genes transportadores de nitrato.

Variedade	Gene	nº de linhagens 1ª geração - T1
Nipponbare	<i>OsNPF5.13</i>	24
Nipponbare	<i>OsNPF7.8</i>	11
Manteiga	<i>OsNPF5.12</i>	3
Manteiga	<i>OsNPF5.15</i>	2

A ausência do antibiótico de seleção, Canamicina, no meio de regeneração de plantas favorece o desenvolvimento de plantas não transformadas (Tabela 7). Devido a isso, foi determinada a expressão relativa dos genes nas linhagens da primeira geração (T1) utilizando como controle endógeno o gene da *Ubiquitina5* (*OsUBC-5*) e uma planta não transformada como controle.

A variedade Manteiga apresentou menor regeneração de plantas resultando em menor número de linhagens obtidas (5 linhagens, Tabela 7), para o gene *OsNPF5.15* apenas a linhagem #2 apresentou aumento nos níveis de expressão (Figura 24), enquanto para o gene *OsNPF5.12* foi possível identificar duas linhagens com maior expressão (#1 e #3, Figura 24). No entanto, em virtude da baixa expressão observada nas linhagens na primeira geração (T1) resolveu-se não continuar com o estudo destes genes.



**Figura 24:** Análise de expressão relativa em folha das linhagens T1 de arroz (var. Nipponbare) obtidas na transformação de plantas via *A. tumefaciens* visando a superexpressão dos genes

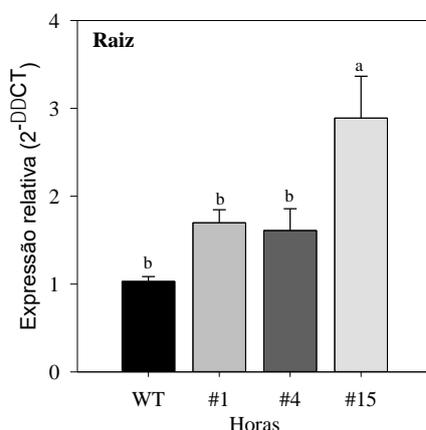
*OsNPF7.8* e *OsNPF5.13* e em folhas de plantas não transformadas (WT), cultivadas em vasos de 7L contendo Chernossolo sob adubação recomendada de 60 kgN/ha.

Quatro linhagens com a construção *p35S:OsNPF7.8:GFP* apresentaram expressão relativa maior que a WT (#1, #2, #4 e #15) e para o gene *OsNPF5.13* quatro linhagens apresentaram valores maiores de expressão (#12, #16, #21 e #29, Figura 24). Apenas três dessas linhagens com maior expressão foram selecionadas para avaliação do efeito da superexpressão no metabolismo de N.

### 3.4 Efeito da Superexpressão do Gene *OsNPF7.8* no Metabolismo de N e Absorção de $\text{NO}_3^-$

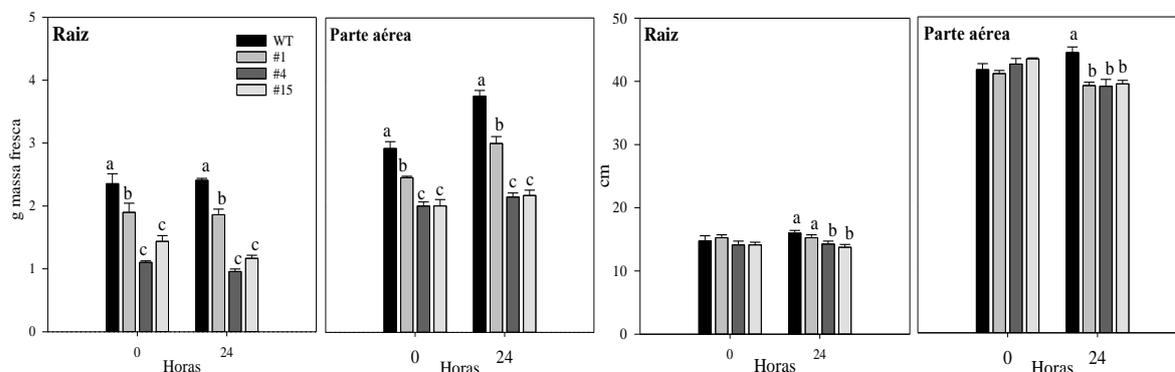
Recentemente genes da família *OsNPF7* tem despertado a atenção de pesquisadores por apresentarem atuação no influxo de  $\text{NO}_3^-$  e localização no vacúolo em plantas de arroz (OUYANG, et al. 2010; HU, et al. 2017; WANG, et al. 2018; HUANG, et al. 2018; HUANG, et al. 2019). O gene *OsNPF7.8* apresentou elevada similaridade com os genes *OsNPF7.1*, *OsNPF7.2*, *OsNPF7.3*, *OsNPF7.4* e *OsNPF7.7* na análise filogenética (Capítulo I, item 3.1), entretanto ainda não há informações sobre a atuação deste gene em plantas de arroz.

A análise de expressão gênica relativa identificou a redução expressiva na superexpressão obtida com a transformação genética nas linhagens da segunda geração (geração - T2) (Figura 25) quando comparada com as linhagens da geração T1 (Figura 24). É importante ressaltar que esse valor de expressão observado para o gene *OsNPF7.8* é resultado da expressão natural do transportador, que está sujeita a regulação somada a expressão do gene fusionado a proteína GFP sob controle do promotor p35S. Essa redução pode ser associada com a regulação biológica realizada pelos fatores de transcrição da própria planta e com a eficiência do promotor P35S em monocotiledôneas. Entretanto, mesmo com essa redução a linhagem #1 e #4 apresentaram 68 e 58% de aumento na expressão e a linhagem #15 apresentou aumento de 280%.



**Figura 25:** Expressão gênica relativa em linhagens de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* linhagens #1, #4, #15 obtidas pela transformação via *Agrobacterium tumefaciens* na segunda geração após transformação e planta do tipo selvagem (WT), cultivadas por 20 dias em solução nutritiva de Hoagland; Arnon (1950) com 5 mM  $\text{N-NO}_3^-$  e submetidas a privação de  $\text{N-NO}_3^-$  por 72 horas. As barras representam erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott ( $p < 0,05$ ). Todos os níveis de expressão foram normalizados quanto aos controles endógenos *OsUBC5* e *OsActin2*.

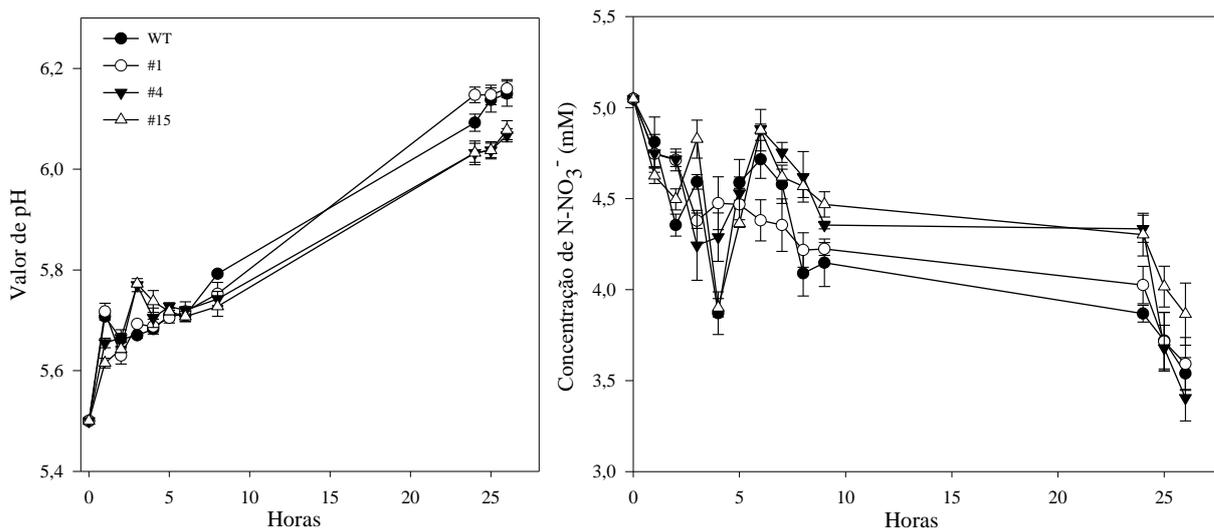
As linhagens transformadas apresentaram redução significativa no peso fresco de raiz (75%) e parte aérea (25%) (Figura 26). Tal redução da massa fresca corrobora os dados encontrados por Arruda, et al. (2018) analisando linhagens superexpressando o transportador *OsNPF4.11* (antigo *OsNRT1.2*) que atua no transporte de nitrato nos pelos radiculares e em regiões maduras da raiz (HUANG et al., 1999). Os resultados obtidos por esses autores apontaram que as linhagens priorizaram o acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes o que prejudicou o crescimento das plantas (ARRUDA, et al. 2018).



**Figura 26:** Valores de massa fresca, comprimento de raiz e parte aérea de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* linhagens #1, #4, #15 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de  $\text{N-NO}_3^-$  por 72h, sendo tempo zero as plantas coletadas imediatamente após esse tempo e 24 horas após o ressurgimento de  $\text{N-NO}_3^-$  (5,0 mM). As barras representam erro padrão das médias de quatro repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott ( $p < 0,05$ ).

A absorção de  $\text{NO}_3^-$  depende do transporte ativo via proteínas transportadoras do tipo simporte carregando o íon para célula juntamente com dois prótons ( $\text{NO}_3^-/2\text{H}^+$ ) o que o torna dependente da atuação das bombas de prótons para a manutenção do potencial eletroquímico da célula (SOUZA; FERNANDES, 2018). Ao avaliarmos o pH da solução nutritiva, podemos observar uma elevação acentuada dos valores de pH logo após a primeira hora, indicando a ocorrência de absorção de  $\text{NO}_3^-$  pelas plantas desde os primeiros momentos após a troca da solução refletindo a queda dos teores do íon na solução (Figura 27) evidenciando a ocorrência de absorção de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes. Isso demonstra a elevada sensibilidade do sistema de transporte.

O gene *OsNPF7.8* pertence a família de transportadores de baixa afinidade de  $\text{NO}_3^-$  que realizam o transporte sob condições de alta disponibilidade do íon (acima 1 mM) (LERAN, et al. 2014). Observando o pH da solução nutritiva podemos observar que inicialmente as linhagens e a planta não transformada (WT) apresentam comportamento semelhante, oito horas depois houve uma diferenciação das linhagens #4 e #15 que apresentaram menor absorção quando comparada com a linhagem #1 e WT (Figura 27). Apenas 23 horas após o início da observação, essa diferença pode ser vista mais claramente com maior incremento nos valores de pH da linhagem #1 e WT em resposta à maior absorção de  $\text{NO}_3^-$  que reflete nos menores teores do íon na solução. Contudo, no último ponto avaliado, às 26h houve uma redução acentuada nos teores de  $\text{NO}_3^-$  na solução da linhagem #4 ultrapassando as plantas WT (Figura 27).



**Figura 27:** Valor de pH e depleção das concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> na solução nutritiva durante o cultivo de plantas de arroz da (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* linhagens #1, #4, #15 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento de 5,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> após 72 horas de privação de N. Barras representam o desvio padrão das médias.

Quanto aos parâmetros cinéticos de absorção, a linhagem #4 apresentou maiores valores de  $V_{\max}$  quando comparada à WT (Tabela 8). A linhagem #15 maiores valores de  $K_m$ , entretanto, foram observados teores maiores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em solução e menor valor de  $V_{\max}$ . Os valores de  $K_m$  representam a afinidade do transportador pelo substrato, íon a ser carregado, enquanto a  $V_{\max}$  representa a velocidade máxima de transporte do íon quando todos os sítios de transporte estão ocupados (SOUZA; FERNANDES, 2018).

