

UFRRJ

INSTITUTO DE AGRONOMIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CIÊNCIA DO SOLO

DISSERTAÇÃO

**Contribuição do Transportador OsNRT2.4 para a
Absorção de Nitrato e Modulação da Arquitetura
Radicular em Arroz sob Baixa Disponibilidade de
Nitrogênio**

Andressa Fabiane Faria de Souza

2018



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

**CONTRIBUIÇÃO DO TRANSPORTADOR OsNRT2.4 PARA A
ABSORÇÃO DE NITRATO E MODULAÇÃO DA ARQUITETURA
RADICULAR EM ARROZ SOB BAIXA DISPONIBILIDADE DE
NITROGÊNIO**

ANDRESSA FABIANE FARIA DE SOUZA

Sob a Orientação da professora

Sonia Regina de Souza

e Coorientação do professor

Carlos Alberto Bucher

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2018

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

Ficha catalográfica elaborada
Com os dados fornecidos pela autora

S719c Souza, Andressa Fabiane Faria de, 1993-
Contribuição do Transportador OsNRT2.4 para a
Absorção de Nitrato e Modulação da Arquitetura
Radicular em Arroz sob Baixa Disponibilidade de
Nitrogênio / Andressa Fabiane Faria de Souza. - 2018.
64 f.

Orientadora: Sonia Regina de Souza.
Coorientador: Carlos Alberto Bucher.
Tese (Doutorado). - - Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Agronomia - Ciência do Solo, 2018.

1. Transportador de alta afinidade. 2.
Raiz lateral. 3. Arroz. I. Souza, Sonia Regina de,
1962-, orient. II. Bucher, Carlos Alberto, 1981-,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Agronomia - Ciência do Solo. IV. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

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

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

ANDRESSA FABIANE FARIA DE SOUZA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/02/2018.

Carlos Alberto Bucher. Dr. UFRRJ
(Co-orientador)

Leandro Azevedo Santos. Dr. UFRRJ

Luiz Mors Cabral. Dr. UFF

DEDICATÓRIA

*Aos meus avós Juraci e José,
pelos últimos bons momentos que Deus permitiu que passássemos juntos.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por sempre iluminar meus caminhos, me dando força, sabedoria e coragem para nunca desistir, independente dos obstáculos iminentes;

A minha família pelo amor, confiança, por todo o suporte que me deram para que eu chegasse até esse momento, me propiciando alcançar novos horizontes, e me tornar quem eu sou hoje;

Agradeço imensamente aos meus amigos, Dalila Araújo, Douglas Gomes, Eduardo Neto, Janne Kety, Júlio César, Marcondes Geraldo, Martha Elisa e Rafael Cavassani pelos momentos de alegria e tristeza, aprendizagem e pelas conversas científicas. Sem eles teria sido tudo muito mais difícil;

Aos professores Manlio Silvestre Fernandes e Leandro Azevedo Santos por terem me acolhido, pelos ensinamentos, e conselhos na condução dos trabalhos que tive grande prazer em desenvolvê-los;

À professora Sonia Regina de Souza, pelo exemplo de profissionalismo, pela orientação, ensinamentos, conselhos, e carinho na condução dos trabalhos;

Ao professor Carlos Alberto Bucher, pelo exemplo de profissionalismo, pela amizade e ensinamentos sobre a pesquisa científica. Ainda pela orientação do trabalho, pelo apoio, pela confiança, e pelo incentivo;

Aos amigos do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, Cassia Bucher, Leilson Arruda, Rafael Rangel, Leandro Martins, Juan Sebastian, Erinaldo Pereira, Renan Braga, Carla Patrícia, Sabrina Dahmer, Marcus Sperandio, Marcela Jacques, Erika Fernandes, Natália Frasson, Luiziene Soares, Rodolfo Vasques e Marian Lis, pelos conhecimentos transmitidos, liberdade para expressar minhas ideias e dúvidas, pelos momentos de descontração e, sobretudo pelo convívio pessoal;

Aos estudantes de iniciação científica, Laura Carine, Pedro Miller, Ana Carolina, Carla Oliveira, Caio Barbas, Thainá Fernandes e Aline Garcia pela contribuição na execução deste trabalho e nas análises laboratoriais;

Ao CPGA-CS e sua coordenação, professores e funcionários do Departamento de Solos pela cordialidade e presteza, em especial ao Marcos Cruz (Marquinhos), Michele Paulain e Vagner Moreira;

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por ter me proporcionado grande crescimento pessoal, além de um ensino de qualidade;

Às agências fomentadoras, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), em que vem sendo fornecido auxílio financeiro desde a Iniciação Científica, na graduação, até o presente momento, na pós-graduação.

BIOGRAFIA

Andressa Fabiane Faria de Souza nasceu na cidade de Ascurra – SC, em 16 de junho de 1993. Concluiu o ensino fundamental na Escola Lia Therezinha e o ensino médio na Escola Agrotécnica Federal de Alegre – ES, na qual adquiriu o título de Técnica em Agropecuária no ano de 2009. Iniciou o curso de graduação em Agronomia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em março de 2010, diplomando-se em 2015. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica por três anos e meio no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do Departamento de Solos, estudando transportadores de nitrogênio em arroz sob a orientação do professor Manlio Silvestre Fernandes. Em setembro de 2013, foi contemplada com a bolsa Ciência Sem Fronteiras da CAPES, passando um ano na Universidade de Padova (Università degli Studi di Padova), quando adquiriu experiência em Monitoramento de Gases de Efeito Estufa e Eficiência de Sistemas de Fitorremediação. Em março de 2016, foi aprovada para o mestrado no Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo (CPGA-CS), sob a orientação da professora Sonia Regina de Souza e coorientação do professor Carlos Alberto Bucher.

RESUMO

SOUZA, Andressa Fabiane Faria de. **Contribuição do transportador OsNRT2.4 para a absorção de nitrato e modulação da arquitetura radicular em arroz sob baixa disponibilidade de nitrogênio**. 2018. 64f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2018.

A disponibilidade de nutrientes no solo influencia na modulação do crescimento e arquitetura radicular. O nitrogênio (N) é um dos fatores que mais limita o crescimento e a produtividade, no entanto, plantas sob deficiência de nitrogênio investem mais no aprofundamento radicular e não limitam o alongamento lateral do sistema radicular. Para que ocorra uma absorção eficiente de nutrientes são necessários transportadores específicos de membrana que irão auxiliar na entrada do nutriente para o interior celular, com ênfase nos transportadores de nitrato de alta afinidade (NRT2). Deste modo, plantas silenciando o gene *OsNRT2.4*, obtidas por meio da técnica de silenciamento gênico por micro RNA artificial, e plantas controle (WT - tipo selvagem) foram submetidas a uma condição de baixo fornecimento de nitrato com o objetivo de investigar o papel do transportador OsNRT2.4 na promoção do estímulo do crescimento radicular. Após o processo de transformação, as plântulas obtidas foram transferidas para casa de vegetação no Departamento de Solos da UFRRJ, para obtenção das sementes de primeira geração (T₁). Sementes das linhagens obtidas apresentaram problemas quanto à germinação, por isso, para a superação da dormência das sementes, foi estabelecido um protocolo de quebra de dormência. Posteriormente, foram conduzidos três experimentos em câmara de crescimento (fitotron). O primeiro e o segundo experimento foram realizados com o intuito de selecionar aquelas linhagens silenciando o gene *OsNRT2.4*. As linhagens e as plantas WT foram cultivadas em solução nutritiva sob baixo fornecimento de nitrato (0,2 mM N-NO₃⁻) e selecionadas com base na análise de expressão gênica por meio do método do CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) e, pela análise morfológica e parâmetros radiculares, experimentos I e II, respectivamente. O experimento III foi realizado com as linhagens selecionadas previamente, L#5 e L#39, e teve como objetivo analisar o efeito do silenciamento do gene *OsNRT2.4* sobre os metabólitos solúveis e sobre o padrão de expressão das enzimas do metabolismo de N e os transportadores de nitrato de alta afinidade, cultivadas em solução nutritiva sob baixo fornecimento de nitrato e ressuprimento (0,1 mM N-NO₃⁻). Foi observado que o silenciamento do gene *OsNRT2.4* induziu uma densidade de raízes laterais semelhantes a WT, porém menor alongamento das raízes laterais, menor área de superfície, menor volume e menor número de pontas, confirmando que o transportador OsNRT2.4 possui um papel na regulação do crescimento radicular, estando especificamente envolvido no crescimento de raízes laterais. O silenciamento também afetou a expressão de outros transportadores de nitrato de alta afinidade (OsNRT2.1 e OsNAR2.1). Além disso, o transportador OsNRT2.4 possui um papel na regulação do fluxo interno de N, atuando no transporte de nitrato da raiz para a parte aérea (efluxo).

Palavras-chave: Transportador de nitrato de alta afinidade. Raiz lateral. Arroz.

ABSTRACT

SOUZA, Andressa Fabiane Faria de. **Contribution of transporter OsNRT2.4 in rice for nitrate uptake and regulating root architecture under low nitrogen availability.** 2018. 64p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2018.

The availability of nutrients in the soil influences growth modulation and root architecture. Nitrogen (N) is one of the factors that most limits plant growth and productivity, as plants with a nitrogen deficiency invest more in root depth and do not limit lateral elongation of the root system. For efficient nutrient uptake to occur, specific transporters located on the plasma membrane are required to assist in the entry of the nutrient into the cellular interior, with emphasis on high-affinity nitrate transporters (NRT2). Thus, plants silencing the *OsNRT2.4* gene, obtained through the gene silencing technique by artificial microRNA (amiRNA), and control plants (WT - wild type) were submitted to a low nitrate dose condition, with the aim of investigating the role of the OsNRT2.4 transporter in the promotion of root growth stimulus. After the process transformation, the seedlings obtained were transferred to greenhouse at the Department of Soils of UFRRJ, to obtain first generation seeds (T₁). Seeds of the obtained lines presented problems regarding the germination, so a protocol to break seed dormancy was established to overcome the problem. Subsequently, three experiments were conducted in a growth chamber (fitotron). The first and second experiments were conducted in order to select those lines silencing the *OsNRT2.4* gene. The lines and WT plants were grown in nutrient solution under a low nitrate dose (0.2 mM N-NO₃⁻) and selected based on the analysis of gene expression by the comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) and by the morphology and root parameters analysis, experiments I and II, respectively. Experiment III was carried out with the previously selected lines, L#5 and L#39. The aim was to analyze the effect of the silencing of the *OsNRT2.4* gene on the soluble metabolites and on the expression pattern of enzymes of the metabolism of N and the high-affinity nitrate transporters, cultured in nutrient solution under low dose and resupply (0.1 mM N-NO₃⁻). It was observed that the silencing of the *OsNRT2.4* gene induced a WT-like lateral root density, but lower lateral root elongation, smaller surface area, lower volume and fewer tips, confirming that the OsNRT2.4 transporter has a role in the regulation of root growth, being specifically involved in the growth of lateral roots. The silencing also affected the expression of other high-affinity nitrate transporters (OsNRT2.1 e OsNAR2.1). In addition, the OsNRT2.4 transporter has a role in the internal N flux regulation, acting in the nitrate transport from roots to shoot (efflux).

Key words: High-affinity nitrate transporter. Lateral root. Rice.

LISTA DE SÍMBOLOS

amiRNA	Micro RNA artificial
cDNA	DNA (Ácido Desoxirribonucleico) complementar (<i>complementary DNA</i>)
DAG	Dias Após a Germinação
FI	Força iônica dos nutrientes na solução nutritiva
L#	Linhagem
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro (<i>Ribonucleic Acid Messenger</i>)
osa-miRNA528	Micro RNA de <i>Oryza sativa</i> 528
<i>OsNRT2.4</i>	Gene do RNA mensageiro para o NRT2.4
OsNRT2.4	Proteína transportadora de nitrato isoforma 2.4
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa (RT) seguida de uma PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)
<i>tween 20</i>	Detergente molecular utilizado no processo de transformação de plantas e também um agente adesivo que ajuda na aderência do antibiótico na folha no teste de resistência a higromicina
WT	Tipo selvagem (<i>wild type</i>) ou planta não transformada, utilizada como planta controle nos experimentos

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Sequências dos primers gerado pela plataforma “WMD3 - Web MicroRNA Designer” contendo o amiRNA para o gene *OsNRT2.4* (LOC_Os01g36720)..... 8
- Tabela 2.** Sequências dos primers forward e reverse usados nas reações de RT-PCR semiquantitativa em Tempo Real para o gene do transportador de nitrato de alta afinidade (*OsNRT2.4*) e para os genes utilizados como controle endógeno: ubiquitina conjugada (*OsUBC – Ubiquitin – conjugating enzyme – E2*) e fator de alongamento (*OseEF-1 α*) e e, seus respectivos locus gênico no banco de dados de arroz, *Rice Genome Annotation Project*..... 15
- Tabela 3.** Sequências dos primers forward e reverse usados nas reações de RT-PCR semiquantitativa em Tempo Real para os genes dos transportadores de nitrato de alta afinidade (*OsNRT2.1*; *OsNRT2.4*), proteína NAR (*OsNAR2.1*), enzimas de assimilação (*OsGS1;1*; *OsGS2*; e *OsNIA1*) e os genes utilizados como controle endógeno: ubiquitina conjugada (*UBC – Ubiquitin – conjugating enzyme – E2*) e fator de alongamento (*OseEF-1 α*) e), e seus respectivos locus gênico obtidos no banco de dados de arroz, *Rice Genome Annotation Project*. 19

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema ilustrativo de PCR para produção de um amiRNA (micro RNA artificial) a partir do vetor pNW55. a) As sequências originais do osa-miRNA 528 e miRNA* do pNW55 (verde) foram substituídas pelas sequências artificiais do miRNA (vermelho) durante as primeiras PCRs. Os múltiplos sítios de clonagem estão em azul. Nesta etapa foram realizadas 3 reações de PCR (primer G-4368 + primer II, primer I + primer IV, primer III + primer G-4369). b) Os fragmentos de DNA resultantes das 3 reações de PCR. c) PCR de fusão dos 3 fragmentos de PCR utilizando os primers G-4368 + G-4369 resultando em um único fragmento de DNA para posterior clonagem. Fonte: adaptado de Warthmann (2008). 9
- Figura 2.** Vetor binário IRS154 usado como vetor de destino dos produtos de PCR digeridos pelas enzimas de restrição BanHI e KpNI. 10
- Figura 3.** Germinação das sementes. A) Emissão da raiz seminal (radícula) e o coleóptilo em mais de 95% das sementes; B) Plântulas aos 7 DAG (dias após a germinação). 13
- Figura 4.** Esquema do cultivo das linhagens e wild type submetidas ao tratamento com baixo suprimento de N (0,2 mM de N-NO₃⁻). Aos 14 DAG foi realizada a seleção pela resistência a higromicina. A coleta foi realizada quatro horas após a troca de solução. DAG: dias após a germinação. 13
- Figura 5.** Esquema do cultivo das linhagens e wild type submetidas ao tratamento com baixo suprimento de N (0,2 mM de N-NO₃⁻). Aos 10 DAG foi realizada a seleção pela resistência a higromicina. Aos 13 DAG a coleta foi realizada quatro horas após a troca por uma nova solução. DAG: dias após a germinação. 16
- Figura 6.** Esquema do cultivo das linhagens e wild type submetidas a dois tratamentos. Tratamento 1: ½ FI (força iônica) com baixo suprimento de N 0,1 mM de N-NO₃⁻; tratamento 2: ½ FI sem N, com ressurgimento no dia da coleta (17 DAG). Aos 6 DAG foi realizada a seleção pela resistência a higromicina. Aos 17 DAG foi realizada a coleta quatro horas após a troca por uma nova solução. DAG: dias após a germinação. 18
- Figura 7.** Etapas da transformação de arroz mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para obtenção de linhagens silenciando o gene *OsNRT2.4*. A) Sementes de arroz da variedade Nipponbare em meio de indução de calos N6D a 32°C por 14 dias em Câmara de Germinação com fotoperíodo controlado para a indução de calos embriogênicos. B) Produção de calos embriogênicos após o período de 14 dias no meio de indução de calos N6D. C) Cultivo da *Agrobacterium tumefaciens* em Meio AB contendo a construção gênica para *OsNRT2.4*. As placas foram colocadas para crescer a 28°C por 3 dias. D) Meio AAM para ressuspensão da *Agrobacterium tumefaciens* e inoculação dos calos. E) Processo de transferência dos calos para o Meio N6D-As (Meio de Cocultivo). F) Calos de arroz da variedade Nipponbare no Meio de seleção contendo os antibióticos: higromicina e timentin permanecendo a 32°C por duas semanas. G) Surgimento das primeiras plântulas após os calos serem cultivados no Meio de regeneração de parte aérea a 28°C. H) Plântulas cultivadas no Meio de regeneração de raiz a 28°C. I) Transferência das plântulas para casa de vegetação para obtenção de sementes após serem aclimatadas por um período de 5 semanas na Câmara de Crescimento com fotoperíodo de