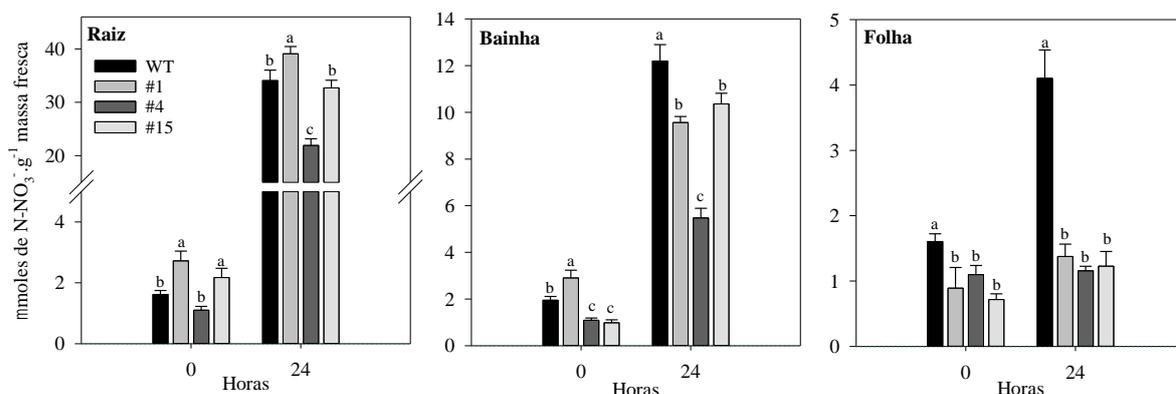
**Tabela 8:** Parâmetros cinéticos ( $V_{\max}$  e  $K_m$ ) da absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* linhagens #1, #4 e #15 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (5,0 mM) após 72 horas de privação de N.

Linhagens	$V_{\max}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )	$K_M$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
WT	90.5b	4405a
#1	76.1b	4190a
#4	183.4a	4430a
#15	79.2b	4495a

\* médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

Ferreira (2013) avaliando linhagens transformadas de arroz superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* identificou fortes alterações de  $K_m$ , mas não houve alterações significativas de  $V_{\max}$  na absorção de amônio. Ou seja, a superexpressão do *OsAMT1.3* promoveu melhoria na afinidade de transporte de amônio, mas não alterou a velocidade máxima de transporte. O gene *OsAMT1.3* é um transportador de alta afinidade de amônio, com maior expressão durante a deficiência de N (BAO, et al. 2015). Neste trabalho a linhagem #15 apresentou maior expressão relativa do gene *OsNPF7.8* (280% em relação a WT) e maior  $K_m$ , entretanto ocorreu menor absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Por outro lado, a linhagem #4 com aumento de 58% da expressão do gene *OsNPF7.8* apresentou aumento significativo na velocidade de transporte de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> quando comparadas as plantas não transformadas.

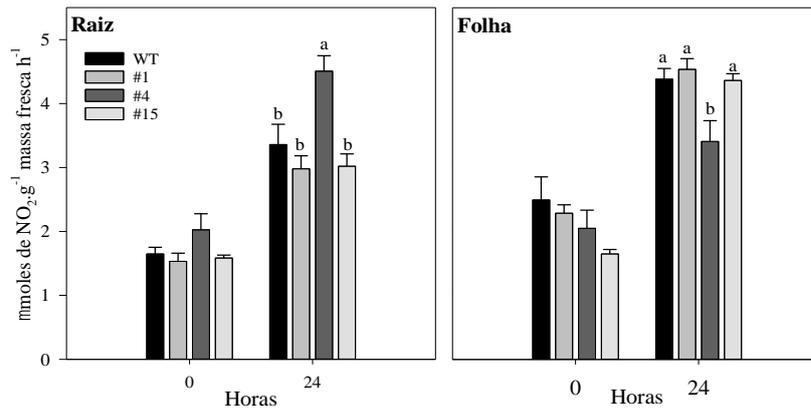
Devido à elevada similaridade do gene *OsNPF7.8* com outros transportadores da família *OsNPF7* encontrada no Capítulo I (item 3.1), incluindo *OsNPF7.7*, *OsNPF7.2*, *OsNPF7.3*, *OsNPF7.1* e *OsNPF7.4* que foram recentemente caracterizados com envolvimento no influxo de  $\text{NO}_3^-$  (OUYANG, et al. 2010; HU, et al. 2017; WANG, et al. 2018; HUANG, et al. 2018; HUANG, et al. 2019) esperava-se maiores teores do íon nas linhagens transformadas. Entretanto, apenas a linhagem #1 apresentou aumento significativo dos teores de  $\text{NO}_3^-$  no tecido da raiz, tanto após 72h de supressão de N quanto 24h após o ressurgimento (Figura 28). Tal aumento na linhagem #1 também foi observado no tecido da bainha após 72h de supressão de  $\text{NO}_3^-$ , porém o mesmo não sucedeu após o ressurgimento.



**Figura 28** Teores de nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ) em raiz, bainha e folha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* linhagens #1, #4, #15 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de  $\text{N-NO}_3^-$  por 72h, sendo tempo zero as plantas coletadas imediatamente após esse tempo e 24 horas após o ressurgimento de  $\text{N-NO}_3^-$  (5,0 mM). As barras representam erro padrão das médias de quatro repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott ( $p < 0,05$ ).

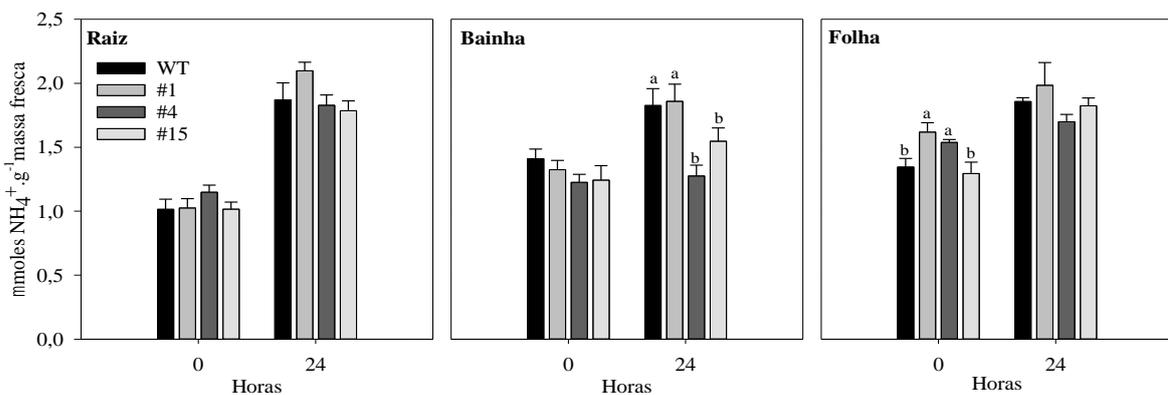
Os tecidos da bainha e folha das linhagens apresentaram teores significativamente menores de  $\text{NO}_3^-$ . Essa redução poderia estar relacionada a menor atividade de transporte em decorrência da fusão do transportador *OsNPF7.8* com a proteína de fluorescência GFP. Contudo, Chopin, et al. (2007) compararam linhagens de *A thaliana* superexpressando o gene *AtNRT2.7* fusionado ao GFP (*p35S:GFP-AtNRT2.7*) com linhagens sem a proteína GFP (*p35S:AtNRT2.7*) e identificaram atividade similar de influxo de  $^{15}\text{NO}_3^-$  em ambos mutantes, demonstrando que a fusão com o GFP não impediu o transporte de  $\text{NO}_3^-$ .

Interessantemente a linhagem #4 apresentou os menores teores de  $\text{NO}_3^-$  em todos os tecidos, mas na raiz, essa redução está associada a maior atividade da enzima Nitrato Redutase (NR), que foi significativamente menor após o ressurgimento (Figura 29). A enzima NR apresenta atividade citosólica, dessa forma é necessário que o nitrato esteja presente no citosol para que seja reduzido e então assimilado (ZHANG, et al. 2012). Entretanto, esse aumento significativo da atividade da enzima NR nesta linhagem não refletiu em aumento dos teores de amônio (Figura 30) ou N-amino (Figura 31).



**Figura 29:** Atividade da enzima Nitrato Redutase em raiz e folha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* linhagens #1, #4, #15 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de  $\text{N-NO}_3^-$  por 72h, sendo tempo zero as plantas coletadas imediatamente após esse tempo e 24 horas após o ressuprimento de  $\text{N-NO}_3^-$  (5,0 mM). As barras representam erro padrão das médias de quatro repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott ( $p < 0,05$ ).

O tecido da bainha das linhagens #4 e #15 apresentou redução significativa dos teores de amônio após o ressuprimento (Figura 30). Contudo, na folha durante o tempo zero (após a supressão por 72 horas) foi observado o contrário com um aumento significativo dos teores nas linhagens #1 e #4 (Figura 30).

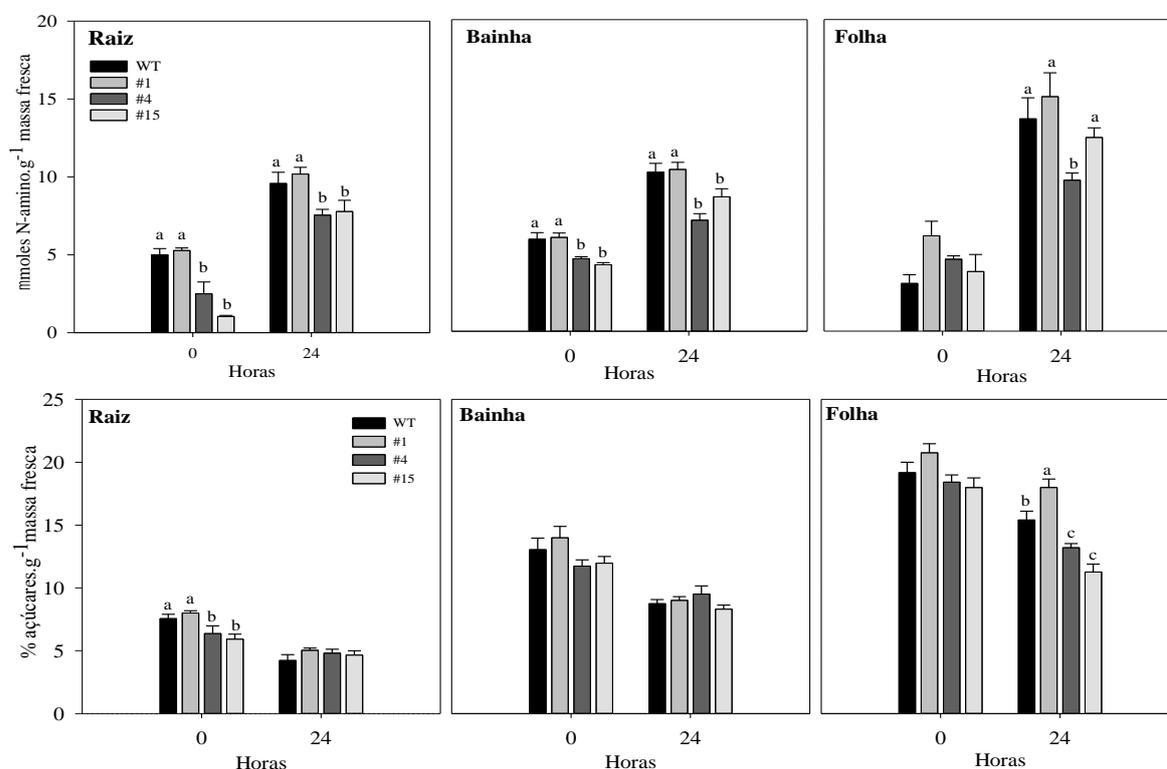


**Figura 30:** Teores de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) em folha, raiz e bainha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* linhagens #1, #4, #15 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de  $\text{N-NO}_3^-$  por 72h, sendo tempo zero as plantas coletadas imediatamente após esse tempo e 24 horas após o ressuprimento de  $\text{N-NO}_3^-$  (5,0 mM). As barras representam erro padrão das médias de quatro repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott ( $p < 0,05$ ).

É possível que este aumento dos teores de amônio na folha esteja relacionado com o transporte de longa distância da raiz para parte aérea, visto que não houve diferença significativa na atividade da enzima NR durante este período neste tecido (Figura 29). He, et al. (2017) estudando o transportador *OsNPF7.2* utilizando linhagens com o gene silenciado por RNAi, não identificaram alterações significativas no conteúdo de  $\text{NO}_3^-$  das plantas e na translocação de nitrato da raiz para parte aérea quando comparadas às não transformadas, comprovando a atividade no transporte intracelular, do citosol para os vacúolos.

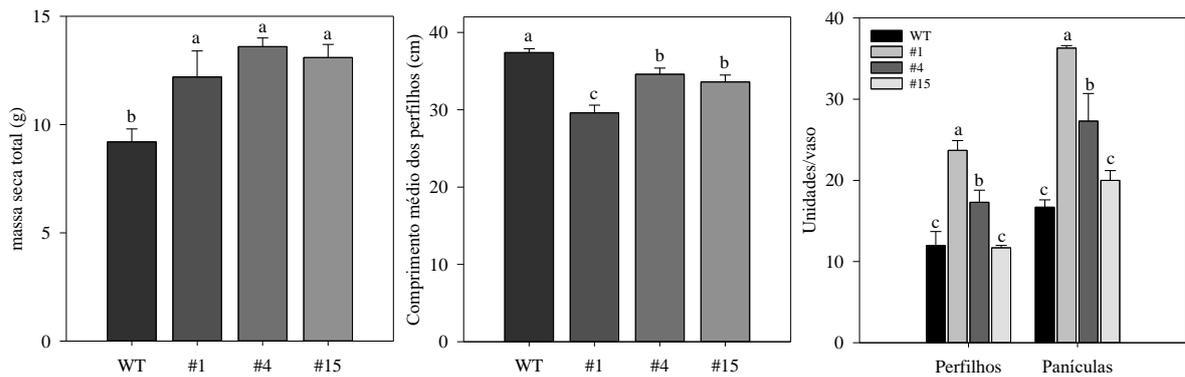
Mesmo com elevados teores de nitrato, as linhagens #4 e #15 apresentaram teores significativamente menores de N-amino na folha, inclusive na raiz e bainha quando comparada

as plantas WT. Teores significativamente menores de açúcares solúveis na raiz também foram observados durante o tempo zero e nas folhas após o ressuprimento (Figura 31). Estas alterações corroboram com a hipótese de alteração no acúmulo de nitrato nos vacúolos, segundo Fernandes (1978) na presença de  $\text{NH}_4^+$  ocorre um intenso processo de mobilização de esqueletos de carbono que é colocado em forma de amidas sinalizando a assimilação de N. Dessa forma, a redução dos teores de açúcares e de N-amino nas linhagens apontam as alterações no metabolismo de nitrogênio priorizando o acúmulo do nitrato nos vacúolos.



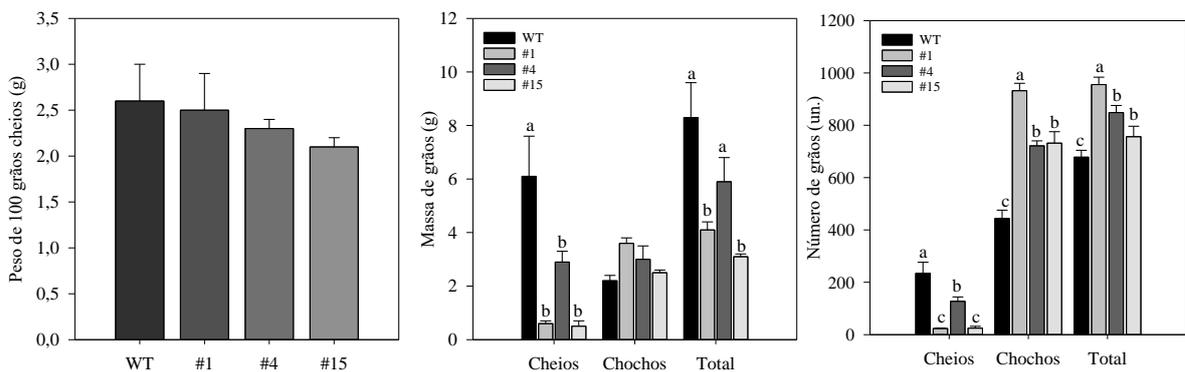
**Figura 31:** Teores de N-amino e açúcares solúveis em folha, raiz e bainha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* linhagens #1, #4, #15 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de  $\text{N-NO}_3^-$  por 72h, sendo tempo zero as plantas coletadas imediatamente após esse tempo e 24 horas após o ressuprimento de  $\text{N-NO}_3^-$  (5,0 mM). As barras representam erro padrão das médias de quatro repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott ( $p < 0,05$ ).

Quanto aos caracteres de produção as linhagens superexpressando o gene *OsNPF7.8* apresentaram aumento significativo da massa seca (entre 32 e 47%), do número de perfilhos de 23 da linhagem #1 contra 12 da WT e do número de panículas de 36 da linhagem #1 contra 16 da planta não transformada (Figura 32). O número de perfilhos é uma característica de grande importância no melhoramento de arroz (WANG, et al. 2018), a identificação de genes que alteram diretamente esta característica permitem determinar estratégias mais eficientes de melhoramento buscando produtividades cada vez maiores (SCHROEDER, et al. 2013). Huang, et al. (2019) reportaram o aumento do número de perfilhos e da massa fresca nas linhagens superexpressando as duas isoformas do gene *OsNPF7.1*. Wang, et al. (2018) também identificaram aumento significativo do número de perfilhos, e de panículas avaliando linhagens de arroz superexpressando o gene *OsNPF7.2*. A superexpressão das duas isoformas do gene *OsNPF7.7* também ocasionaram o aumento significativo do número de perfilhos e de panículas (HUANG, et al. 2018). O gene *OsNPF7.3* quando superexpresso também demonstrou aumento do número de perfilhos (FANG, et al. 2017).



**Figura 32:** Massa seca total ( $\text{g.vaso}^{-1}$ ), comprimento médio de perfilhos, número de perfilhos e de panículas por vaso de plantas do tipo selvagem (WT, var. Nipponbare) e linhagens #1, #4, #15 superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* no final do ciclo. As barras representam o erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott ( $p < 0,05$ ).

Ao avaliarmos a produtividade de grãos, foi possível identificar um aumento significativo no número total de grãos das linhagens que chegou a 40% (linhagem #1 Figura 33). Todavia, o experimento na casa de vegetação foi instalado durante o período outono/inverno e com isso as plantas sofreram com a redução do fotoperíodo afetando diretamente a produtividade por ocasionar menor enchimento de grãos. A superexpressão dos genes *OsNPF7.1* (HUANG, et al. 2019), *OsNPF7.2* (WANG, et al. 2018), *OsNPF7.3* (FANG, et al. 2017) e *OsNPF7.7* (HUANG, et al. 2018) também demonstraram beneficiar significativamente o número total de grãos.



**Figura 33:** Peso de 100 grãos cheios (g), massa de grãos, número de grãos por vaso de planta do tipo selvagem (WT, var. Nipponbare) e linhagens #1, #4, #15 superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF7.8* no final do ciclo. As barras representam o erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott ( $p < 0,05$ ).

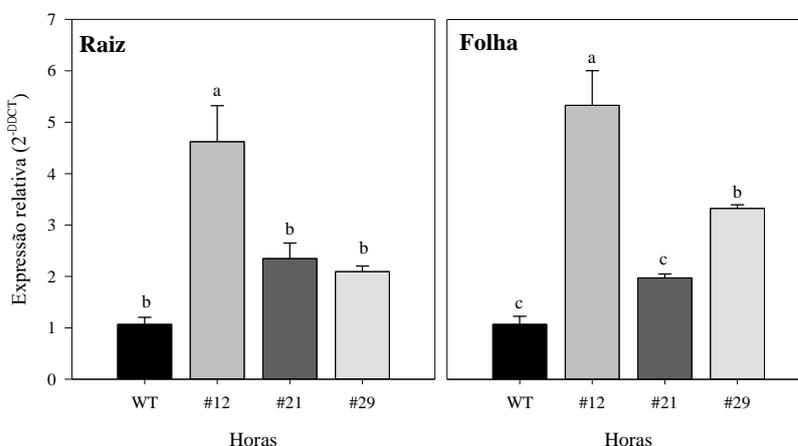
### 3.5 Efeito da Superexpressão do Gene *OsNPF5.13* no Metabolismo de N.

Os resultados da análise filogenética encontrados no Capítulo I (Figura 2) indicaram a possível analogia de função entre o gene *OsNPF5.13* e os transportadores *AtNPF5.16*, *AtNPF5.12* e *AtNPF5.11* caracterizados em *A. thaliana* como atuantes no efluxo de nitrato a partir do vacúolo (HE, et al. 2017). Buscando observar essa relação com o efluxo de  $\text{NO}_3^-$  no

metabolismo de N foi realizado o cultivo das linhagens #12, #21 e #29 superexpressando o transportador *OsNPF5.13* sob alta disponibilidade de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (5mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). É importante notar que o tempo zero considerado neste experimento é composto pelas plantas que receberam 5mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> até os 24 dias, sendo que a solução foi trocada a cada três dias, então as plantas do tempo zero estavam no 3º dia da solução contendo 5mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

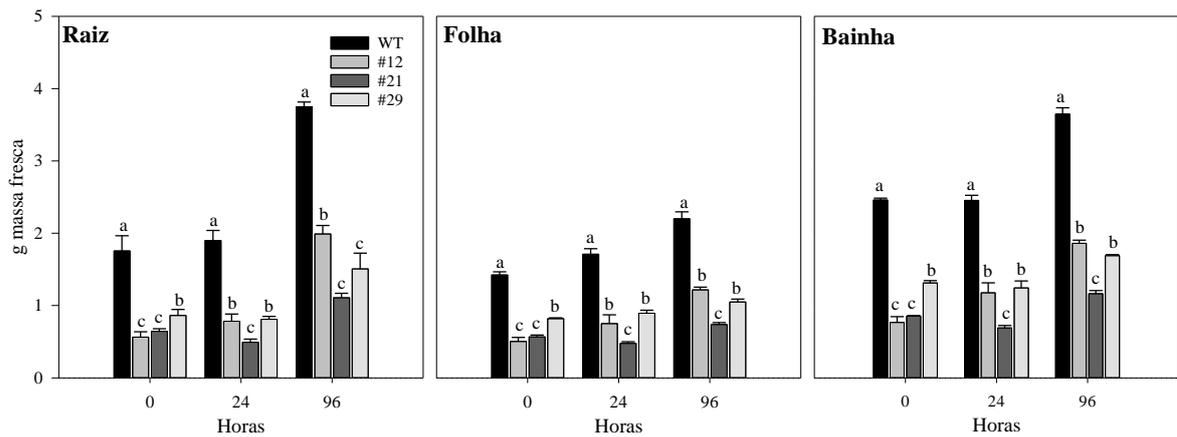
A análise de expressão gênica relativa identificou uma redução na superexpressão obtida com a transformação genética nas linhagens da geração T1 (Figura 24) quando comparada com as linhagens utilizadas no experimento da geração T2 (Figura 34). Essa redução pode ser associada com a regulação biológica realizada pelos fatores de transcrição da própria planta e com a eficiência do promotor P35S em monocotiledôneas.

Os genes da família NPF são em sua maioria constitutivos, ou seja, expressos ao longo de todo desenvolvimento da planta (LERÁN, et al. 2014), dessa forma esse valor de expressão observado para o gene *OsNPF5.13* é resultado da expressão natural do transportador, que está sujeita a regulação, somada a expressão do gene sob controle do promotor p35S. Entretanto, mesmo com essa redução as linhagens apresentaram ao menos o dobro de expressão do gene *OsNPF5.13* quando comparada a não transformada (WT) (Figura 34).