14horas/10horas (luz/escuro), fluxo de fótons fotossintéticos de $320 \mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, umidade relativa do ar de 65% e temperatura de 28°C (diurna/noturna). 21

Figura 8. Expressão gênica relativa em raízes das linhagens de arroz da variedade Nipponbare obtidas após o procedimento de transformação de plantas via *Agrobacterium tumefaciens* em raízes das plantas WT e das linhagens transformadas, cultivadas sob fornecimento constante de $0,2 \text{ mM}$ de N-NO_3^- , coletadas no 21° DAG após 4 horas da troca de solução nutritiva. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média. DAG: dias após a germinação. Todos os níveis de expressão do *OsNRT2.4* foram normalizados para a expressão do *OsUBC* e *OseEF-1 α* 22

Figura 9. Parâmetros morfológicos: A) altura da parte aérea em centímetros, B) profundidade radicular em centímetros, C) peso de massa seca (MS) de raiz em gramas das plantas WT e linhagens de arroz da variedade Nipponbare cultivadas sob fornecimento constante de $0,2 \text{ mM}$ de N-NO_3^- durante 13 dias, tendo sido a coleta realizada 4 horas após a troca da solução nutritiva. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média. 24

Figura 10. Parâmetros radiculares: A) comprimento em milímetros, B) área de superfície em milímetros quadrados, C) volume em milímetros cúbicos, D) número de pontas, E) relação pontas/comprimento em milímetros, F) diâmetro médio em mm/10 obtidos através da análise no software *WinRhizo Arabidopsis* (2012b) das plantas WT e das 9 linhagens transformadas cultivadas sob fornecimento constante de $0,2 \text{ mM}$ de N-NO_3^- durante 13 dias, tendo sido a coleta realizada 4 horas após a troca da solução nutritiva. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média. 26

Figura 11. Parâmetro radicular: comprimento, dentro das classes de diâmetro: A) menor que $0,5 \text{ mm}$ (muito finas), B) $0,5$ a $1,50 \text{ mm}$ (raízes finas), C) $1,50$ a $3,50 \text{ mm}$ (medianamente espessas), obtidos de raízes intactas, utilizando o software *WinRhizo Arabidopsis* (2012b), das plantas WT e das 9 linhagens transformadas cultivadas sob fornecimento constante com $0,2 \text{ mM}$ de N-NO_3^- durante 13 dias. A coleta foi realizada 4 horas após a troca da solução nutritiva. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média. 27

Figura 12. Parâmetro radicular: área de superfície, dentro das classes de diâmetro: A) menor que $0,5 \text{ mm}$ (muito finas), B) $0,5$ a $1,50 \text{ mm}$ (raízes finas), C) $1,50$ a $3,50 \text{ mm}$ (medianamente espessas), obtidos de raízes intactas, utilizando o software *WinRhizo Arabidopsis* (2012b), das plantas WT e das 9 linhagens transformadas cultivadas sob fornecimento constante com $0,2 \text{ mM}$ de N-NO_3^- durante 13 dias. A coleta foi realizada 4 horas após a troca da solução nutritiva. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média. 28

Figura 13. Parâmetro radicular: volume, dentro das classes de diâmetro: A) menor que $0,5 \text{ mm}$ (muito finas), B) $0,5$ a $1,50 \text{ mm}$ (raízes finas), C) $1,50$ a $3,50 \text{ mm}$ (medianamente espessas), obtidos de raízes intactas, utilizando o software *WinRhizo Arabidopsis* (2012b), das plantas WT e das 9 linhagens transformadas cultivadas sob fornecimento constante com $0,2 \text{ mM}$ de N-NO_3^- durante 13 dias. A coleta foi realizada 4 horas após a troca da solução nutritiva. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média. 29

Figura 14. Parâmetro radicular: número de pontas, dentro das classes de diâmetro: A) menor que 0,5 mm (muito finas), B) 0,5 a 1,50 mm (raízes finas), C) 1,50 a 3,50 mm (medianamente espessas), obtidos de raízes intactas, utilizando o software *WinRhizo Arabidopsis* (2012b), das plantas WT e das 9 linhagens transformadas cultivadas sob fornecimento constante com 0,2 mM de N-NO₃⁻ durante 13 dias. A coleta foi realizada 4 horas após a troca da solução nutritiva. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet (p<0,05). As barras indicam o erro padrão da média..... 30

Figura 15. Expressão gênica relativa de raízes de plantas WT e linhagens de arroz selecionadas da variedade Nipponbare obtidas após o procedimento de transformação de plantas via *Agrobacterium tumefaciens* em raízes das plantas WT e das linhagens transformadas, cultivadas sob fornecimento constante de 0,2 mM de N-NO₃⁻ por 6 dias, coletadas no 21° DAG após 4 horas da troca de solução nutritiva. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet (p<0,05). As barras indicam o erro padrão da média. DAG: dias após a germinação. Todos os níveis de expressão do *OsNRT2.4* foram normalizados para a expressão do *OsUBC* e *OseEF-1a*.. 32

Figura 16. Massa fresca em gramas de A) raiz e B) parte aérea, C) relação raiz/parte aérea das plantas WT e linhagens de arroz transformadas L#5 e L#39. As plantas foram cultivadas sob fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO₃⁻, e aos 13 DAG foram submetidas aos tratamentos. Tratamento 1: fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO₃⁻; Tratamento 2: consistiu na privação de N por um período de 4 dias com ressurgimento de 0,1 mM N-NO₃⁻ quatro horas antes da coleta. Aos 17 DAG foi realizada a coleta quatro horas após a troca da solução nutritiva. DAG: dias após a germinação. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet (p<0,05). As barras indicam o erro padrão da média..... 33

Figura 17. Metabólitos solúveis: A e C) Teores de N-amino em gramas/massa fresca (MF), B e D) teores de glicose em miligramas/massa fresca (MF) das plantas WT e linhagens de arroz transformadas L#5 e L#39. As plantas foram cultivadas sob fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO₃⁻, e aos 13 DAG foram submetidas aos tratamentos. Tratamento 1: fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO₃⁻; Tratamento 2: consistiu na privação de N por um período de 4 dias com ressurgimento de 0,1 mM N-NO₃⁻ quatro horas antes da coleta. Aos 17 DAG foi realizada a coleta quatro horas após a troca da solução nutritiva. DAG: dias após a germinação. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet (p<0,05). As barras indicam o erro padrão da média..... 35

Figura 18. Metabólitos solúveis: A e C) Teores de N-NO₃⁻ em micro moles/gramas de massa fresca (MF), B e D) teores de NH₄⁺ em micro moles/gramas de massa fresca (MF) das plantas WT e linhagens de arroz transformadas L#5 e L#39. As plantas foram cultivadas sob fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO₃⁻, e aos 13 DAG foram submetidas aos tratamentos. Tratamento 1: fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO₃⁻; Tratamento 2: consistiu na privação de N por um período de 4 dias com ressurgimento de 0,1 mM N-NO₃⁻ quatro horas antes da coleta. Aos 17 DAG foi realizada a coleta quatro horas após a troca da solução nutritiva. DAG: dias após a germinação. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet (p<0,05). As barras indicam o erro padrão da média. 36

Figura 19. Expressão gênica relativa das enzimas do metabolismo de N: A, B) *OsGS1;1*, C, D) *OsGS2*, E, F) enzima de assimilação de NO₃⁻, *OsNIA1*, em raiz e parte aérea das

plantas WT e das linhagens de arroz transformadas L#5 e L#39. As plantas foram cultivadas sob fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO₃⁻, e aos 13 DAG foram submetidas aos tratamentos. Tratamento 1: fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO₃⁻ Tratamento 2: consistiu na privação de N por um período de 4 dias com ressurgimento de 0,1 mM N-NO₃⁻ quatro horas antes da coleta. Aos 17 DAG foi realizada a coleta quatro horas após a troca da solução nutritiva. DAG: dias após a germinação. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet (p<0,05). As barras indicam o erro padrão da média. Todos os níveis de expressão do *OsNRT2.4* foram normalizados para a expressão do *OsUBC* e *OseEF-1a*..... 39

Figura 20. Expressão gênica relativa do gene *OsNRT2.4* em A) raiz e B) parte aérea das plantas WT e das linhagens de arroz transformadas L#5 e L#39. As plantas foram cultivadas sob fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO₃⁻, e aos 13 DAG foram submetidas aos tratamentos. Tratamento 1: fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO₃⁻ Tratamento 2: consistiu na privação de N por um período de 4 dias com ressurgimento de 0,1 mM N-NO₃⁻ quatro horas antes da coleta. Aos 17 DAG foi realizada a coleta quatro horas após a troca da solução nutritiva. DAG: dias após a germinação. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet (p<0,05). As barras indicam o erro padrão da média. Todos os níveis de expressão do *OsNRT2.4* foram normalizados para a expressão do *OsUBC* e *OseEF-1a*..... 41

Figura 21. Expressão gênica relativa do gene A) *OsNRT2.1* e B) *OsNAR2.1* em raiz das plantas WT e das linhagens de arroz transformadas, L#5 e L#39. As plantas foram cultivadas sob fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO₃⁻, e aos 13 DAG foram submetidas aos tratamentos. Tratamento 1: fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO₃⁻ Tratamento 2: consistiu na privação de N por um período de 4 dias com ressurgimento de 0,1 mM N-NO₃⁻ quatro horas antes da coleta. Aos 17 DAG foi realizada a coleta quatro horas após a troca da solução nutritiva. DAG: dias após a germinação. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet (p<0,05). As barras indicam o erro padrão da média. Todos os níveis de expressão do *OsNRT2.4* foram normalizados para a expressão do *OsUBC* e *OseEF-1a*..... 43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Arroz: Planta-Modelo para os Estudos Biotecnológicos	3
2.2 Importância do Nitrogênio para as Plantas	4
2.3 Modulação do Crescimento e Arquitetura Radicular	5
2.4 Regulação da Absorção de Nitrato pelos Transportadores de Alta Afinidade	6
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1 Obtenção de Linhagens Silenciando o Gene <i>OsNRT2.4</i>	8
3.1.1 Construção do cassete de expressão para silenciamento do gene <i>OsNRT2.4</i> por meio da técnica de microRNA artificial.....	8
3.1.2 Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10
3.1.3 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10
3.1.4 Transformação de arroz mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	11
3.2 Seleção das Linhagens Silenciando o Gene <i>OsNRT2.4</i> na Variedade Nipponbare.....	12
3.2.1 Análise da expressão gênica a partir do método do CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) – Experimento I.....	12
3.2.2 Análise morfológica e radicular das linhagens silenciadas para o gene <i>OsNRT2.4</i> – Experimento II	16
3.3 Análise do Efeito do Silenciamento do Gene <i>OsNRT2.4</i> sobre os Parâmetros Morfológicos e o Padrão de Expressão das Enzimas do Metabolismo de N e Transportadores de Nitrato de Alta Afinidade – Experimento III	17
3.4 Análise Estatística.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 Linhagens de Arroz Obtidas Durante o Processo de Transformação para o Silenciamento do Gene <i>OsNRT2.4</i>	20
4.2 Seleção das Linhagens Silenciando o Gene <i>OsNRT2.4</i> quanto ao Padrão de Expressão Gênica e Parâmetros Morfológicos e Radiculares	22
4.2.1 Avaliação do padrão de expressão gênica do <i>OsNRT2.4</i> em resposta ao $N-NO_3^-$ – Experimento I.....	22

4.2.2 Avaliação da influência do gene <i>OsNRT2.4</i> sobre os parâmetros morfológicos e radiculares em resposta ao suprimento de N-NO ₃ ⁻ – Experimento II	23
4.3 Efeito do Silenciamento do Gene <i>OsNRT2.4</i> sobre os Metabólitos Solúveis, Padrão de Expressão das Enzimas do Metabolismo de N e Transportadores de NO ₃ ⁻ de Alta Afinidade – Experimento III.....	32
4.3.1 Avaliação dos metabólitos solúveis – NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , N-amino e açúcares solúveis.	32
4.3.2 Expressão das enzimas do metabolismo de nitrogênio.....	38
5 CONCLUSÕES	46
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
8 ANEXOS	62

1 INTRODUÇÃO

A disponibilidade de nutrientes no solo influencia na modulação do crescimento e arquitetura radicular, sendo esta última determinante para uma maior eficiência de aquisição (Kiba & Krapp, 2016). De acordo com López-Bucio et al. (2003), existem 3 processos responsáveis pela determinação da arquitetura radicular: primeiro, a divisão celular no meristema apical da raiz, responsável pelo crescimento indeterminado da raiz pela adição de novas células; o segundo processo está relacionado com a formação de raízes laterais, que aumenta a capacidade de exploração do solo; e o terceiro, a formação de pelos radiculares que incrementam a superfície de contato solo-planta.

Como a água e os nutrientes no solo não são bem distribuídos, o arranjo espacial do sistema radicular é crucial para otimizar o uso dos recursos disponíveis, sendo o comprimento, número, ângulo e posicionamento componentes determinantes na capacidade de exploração do solo pelas raízes (Koevoets et al., 2016).

Ainda segundo estes mesmos autores (Koevoets et al., 2016), a arquitetura do sistema radicular é moldada em resposta aos diferentes tipos de estresses abióticos, sendo muito estudadas as condições de estresse salino, seca, e plantas sob baixa disponibilidade, principalmente de fósforo e nitrogênio (N), em que a deficiência por fosfato ocasiona um crescimento mais superficial do sistema radicular e menor crescimento da raiz principal, ao passo que a baixa disponibilidade de nitrato (NO_3^-) não limita o alongamento primário permitindo que o sistema radicular alcance camadas mais profundas do solo.

No tocante ao cenário em destaque, o nutriente para este estudo é o N, um dos elementos mais requeridos pelas plantas, sendo essencial em todos os aminoácidos, incorporado em proteínas, presente nos ácidos nucleicos (DNA e RNA), bem como constitui cerca de 2% da massa seca (Samarappuli et al., 2014).