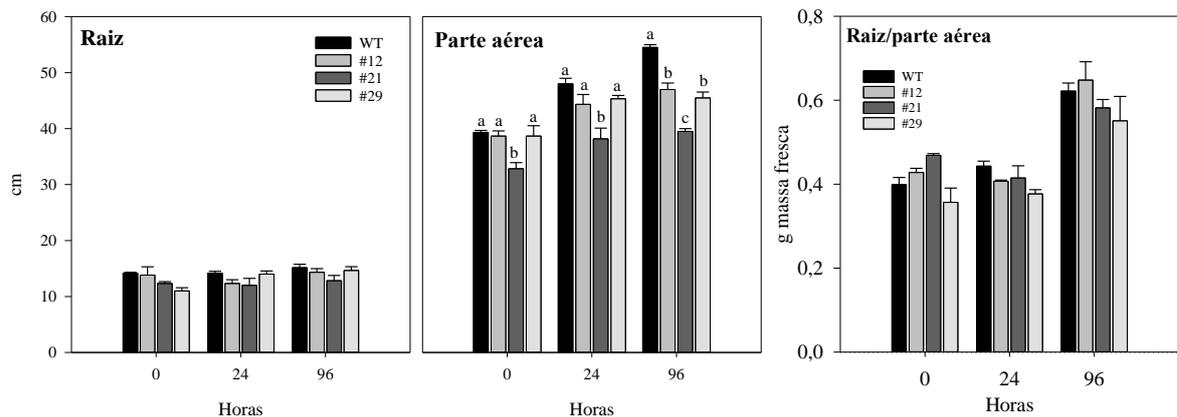
**Figura 34:** Expressão gênica relativa de linhagens de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13*, linhagens #12, #21, #29, obtidas pela transformação via *A. tumefaciens* e cultivadas até a segunda geração e planta do tipo selvagem (WT), sob fornecimento constante de 5mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> coletadas aos 24 DAG (tempo zero). As barras representam erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p < 0,05). Todos os níveis de expressão foram normalizados quanto aos controles endógenos *Ubiquitina (OsUBQ5)* e *Actina2 (OsActin2)*.

As plantas transformadas apresentaram redução significativa na massa fresca das raízes, bainhas e folhas quando comparadas a planta não transformada (Figura 35). As linhagens apresentaram sempre menor massa em todas as partes da planta em todos os tempos analisados. Huang e colaboradores (2019) ao avaliarem linhagens superexpressando o gene *OsNPF7.4* também identificaram redução da biomassa das plantas.



**Figura 35:** Valores de massa fresca de raiz, folha e bainha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13* linhagens #12, #21, #29 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de  $N-NO_3^-$  por 24 e 96h, sendo considerado tempo zero as plantas coletadas 72h após a troca da solução nutritiva com 5mM de  $N-NO_3^-$ . As barras representam erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott ( $p < 0,05$ ).

Apesar da redução significativa na massa das plantas quando avaliamos a relação raiz/ parte aérea da massa fresca não houve diferenças significativas entre as linhagens e a planta não transformada (WT) mesmo com a aplicação da supressão de N por 96 horas (Figura 36). Essa ausência de diferença pode ser explicada pelo comprimento da raiz e da parte aérea onde também não foi observada diferença significativa (Figura 36). Apenas a linhagem #21 apresentou redução significativa do comprimento de parte aérea em todos os tempos analisados, contudo esta linhagem foi a que apresentou menor massa fresca em todas as partes (Figura 35).

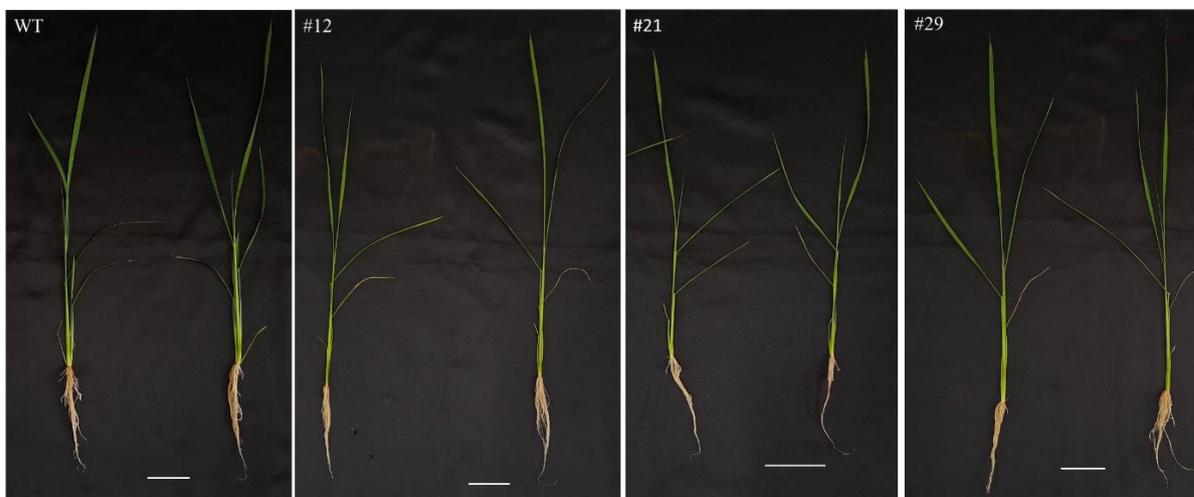


**Figura 36:** Comprimento radicular, de parte aérea e relação raiz/parte aérea de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13* linhagens #12, #21, #29 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de  $N-NO_3^-$  por 24 e 96h, sendo considerado tempo zero as plantas coletadas 72h após a troca da solução nutritiva com 5mM de  $N-NO_3^-$ . As barras representam erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott ( $p < 0,05$ ).

Condições de deficiência leve de N tendem a provocar um crescimento maior e mais profundo das raízes laterais (BANG, et al. 2021) como foi observado no Capítulo 1 (Figura 6) em plantas de arroz da variedade Manteiga submetidas a 72 horas de supressão de N. Entretanto, quando observamos a relação raiz parte aérea podemos observar que mesmo com a redução

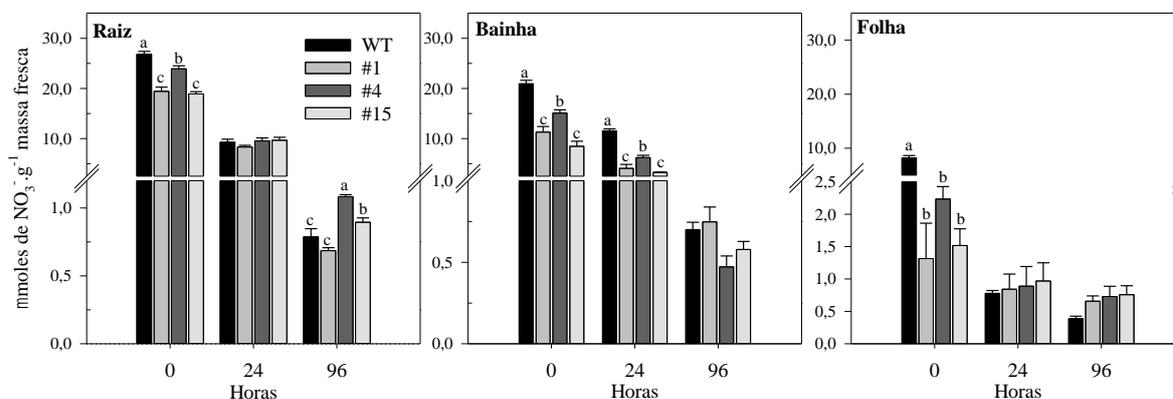
significativa da massa fresca nas linhagens a relação raiz/parte aérea não apresentou diferença em comparação a WT, dessa forma, podemos observar que houve uma relação de compensação da massa fresca com o crescimento da planta.

Comparando o aspecto visual das linhagens superexpressando o gene *OsNPF5.13* quando comparado com a WT é possível perceber que houve uma redução no acúmulo de massa e no desenvolvimento da parte aérea (Figura 37). Dentre elas, a linhagem #21 é notadamente a mais afetada.



**Figura 37:** Plantas selvagens da variedade Nipponbare (WT), linhagens mutantes 12, 21 e 29 (#12, #21 e #29 plantas transformadas superexpressando o gene *OsNPF5.13*) submetidas a dose constante de  $\text{N-NO}_3^-$  até os 24 dias após a germinação, considerado tempo zero. Barras representam 5 cm.

As linhagens transformadas apresentaram teores de nitrato significativamente menores em todas as partes no tempo zero, que é o ponto onde as plantas receberam 5mM de  $\text{N-NO}_3^-$  constante (Figura 38). Redução significativa dos teores de nitrato nas raízes também foi reportado por He, et al. (2017) em linhagens superexpressando o gene *AtNPF5.12* em *A. thaliana*, este gene foi localizado pelos autores com expressão no vacúolo e caracterizado como atuante no efluxo de nitrato a partir do vacúolo. Corroborando com a hipótese de atuação deste gene (*OsNPF5.13*) no efluxo de  $\text{NO}_3^-$  em arroz.



**Figura 38:** Teores de nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ) em raiz, bainha e folha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13* linhagens #12, #21, #29 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de  $\text{N-NO}_3^-$  por 24 e 96h, sendo considerado tempo zero as plantas coletadas 72h após a troca da solução nutritiva com 5mM de

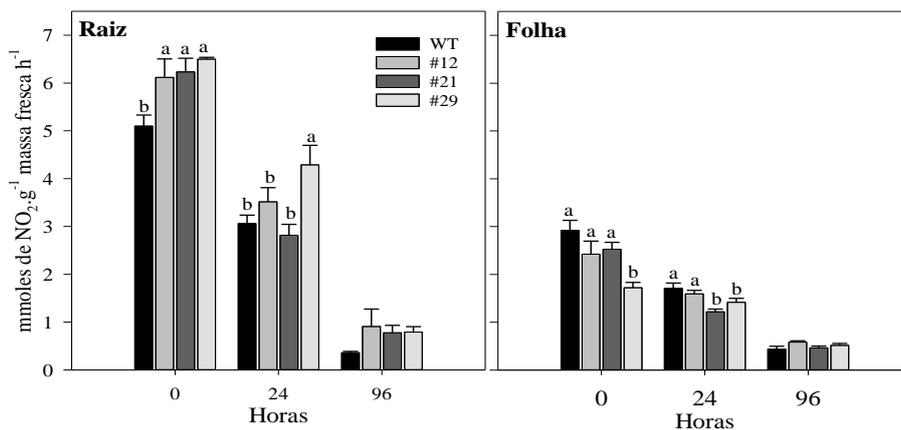
N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As barras representam erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05).

Os teores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> na bainha das linhagens transformadas apresentaram redução significativa mesmo após 24h da supressão de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> com o fornecimento de solução nutritiva sem N. O tecido da bainha é conhecido como atuante na reserva de nutrientes, como já foi reportado no primeiro capítulo, devido à baixa atividade das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase. Tendo isso em vista, a redução prolongada dos teores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> observados nas bainhas das linhagens reforçam o favorecimento da remobilização do íon que estava armazenado neste tecido para outros órgãos.

O período de 96 horas de supressão do N em solução nutritiva foi suficiente para reduzir significativamente os teores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nos tecidos. Por outro lado, é possível observar um aumento significativo dos teores do íon nas raízes das linhagens #21 e #29 após 96 horas de supressão do fornecimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 38), apontando a ocorrência de remobilização.

A atividade da enzima nitrato redutase (NR) foi significativamente maior nas raízes das três linhagens transformadas durante o tempo zero. Na linhagem #29 a maior atividade da NR perdura até 24 horas após a supressão (Figura 39). A concentração de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no citosol é o principal fator que controla a expressão da NR (HIREL, 2020). Du, et al. (2008) demonstraram a existência da correlação negativa entre a atividade da enzima NR e os conteúdos de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em folhas de repolho chinês. Tal relação inversa foi encontrada nas linhagens #21 e #29 onde podemos observar que os menores teores de nitrato nas raízes (Figura 38) estão associados a atividade significativamente maior da NR (Figura 39) indicando menor acúmulo de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nos vacúolos das plantas transformadas em relação a WT.

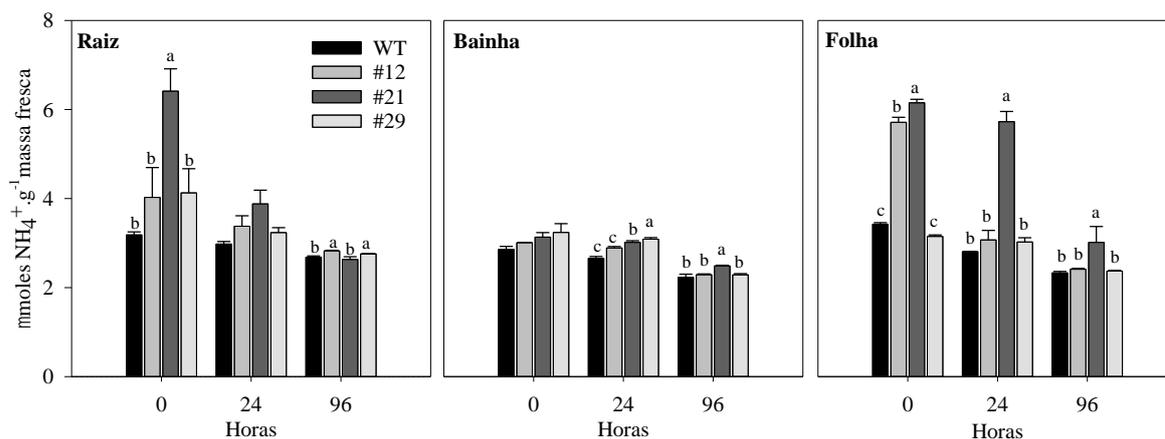
Nas folhas, a atividade da NR foi significativamente menor na linhagem #29 durante o tempo zero. Após 24 horas de supressão de N, além da linhagem #29 a linhagem #21 também apresentou redução significativa da atividade (Figura 39).