Por ser um nutriente de elevada demanda é um recurso importante no crescimento das plantas, favorecendo o incremento no peso, no número de panículas, tamanho das folhas, número de espiguetas e número de grãos cheios que, em grande parte, determinam a produtividade de uma planta de arroz (Bloom, 2015).

O arroz é um dos cereais mais consumidos e produzidos ao redor do mundo, perdendo apenas para as culturas milho e trigo (FAO, 2016). É um cereal de suma importância na dieta alimentar da população brasileira, sendo um alimento rico em amido e altamente calórico (Lam-Sánchez et al., 1994). O desenvolvimento de variedades de arroz com capacidade de absorver e utilizar N com mais eficiência, torna-se uma alternativa para o aumento da produção e a diminuição do uso de fertilizantes nitrogenados em sistemas nos quais o seu uso é intensivo, o que causaria a diminuição dos custos de produção e riscos ambientais.

A baixa disponibilidade de nitrogênio (N) é um dos fatores que mais limita o crescimento e a produtividade em plantas. A forma disponível de N no solo pode ser como íons orgânicos, NO_3^- e NH_4^+ ou aminoácidos, que podem ser catiônicos, aniônicos ou neutros dependendo da espécie química e do pH do solo. Entretanto, NO_3^- e NH_4^+ são consideradas as principais formas de N no solo para as plantas, podendo ser assimilado na raiz ou transportado inalterado para a parte aérea (Haynes & Goh, 1978; Kronzucker et al., 2000).

Para que ocorra a absorção de N são necessários transportadores específicos de membrana que irão auxiliar na entrada do nutriente para o interior celular. Os primeiros transportadores de nitrato (NO_3^-) foram identificados e caracterizados há mais de 20 anos. Assim, pelo menos 4 famílias transportadoras de nitrato têm sido identificadas nas plantas:

NPF (anteriormente NRT1/PTR), NRT2 (Buchner & Hawkesford, 2014), CLC e SLAC1/SLAH (Wang et al., 2012)

De acordo com Feng et al. (2011) o transportador de nitrato OsNRT2.4, membro da família NRT2 (transportador de alta afinidade), possui sua expressão regulada pelo baixo suprimento de N em arroz (*Oryza sativa*). Uma pesquisa recente, desenvolvida pelo grupo de pesquisa de Wei et al. (2018), relatou que o transportador OsNRT2.4 é expresso nos primórdios das raízes laterais e desempenha um papel importante no crescimento do arroz.

Para avaliar o papel do transportador OsNRT2.4 no crescimento radicular de arroz sob baixo suprimento de N, tornou-se necessário lançar mão de técnicas voltadas para engenharia genética de plantas, sendo que muitos estudos utilizam a técnica do silenciamento gênico como ferramenta para estudos da função de um gene, além dos esforços que têm sido feitos acerca de protocolos que sejam eficientes na transformação genética de plantas mediada pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (Sahoo et al., 2011; Shri et al., 2013).

O uso de microRNAs artificiais (amiRNAs) com base na tecnologia do microRNA fornece uma solução inteligente para clivagens específicas da sequência de qualquer transcrição alvo, designando um grande potencial para abordagens biotecnológicas para proteção de cultivos (Baldrich & San Segundo, 2016), além de fornecer uma abordagem altamente específica para o silenciamento gênico em plantas (Ossowski et al., 2008).

Assim, fundamenta-se a importância deste estudo na absorção eficiente de nutrientes que ocorre devido à diversidade de transportadores de nitrogênio, com ênfase nos transportadores de nitrato de alta afinidade (NRT2). A obtenção de linhagens de arroz silenciando o gene *OsNRT2.4* possibilita avaliar seu efeito sobre o sistema de alta afinidade para absorção de $N-NO_3^-$, bem como possíveis alterações na sinalização e/ou habilidade em absorver nitrato, podendo influenciar em um melhor desenvolvimento radicular ao longo do ciclo da cultura.

A hipótese desta dissertação parte do princípio de que o transportador OsNRT2.4 está envolvido na regulação da absorção de nitrogênio, na modulação da morfologia e na arquitetura radicular em ambiente com baixa disponibilidade de nitrato.

Com base nessas informações, o objetivo deste trabalho foi investigar o papel do transportador OsNRT2.4 na promoção do estímulo do crescimento radicular em resposta ao baixo suprimento de $N-NO_3^-$ em linhagens mutantes de arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade Nipponbare, obtidas por meio da técnica de silenciamento gênico por microRNA artificial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Arroz: Planta-Modelo para os Estudos Biotecnológicos

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos alimentos básicos mais consumidos pela população humana ao redor do mundo ficando atrás apenas das culturas de milho e trigo. Seu consumo ocorre principalmente nos países em desenvolvimento, fornecendo uma grande porção de calorias e proteínas na dieta humana (GRiSP, 2013; Baldrich & San Segundo, 2016).

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2018) a produção mundial de arroz na safra 2017/2018 foi de 495,4 milhões de toneladas, com a China em primeiro lugar na produção (148, 87 milhões de toneladas) e o Brasil ficando entre os dez principais produtores de arroz do mundo, produzindo conforme os dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018) 12,07 milhões de toneladas para uma área plantada de 1,97 milhão de hectares.

A importância do arroz tem sido comprovada em estudos realizados que evidenciam sua maior eficiência quanto à aquisição e ao uso de nitrogênio (N) devido aos genes envolvidos na melhoria no uso eficiente de nitrogênio reduzindo, assim, o uso de fertilizantes químicos que resultam em poluição ambiental, mudanças climáticas e perda de biodiversidade (Bredemeier & Mundstock, 2000; Li et al., 2017).

Diante de tal panorama, a cultura do arroz surgiu como uma planta modelo nos estudos de biologia molecular em monocotiledôneas por diversas razões (Shimamoto & Kyojuka, 2002). O tamanho do seu genoma é relativamente pequeno comparado com o de outros cereais, como milho (3000Mb), cevada (3500 Mb) e trigo (7000 Mb) (Kurata et al., 2002), o que facilitou o sequenciamento completo do genoma de arroz da variedade Nipponbare, com o tamanho do genoma variando entre 384,2 a 386,5 Mbp e a cobertura da montagem variando entre 96,6-97,1% de todo o genoma, distribuídos em 12 cromossomos (Kawahara et al., 2013).

Outra razão é a disponibilidade de ferramentas para estudos de genômica funcional (Li et al., 2018b), como plataformas para identificação e caracterização de um gene e ferramentas para estudo de função gênica, por exemplo, a técnica do T-DNA, tecnologia de microarranjo para estudo do perfil de expressão do mRNA, a técnica do microRNA artificial para o silenciamento do gene, o uso da tecnologia Gateway para superexpressão do gene, e a técnica mais recente: CRISPR/Cas9 para o nocaute de genes. Além dos protocolos estabelecidos para a transformação gênica mediados pela *Agrobacterium tumefaciens* serem relativamente mais fáceis quando comparado a outros cereais (Toki et al., 2006; Sahoo et al., 2011).

Ao longo de décadas, o Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas (LNMP) vem desenvolvendo trabalhos com a cultura de arroz, tendo sido relatada, em inúmeros trabalhos, a importância de se estudar variedades locais do Maranhão que possuem maior acúmulo de proteína em grãos de arroz, bem como apresentam maior eficiência quanto à absorção, assimilação e remobilização de N (Fernandes, 1978, 1990; Souza, 1995; Souza et al., 1998; Santos et al., 2005; Bucher, 2007; Coelho et al., 2016). Além disso, sem esquecer daquelas variedades que desenvolvem estratégias quanto à disponibilidade de nitrogênio no meio (Souza et al., 1999; Baptista et al., 2000; Santos et al., 2009a).

Com o advento das técnicas de biologia molecular, novos métodos de pesquisa em nutrição de plantas foram sendo implementados como suporte para os estudos de eficiência no uso de nitrogênio, como o uso de ferramentas moleculares para estudo da função gênica em plantas de arroz (Santos, 2009; Ferreira et al., 2015; Neves, 2014; Sperandio, 2015) que, por

consequente, tem elucidado os mecanismos envolvidos na tolerância ao déficit hídrico (Rangel, 2014; Ferreira, 2017; Rangel, 2018), e a adaptação das plantas a ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes (Santos et al., 2009b; Bucher et al., 2014; Arruda et al., 2018).

2.2 Importância do Nitrogênio para as Plantas

O nitrogênio (N) é um elemento essencial requerido em quantidades superiores, exceto para o carbono, oxigênio e hidrogênio, sendo essencial em todos os aminoácidos, incorporado em proteínas, e está presente nas bases que compõem os ácidos nucleicos, tais como DNA e RNA. A maioria das plantas usa o N mineral dos solos, com exceção de algumas leguminosas que podem fixar o N atmosférico por meio da simbiose com bactérias, para que ocorra a conversão do nitrogênio gasoso em formas utilizáveis pelos organismos vivos (Basuchaudhuri, 2015).

Por ser um nutriente de elevada demanda é um recurso importante no crescimento das plantas, favorecendo o incremento no peso, no número de panículas, tamanho das folhas, número de espiguetas, e número de grãos cheios que, em grande parte, determina a produtividade de uma planta de arroz (Bloom, 2015). O N constitui aproximadamente 2% da massa seca produzida, sendo muito utilizado em moléculas de clorofila, que são essenciais para a fotossíntese e manutenção do crescimento (Samarappuli et al., 2014). Em áreas de cultivo de arroz sob sistema de sequeiro (terras altas), o N tem um papel fundamental: aumentar a área foliar da planta. Esse aumento viabiliza a eficiência de interceptação da radiação solar e a taxa fotossintética, assim como os componentes que influenciam na produtividade do grão (EMBRAPA, 2004).

A improbabilidade dos solos cultivados fornecerem às plantas todos os nutrientes em quantidades suficientes para o seu desenvolvimento faz da fertilização química uma atividade essencial para a agricultura. Em solos tropicais, as plantas cultivadas apresentam uma forte dependência da fertilização nitrogenada aplicada, principalmente, nas formas de NO_3^- e NH_4^+ (Tilman, 1999).

De acordo com dados do The World Bank (2016), de 2002-2013 houve um incremento no consumo mundial de fertilizantes, atingindo o valor de 120 Kg/ha de terra cultivável. Após a Revolução Verde ocorreu um progresso impressionante no aumento da produtividade das culturas ao longo das últimas décadas. No entanto, os esforços para aumentar a produtividade por meio da utilização de fertilizantes químicos, defensivos agrícolas e a irrigação intensiva resultam em aumentos significativos nos custos de produção e nos impactos ambientais.

Os adubos nitrogenados mais utilizados são a ureia (45% de N), sulfato de amônio (21% de N e 23% de S), nitrato de potássio (13% de N e 44% de K_2O), fosfato monoamônico ou MAP (10% de N e 46 a 50% de P_2O_5) e fosfato diamônico ou DAP (16% de N e 38 a 40% de P_2O_5). No Brasil, as principais fontes de N utilizadas na cultura do arroz são a ureia e o sulfato de amônio, pois possuem maiores concentrações de N, menor preço para aquisição, e menor poder acidificante do solo, quando comparada as outras fontes (Marchesan et al., 2011).

De acordo com os trabalhos publicados, a utilização eficiente de N promove um melhor crescimento e produtividade das plantas, além de prevenir os efeitos negativos dos fertilizantes nitrogenados no meio ambiente e para a saúde humana (Tilman et al., 2001; Masclaux-Daubresse et al., 2010; Laugier et al., 2012; Kechid et al., 2013; Lezhneva et al., 2014; Xia et al., 2014; Chen et al., 2016). São diversos os grupos de pesquisa que têm buscado aplicação de tecnologias para alcançar uma intensificação na produção de forma sustentável, o que significa utilizar menos pesticidas, fertilizantes, água, estudar variedades

resistentes à seca e, ao mesmo tempo, buscar maiores rendimentos por unidade de área ou maior eficiência de uso de insumos (FAO, 2016).

É unânime o reconhecimento entre os pesquisadores das ciências agrárias acerca da necessidade de desenvolver variedades de plantas que apresentem a capacidade de absorver e utilizar o nitrogênio de maneira mais eficiente (Hirel et al., 2007; Kichey et al., 2007; Tabuchi et al., 2007; Masclaux-Daubresse et al., 2008). A absorção de nitrogênio do solo é dependente da condição ambiental e da capacidade da planta, e nesse contexto, é estimado que até 70% do N aplicado ao solo como fertilizante pode ser perdido (Peoples et al., 1995; Hodge et al., 2000).

A aquisição do N mineral é realizada por meio do sistema radicular sob a forma de nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+) podendo ser assimilado na própria raiz ou ser transportado inalterado para a parte aérea, na qual ocorrerá a sua assimilação. Ambos, nitrato e amônio, são consideradas as principais formas de N no solo para as plantas (Haynes & Goh, 1978; Kronzucker et al., 2000).

O nitrato (NO_3^-) é a maior fonte de N para a maioria das plantas superiores (Bloom, 2015), podendo ser acumulado no vacúolo ou ser reduzido a nitrito no citosol da célula e convertido a amônio no plastídio, para a sua posterior incorporação em aminoácidos, enquanto que o NH_4^+ , após a sua entrada na célula, é diretamente incorporado em aminoácidos (Souza & Fernandes, 2018). A conversão de NO_3^- em aminoácidos é um processo altamente exigente em termos energéticos, quando comparado à demanda energética necessária para a assimilação de NH_4^+ , pois este não precisa ser reduzido para ser incorporado (Bloom, 2015).

2.3 Modulação do Crescimento e Arquitetura Radicular

Já está claramente elucidada a necessidade de adaptação das plantas às mudanças climáticas, bem como a baixa disponibilidade de nutrientes, podendo, por exemplo, otimizar a interceptação de nitrato no solo. Mediante a susceptibilidade do N ser perdido da solução do solo, uma das formas de viabilizar uma eficiente absorção de nitrato é por intermédio de modificações na arquitetura radicular melhorando, assim, a capacidade para absorver e utilizar o N mais eficientemente (Krapp et al., 2014).

A disponibilidade de nutrientes na solução do solo pode ser determinante na arquitetura do sistema radicular (qualquer modificação afeta profundamente a capacidade das plantas em absorver água e nutrientes, sendo influenciada também por fatores ambientais), no surgimento de raízes adventícias e pode ainda afetar específicas funções nas plantas que dependem da disponibilidade de nutrientes (López-Bucio et al., 2003). Além disso, entender o desenvolvimento, a arquitetura, a atividade e plasticidade do sistema radicular, pode ter grande impacto sobre a eficiência de absorção de nutrientes (Gruber et al., 2013; Koevoets et al., 2016; Kadam et al., 2017).

Koevoets et al. (2016) destacam que a distribuição de água e nutrientes no solo determinam o volume de solo a ser explorado pelo sistema radicular, modulando o comprimento, número, posição e ângulo dos componentes radiculares que, juntos, determinam o arranjo espacial do sistema radicular. A habilidade de modular o arranjo espacial do sistema radicular é um importante aspecto na adaptação das plantas a uma grande variedade de condições abióticas (Smith & De Smet, 2012).

Segundo Miller et al. (2007), muitos trabalhos publicados comparam o crescimento radicular de plantas *wild type* (WT) com plantas mutantes, assim como tem sido identificado genes que atuam em transportadores específicos de NO_3^- , podendo induzir o desenvolvimento

do alongamento das raízes laterais, sendo que esta função ocorre independente do influxo de NO_3^- .