**Figura 39:** Atividade da enzima Nitrato Redutase em raiz, folha e bainha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13* linhagens #12, #21, #29 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 24 e 96h, sendo considerado tempo zero as plantas coletadas 72h após a troca da solução nutritiva com 5mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As barras representam erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05).

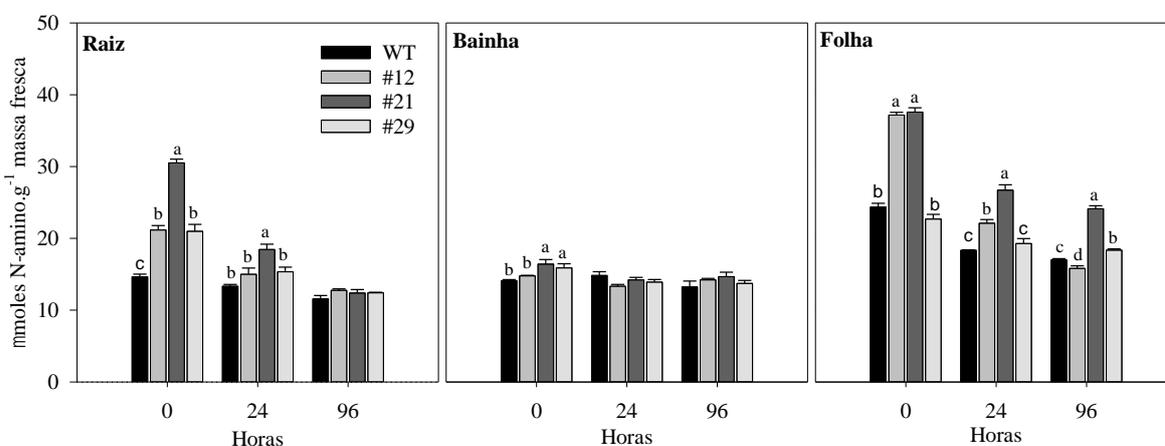
Como esperado, em resposta à maior atividade da enzima NR e aos menores teores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foram observados maiores teores de amônio (Figura 40) e N-amino (Figura 41) nas raízes das linhagens transformadas em comparação com as plantas não transformadas, confirmando a maior atividade metabólica de redução e assimilação de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> neste tecido. Tal preferência de

acúmulo e redução na raiz também foi reportado por Santos, et al. (2011) ao avaliar as variedades IAC-47 e Piauí apontadas como linhagens mais eficientes na absorção e uso de N.



**Figura 40:** Teores de amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) em folha, raiz e bainha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13* linhagens #12, #21, #29 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 24 e 96h, sendo considerado tempo zero as plantas coletadas 72h após a troca da solução nutritiva com 5mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As barras representam erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott (p<0,05).

Nas folhas, apesar da menor atividade da NR e dos teores reduzidos de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foi observado teores significativamente maiores de amônio, principalmente na linhagem #21 (Figura 40), e de N-amino (Figura 41) nas linhagens transformadas nos três tempos avaliados. As raízes das plantas transformadas também apresentaram teores significativamente maiores de N-amino no tempo zero e após 24h de supressão de N. He, et al. (2017) ao avaliarem linhagens superexpressando os genes *AtNPF5.11*, *AtNPF5.12* e *AtNPF5.16* identificaram maior proporção de <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> na parte aérea das linhagens transformadas quando comparada a WT, indicando que os genes homólogos ao analisado neste trabalho melhoraram o transporte de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de longa distância, das raízes para parte aérea, o que corrobora com os resultados aqui apresentados.



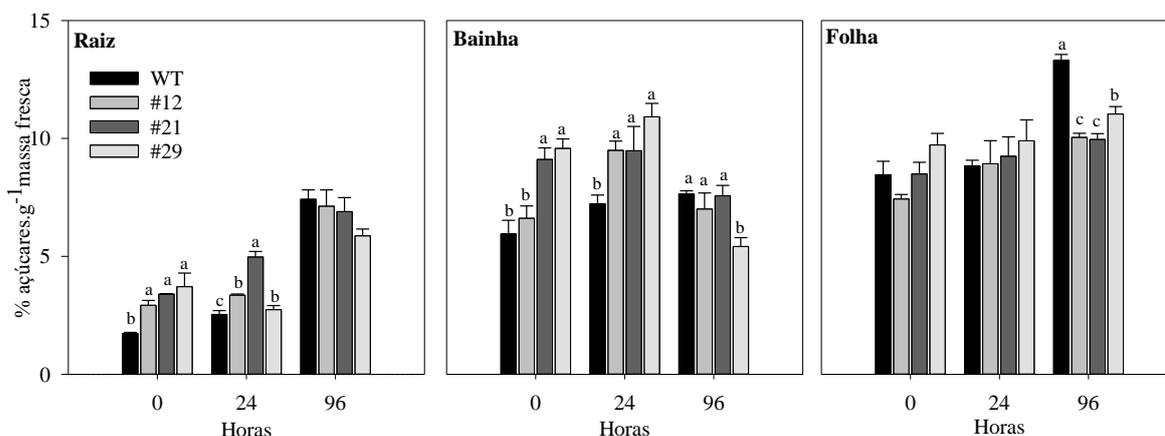
**Figura 41:** Teores de N-amino em folha, raiz e bainha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13* linhagens #12, #21, #29 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 24 e 96h, sendo considerado tempo zero as plantas coletadas 72h após a troca da solução nutritiva com 5mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As barras

representam erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott ( $p < 0,05$ ).

É importante notar que no tempo zero apesar dos teores significativamente menores de  $\text{NO}_3^-$  no tecido da bainha (Figura 38), não foram observadas alterações significativas nos teores de amônio no mesmo momento (Figura 40), mas houve um aumento dos teores de N-amino (Figura 41) e açúcares solúveis (Figura 42) neste tecido, nas três linhagens mutantes em comparação com a WT. Estes resultados evidenciam que a superexpressão do gene *OsNPF5.13* promoveu a remobilização do  $\text{NO}_3^-$  e aumentou a estabilidade na assimilação de nitrogênio.

O aumento significativo dos teores de N-amino encontrado pode estar relacionado com a redução significativa da massa fresca das linhagens (Figura 35). Huang, et al. (2019) também evidenciaram um aumento significativo de N-amino nas linhagens superexpressando o gene *OsNPF7.4*, os autores apontaram a influência desse acúmulo de aminoácidos na inibição do acúmulo de biomassa das plântulas, afetando o perfilhamento e a produtividade das linhagens. Essa resposta ao acúmulo de N-amino também foi reportada por Lu, et al. (2018) ao estudarem o transportador de aminoácidos *OsAAP3* em arroz.

Contudo, durante a supressão não houve diferença significativa nos teores de N-amino no tecido da bainha das linhagens transformadas mesmo com o aumento dos teores de amônio e dos teores de açúcares solúveis. Este comportamento ressalta a atuação do tecido da bainha como tecido de reserva de nutrientes como foi apontado no capítulo I (item 3.2) e por Santos, et al. (2005 e 2011).

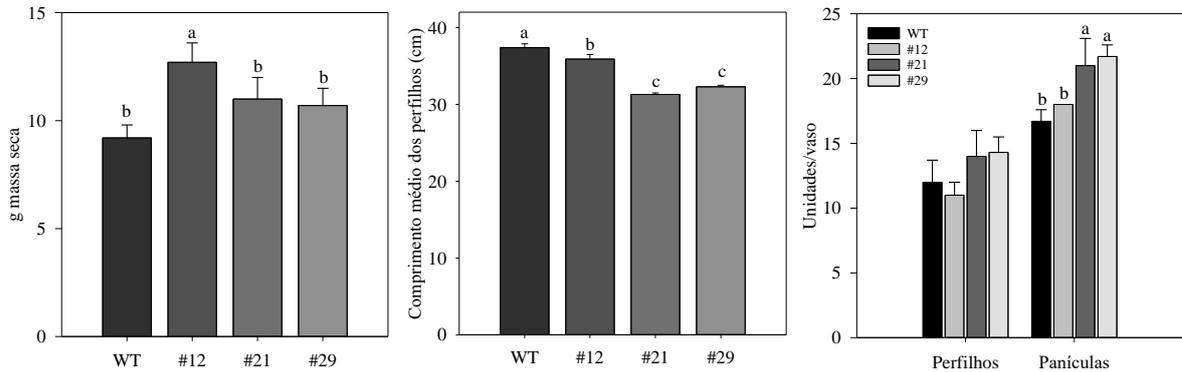


**Figura 42:** Teores de açúcares solúveis em folha, raiz e bainha de plantas de arroz (var. Nipponbare) superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13* linhagens #12, #21, #29 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a supressão de  $\text{N-NO}_3^-$  por 24 e 96h, sendo considerado tempo zero as plantas coletadas 72h após a troca da solução nutritiva com 5mM de  $\text{N-NO}_3^-$ . As barras representam erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott ( $p < 0,05$ ).

Avaliando a produção até o final do ciclo, a linhagem #12 apresentou aumento significativo da massa seca (Figura 43). Entretanto, esse aumento não teve relação com o número de perfilhos ou de panículas, visto que não houve diferença significativa entre a linhagem e a planta não transformada para essas características (Figura 43).

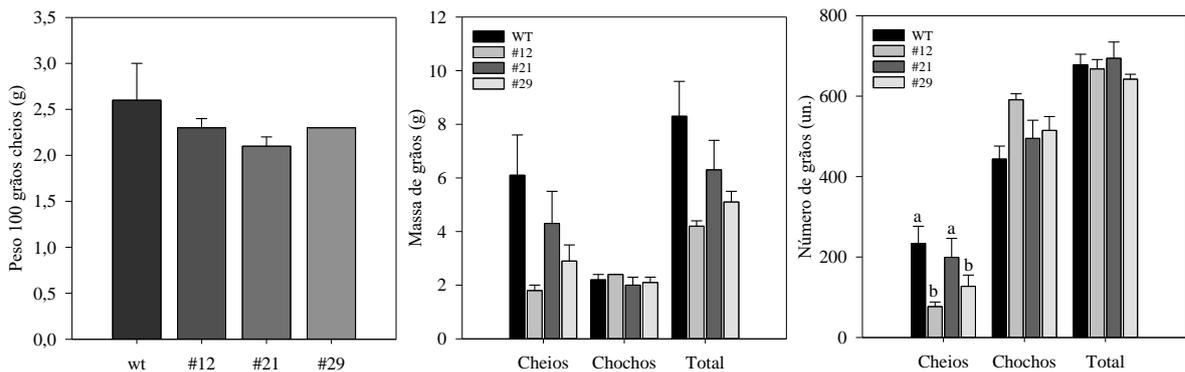
As linhagens #21 e #29 apresentaram aumento significativo do número de panículas, visto que as linhagens apresentaram ~21 panículas contra apenas 16 da não transformada (Figura 43). Contudo, essas linhagens também apresentaram comprimento médio de perfilhos significativamente menor e não diferiram significativamente na produção de grãos (Figura 44).

Huang, et al. (2019) ao avaliarem a superexpressão das isoformas do gene *OsNPF7.4* identificaram redução significativa do número de perfilhos, número de grãos cheios e de produtividade de grãos por planta.



**Figura 43:** Massa seca total ( $\text{g.vaso}^{-1}$ ), comprimento médio de perfilhos, número de perfilhos e de panículas por vaso de planta do tipo selvagem (WT, var. Nipponbare) e linhagens #12, #21, #29 superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13* no final do ciclo. As barras representam o erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott ( $p < 0,05$ ).

As linhagens apresentaram redução significativa no número de grãos cheios 1,8g da linhagem #12 contra 6,1g da WT (Figura 44). Entretanto, o cultivo das plantas foi realizado no período outono/inverno e por isso sofreram com a redução do fotoperíodo afetando a produtividade e o enchimento dos grãos.



**Figura 44:** Peso de 100 grãos cheios (g), massa de grãos, número de de grãos por vaso de planta não transformada (WT, var. Nipponbare) e linhagens #12, #21, #29 superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF5.13* no final do ciclo. As barras representam o erro padrão das médias de três repetições e as letras indicam diferença significativa entre as médias pelo teste Scott-knott ( $p < 0,05$ ).

A superexpressão do gene *OsNPF5.13* demonstrou uma redução dos teores de nitrato, contudo as linhagens transformadas apresentaram maiores teores de N-amino,  $\text{NH}_4^+$  e açúcares solúveis, indicando maior estabilidade no metabolismo de N mesmo após 96h de restrição de N em solução nutritiva. Além disso, as linhagens apresentaram maior número de panículas demonstrando que este gene pode ter influência na produtividade de grãos em arroz.

## 4 CONCLUSÕES

A superexpressão do gene *OsNPF5.13* resultou em linhagens com menores teores de nitrato nos tecidos, aumento na atividade da enzima nitrato redutase (NR) e na estabilidade da assimilação de  $\text{NO}_3^-$ , com teores maiores de amônio, N-amino e açúcares solúveis. Estes resultados contribuem com a hipótese de atuação deste gene no efluxo de  $\text{NO}_3^-$  a partir do vacúolo em arroz.

Por outro lado, a superexpressão do gene *OsNPF7.8* resultou em linhagens com maiores teores de  $\text{NO}_3^-$ , menor atividade da enzima NR e redução dos teores de amônio, N-amino e açúcares solúveis, corroborando com a possibilidade de atuação deste gene no influxo de nitrato para o vacúolo. Além disso, a superexpressão desse gene ocasionou um aumento de até 40% no número total de grãos.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste trabalho são inéditos no estudo de acúmulo e remobilização de nitrogênio e desempenham grande importância para a definição de estratégias a fim de reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados no cultivo de arroz. O que contribui diretamente para redução dos custos de produção e permite o cultivo de forma mais sustentável reduzindo os prejuízos ocasionados ao meio ambiente.

Entretanto, ainda são necessários outros estudos para determinar a atuação dos transportadores *OsNPF5.12*, *OsNPF5.15*, *OsNPF5.13* e *OsNPF7.8* no metabolismo de N.

Para os genes *OsNPF5.13* e *OsNPF7.8* recomenda-se a realização da localização subcelular da expressão dos transportadores para confirmar sua expressão no tonoplasto, expressão em ovócitos para confirmação do transporte de  $\text{NO}_3^-$  e função efluxo/influxo e o estudo de plantas nocaute para estes genes buscando identificar a real importância desses no acúmulo/remobilização de  $\text{NO}_3^-$ . E para o gene *OsNPF5.13* a realização de estudos utilizando as linhagens obtidas em cultivo com  $^{15}\text{N}$  como fonte de nitrogênio, permitirá avaliar a relação deste transportador com o aumento da estabilidade de assimilação e no transporte de longa distância, da raiz para parte aérea.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, E. S.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Características morfológicas e moleculares e acúmulo de proteína em grãos de variedades de arroz do Maranhão. **Pesq. agropec. bras.**, v. 38, n. 11, p. 1281-1288, 2003.
- ARAUJO, O. J.; PINTO, M. S.; SPERANDIO, M. V.; SANTOS, L. A.; STARK, M. E.; FERNANDES, M. S.; SANTOS, A. M.; SOUZA, S. R.; Expression of the genes *OsNRT1. 1*, *OsNRT2. 1*, *OsNRT2. 2*, and kinetics of nitrate uptake in genetically contrasting rice varieties. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 2, p. 306–14, 2015.
- ARAYA, T.; KUBO, T.; von WIRÉN, N.; TAKAHASHI, H. Statistical modeling of nitrogen-dependent modulation of root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 58, p. 254-265, 2016.
- ARRUDA, L. N.; BUCHER, C. A.; RANGEL, R. P.; DE SOUZA, A. F. F.; FERNANDES, M. S.; DE SOUZA, S. R Superexpressão do transportador *OsNPF4.11 (OsNRT1.2)* afeta teor de nitrato, parâmetros radiculares e crescimento de arroz. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 13, n. 1, p. 5493, 2018.
- ASENSIO, J. S. R.; RACHMILEVITCH, S.; BLOOM, A. J. Responses of Arabidopsis and wheat to rising CO<sub>2</sub> depend on nitrogen source and nighttime CO<sub>2</sub> levels. **Plant physiology**, v. 168, n. 1, p. 156-163, 2015.
- BAO, A.; LIANG, Z.; ZHAO, Z.; CAI, H. Overexpressing of OsAMT1-3, a High Affinity Ammonium Transporter Gene, Modifies Rice Growth and Carbon-Nitrogen Metabolic Status. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 5, p. 9037–9063, 2015.
- BANG, T. C.; HUSTED, S.; LAURSEN, K. H.; PERSSON, D. P.; SCHJOERRING, J. K. The molecular–physiological functions of mineral macronutrients and their consequences for deficiency symptoms in plants. **New Phytologist**, v. 229, n. 5, p. 2446-2469, 2021.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BUCHER, C. A., SANTOS, L. A.; MATOS, N. E.; RANGEL, R. P.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. The transcription of nitrate transporters in upland rice varieties with contrasting nitrate-uptake kinetics. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 177, n. 3, p. 395–403, 2014.
- CAPLAN, A.; DEKEYSER, R.; VAN MONTAGU, M. Selectable markers for rice transformation. **Methods Enzymol.** v. 216, p. 426–441, 1992.
- CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.6, p.71-80, 1975
- CHAKRABORTY, M.; SAIRAM REDDY, P.; LAXMI NARASU, M.; KRISHNA, G.; RANA, D. Agrobacterium-mediated genetic transformation of commercially elite rice restorer line using nptII gene as a plant selection marker. **Physiol Mol Biol Plants.**, v. 22, n. 1, p. 51–60, 2016.
- CHAPETA, A. C. O.; PEREIRA, E. G.; DONATO, A. F.; FERNANDES, E. D. C.; SANTOS, L. A.; BUCHER, C. A.; BUCHER, C. P. C. Variedades de arroz locais como alternativas viáveis para uma agricultura mais sustentável. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e**

- Sustentabilidade**, v. 7, n. 15, p. 225-232, 2020.
- CHENG, Y. L.; TU, S. L. Alternative Splicing and Cross-Talk with Light Signaling. **Plant and Cell Physiology**, v. 59, n. 6, p. 1104-1110, 2018.
- CHOPIN, F.; ORSEL, M.; DORBE, M.-F.; CHARDON, F.; TRUONG, H.-N.; MILLER, A. J.; KRAPP, A.; DANIEL-VEDELE, F. The Arabidopsis *ATNRT2.7* Nitrate Transporter Controls Nitrate Content in Seeds. **The Plant Cell Online**, v. 19, n. 5, p. 1590–1602, 2007.
- COHEN, J. Fields of dreams. **Science**, v. 365, n. 6452, p. 422–425, 2019.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v.6, safra 2018/19 n.8. Oitavo levantamento, Brasília, p. 1-132, 2019.
- \_ **Acomp. da safra brasileira de grãos**. v. 7, safra 2019/20, n.9. Nono levantamento, Brasília, p. 1-31, jun. 2020.
- \_ **Acomp. safra brasileira de grãos**. v.8, safra 2020/21, n. 4. Quarto levantamento, Brasília, p. 1-85, jan. 2021.
- \_ Evolução dos custos de produção de arroz no Brasil. **Compêndio de Estudos Conab**. v.4, Brasília, p. 30, 2016.
- COSKUN, D.; BRITTO, D. T.; SHI, W.; KRONZUCKER, H. J. How Plant Root Exudates Shape the Nitrogen Cycle. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 8, p. 661–673, 2017.
- COUSINS, A. B.; BLOOM, A. J. Oxygen consumption during leaf nitrate assimilation in a C3 and C4 plant: the role of mitochondrial respiration. **Plant, Cell & Environment**, v. 27, n. 12, p. 1537-1545, 2004.
- CRAWFORD, N. M.; GLASS, A. D. M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in plant science**, v. 3, n. 10, p. 389–395, 1998.
- DE ANGELI, A.; MONACHELLO, D.; EPHRITIKHINE, G.; FRACHISSE, J. M.; THOMINE, S.; GAMBALE, F.; BARBIER-BRYGOO, H. The Nitrate/proton Antiporter AtCLCa Mediates Nitrate Accumulation in Plant Vacuoles. **Nature**, v. 442, n. 7105, p. 939–942, 2006.
- DECHORGNAT, J.; NGUYEN, C. T.; ARMENGAUD, P.; JOSSIER, M.; DIATLOFF, E.; FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, F. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. **J. Exp. Bot.** v. 62, p. 1349–1359, 2011.
- DEBOUBA, M.; DGUIMI, H.; GHORBEL, M. Expression pattern of genes encoding nitrate and ammonium assimilating enzymes in Arabidopsis thaliana exposed to short term NaCl stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, n. 2, p. 155-60, 2013.
- DU, S. T.; LI, L. L.; ZHANG, Y. S.; LIN, X. Y. Nitrate accumulation discrepancies and variety selection in different Chinese cabbage (*Brassica chinensis* L.) genotypes. **J. Plant Nutr.** v. 14, p. 969–975, 2008.
- DU, X.; FANG, T.; LIU, Y.; HUANG, L.; ZANG, M.; WANG, G.; LIU, Y.; FU, J. Transcriptome profiling predicts new genes to promote maize callus formation and transformation. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 1633, 2019.
- EMBRAPA. **Visão 2030: o futuro da agricultura brasileira**. Brasília, DF: Embrapa, p. 212, 2018.
- FAGERIA, N. K.; DOS SANTOS, A. B.; CUTRIM, V. D. A. Produtividade de arroz irrigado e eficiência de uso do nitrogênio influenciadas pela fertilização nitrogenada. **Pesquisa**

**Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 7, p. 1029–1034, 2007.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical databases**. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em 11 mai. 2020.

FAN, X. R.; XIE, D.; CHEN, J. G.; LU, H.; XU, Y.; MA, C.; XU, G. Over-expression of *OsPTR6* in rice increased plant growth at different nitrogen supplies but decreased nitrogen use efficiency at high ammonium supply. **Plant Sci.**, v. 227, p. 1–11, 2014.

FANG, Z.; BAI, G.; HUANG, W.; WANG, Z.; WANG, X.; ZHANG, M. The Rice Peptide Transporter *OsNPF7.3* Is Induced by Organic Nitrogen, and Contributes to Nitrogen Allocation and Grain Yield. **Front. Plant Sci**, v. 8, n. 1338, p. 12, 2017.

FANG, Z.; XIA, K.; YANG, X.; GROTEMEYER, M.S.; MEIER, S.; RENTSCH, D.; XU, X.; ZHANG, M. Altered expression of the *PTR/NRT1* homologue *OsPTR9* affects nitrogen utilization efficiency, growth and grain yield in rice. **Plant Biotechnol. J.**, v. 11, p. 446–458, 2012.

FARNDEN, K. J. S.; ROBERTSON, J. G. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogen. In: BERGSEN, F. J. ed. *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*, Chichester: **John Wiley**, p.265-314, 1980.

FELKER, P. Micro determination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v. 49, 1977.

FELSENSTEIN J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**. v. 39, p. 783-791.

FENG, Y.; ZHAI, R. R.; LIN, Z. C.; CAO, L. Y.; WEI, X. H.; CHENG, S. H. Quantitative trait locus analysis for rice yield traits under two nitrogen levels. **Rice Science**, v. 22, n. 3, p. 108–115, 2015.

FERNANDES, M. S. **Effects to light and temperature on the nitrogen metabolism of tropical rice**. Michigan State University, 1974. Ph.D. Thesis.

FERNANDES, M.S. N-carriers, light and temperature influences on uptake and assimilation of nitrogen by rice. **Turrialba**. San Jose, v. 34, p. 9-18, 1984.