Além disso, a aplicação de nitrato pode determinar inúmeras mudanças por ser um íon de sinalização, podendo controlar a expressão de muitos genes induzidos por nitrato e alterações metabólicas (Crawford, 1995; Kant, 2018), influenciar o crescimento e desenvolvimento das plantas, como, por exemplo, o alongamento de raízes laterais e alterações no tempo de florescimento (Zhang & Forde, 2000; Fredes et al., 2019).

2.4 Regulação da Absorção de Nitrato pelos Transportadores de Alta Afinidade

Entender o sistema de transporte de nutrientes nas raízes é muito importante para melhorar o uso eficiente de N (Krapp, 2015). A caracterização dos transportadores de nitrato tem um papel fundamental no entendimento do transporte deste nutriente em nível celular e de planta, podendo associar as várias condições ambientais quanto à exposição das plantas (Léran et al., 2014).

Os vegetais usam uma combinação de transportadores e canais com diversa gama de afinidade e especificidade, visto que muitas dessas funções já foram elucidadas em *Arabidopsis thaliana* (Kiba & Krapp, 2016). Considerando os diversos estudos que relatam a importância dos transportadores de nitrato, sendo estes envolvidos na absorção, translocação e estocagem de nitrato na planta, eles são didaticamente separados na família: NPF (*Nitrate Transporter 1/Peptide Transporter (NRT1/PTR) Family*, nomenclatura renomeada por Léran et al., 2014); NRT2 (*Nitrate Transporter 2 family*) (Buchner & Hawkesford, 2014); CLC (*Chloride Channel*) com 7 membros em *Arabidopsis*; e SLAC1/SLAH (*Slowly Activating Anion Channel*) com 5 membros em *Arabidopsis* (Wang et al., 2012; Krapp et al., 2014; Fan et al., 2017).

As proteínas que pertencem à família NPF (*Nitrate Peptide Family*) são transportadoras de baixa afinidade (LATS – *Low Affinity Transport System*), que atuam quando sob alta concentração externa de nitrato no meio (concentrações externas superiores a 1mM) (Buchner & Hawkesford, 2014; Xia et al., 2014). Já foram identificados 53 membros no genoma de *Arabidopsis* (Léran et al., 2014; Krapp et al., 2014; Kiba & Krapp, 2016), 44 genes em *Ananas comosus* (pera) (Li et al., 2018a), 93 membros em arroz e 92 membros em *Lotus japonicus* (Léran et al., 2014) e outros 97 membros em *Medicago truncatula* (Pellizzaro et al., 2017).

Embora os membros NPF apresentem baixa afinidade por nitrato (Léran et al., 2014), algumas proteínas, bem como *AtNPF6.3* (*AtNRT1.1* ou *CHL1*) em *Arabidopsis* (Ho et al., 2009) e *MtNPF6.8* (*MtNRT1.3*) em *Medicago truncatula* (Morère-Le Paven et al., 2011), atuam como transportadores de nitrato de dupla afinidade, isto é, atuam tanto no sistema HATS quanto no sistema LATS. Além disso, *AtNPF6.3* foi o primeiro “*transceptor*” identificado em plantas, isto é, uma proteína que possui dupla afinidade no sistema de transporte e atua na sinalização de nitrato nas plantas (Ho et al., 2009; Gojon et al., 2011), além de estar envolvida também no transporte de auxina (Krouk et al., 2010).

Em contrapartida, os membros da família NRT2 (*Nitrate Transport 2*) são transportadores de alta afinidade (HATS - *High Affinity Transport System*), que possuem sua expressão regulada pelo baixo suprimento de N (concentrações externas inferiores a 1mM) para que possa ser induzido (Cai et al., 2008; Feng et al., 2011). Foram identificados pelo menos sete membros no genoma de *Arabidopsis* (Miller et al., 2007; Pellizzaro et al., 2015), quatro em arroz (Cai et al., 2008; Feng et al., 2011), três em *Medicago truncatula* (Pellizzaro et al., 2015, 2017) e quatro em *Lotus japonicus* (Léran et al., 2014).

Em *Arabidopsis*, quatro dos sete membros da família de transporte NRT2, *AtNRT2.1*, *AtNRT2.2*, *AtNRT2.4* e *AtNRT2.5* são expressos nas raízes das plantas privadas do fornecimento de N e ainda sugerem uma distribuição espaço-temporal, pois, embora *AtNRT2.4* e *AtNRT2.5* sejam expressos no mesmo tipo de célula, as suas formas predominantes mudam, sendo expressos em plântulas jovens e plantas adultas, respectivamente, enquanto o *AtNRT2.1* é fortemente expresso nas partes mais velhas do sistema radicular (Kiba et al., 2012; Krapp et al., 2014; Kiba & Krapp, 2016).

O nível de expressão de muitos transportadores NRT2 em plantas superiores é modulado pela presença de uma proteína acessória chamada NAR2 (ou NRT3), proteína relacionada com a assimilação do nitrato (Miller et al., 2007; Yan et al., 2011; Krapp et al., 2014; Fan et al., 2017). Foram caracterizados dois genes NAR2 em *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* (Pellizzaro et al., 2015), e somente NAR2.1 mostrou ser necessário para a função do transportador NRT2.1 na aquisição de nitrato (Feng et al., 2011; Yan et al., 2011).

Ao estudar uma variedade de arroz local cultivada por agricultores no Estado do Maranhão, Bucher et al. (2014) observaram que a variedade Piauí sob baixa concentração de N-NO_3^- em solução apresentou um aumento da expressão dos transportadores de alta afinidade. Os resultados sugerem ainda que a maior expressão de NAR2.1/NRT2.1~3a foi responsável pela maior absorção de NO_3^- nesse tratamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Com o objetivo de investigar a hipótese de que o transportador *OsNRT2.4* contribui para a absorção de $N-NO_3^-$, bem como possíveis envolvimento desse transportador em eventos de sinalização, lançou-se mão da técnica de silenciamento gênico via micro RNA. As linhagens de arroz transformadas silenciando o gene *OsNRT2.4* foram selecionadas quanto à expressão do gene e análises dos parâmetros morfológicos e radiculares, sob baixa dose de nitrogênio, experimento I e II, respectivamente. Em seguida, foi conduzido o experimento III, em que as linhagens selecionadas foram submetidas a uma condição de baixa dose e ressurgimento de nitrogênio.

3.1 Obtenção de Linhagens Silenciando o Gene *OsNRT2.4*

3.1.1 Construção do cassete de expressão para silenciamento do gene *OsNRT2.4* por meio da técnica de microRNA artificial

A partir da plataforma “WMD3 - Web MicroRNA Designer” (<http://wmd3.weigelworld.org/>) desenvolvida pelo Instituto Max Planck (Max Planck Institute for Developmental Biology) foi construído o microRNA artificial (amiRNA) para o gene *OsNRT2.4*. Como resultado, a plataforma forneceu 4 tipos de *primers* para o amiRNA, sendo que foram feitas duas construções de micro RNA artificial, denominados de A e B, ambos silenciando o gene *OsNRT2.4* (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos primers gerado pela plataforma “WMD3 - Web MicroRNA Designer” contendo o amiRNA para o gene *OsNRT2.4* (LOC_Os01g36720).

Gene	Primers	Sequência
<i>OsNRT2.4miA</i>	I miR-s	5'-agTTTTGCAGACGAAAGGAACGTcaggagattcagttga-3'
	II miR-a	5'-tgACGTTTCCTTTCGTCTGCAAAAActgctgctgctacagcc-3'
	III miR*s	5'-ctACGTTGCTTACGTCTGCAAAAAttctgctgctaggctg-3'
	IV miR*a	5'-aaTTTTGCAGACGTAAGCAACGTtagagaggcaaaagtga-3'
<i>OsNRT2.4miB</i>	I miR-s	5'-agTAAGCACGCGAAGAGGTACacaggagattcagttga-3'
	II miR-a	5'-tgTGTACCTCTTCGCGTGCTTActgctgctgctacagcc-3'
	III miR*s	5'-ctTGTACGTCTACGCGTGCTTAttctgctgctaggctg-3'
	IV miR*a	5'-aaTAAGCACGCGTAGACGTACAagagaggcaaaagtga-3'

Nota: Sequência universal dos primers G-4368: 5'-CTG CAA GGC GAT TAA GTT GGG TAA C-3', G-4369: 5'-GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG GAA ACA G-3'.

Esses *primers* foram utilizados em três reações de PCR com o vetor pNW55 para substituição do osa-miRNA528 (micro RNA 528 de arroz) pelo amiRNA (micro RNA artificial) desejado, mantendo a estrutura do anterior (Figura 1). As sequências originais do

osa-miRNA528 e miRNA* do pNW55 (verde) foram substituídas pelas sequências artificiais do miRNA (vermelho) durante as primeiras PCRs.

As sequências complementares aos *primers* no pNW55 são indicadas em amarelo, e os múltiplos sítios de clonagem, em azul. O osa-miRNA528 presente nesse vetor foi substituído pelo amiRNA do gene *OsNRT2.4* (LOC_Os01g36720) mantendo a estrutura do anterior. Nesta etapa foram realizadas 3 reações de PCR (primer G-4368 + primer II; primer I + primer IV; primer III + primer G-4369) que originaram 3 fragmentos de DNA. Posteriormente, ocorreu a fusão dos 3 fragmentos de DNA por meio de uma nova PCR, utilizando os primers G-4368 + G-4369, resultando em um único fragmento de DNA para posterior clonagem.

As reações de PCR utilizadas para obter um único fragmento foram realizadas com a Phusion, DNA polimerase de alta fidelidade na amplificação. Para uma reação de 20 μ L, a reação foi realizada utilizando 4 μ L tampão de amplificação Phusion (5x), 0,4 μ L dNTP (10 mM), 0,2 μ L do vetor pNW55, 0,2 μ L DNA polimerase da Phusion, 1 μ L primer e água miliQ autoclavada. A reação de PCR prosseguiu com a seguinte programação: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; 34 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de anelamento a 65°C e 30 segundos de extensão a 72°C; e uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

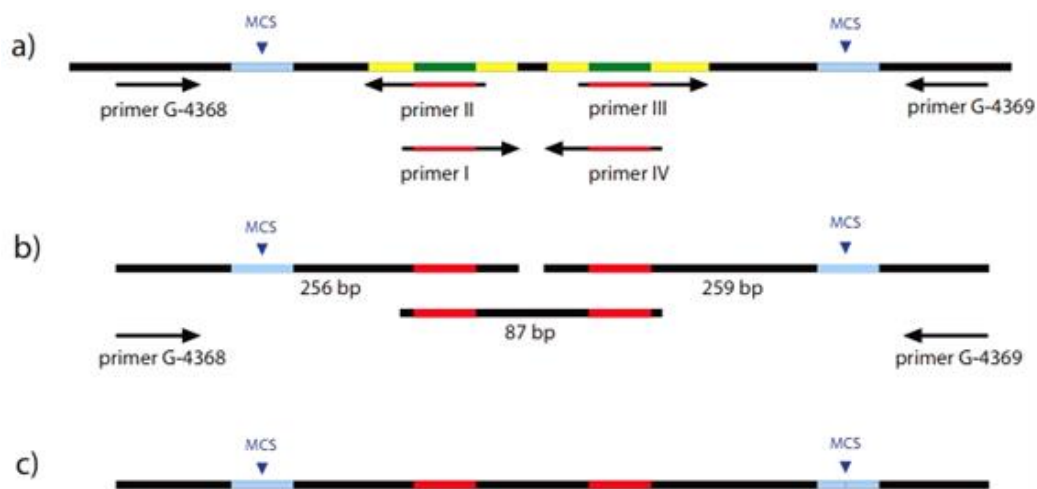


Figura 1. Esquema ilustrativo de PCR para produção de um amiRNA (micro RNA artificial) a partir do vetor pNW55. a) As sequências originais do osa-miRNA 528 e miRNA* do pNW55 (verde) foram substituídas pelas sequências artificiais do miRNA (vermelho) durante as primeiras PCRs. Os múltiplos sítios de clonagem estão em azul. Nesta etapa foram realizadas 3 reações de PCR (primer G-4368 + primer II, primer I + primer IV, primer III + primer G-4369). b) Os fragmentos de DNA resultantes das 3 reações de PCR. c) PCR de fusão dos 3 fragmentos de PCR utilizando os primers G-4368 + G-4369 resultando em um único fragmento de DNA para posterior clonagem. Fonte: adaptado de Warthmann (2008).

Após a obtenção do fragmento, foi feita a corrida em gel de agarose 1,2% para confirmação do fragmento e realizada a purificação do gel usando o kit Wizard® SV Gel and PCR clean-up System seguindo as recomendações do fabricante (Promega). Após a purificação, 1 μ g do amiRNA e também 1 μ g do vetor IRS foram digeridos com as enzimas de restrição BanHI e KpNI e transferido para o vetor binário IRS154 (Figura 2) utilizando o kit T4 DNA ligase (Promega).

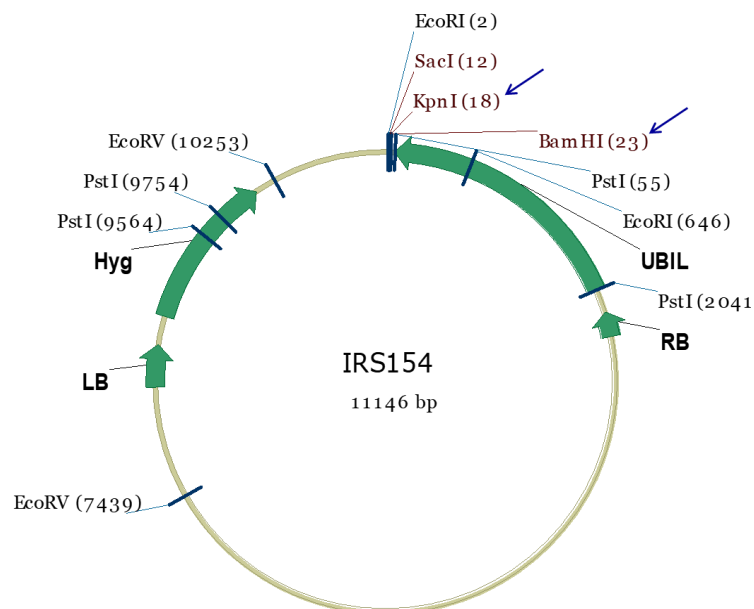


Figura 2. Vetor binário IRS154 usado como vetor de destino dos produtos de PCR digeridos pelas enzimas de restrição BanHI e KpNI.

3.1.2 Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

Para o cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* foi usado o meio YEB contendo 5 g. L⁻¹ de extrato de carne, 1 g. L⁻¹ de extrato de levedura, 1 g. L⁻¹ de peptona, 5 g. L⁻¹ de sacarose, 0,002 g. L⁻¹ de MgSO₄, pH 7,4. Para meios sólidos, foi adicionado ágar (1,5%) ao meio de cultura. O estoque de *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) contendo o amiRNA para o gene *OsNRT2.4* foi riscado em meio YEB sólido contendo Rifamicina (Rf) 100 µg.mL⁻¹ e Gentamicina (Gm) 40 µg. mL⁻¹, e incubado a 28°C por 24 horas. Com o auxílio de uma alça flambada apenas uma colônia isolada foi transferido para um tubo falcon de 50 mL contendo 3mL de meio YEB (Rf/Gm) que foi incubado a 28°C em agitador orbital a 150 rpm por 48 horas. Apenas 2 mL da cultura fresca foram inoculados em 50 mL de meio YEB contendo Rf e Gm em erlenmeyer de 250 mL.