FERNANDES, M. S. Absorção e metabolismo de nitrogênio em plantas. **Boletim Técnico**, v. 1, 50 p., 1978.

FERREIRA, D.F. **Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0**. In. Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria. Anais. São Carlos: UFSCar, p. 255-258, 2000.

FERREIRA, L. M. **Caracterização funcional do transportador de amônio OsAMT1. 3 e seu efeito sobre a nutrição nitrogenada em plantas de arroz**. 2013. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

FERROL, N. Membrane Transporters, an Overview of the Arbuscular Mycorrhizal Fungal Transportome. **Encyclopedia of Mycology**, v. 1, p. 44-53, 2021.

FREIRE, L. R.; BALIEIRO, F. de C.; ZONTA, E.; ANJOS, L. H. C. dos; PEREIRA, M. G.; LIMA, E.; GUERRA, J. G. M.; FERREIRA, M. B. C.; LEAL, M. A. de A.; CAMPOS, D. V. B. de. Manual de calagem e adubação do Estado do Rio de Janeiro. **Embrapa**, v. 1, p. 430, 2013.

- 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. 185–186, 2001.
- GUELFÍ, D. Fertilizantes nitrogenados estabilizados, de liberação lenta ou controlada. **Informações Agronômicas**, n. 157, p. 1–13, 2017.
- GRAVELEY, B. R. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. **Trends in genetics**, v. 17, n. 2, p. 100-107; 2001.
- HAN, M., OKAMOTO, M., BEATTY, P. H., ROTHSTEIN, S. J., AND GOOD, A. G. The genetics of nitrogen use efficiency in crop plants. **Annu. Rev. Genet.** V. 49, p. 269–289, 2015.
- HE, Y. N.; PENG, J. S.; CAI, Y.; LIU, D. F.; GUAN, Y.; YI, H. Y.; GONG, J. M. Tonoplast-localized nitrate uptake transporters involved in vacuolar nitrate efflux and reallocation in *Arabidopsis*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- HE, F.; CHEN, S.; NING, Y.; WANG, G.-L. Rice (*Oryza sativa*) Protoplast Isolation and Its Application for Transient Expression Analysis. **Current Protocols in Plant Biology**, v. 1, p. 373–383, 2016.
- HIEI, Y.; ISHIDA, Y.; KOMARI, T. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 628, p. 1-11, 2014.
- HIEI, Y.; KOMARI, T. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. **Nat Protoc**, v. 3, p. 824–834, 2008.
- HIREL, B.; KRAPP, A. Nitrogen Utilization in Plants I Biological and Agronomic Importance. **Encyclopedia of Biochemistry**, ed. 3, p. 1-14, 2020.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural of Experimental Station Bull**, v.347, p. 1-32, 1950.
- HO, C. H.; LIN, S. H.; HU, H. C.; TSAY, Y. F. *CHL1* functions as a nitrate sensor in plants. **Cell**, v. 138, n. 6, p. 1184-1194, 2009.
- HOLZSCHUH, M. J.; BOHNEN, H.; ANGHINONI, I.; MEURER, E. J.; CARMONA, F. C.; COSTA, S. E. V. G. A. Resposta do arroz irrigado ao suprimento de amônio e nitrato. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v. 33, n. 5, p. 1323-1331, 2009.
- HU, X.; ZHANG, J.; LIU, W.; WANG, Q.; WANG, T.; LI, X.; LU, X.; GAO, L.; ZHANG, W. *CsNPF7.2* Has a Potential to Regulate Cucumber Seedling Growth in Early Nitrogen Deficiency Stress. **Plant Molecular Biology Reporter**, p. 1-17, 2020.
- HU, R.; QIU, D.; CHEN, Y.; MILLER, A. J.; FAN, X.; PAN, X.; ZHANG, M. Knock-Down of a Tonoplast Localized Low-Affinity Nitrate Transporter *OsNPF7.2* Affects Rice Growth under High Nitrate Supply. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1529, 2016.
- HU, B.; WANG, W.; OU, S.; TANG, J.; LI, H.; CHE, R.; ZHANG, Z.; CHAI, X.; WANG, H.; WANG, Y.; LIANG, C.; LIU, L.; PIAO, Z.; DENG, Q.; DENG, K.; XU, C.; LIANG, Y.; ZHANG, L.; LI, L.; CHU, C. Variation in *NRT1.1B* contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies. **Nature Genetics**, v. 47, n. 7, p. 834, 2015.
- HUANG, W.; NIE, H.; FENG, F.; WANG, J.; LU, K.; FANG, Z. Altered expression of *OsNPF7.1* and *OsNPF7.4* differentially regulates tillering and grain yield in rice. **Plant science**, v. 283, p. 23-31, 2019.
- HUANG, W.; BAI, G.; WANG, J.; ZHU, W.; ZENG, Q.; LU, K.; SUN, S.; FANG, Z. Two Splicing Variants of *OsNPF7.7* Regulate Shoot Branching and Nitrogen Utilization Efficiency

in Rice. **Front. Plant Sci.**, v. 9, n.300, 2018.

HUANG, N. C.; LIU, K. H.; LO, H. J.; TSAY, Y. F. Cloning and functional characterization of an Arabidopsis nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. **The Plant Cell Online**, v. 11, n. 8, p. 1381-1392, 1999.

HUANG N.; CHIANG C.; CRAWFORD N.; TSAY Y. CHL1 encodes a component of the low-affinity nitrate uptake system in Arabidopsis and shows cell type specific expression in roots. **Plant Cell**, v. 8, p. 2183–2191, 1996.

IFAG. Custos de Produção. Disponível em: <<http://ifag.org.br/custos-de-producao>>. Acesso em: 17 fev. 2021.

JAGANATHAN, D.; RAMASAMY, K.; SELLAMUTHU, G.; JAYABALAN, S.; VENKATARAMAN, G. CRISPR for Crop Improvement: An Update Review. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 985, 17 jul. 2018.

JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 646-651, 2006.

JAIN, R., JENKINS, J., SHU, S.; CHERN, M.; MARTIN, J. A.; COPETTI, D.; DUONG, P. Q.; PHAM, N. T.; KUDRNA, D. A.; TALAG, J.; SCHACKWITZ, W. S.; LIPZEN, A. M.; DILWORTH, D.; BAUER, D.; GRIMWOOD, J.; NELSON, C. R.; XING, F.; XIE, W.; BARRY, K. W.; WING, R. A.; SCHMUTZ, J.; LI G.; RONALD P. C. Genome sequence of the model rice variety KitaakeX. **BMC Genomics**, p. 20, n. 905, 2019.

JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 43, n. 6, p. 1274-9, 1971.

JEWEL, Z. A.; ALI, J.; MAHENDER, A.; HERNANDEZ, J.; PANG, Y.; LI, Z. Identification of Quantitative Trait Loci Associated with Nutrient Use Efficiency Traits, Using SNP Markers in an Early Backcross Population of Rice (*Oryza sativa* L.). **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 4, 2019.

JUNIOR, A. S. L. F.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S.; ROSSIELLO, R. O. P. Eficiência do Uso de Nitrogênio para Produção de Grão e Proteína por Cultivares de Arroz. **Pesq. agropec. bras.**, v. 32, n. 4, p. 435–442, 1997.

KANNO, Y.; HANADA, A.; CHIBA, Y.; ICHIKAWA, T.; NAKAZAWA, M.; MATSUI, M.; KOSHIBA, T.; KAMIYA, Y.; SEO, M. Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** v. 109, p. 9653–9658, 2012.

KANT S.; BI Y. M.; ROTHSTEIN S. J.; Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 4, p. 1499-1509, 2011.

KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A., Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. **Trends Plant Sci.** v. 7, n. 5, p. 193-195, 2002

KAWAHARA, Y.; DE LA BASTIDE, M.; HAMILTON, J. P.; KANAMORI, H.; MCCOMBIE, W. R.; OUYANG, S.; SCHWARTZ, D. C.; TANAKA, T.; WU, J.; ZHOU, S.; CHILDS, K. L.; DAVIDSON, R. M.; LIN, H.; QUESADA-OCAMPO, L.; VAILLANCOURT, B.; SAKAI, H.; LEE, S. S.; KIM, J.; NUMA, H.; ITOH, T.; BUELL, C. R.; MATSUMOTO, T. Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. **Rice**, v. 6, n. 1, p. 4, 2013.

KRONZUCKER, H. J.; GLASS, A. D. M.; SIDDIQI, M. Y.; KIRK, G. J. D. Comparative kinetic analysis of ammonium and nitrate acquisition by tropical lowland rice: Implications for rice cultivation and yield potential. **New Phytol.**, 145:471-476, 2000.

KROUK, G., LACOMBE, B., BIELACH, A., PERRINE-WALKER, F., MALINSKA, K., MOUNIER, E., HOYEROVA, K., TILLARD, P., LEON, S., LJUNG, K., ZAZIMALOVA, E., BENKOVA, E., NACRY, P., & GOJON, A. Nitrate-regulated auxin transport by *NRT1.1* defines a mechanism for nutrient sensing in plants. **Developmental cell**, v. 18, n. 6, p. 927-937, 2010.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. msw054, 2016.

LÉRAN, S.; VARALA, K.; BOYER, J. C.; CHIURAZZI, M.; CRAWFORD, N.; DANIEL-VEDELE, F.; DAVID, L.; DICKSTEIN, R.; FERNANDEZ, E.; FORDE, B.; GASSMANN, W.; GEIGER, D.; GOJON, A.; GONG, J. M.; HALKIER, B. A.; HARRIS, J. M.; HEDRICH, R.; LIMAMI, A. M.; RENTSCH, D.; SEO, M.; TSAY, Y. F.; ZHANG, M.; CORUZZI, G.; LACOMBE, B. A unified nomenclature of nitrate transporter 1/peptide transporter family members in plants. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 1, p. 5-9, 2014.

LI, Y.; OUYANG, J.; WANG, Y. Y.; HU, R.; XIA, K.; DUAN, J.; WANG, Y.; TSAY, Y.-F.; ZHANG, M. Disruption of the rice nitrate transporter *OsNPF2.2* hinders root-to-shoot nitrate transport and vascular development. **Sci. Rep.** v. 5, p. 9635, 2015.

LIANG, G; ZHANG, Z. Reducing the Nitrate Content in Vegetables Through Joint Regulation of Short Distance Distribution and Long-Distance Transport. **Front. Plant Sci.** v. 11, n. 1079, p. 8, 2020.

LIN, C.-M.; KOH, S.; STACEY, G.; YU, S.-M.; LIN, T.-Y. & TSAY, Y.-F. Cloning and Functional Characterization of a Constitutively Expressed Nitrate Transporter Gene, *OsNRT1*, from Rice. **Plant Physiology**, v.122, n.2, p. 379-388, 2000.

LIU, K. H.; TSAY, Y. F. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter *CHL1* by phosphorylation. **EMBO Journal**, v. 22, n. 5, p. 1005-1013, 2003.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LU, K.; WU, B.; WANG, J.; ZHU, W.; NIE, H.; QIAN, J.; HUANG, W.; FANG, Z.; Blocking amino acid transporter *OsAAP3* improves grain yield by promoting outgrowth buds and increasing tiller number in rice. **Plant Biotech. J.** v. 16, p. 1710-1722, 2018.

LUU, T.; STIEBNER, M.; MALDONADO, P. E.; VALDÉS, S.; MARÍN, D.; DELGADO, G.; LALUZ, V.; WU, L.; CHAVARRIAGA, P.; TOHME, J.; SLAMET-LOEDIN, I. H. E.; FROMMER, W. B. Efficient *Agrobacterium* -mediated Transformation of the Elite- Indica Rice Variety Komboka. **Bio-protocol**, v. 10, n. 17, p. e3739, 2020.

MA, J.; HE, Y. H.; WU, C. H.; LIU, H. P.; HU, Z. Y.; SUN, G. M. Effective *Agrobacterium*-mediated transformation of pineapple with *CYP1A1* by kanamycin selection technique. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 10, p. 2555-2562, 2012.

MAXIMINIANO, R. V. **Estudos das propriedades da Inosina em DNA através do modelo Peyrard-Bishop e análise dos parâmetros termodinâmicos utilizados na predição de estruturas secundárias de RNA.** 2017. 131f. Tese (Doutorado em Física). Instituto de Ciências Exatas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2017.

MIGOCKA, M.; WARZYBOK, A.; PAPIERNIAK, A.; KŁOBUS, G.  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  Antiport in the

Tonoplast of Cucumber Root Cells Is Stimulated by Nitrate Supply: Evidence for a Reversible Nitrate-Induced Phosphorylation of Vacuolar  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  Antiport. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e73972, 2013.

MILLER, A. J.; FAN, X.; ORSEL, M.; SMITH, S. J.; WELLS, D. M. Nitrate transport and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 9, p. 2297–2306, 2007.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**, v. 5, p. 62-71, 2001.

NACRY, P.; BOUGUYON, E.; GOJON, A. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. **Plant Soil**, v. 370, p. 1-29, 2013.

NAKAMURA, A., FUKUDA, A., SAKAI, S., & TANAKA, Y. Molecular cloning, functional expression and subcellular localization of two putative vacuolar voltage-gated chloride channels in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Cell Physiology**, v.47, n.1, p. 32-42, 2006.

NISHIMURA, A.; AICHI, I.; MATSUOKA, M. A protocol for Agrobacterium-mediated transformation in rice. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2796–2802, 2007.

ONU. Organização das Nações Unidas Brasil. Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 2. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/2> Acesso em: 01 fev. 2021.

OUYANG, J., CAI, Z., XIA, K., WANG, Y., DUAN, J., & ZHANG, M. Identification and analysis of eight peptide transporter homologs in rice. **Plant science**, v. 179, n.4, p. 374-382, 2010.

QIU, W, WANG, Z, HUANG, C, CHEN, B, & YANG, R. Nitrate accumulation in leafy vegetables and its relationship with water. **Journal of soil science and plant nutrition**, p. 14, n.4, p. 761-768, 2014.

RAZZAQ, A.; HAFIZ, I. A.; MAHMOOD, I.; HUSSAIN, A. Development of in planta transformation protocol for wheat. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 740-750, 2011.

REIS, V. M.; JESUS, E. C.; SCHWAB, S.; OLIVEIRA, A. L. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. VIII Fixação Biológica de Nitrogênio. *In: Nutrição Mineral de Plantas*. 2. ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2018. p.

RIBEIRO, F. W.; RODRIGUES, C. C.; PEIXOTO, S. A.; SILVA, A. C.; ARAÚJO, M. da S. Perspectiva econômica da implantação de arroz de terras altas no sudeste de Goiás. **Agrarian Academy**, v. 10, n. 5, p. 150–160, 2018.

ROLÃO, K. P.; ROSA, R. D. O.; NETO, L. F. F. **Análise de rentabilidade entre o cultivo de arroz irrigado e cultivo de arroz sequeiro**. 2019, São Paulo - SP: XX ENGEMA, 2019. p. 17. Disponível em: <http://engemausp.submissao.com.br/20/anais/arquivos/153.pdf>

RUIZ, H. A.; FERNANDES FILHO, E. I. **Cinética: software para estimar as constantes  $V_{m\acute{a}x}$  e  $KM$  da equação de Michaelis-Menten**. *In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas*, n.10, 1992, Piracicaba. Anais. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.124-125. 1992.

SABU, S.; KHANAM, S; SUBITSHA, A. H. Agrobacterium-Mediated Transformation in *Oryza Sativa* (Rice) to Improve Crop Yield: A Review. **International Journal of Scientific Research and Engineering Development**, v. 3, n. 6, p. 762-770, 2020.

- SAIKA, H., TOKI, S. Mature seed-derived callus of the model indica rice variety Kasalath is highly competent in *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell Rep**, v. 29, p. 1351–1364, 2010.
- SAITOU N.; NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** v.4, p. 406-425, 1987.
- SANTI, S.; LOCCI, G.; MONTE, R.; PINTON, R.; VARANINI, Z. Induction of nitrate uptake in maize roots: expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoforms. **J Exp Bot**, v. 54, p. 1851–1864, 2003.
- SANTOS, A. M.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Teores de nitrogênio, fósforo e frações solúveis em duas Variedades de arroz cultivadas em solução nutritiva sob dois níveis de nitrato. **Agronomia**, v. 37, n. 1, p. 76 - 81, 2003.
- SANTOS, L. A., BUCHER C. A., SOUZA S. R.; FERNANDES M. S. Nitrogen metabolism of rice under low nitrate availability. **Agronomia**, v. 39, p. 28–33, 2005.
- SANTOS, A. M., STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Effects of seasonal nitrate flush on nitrogen metabolism and soluble fractions accumulation in two rice varieties. **Journal of Plant Nutrition**, v. 30, n. 9, p. 1371–1384, 2007.
- SANTOS, A. M. D.; BUCHER, C. A.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S., Souza, S. R. Efeito da disponibilidade de nitrato em solução nutritiva sobre a absorção de nitrogênio e atividade enzimática de duas cultivares de arroz. **Bragantia**, v. 68, n. 1, p. 215–220, 2009.
- SANTOS, L. A.; SANTOS, W. A.; SPERANDIO, M. V. L.; BUCHER, C. A.; DE SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrate uptake kinetics and metabolic parameters in two rice varieties grown in high and low nitrate. **Journal of Plant Nutrition**, v. 34, n. 7, p. 988-1002, 2011.
- SCHROEDER, J. I.; DELHAIZE, E.; FROMMER, W. B.; GUERINOT, M. L.; HARRISON, M. J.; HERRERA-ESTRELLA, L.; HORIE, T.; KOCHIAN, L. V.; MUNNS, R.; NISHIZAWA, N. K.; TSAY, Y. F.; SANDERS, D.; Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production, **Nature**, v. 497 p. 60–66, 2013.
- SILVA, O. F. d.; WANDER, A. E. **Viabilidade econômica da cultivar de arroz de terras altas BRS Sertaneja**. 52º Congresso da SOBER - Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, Goiânia – GO, p. 1–13, 2014.
- SHAN, X.; LI, Y.; ZHOU, L.; TONG, L.; WEI, C.; QIU, L.; GAO, X.; WANG, L. Efficient isolation of protoplasts from freesia callus and its application in transient expression assays. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 138, n. 3, p. 529-541, 2019.
- SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L. M. & FERNANDES, M. S. Nitrogen Remobilization During the Reproductive Period in Two Brazilian Rice Varieties. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, n. 10, p. 2049-2063, 1998.
- SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S.; IX - Nitrogênio. *In*: FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R.; SANTOS, L. A. **Nutrição Mineral de Plantas**. 2. ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2018. p. 309-376.
- SPERANDIO, M. V. L.; SANTOS, L. A.; BUCHER, C. A.; FERNANDES, M. S.; DE 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, n. 2, p. 251-258, 2011.
- TEDESCO, M. J. Extração simultânea de N, P, K, Ca e Mg em tecido de plantas por digestão com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, **UFRGS**, p. 23, 1982.

- TILMAN, D.; BALZER, C.; HILL, J.; BEFORT, B. L. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 50, p. 20260–20264, 2011.
- TOKI, S.; HARA, N.; ONO, K.; ONODERA, H.; TAGIRI, A.; OKA, S.; TANAKA, H. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. **The Plant Journal**, v. 47, p. 969-976, 2006.
- TSAY, Y. F.; CHIU, C. C.; TSAI, C. B.; HO, C. H.; HSU, P. K. Nitrate transporters and peptide transporters. **FEBS Letters**, v. 581, n. 12, p. 2290–2300, 2007.
- TWYMAN, R. M.; STOGER, E.; KOHLI, A.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. Selectable and screenable markers for rice transformation. In: JACKSON, J. F.; LINSKENS, H. F.; INMAN, R. B. (eds) **Molecular methods of plant analysis**, v. 22, Testing for genetic manipulation in plants. Springer, Berlin, p. 1–18, 2002.
- VITOUSEK, P. M.; MENGE, D. N.; REED, S. C.; CLEVELAND, C. C. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 368, n. 1621, p. 20130119, 2013.
- VON WITTGENSTEIN, N. J., LE, C. H., HAWKINS, B. J., EHLTING, J. Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. **BMC evolutionary biology**, v. 14, p. 11, 2014.
- VON DER FECHT-BARTENBACH, J.; BOGNER, M.; DYNOWSKI, M.; LUDEWIG, U. CLC-b-mediated  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  exchange across the tonoplast of Arabidopsis vacuoles. **Plant and Cell Physiology**, v. 51, n. 6, p. 960–968, 2010.
- WAMSER, A. F.; MUNDSTOCK, C. M. Adubação nitrogenada em estádios fenológicos em cevada, cultivar “MN 698”. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 942–948, 2007.
- WANG, H.; WAN, Y.; BUCHNER, P.; KING, R.; MA, H.; HAWKESFORD, M. J. (2020). Phylogeny and gene expression of the complete NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER FAMILY in *Triticum aestivum*. **Journal of experimental botany**, v. 71, n. 15, p. 4531-4546, 2020.
- WANG, J.; LU, K.; NIE, H.; ZENG, Q.; WU, B.; QIAN, J.; FANG, Z. Rice nitrate transporter *OsNPF7.2* positively regulates tiller number and grain yield. **Rice**, v. 11, n. 1, p. 12, 2018.
- WANG, L.; XUE, C.; PAN, X.; CHEN, F.; LIU, Y. Application of controlled-release urea enhances grain yield and Nitrogen Use Efficiency in irrigated rice in the Yangtze River Basin, China. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 999, 19 jul. 2018.
- WEI, D.; CUI, K.; YE, G.; PAN, J.; XIANG, J.; HUANG, J.; NIE, L. QTL mapping for nitrogen-use efficiency and nitrogen-deficiency tolerance traits in rice. **Plant and Soil**, v. 359, n. 1–2, p. 281–295, 2012.
- WEN, Z.; KAISER B. N. Unraveling the Functional Role of *NPF6* Transporters. **Front. Plant Sci**, v. 9, n. 973, p. 8, 2018.
- WEN, Z.; TYERMAN, S. D.; DECHORGNAT, J.; OVCHINNIKOVA, E.; DHUGGA, K. S.; KAISER, B. N. Maize NPF6 Proteins Are Homologs of Arabidopsis *CHLI* That Are Selective for Both Nitrate and Chloride. **The Plant cell**, v. 29, n. 10, p. 2581–2596, 2017.
- WU, T.; QIN, Z.; FAN, L.; XUE, C.; ZHOU, X.; XIN, M.; DU, Y. Involvement of *CsNRT1.7* in nitrate recycling during senescence in cucumber. **J. Plant Nutr. Soil Sci.**, 177: p. 714-721, 2014.

- YEMM, E. W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, n. 948, p. 209–214, 1955.
- YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of Carbohydrates Plant Extracts by Anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, p.508-514, 1954.
- YOO, S., CHO, Y. & SHEEN, J. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1565–1572, 2007.
- YUNFENG, C.; SHUANGLAI, L.; DONGHAI, L.; JUN, F.; YAN, Q.; CHENG, H.; XIANGE, X. Yield, nitrogen use efficiency and balance response to thirty-five years of fertilization in paddy rice-upland wheat cropping system. **Plant, Soil and Environment**, v. 65, n. 2, p. 55–62, 2019.
- XIA, X.; FAN, X.; WEI, J.; FENG, H.; QU, H.; XIE, D.; MILLER, A. J.; XU, G. Rice nitrate transporter *OsNPF2.4* functions in low affinity acquisition and long distance transport. **J. Exp. Bot.**, v. 66, p. 317–331, 2015.
- ZHANG, Z. H.; HUANG, H. T.; SONG, H. X.; LIU, Q.; RONG, X. M.; PENG, J. W.; XIE, G.X.; ZHANG, Y.P.; GUAN, C. Y. Research advances on nitrate nitrogen reutilization by proton pump of tonoplast and its relation to nitrogen use efficiency. **Australian Journal of Crop Science**, v. 6, n. 9, p. 1377-1382, 2012.
- ZHAO, F. L.; LI, Y. J.; HU, Y.; GAO, Y. R.; ZANG, X. W.; DING, Q.; WANG, Y. J.; WEN, Y. Q. A highly efficient grapevine mesophyll protoplast system for transient gene expression and the study of disease resistance proteins. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 125, n. 1, p. 43-57, 2016.
- ZHAO, X., HUANG, J., YU, H., WANG, L. & XIE, W. Genomic survey, characterization and expression profile analysis of the peptide transporter family in rice (*Oryza sativa* L.). **BMC Plant Biol.** v. 10, p. 92, 2010.