A incubação foi realizada a 28°C sob agitação constante de 150rpm, até atingir uma DO₆₀₀ de aproximadamente 0,6. A cultura foi, então, dividida em dois tubos falcon de 50mL e incubada no gelo por 20 minutos. Em seguida, as células foram precipitadas a 1.000xg por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado solubilizado em 500µL de uma solução contendo CaCl₂ (20 mM) e glicerol (10%). As células foram divididas em alíquotas de 100 µL acondicionadas em microtubos estéreis de 1,5mL e mantidas em freezer a -80°C para uso posterior.

3.1.3 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Depois de confirmadas por restrição, a construção gênica com o vetor IRS154 contendo os primers do amiRNA foi inserida em células de *Agrobacterium tumefaciens* estirpe LBA4404, como descrito a seguir. Foi adicionado 1µg de plasmídeo a 100µL de *Agrobacterium* competente. A mistura foi homogeneizada suavemente e incubada no gelo por 30 minutos. As células misturas ao plasmídeo foram congeladas em nitrogênio líquido por cinco minutos e, na sequência, incubada a 37°C em banho-maria por mais cinco minutos.

Em seguida, foi adicionado 1mL de meio líquido YEB, e as células foram mantidas sob agitação constante a 150 rpm durante duas horas a 28°C. Apenas posteriormente a cultura foi vertida em meio YEB sólido com os antibióticos correspondentes a construção: rifamicina (100µg/mL) e canamicina (50µg/mL). Esses antibióticos são referentes à resistência genômica e plasmidial (vetor IRS 154) da *Agrobacterium*, respectivamente. As placas foram incubadas a 28°C durante três dias. A transformação foi confirmada por PCR de colônia. O meio para PCR de colônia foi montado utilizando TaqDNA polimerase e água miliQ autoclavada para uma reação de 25 µl, seguindo as recomendações do fabricante.

3.1.4 Transformação de arroz mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Para transformação de plantas de arroz foram utilizados os métodos de transformação de Toki et al. (2006), e Sahoo et al. (2011) modificados. As sementes de arroz da variedade Nipponbare foram descascadas e desinfestadas com etanol 70% durante 1 minuto para uma desinfestação superficial. Posteriormente, foi adicionada uma solução contendo 2,5% de hipoclorito e 0,05% de tween 20, e as sementes foram agitadas por inversão durante 15 minutos, e lavadas com água deionizada estéril 5 vezes. Em seguida, foi adicionada uma solução contendo somente o hipoclorito, seguindo o mesmo procedimento.

Após a desinfestação, foram colocadas 25 sementes por placa de Petri contendo 40mL de meio N6D (anexo). As sementes foram colocadas deitadas para que o embrião estivesse em contato com o meio. As placas foram vedadas com fita microporosa e incubadas a 32°C com luz constante (5000 lux) por um período de 14 dias na Câmara de Germinação com fotoperíodo controlado para a indução de calos embriogênicos.

Foi preparado o Meio AB para o cultivo da *Agrobacterium tumefaciens* que carrega a construção gênica para *OsNRT2.4*. As placas foram colocadas para crescer a 28°C por 3 dias. Decorrido esse tempo, foi preparado um meio AAM para ressuspensão da *Agrobacterium* até atingir a densidade ótica (DO_{600}) 0,1. Somente os calos com alta atividade de divisão foram inoculados com *Agrobacterium tumefaciens*, e homogeneizados por inversão durante três minutos. Após o contato, os calos foram transferidos para placas de Petri contendo papel filtro estéril, para drenar o excesso de bactéria, e depois dispostos sobre o meio N6D-As (Meio de Cocultivo) contendo papel filtro estéril + 0,5 mL de meio AAM, onde permaneceram por três dias a 25°C no escuro.

Após esse período, os calos foram lavados com água deionizada estéril e com uma solução contendo 200 mg.L⁻¹ de Timentin para reduzir a carga microbiana dos calos (etapa de eliminação da *Agrobacterium*), e foram transferidos para um meio de seleção contendo os antibióticos: higromicina e timentin permanecendo a 32°C por duas semanas. Aqueles calos resistentes e com alta atividade de divisão foram transferidos para o meio de regeneração de parte aérea, bem como incubados a 28°C até o surgimento das primeiras plântulas (2 semanas).

Logo após a formação das plântulas, as mesmas foram transferidas para o meio de indução de raízes. Após a regeneração da parte aérea e das raízes, as plantas foram submetidas a uma aclimação em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 14horas/10horas (luz/escuro), fluxo de fótons fotossintéticos de 320 µmol m⁻².s⁻¹, umidade relativa do ar de 65% e temperatura de 28°C/24°C (diurna/noturna), por um período de 5 semanas. Após esse período, as plantas foram levadas para casa de vegetação para obtenção das sementes. A composição dos meios utilizados encontra-se detalhada na seção 7 (anexo).

Cada plântula regenerada no cultivo in vitro representou uma linhagem independente (L#1, L#2, L#3 e assim por diante) na geração T₀. Após a obtenção das linhagens T₀ estas foram transferidas para a casa de vegetação e, ao final do ciclo de cultivo, cada linhagem

separadamente deu origem às sementes da primeira geração (T_1). As sementes da geração T_1 foram, então, cultivadas em casa de vegetação para a obtenção das sementes da segunda geração (T_2), que passaram por processo de confirmação da transformação (seleção pela resistência a higromicina).

Devido ao curto tempo disponível para o cultivo de mais um ciclo, foram utilizadas para os experimentos sementes obtidas na geração T_1 e, durante a condução dos experimentos, as plantas passaram por processo de confirmação da transformação (seleção pela resistência a higromicina, com a aplicação de higromicina no limbo foliar ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$) e a eliminação das plantas que apresentaram sintomas de necrose na região da aplicação.

3.2 Seleção das Linhagens Silenciando o Gene *OsNRT2.4* na Variedade Nipponbare

Com o intuito de selecionar aquelas linhagens silenciando o gene *OsNRT2.4*, após o processo de transformação foram conduzidos dois experimentos distintos. O primeiro foi para analisar o nível de expressão do gene *OsNRT2.4* e o segundo experimento foi para analisar as possíveis modificações do silenciamento do gene *OsNRT2.4* sobre os parâmetros morfológicos e radiculares.

3.2.1 Análise da expressão gênica a partir do método do CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) – Experimento I

Sementes da variedade Nipponbare (wild type e linhagens T_1) foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2,5% sob agitação por inversão durante 15 minutos, bem como lavadas em seguida com água destilada 5 vezes. Na sequência, foram acondicionadas sobre gaze em vasos de 700 mL e colocadas para germinar em água destilada na Câmara de Crescimento, com fluxo de fótons fotossintéticos dentro de uma faixa 318 a $330 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, fotoperíodo 14horas/10horas (luz/escuro), 70% de umidade e temperatura 28°C (diurna/noturna), no Departamento de Solos da UFRRJ.

Para superação da dormência das sementes foi estabelecido um protocolo de “Quebra de dormência” com base na RAS (Regras para Análise de Sementes) (Brasil, 2009). As sementes foram previamente aquecidas a 45°C por 2 horas em estufa de circulação de ar forçada; em seguida foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 2,5% sob agitação por inversão durante 15 minutos, e deixadas imersas em água deionizada *overnight* na Câmara de Crescimento de acordo com as condições descritas anteriormente. No dia posterior, as sementes imersas em água foram aquecidas novamente a 45°C por 2 horas e colocadas para germinar. A germinação foi considerada a partir do momento que surgiu a primeira raiz seminal (radícula) e o coleóptilo em mais de 95% das sementes (Figura 3).

Aos 3 DAG (dias após a germinação) as plântulas passaram a ser cultivadas em uma solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada com $1/8$ força iônica (FI), 1 mM de N-NO_3^- , tendo sido fornecido na forma de nitrato de cálcio, com o pH sendo mantido a 5,5 em todas as soluções. Aos 7 e aos 10 DAG foi fornecida uma solução de $1/4$ FI com 2 mM de N-NO_3^- e aos 12 DAG as plântulas receberam uma solução de $1/2$ FI com 2 mM de N-NO_3^- .

Aos 14 DAG as plântulas foram selecionadas pela resistência a higromicina, que teve por finalidade selecionar as plântulas que possuíam o micro RNA artificial inserido. O teste consistiu em aplicar no limbo foliar uma solução de 2 μL higromicina (antibiótico de seleção; concentração: $50 \mu\text{g.L}^{-1}$) e 0,05% de *tween 20* (agente adesivo para ajudar na aderência da higromicina no limbo foliar) e sendo posteriormente a área de aplicação coberta com papel alumínio para evitar a degradação do antibiótico pela luz. O teste teve uma duração de 3 dias, e foram selecionadas as plântulas que não apresentaram necrose no local de aplicação.

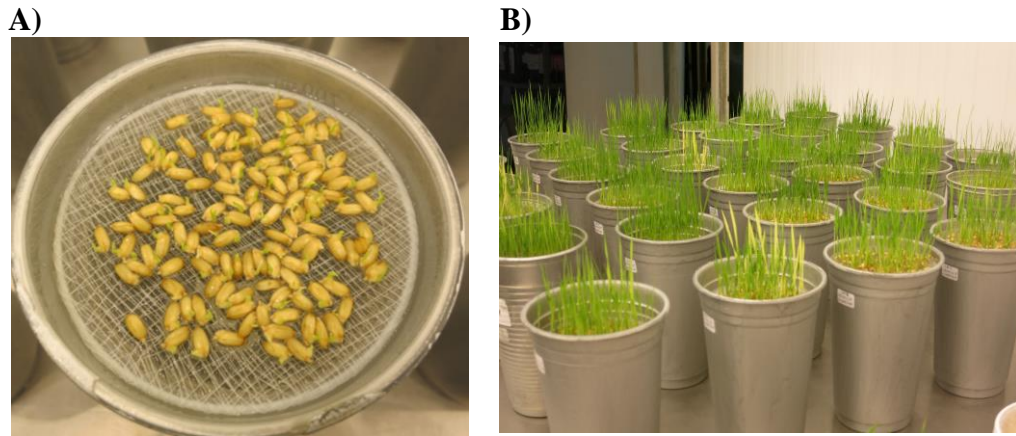


Figura 3. Germinação das sementes. A) Emissão da raiz seminal (radícula) e o coleóptilo em mais de 95% das sementes; B) Plântulas aos 7 DAG (dias após a germinação).

Aos 15 DAG iniciou-se o tratamento com uma solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada com ½ FI com 0,2 mM de N-NO_3^- , sendo realizada uma troca a cada 3 dias. O experimento foi conduzido com 4 repetições para cada linhagem e a planta tipo selvagem foi usada como controle, tendo sido avaliado um total de 12 linhagens neste experimento. As plantas foram coletadas aos 21 DAG (Figura 4), quatro horas após a troca da solução nutritiva, tendo sido coletadas as raízes, e congeladas imediatamente em N_2 líquido e armazenadas a -80°C . Posteriormente, o RNA foi extraído e realizada a análise de expressão gênica.

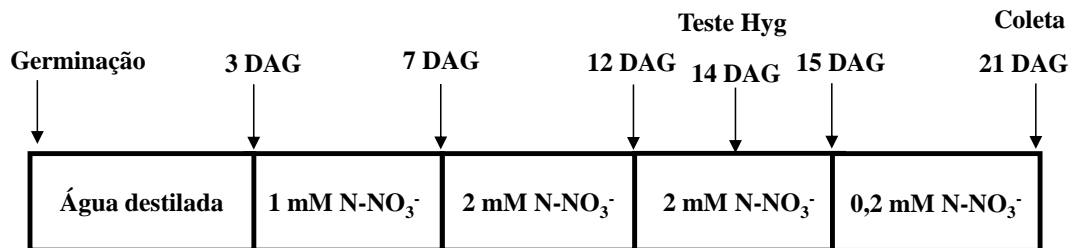


Figura 4. Esquema do cultivo das linhagens e wild type submetidas ao tratamento com baixo suprimento de N (0,2 mM de N-NO_3^-). Aos 14 DAG foi realizada a seleção pela resistência a higromicina. A coleta foi realizada quatro horas após a troca de solução. DAG: dias após a germinação.

a) Extração de RNA total

O RNA total foi extraído segundo Gao et al. (2001) utilizando tampão NTES (Tris-HCl (0,2 M) pH 8,0; EDTA (25 mM) pH 8,0; NaCl (0,3 M) e SDS (2%)). Amostras de raízes foram maceradas em N_2 líquido e homogêneas por 10 minutos em vórtex numa mistura contendo 800 μL de tampão NTES e 600 μL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Em seguida, o material vegetal foi centrifugado a 18.000xg. por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo e novamente centrifugado por 20 minutos com 500 μL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico.

Após o procedimento, o RNA total foi precipitado pela adição de 1/10 volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 ($\text{NaOAc}_{\text{DEPC}}$) (70 μL) e 1 volume de isopropanol puro (700 μL),

sendo mantido -80°C por 1 hora seguido de uma centrifugação a 18.000 xg por 20 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µL de etanol_{DEPC} 70% gelado e centrifugado a 18.000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi solubilizado em 500 µL H₂O_{DEPC} e, novamente, precipitado com 600 µL de cloreto de lítio 4M pH 4,8 (LiCl_{DEPC}) durante 16 horas a 4°C. Decorrido esse período, a solução foi centrifugada a 18.000 xg por 20 minutos a 4°C e o precipitado foi outra vez solubilizado em 450 µL H₂O_{DEPC}. Após a completa dissolução foi adicionado acetato de sódio 3M pH 5,2 (NaOAc_{DEPC}) (50 µL) e etanol absoluto (1000 µL). A mistura foi mantida por 1 hora a -80°C e centrifugada a 18.000 xg por 20 min a 4°C.

O precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% e, em seguida, centrifugado a 18000xg por 10 minutos. Após a centrifugação, o etanol foi pipetado para não desfazer o precipitado e os tubos foram mantidos abertos no gelo para evaporação total do etanol por cerca de 15 minutos. Após a secagem, o precipitado foi solubilizado com H₂O_{DEPC} (30 µL) e armazenado a -80°C. Após a extração, o RNA total foi quantificado espectrofotometricamente por meio do equipamento Nanodrop. A qualidade do RNA extraído foi verificada por meio das relações $A_{260/230}$ capazes de detectar reagentes orgânicos utilizados na lise química e $A_{260/280}$ capaz de detectar contaminação por proteínas, devendo esta razão estar entre 1,9 e 2,1. Após a quantificação, foi realizada a eletroforese em gel de agarose (1%) e corado com gel red, para controle da integridade do RNA.

b) Síntese de cDNA e reações de PCR em tempo real

Após a quantificação de RNA, procedeu-se a síntese de cDNA. Amostras de 1 µg de RNA total foram tratadas DNase I (Sigma-Aldrich) seguindo as recomendações do fabricante e a síntese de cDNA foi realizada com o kit “*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits*” (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante.

As reações de PCR em tempo real foram feitas no aparelho “StepOne Plus Real-Time PCR System” (Applied Biosystems) utilizando o kit “*HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX)*” (Solis Biodyne) seguindo as recomendações do fabricante. Todas as reações foram feitas em duplicata. A reação foi montada em placas de PCR da seguinte maneira: 2 µL da mistura de *primers forward+reverse* (0,12 µM cada); 2 µL de 5x *HOT FIREPol® EvaGreen* e 6 µL da reação de síntese de cDNA diluída 1:4, devido à baixa expressão do gene *OsNRT2.4* detectado em ensaios realizados previamente. A mistura foi centrifugada por 1 minuto a 4000 rpm, agitada por 1 minuto em agitador de placas e centrifugada por 3 minutos novamente a 4000 rpm a 25°C, e levada para o aparelho de PCR em tempo real.

Cada reação foi realizada da seguinte maneira: quinze minutos a 95°C e quarenta ciclos de amplificação com 95°C por 15 segundos e 60°C por vinte segundos e 72°C por trinta segundos (temperatura de coleta da fluorescência). A especificidade dos “*primers*” foi analisada por alinhamento das sequências nos bancos de dados (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e experimentalmente ao fim da reação de PCR durante a curva de dissociação (“*melting curve*”) para identificar possíveis amplificações inespecíficas, com ciclos de amplificação de quinze segundos a 95°C, e um aumento de temperatura de 0,4°C a cada ciclo de 60°C até 95°C. Todos os “*primers*” apresentaram especificidade para cada gene analisado. A análise da expressão gênica por RT-PCR semiquantitativa em Tempo Real foi realizada com base no método do CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) (Livak & Schmittgen, 2001). Como controle endógeno foram utilizados os genes da ubiquitina conjugada (*OsUBC – Ubiquitin – conjugating enzyme – E2*) e fator de alongamento (*OseEF-1α*) (Tabela 2).

Tabela 2. Sequências dos primers forward e reverse usados nas reações de RT-PCR semiquantitativa em Tempo Real para o gene do transportador de nitrato de alta afinidade (*OsNRT2.4*) e para os genes utilizados como controle endógeno: ubiquitina conjugada (*OsUBC – Ubiquitin – conjugating enzyme – E2*) e fator de alongamento (*OseEF-1 α*) e e, seus respectivos locus gênico no banco de dados de arroz, *Rice Genome Annotation Project*.

Gene	Locus do gene	Forward primer	Reverse primer
<i>OsNRT2.4</i>	LOC_Os01g36720	5'-ACGAAGCTGGTGGGAAGAAGAAG-3'	5'-ACGACGCCATCGCCATA-3'
<i>OsUBC</i>	LOC_Os02g42314	5'-CCGTTTGTAGAGCCATAATTGCA-3'	5'-AGGTTGCCTGAGTCACAGTTAAGT-3'
<i>OseEF-1α</i>	LOC_03g08020	5'-CTCTTGGTCGTTTTGCCGTG-3'	5'-TGCAGATATGGAAAGCACCACT-3'

3.2.2 Análise morfológica e radicular das linhagens silenciadas para o gene *OsNRT2.4* – Experimento II

Sementes da variedade Nipponbare (wild type e linhagens T₁) foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2,5% sob agitação por inversão durante 15 minutos, e lavadas com água destilada 5 vezes. Em seguida, foram acondicionadas sobre gaze em vasos com capacidade de 300 mL e colocadas para germinar em água destilada na Câmara de Crescimento, com fluxo de fótons fotossintéticos dentro de uma faixa 318 a 330 $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; fotoperíodo 14 horas/10 horas (luz/escuro), 70% umidade e temperatura 28°C (diurna/noturna), no Departamento de Solos da UFRRJ.

Aos 3 DAG (dias após a germinação) as plântulas foram submetidas a uma solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada com ¼ FI com 0,2 mM de N-NO_3^- . A cada 3 dias foi realizada a troca de solução. Aos 10 DAG as plântulas foram selecionadas pela resistência a higromicina que teve por finalidade selecionar as plântulas que possuíam o micro RNA artificial inserido. O teste consistiu em aplicar no limbo foliar uma solução de 2 μL higromicina (antibiótico de seleção; concentração: 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e 0,05% de *tween 20* (agente adesivo para ajudar na aderência da higromicina no limbo foliar) e sendo, posteriormente, a área de aplicação coberta com papel alumínio para evitar a degradação do antibiótico pela luz. O teste teve uma duração de 3 dias e foram selecionadas as plântulas que não apresentaram necrose no local de aplicação.

O experimento foi conduzido com 4 repetições para cada linhagem e a planta tipo selvagem foi usada como controle, tendo sido avaliadas neste experimento após a seleção prévia pela análise de expressão gênica, 9 linhagens.

Aos 13 DAG (Figura 5) foi realizada a coleta, 4 horas após a troca da solução nutritiva, tendo sido determinado no momento da coleta a massa fresca da parte aérea e raiz em gramas, e mensurado o comprimento da parte aérea e a profundidade máxima das raízes em centímetros. Para a análise dos parâmetros radiculares, as raízes foram armazenadas em álcool 50% e escaneadas posteriormente.

As imagens foram analisadas utilizando o software *WinRhizo Arabidopsis* (2012b) na definição de 600 dpi (pontos por polegada). Os parâmetros determinados foram os seguintes: comprimento total de raízes (mm), área de superfície (mm^2), volume radicular (mm^3), número de pontas, relação pontas/comprimento (mm), diâmetro médio (mm/10). Todos estes parâmetros, exceto os dois últimos, foram classificados de acordo com três classes de diâmetro (ϕ): raízes muito finas (ϕ menor que 0,5 mm), raízes finas ($> 0,5 \text{ mm } \phi < 1,5 \text{ mm}$), raízes medianamente espessas ($> 1,5 \text{ mm } \phi < 3,5 \text{ mm}$).

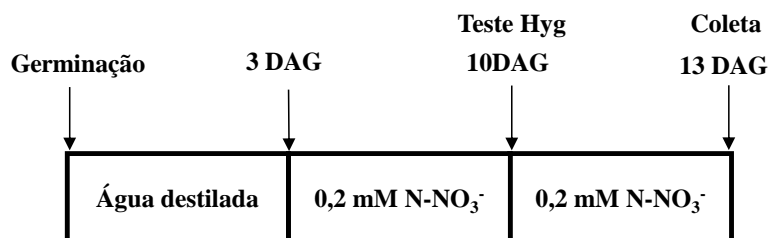


Figura 5. Esquema do cultivo das linhagens e wild type submetidas ao tratamento com baixo suprimento de N (0,2 mM de N-NO_3^-). Aos 10 DAG foi realizada a seleção pela resistência a higromicina. Aos 13 DAG a coleta foi realizada quatro horas após a troca por uma nova solução. DAG: dias após a germinação.

3.3 Análise do Efeito do Silenciamento do Gene *OsNRT2.4* sobre os Parâmetros Morfológicos e o Padrão de Expressão das Enzimas do Metabolismo de N e Transportadores de Nitrato de Alta Afinidade – Experimento III

Realizada a seleção prévia das linhagens, neste experimento foram avaliados os efeitos do silenciamento gênico sobre os metabólitos solúveis e sobre o padrão de expressão das enzimas do metabolismo de N e transportadores de alta afinidade. Com o objetivo de investigar a função do transportador *OsNRT2.4* em linhagens mutantes com baixos níveis de expressão do gene *OsNRT2.4*, as linhagens de plantas de arroz foram cultivadas em solução nutritiva sob baixo fornecimento e ressuprimento de N-NO_3^- .

Sementes da variedade Nipponbare (wild type e linhagens T_1) foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2,5% sob agitação por inversão durante 15 minutos, e lavadas em seguida com água destilada 5 vezes. Em seguida, foram acondicionadas sobre gaze em vasos de 700 mL e colocadas para germinar em água destilada na Câmara de Crescimento, com fluxo de fótons fotossintéticos dentro de uma faixa 318 a 330 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperíodo 14horas/10horas (luz/escuro), 70% de umidade e temperatura 28°C (diurna/noturna), no Departamento de Solos da UFRRJ.

Aos 3 DAG (dias após a germinação) as plântulas foram submetidas a uma solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) modificada com ¼ FI com 1 mM de N-NO_3^- . A cada 3 dias foi realizada a troca de solução. Aos 6 DAG as plântulas foram selecionadas pela resistência a higromicina que teve por finalidade selecionar as plântulas que possuíam o micro RNA artificial inserido. O teste consistiu em aplicar no limbo foliar uma solução de 2 μL higromicina (antibiótico de seleção; concentração: 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e 0,05% de *tween 20* (agente adesivo para ajudar na aderência da higromicina no limbo foliar) e sendo na sequência a área de aplicação coberta com papel alumínio para evitar a degradação do antibiótico pela luz. O teste teve uma duração de 3 dias, e foram selecionadas as plântulas que não apresentaram necrose no local de aplicação.

Aos 10 DAG foi fornecida uma dose de ½ FI com 0,1 mM de N-NO_3^- . Aos 13 DAG iniciaram-se os tratamentos, em que metade dos vasos continuaram sob fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO_3^- e a outra metade permaneceu sob uma privação de N durante 4 dias, com ressuprimento 4 horas antes da coleta. Este experimento foi conduzido com 4 repetições, 2 linhagens + WT (planta tipo selvagem utilizada como controle) e 2 tratamentos.

Aos 17 DAG (Figura 6) foi realizada a troca solução nutritiva sob uma dose de ½ FI com 0,1 mM de N-NO_3^- para ambos os tratamentos. A coleta foi realizada quatro horas após a troca da solução nutritiva. As plantas foram particionadas em raiz e parte aérea, pesadas e, então, foi destinada uma parte para análise de expressão, tendo sido congeladas imediatamente em N_2 líquido e armazenadas a -80°C, e uma outra parte, destinada para análise dos metabólitos solúveis.

A extração do RNA foi, segundo Gao et al. (2001), como descrito no item 3.2.1. A análise de expressão gênica por RT-PCR semiquantitativa em Tempo Real por meio do método do CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) (Livak & Schmittgen, 2001) e a análise da especificidade dos *primers* foram realizadas como descrito no item 3.2.1.2. Foram utilizadas sequências dos *primers* para os genes dos transportadores de nitrato de alta afinidade (*OsNRT2.4*; *OsNRT2.1*), proteína NAR (*OsNAR2.1*), enzimas de assimilação (*OsGS1;1*; *OsGS2*; e *OsNIA1*) e os genes utilizados como controle endógeno foram: ubiquitina conjugada (*OsUBC – Ubiquitin – conjugating enzyme – E2*) e fator de alongamento (*OseEF-1 α*) e, e seus respectivos números de acesso obtidos no banco de dados de arroz, *Rice Genome Annotation Project* (Tabela 3).

Amostra vegetal de 0,5 g foi destinada para análise dos metabólitos solúveis, sendo homogeneizadas em etanol 80%, trituradas e filtradas com auxílio de papel filtro. Na sequência, foi realizada a partição com clorofórmio (Fernandes, 1983). O extrato obtido foi utilizado para determinação dos teores de N-amino livre utilizando ninidrina (Yemm e Cocking, 1955), N-NO₃⁻ utilizando cloreto de vanádio III (VCl₃) (Miranda et al., 2001), N-NH₄⁺ (Felker, 1977) e açúcares solúveis pelo método da antrona (Yemm e Willis, 1954).

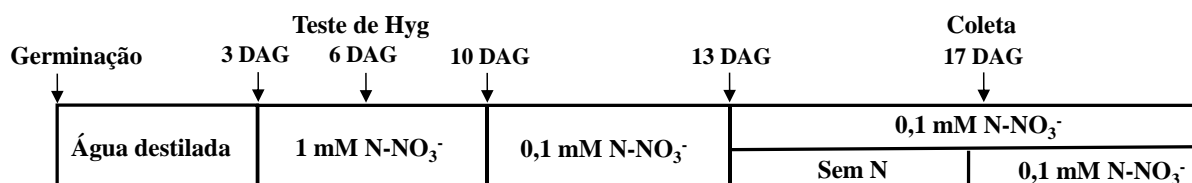


Figura 6. Esquema do cultivo das linhagens e wild type submetidas a dois tratamentos. Tratamento 1: ½ FI (força iônica) com baixo suprimento de N 0,1 mM de N-NO₃⁻; tratamento 2: ½ FI sem N, com ressuprimento no dia da coleta (17 DAG). Aos 6 DAG foi realizada a seleção pela resistência a higromicina. Aos 17 DAG foi realizada a coleta quatro horas após a troca por uma nova solução. DAG: dias após a germinação.

3.4 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico utilizando-se o software R. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância por meio dos seguintes testes: verificação de normalidade (teste de Shapiro-Wilk), homocedasticidade das variâncias (teste de Bartlett) e teste t, em que as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade (p-value < 0,05). Os efeitos das variáveis foram verificados pelo teste F (5% de probabilidade).

Tabela 3. Sequências dos primers forward e reverse usados nas reações de RT-PCR semiquantitativa em Tempo Real para os genes dos transportadores de nitrato de alta afinidade (*OsNRT2.1*; *OsNRT2.4*), proteína NAR (*OsNAR2.1*), enzimas de assimilação (*OsGS1;1*; *OsGS2*; e *OsNIA1*) e os genes utilizados como controle endógeno: ubiquitina conjugada (UBC – *Ubiquitin – conjugating enzyme – E2*) e fator de alongamento (*OseEF-1α*) e, e seus respectivos locus gênico obtidos no banco de dados de arroz, *Rice Genome Annotation Project*.

Gene	Locus do gene	Forward primer	Reverse primer
<i>OsNRT2.1</i>	LOC_Os02g02170	5'-GCGACCGAGACCAGCAATAC-3'	5'-TTCATCACCGTTTGCAACAAG-3'
<i>OsNAR2.1</i>	LOC_Os02g38230	5'-AAGACGCAGGTGTTCTCTCC-3'	5'-ACTTCACCGTGCTTGGGC-3'
<i>OsNRT2.4</i>	LOC_Os01g36720	5'-ACGAAGCTGGTGGGAAGAAGAAG-3'	5'-ACGACGCCATCGCCATA-3'
<i>OsGS1;1</i>	LOC_Os02g50240	5'-CCGGAGTCGTCGTCTCATTT-3'	5'-GAGCTTCTCAATGGCGGACT-3'
<i>OsGS2</i>	LOC_Os04g56400	5'-AGGCGAAGGGAAAAGGCTAC-3'	5'-GAGGGTTGGCTCCCAAAGAA-3'
<i>OsNIA1</i>	LOC_Os08g36500	5'-CTACATCGACGTCAAGGGGC-3'	5'-TGGATGACCTGGTACATGGG-3'
<i>OsUBC</i>	LOC_Os02g42314	5'-CCGTTTGTAGAGCCATAATTGCA-3'	5'-AGGTTGCCTGAGTCACAGTTAAGT-3'
<i>OseEF-1α</i>	LOC_03g08020	5'-CTCTTGGTCGTTTTGCCGTG-3'	5'-TGCAGATATGGAAAGCACCCT-3'

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Linhagens de Arroz Obtidas Durante o Processo de Transformação para o Silenciamento do Gene *OsNRT2.4*

O método de escolha da transferência do gene foi a transformação mediada pela *Agrobacterium tumefaciens*, bactéria encontrada no solo e que possui a capacidade natural de transferir seu DNA (T-DNA ou DNA de transferência) para as células de muitas espécies de eudicotiledôneas, induzindo a formação de tumores nas plantas, conhecido como galha-dacoroa ou a síndrome da raiz em cabeleira (Hiei et al., 1997; Hiei et al., 2014). Em meados dos anos 1990, Hiei et al. (1994) e Ishida et al. (1996) desenvolveram um sistema de transformação genética de monocotiledôneas a partir da indução de calos de embriões maduros em arroz, e embriões imaturos de milho, após o cocultivo dos tecidos com *Agrobacterium tumefaciens*.

Dentre os diversos métodos de transformação, a transformação indireta via *Agrobacterium tumefaciens* se tornou mais popular em arroz do que outras técnicas, apresentando inúmeras vantagens, dentre elas, a alta eficiência de transformação, inserção de pequenos números de cópias de T-DNA dentro do cromossomo, e a integração do gene no genoma do hospedeiro de maneira mais precisa e intacta (Hiei et al., 2008).

Recentemente foi demonstrado por Hiei et al. (2014) que, em razão do poder de virulência da *Agrobacterium*, arroz e milho podem ser transformados, sendo realizado o cocultivo de células caulinares ou embriões imaturos. A transformação via *Agrobacterium* se tornou uma das técnicas mais utilizadas e eficientes na engenharia genética de plantas (Andrieu et al., 2012; Patel, et al., 2013; Nester, 2015).

Para certas cultivares japônicas, como a variedade Nipponbare, a indução de calos embriogênicos altamente transformáveis é simples e altamente reprodutível, sendo necessário 1 semana para indução dos calos (Toki et al., 2006) podendo ser estendido para 14 dias com a finalidade de aumentar o rendimento de calos, sem que isso afete o processo de obtenção de plantas transgênicas morfológicamente normais e férteis após o processo de transformação in vitro (Hiei et al., 1994; Hiei et al., 1997; Hiei et al., 2008).

Desde o início da cultura de tecidos, foram necessários 3 meses para obtenção das primeiras plântulas transformadas, em que, cada planta regenerada a partir de um calo isolado foi considerada uma linhagem. Foram obtidas 44 linhagens (Figura 7) silenciando o gene *OsNRT2.4* utilizando a construção do micro RNA artificial (*amiRNA*). Após a obtenção das linhagens, estas foram transferidas para a casa de vegetação e cada linhagem separadamente deu origem às sementes da primeira geração (T₁).

As sementes da geração T₁ passaram por uma triagem prévia, sendo eliminadas aquelas linhagens que produziram poucas sementes; linhagens que geraram plantas albinas; linhagens que, mesmo após o tratamento para a quebra de dormência, não germinaram (vide protocolo de “quebra de dormência” seção 3.2.1); e aquelas linhagens que não apresentaram resistência a higromicina. Assim, permaneceram ao todo 12 linhagens contendo a construção do *amiRNA*. As linhagens selecionadas da geração T₁ passaram novamente por processo de confirmação da transformação (seleção pela resistência a higromicina), e foram utilizadas para condução dos experimentos posteriores.

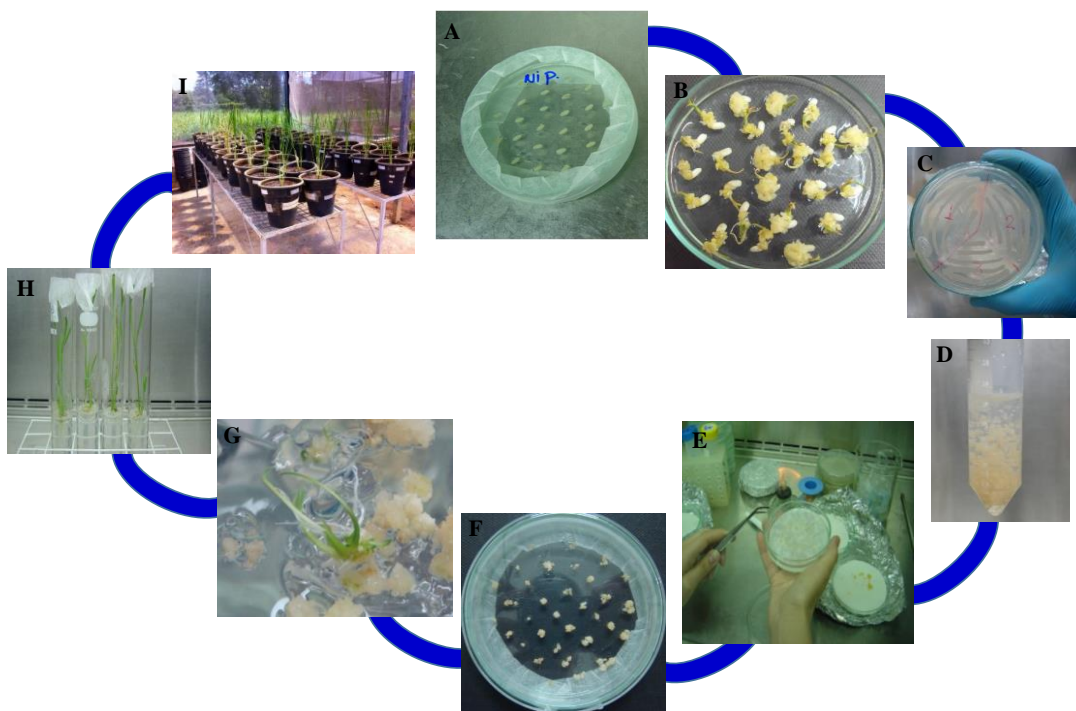


Figura 7. Etapas da transformação de arroz mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para obtenção de linhagens silenciando o gene *OsNRT2.4*. A) Sementes de arroz da variedade Nipponbare em meio de indução de calos N6D a 32°C por 14 dias em Câmara de Germinação com fotoperíodo controlado para a indução de calos embriogênicos. B) Produção de calos embriogênicos após o período de 14 dias no meio de indução de calos N6D. C) Cultivo da *Agrobacterium tumefaciens* em Meio AB contendo a construção gênica para *OsNRT2.4*. As placas foram colocadas para crescer a 28°C por 3 dias. D) Meio AAM para ressuspensão da *Agrobacterium tumefaciens* e inoculação dos calos. E) Processo de transferência dos calos para o Meio N6D-As (Meio de Cocultivo). F) Calos de arroz da variedade Nipponbare no Meio de seleção contendo os antibióticos: higromicina e timentin permanecendo a 32°C por duas semanas. G) Surgimento das primeiras plântulas após os calos serem cultivados no Meio de regeneração de parte aérea a 28°C. H) Plântulas cultivadas no Meio de regeneração de raiz a 28°C. I) Transferência das plântulas para casa de vegetação para obtenção de sementes após serem aclimatadas por um período de 5 semanas na Câmara de Crescimento com fotoperíodo de 14horas/10horas (luz/escuro), fluxo de fótons fotossintéticos de 320 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, umidade relativa do ar de 65% e temperatura de 28°C (diurna/noturna).

4.2 Seleção das Linhagens Silenciando o Gene *OsNRT2.4* quanto ao Padrão de Expressão Gênica e Parâmetros Morfológicos e Radiculares

4.2.1 Avaliação do padrão de expressão gênica do *OsNRT2.4* em resposta ao N-NO_3^- – Experimento I

As 12 linhagens obtidas na primeira geração (T1), selecionadas previamente, foram avaliadas quanto ao padrão de expressão do gene *OsNRT2.4* por meio da RT-PCR semiquantitativa e *OsUBC* e *OseEF-1 α* foram usados como controle endógeno para normalizar os dados de expressão.

As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade ($p\text{-value} < 0,05$) sendo assim, possível verificar a diferença estatística entre as linhagens transformadas e a WT. Dentre as 12 linhagens avaliadas da geração T1 foi possível detectar diferença estatística na expressão do gene *OsNRT2.4* nas raízes de 8 linhagens de arroz (L#39, L#20, L#23, L#22, L#15, L#5, L#2, L#19) (Figura 8) mostrando uma redução na expressão. E dentre as linhagens avaliadas, 9 linhagens apresentaram nível de silenciamento acima de 50%.

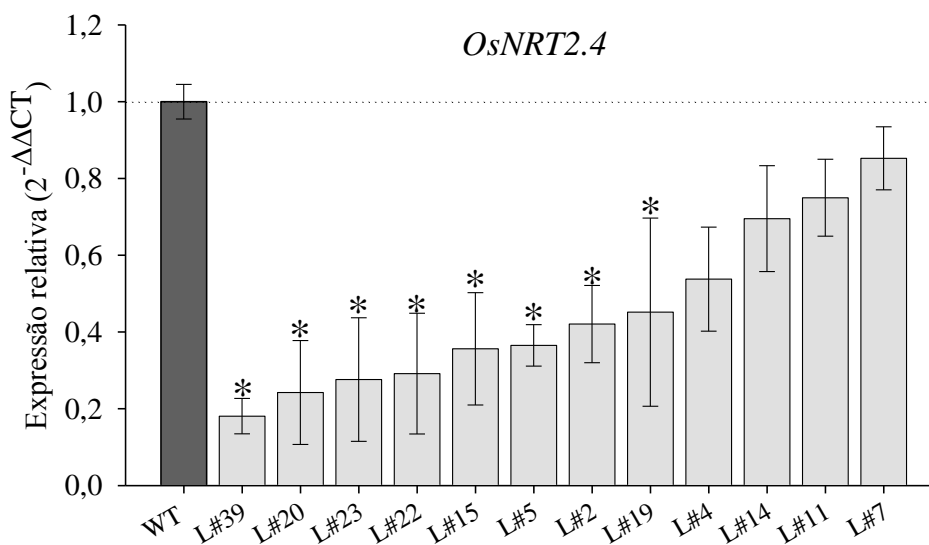


Figura 8. Expressão gênica relativa em raízes das linhagens de arroz da variedade Nipponbare obtidas após o procedimento de transformação de plantas via *Agrobacterium tumefaciens* em raízes das plantas WT e das linhagens transformadas, cultivadas sob fornecimento constante de 0,2 mM de N-NO_3^- , coletadas no 21° DAG após 4 horas da troca de solução nutritiva. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média. DAG: dias após a germinação. Todos os níveis de expressão do *OsNRT2.4* foram normalizados para a expressão do *OsUBC* e *OseEF-1 α* .

Jain et al. (2006) analisando a estabilidade na expressão de 10 genes de controle endógeno verificaram que a expressão dos genes *UBQ5*, *eEF-1 α* , *UBC* acabaram sendo mais estáveis nos tecidos analisados sob diferentes condições experimentais, enquanto que os genes *ACT11* e o β -*TUB* exibiram uma variabilidade na expressão inaceitável, limitando seu uso como controle interno.

Ainda segundo os mesmos autores (Jain et al., 2006), a alta estabilidade na expressão de um gene indica que o uso de um único gene de controle endógeno é apropriado para o experimento, contudo para muitos estudos pode ser requerido a normalização com dois ou mais genes de controle endógeno, considerando que para cada condição experimental e a espécie em estudo, a estabilidade na expressão do gene endógeno pode ser variável.

Para garantir a efetividade do silenciamento diversas publicações sugerem diferentes taxas de sucesso. Enquanto algumas publicações sugerem uma eficiência igual ou superior a 75% em *Arabidopsis* (Schwab et al., 2006; Ossowski et al., 2008; Zhang et al., 2018), outras publicações indicam taxas menores, como relatado pelos autores Gasparis et al. (2017) utilizando *Triticum aestivum* (trigo) e x *Triticosecale* Wittmack (triticale, um híbrido entre trigo e centeio (*Secale cereale*) que consideraram “silenciadas” todas as plantas obtidas na primeira geração com expressão igual ou menor que 0,8 comparado ao controle de 1,0, enquanto que a expressão relativa acima de 1,2 indicou a superexpressão das linhagens. O alto nível de silenciamento (superior a 50%) foi obtido em mais de 60 plantas da geração T₁ em ambas as espécies, e o forte silenciamento dos genes não foi transmitido para a geração T₂.

Zhang et al. (2018) conseguiram obter, ao avaliar o silenciamento gênico em linhagens de arroz, uma variação no silenciamento entre 60% a 80% dentre as linhagens avaliadas. Evidências não publicadas pelo Laboratório de Nutrição de Plantas sugerem que taxas superiores a 50% em arroz garantem uma efetividade satisfatória no silenciamento gênico.

Ainda segundo os mesmos autores, Zhang et al. (2018), a tecnologia do amiRNA é uma ferramenta poderosa para abordar a função gênica específica em plantas. No entanto, o silenciamento gênico em um tipo específico de célula pode não causar uma mudança fenotípica óbvia ou uma redução no transcrito alvo no nível da planta inteira, fazendo com que o rastreamento de plantas transgênicas com silenciamento ideal seja um desafio técnico.

Assim, baseando-se no resultado de expressão obtido e nos dados publicados por outros autores foram selecionadas as 9 linhagens que apresentaram menores níveis de expressão sobre a absorção de N-NO₃⁻, com nível de silenciamento acima de 50%, que são elas, L#39, L#20, L#23, L#22, L#15, L#5, L#2, L#19 e L#4, e estas foram avaliadas no experimento seguinte quanto aos parâmetros morfológicos e radiculares.

4.2.2 Avaliação da influência do gene *OsNRT2.4* sobre os parâmetros morfológicos e radiculares em resposta ao suprimento de N-NO₃⁻ – Experimento II

As linhagens selecionadas no experimento I expressando o *OsNRT2.4* foram utilizadas para este segundo experimento, tendo como objetivo verificar os possíveis efeitos do silenciamento sobre os parâmetros morfológicos e radiculares utilizando uma dose constante de 0,2 mM de N-NO₃⁻ durante 13 dias.

Analisando os parâmetros morfológicos, o comprimento mensurado da parte aérea não apresentou diferença estatística entre as linhagens transformadas e a WT (Figura 9A). Quando avaliada a profundidade radicular, apenas as linhagens L#23, L#2 e L#19 foram significativamente menores que as plantas WT (Figura 9B). E no gráfico de massa seca, todas as linhagens, com exceção da L#2, foram significativamente menores quando comparada com a WT (Figura 9C).

Em comparação com a WT, o silenciamento não inibiu significativamente o crescimento da parte aérea e a profundidade radicular das linhagens sob baixo suprimento de NO₃⁻ (0,2 mM N-NO₃⁻). No entanto, as linhagens apresentaram apenas uma redução na biomassa produzida quando comparada a WT.

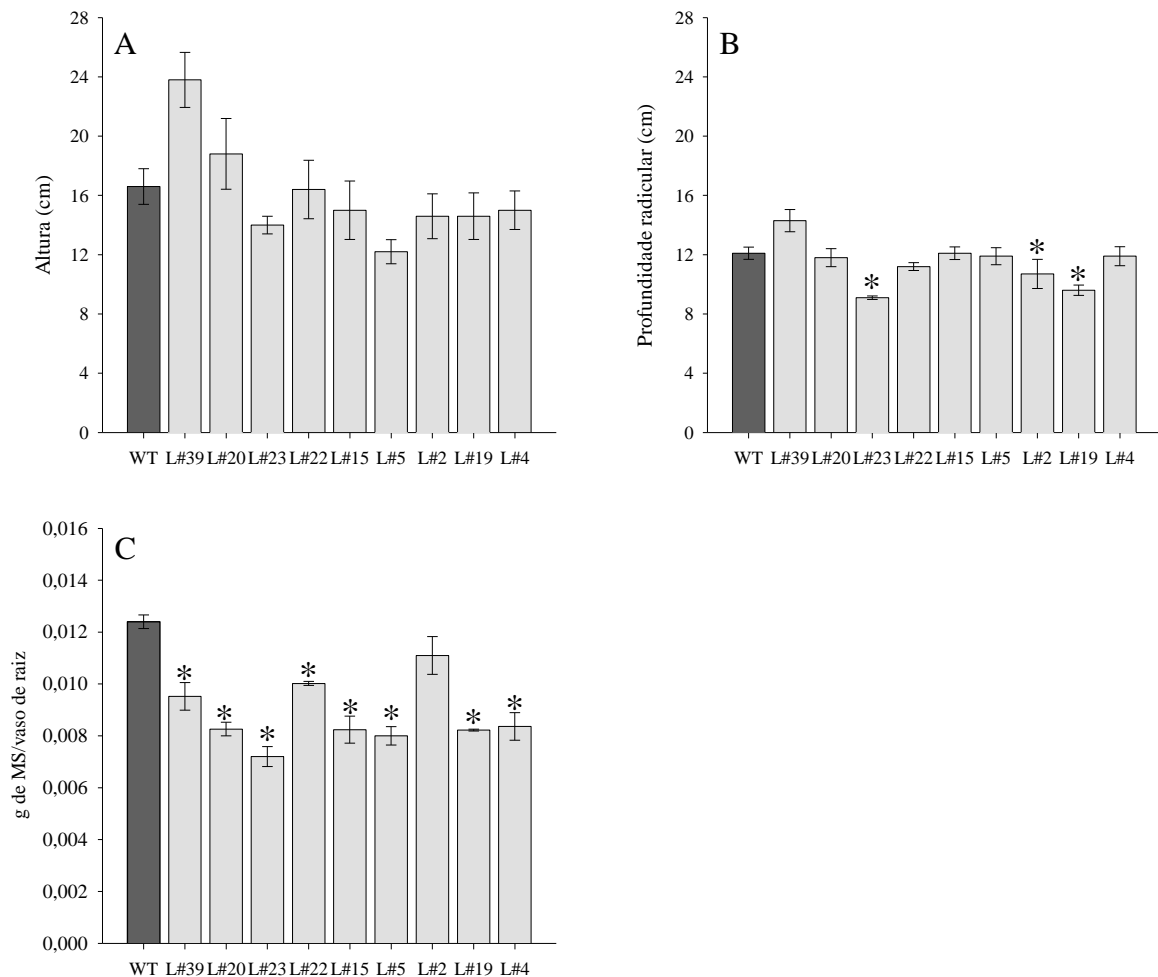


Figura 9. Parâmetros morfológicos: A) altura da parte aérea em centímetros, B) profundidade radicular em centímetros, C) peso de massa seca (MS) de raiz em gramas das plantas WT e linhagens de arroz da variedade Nipponbare cultivadas sob fornecimento constante de 0,2 mM de $N-NO_3^-$ durante 13 dias, tendo sido a coleta realizada 4 horas após a troca da solução nutritiva. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média.

Tais resultados diferem do encontrado por Wei et al. (2018) que, ao cultivar as plantas de arroz sob baixa (0,25 mM $N-NO_3^-$) e alta dose (2,5 mM $N-NO_3^-$), fez com que o nocaute do *OsNRT2.4* inibisse significativamente a profundidade radicular e parte aérea, resultando em um menor peso seco e menor acúmulo de nitrato.

Corroborando com os resultados do estudo proposto, Sun et al. (2016) utilizando também a técnica de microRNA artificial (amiRNA) tendo como precursor osa-MIR528, o mesmo utilizado neste trabalho, sendo o método de escolha da transferência do gene também a transformação mediada pela *Agrobacterium tumefaciens*, verificaram que plantas transgênicas de arroz carregando resistência a *Rice stripe vírus* (vírus da faixa de arroz) e *Rice black streaked dwarf vírus* (vírus anão de arroz preto) cresceram normalmente e não houve diferença significativa nas características agrônômicas (comprimento da parte aérea, número de grãos por panícula, peso de 1000 grãos e duração do crescimento), indicando que a

expressão das construções artificiais *in vivo* tem pouco efeito sobre os genes hospedeiros críticos para o crescimento e desenvolvimento.

Do mesmo modo, Yao et al. (2018) buscando entender a função da proteína argonauta (AGO), proteína que desempenha papel importante na regulação do crescimento e desenvolvimento, descobriram que a proteína causa aborto dos pólenes, resultando em uma redução no rendimento de grãos. No entanto, os autores verificaram que não houve diferença significativa entre a WT e as linhagens transgênicas quanto ao estágio de crescimento vegetativo, indicando que o silenciamento do gene *OsAGO17* não afeta o crescimento vegetativo em arroz, apoiando os resultados encontrados neste trabalho.

Para Zhang et al. (2018) selecionar linhagens somente com base no fenótipo da planta pode ser controverso. Quando o silenciamento de genes não gera fenótipo de crescimento, a seleção de plantas transgênicas para o silenciamento ótimo do gene pode ser complicada devido aos mecanismos de ação imprevisíveis do amiRNA.

Em contrapartida, quando analisados os resultados dos parâmetros radiculares obtidos a partir do software *WinRhizo Arabidopsis* (2012b) foi possível verificar que ao cultivar as plantas sob baixa dose de N (0,2 mM N-NO₃⁻) ocorreu uma redução significativa em quase todos os parâmetros radiculares analisados nas linhagens transformadas em relação às plantas WT (Figura 10A, B, C, D), exceto para a relação pontas/comprimento (mm) e o diâmetro médio (Figura 10E, F), indicando que, apesar da redução no comprimento (Figura 10A) e no número de pontas (Figura 10D), a densidade de raízes laterais/milímetro e o diâmetro médio permaneceram inalterados.

Estes resultados corroboram com Wei et al. (2018) que, ao cultivar as plantas de arroz sob baixa (0,25 mM N-NO₃⁻) e alta dose (2,5 mM N-NO₃⁻), o nocaute do *OsNRT2.4* resultou em um decréscimo de 30 a 40% no comprimento de raízes laterais e um decréscimo de 20-25% no número total de raízes laterais.

Além disso, Wei et al. (2018) ao realizarem o estudo de localização subcelular em protoplasto de arroz, verificaram que o transportador OsNRT2.4 está localizado na membrana plasmática e, por meio da coloração de GUS foi possível detectar sua maior expressão na base dos primórdios de raízes laterais e o mesmo resultado foi relatado em outro estudo realizado por Feng et al. (2011). Igualmente, foi verificado pelos autores Feng et al. (2011), que o gene *OsNRT2.4*, além de ser expresso na base dos primórdios de raízes laterais, também é expresso nas pontas e zonas de pelos radiculares, não sendo detectado nos tecidos vasculares dos primórdios das raízes adventícias.

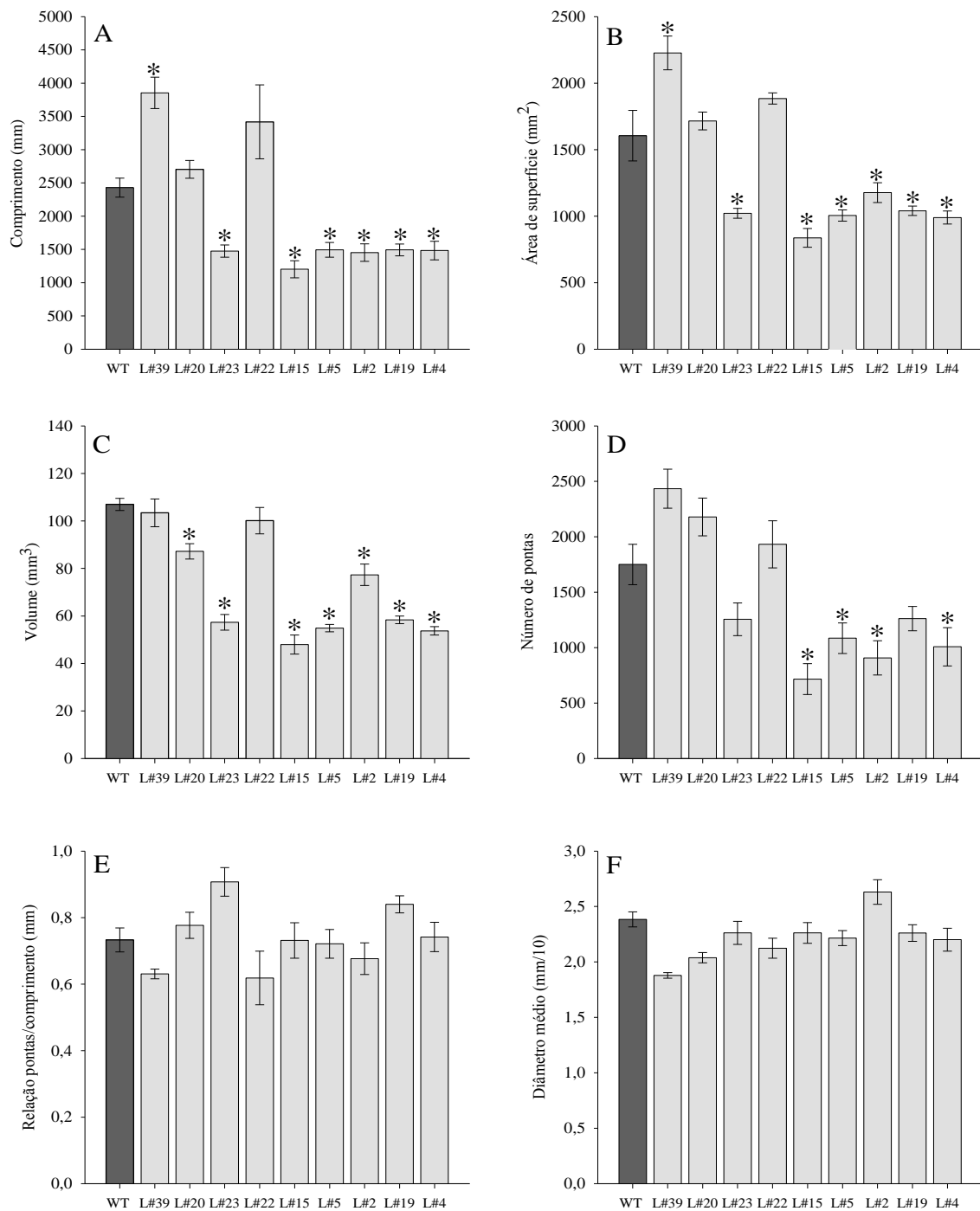


Figura 10. Parâmetros radiculares: A) comprimento em milímetros, B) área de superfície em milímetros quadrados, C) volume em milímetros cúbicos, D) número de pontas, E) relação pontas/comprimento em milímetros, F) diâmetro médio em mm/10 obtidos através da análise no software *WinRhizo Arabidopsis* (2012b) das plantas WT e das 9 linhagens transformadas cultivadas sob fornecimento constante de 0,2 mM de N-NO_3^- durante 13 dias, tendo sido a coleta realizada 4 horas após a troca da solução nutritiva. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média.

Com o intuito de verificar de forma mais aprofundada a atuação do OsNRT2.4 no crescimento radicular, todos os parâmetros radiculares foram avaliados dentro das classes de diâmetro (ϕ): raízes muito finas (ϕ menor que 0,5 mm), raízes finas ($> 0,5$ mm $\phi < 1,5$ mm), raízes medianamente espessas ($> 1,5$ mm $\phi < 3,5$ mm).

Quando avaliado o comprimento de raízes foi observado uma diferença significativa entre plantas WT e as linhagens nas classes de diâmetro de raízes finas (0,5 a 1,50 mm) (Figura 11B) e medianamente espessas (1,50 a 3,50 mm) (Figura 11C), não tendo sido observado diferença estatística na classe de raízes muito finas (diâmetro menor que 0,5 mm) (Figura 11A).

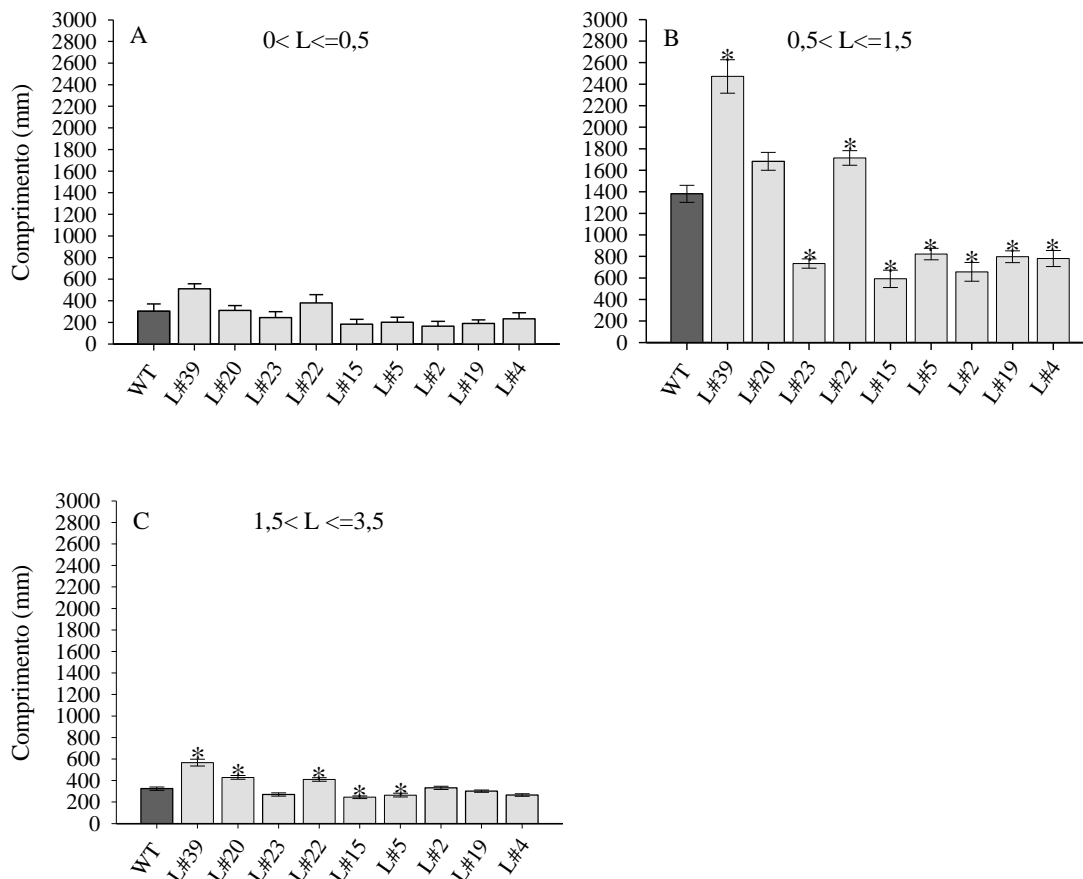


Figura 11. Parâmetro radicular: comprimento, dentro das classes de diâmetro: A) menor que 0,5 mm (muito finas), B) 0,5 a 1,50 mm (raízes finas), C) 1,50 a 3,50 mm (medianamente espessas), obtidos de raízes intactas, utilizando o software *WinRhizo Arabidopsis* (2012b), das plantas WT e das 9 linhagens transformadas cultivadas sob fornecimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ durante 13 dias. A coleta foi realizada 4 horas após a troca da solução nutritiva. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média.

Quando avaliada a área de superfície em milímetros quadrados (mm^2) observa-se uma diferença significativa entre plantas WT e as linhagens nas classes de diâmetro de raízes finas (0,5 a 1,50 mm) (Figura 12B) e medianamente espessas (1,50 a 3,50 mm) (Figura 12C), não tendo sido observado diferença estatística na classe de raízes muito finas (diâmetro menor que 0,5 mm) (Figura 12A).

A área de superfície depende do desenvolvimento dos pelos radiculares e do diâmetro de raiz. De acordo com Rossiello et al. (1995), área superficial e comprimento são parâmetros preferidos para expressão das taxas de absorção de água e nutrientes. Sabe-se que raízes de menor diâmetro podem proporcionar uma maior capacidade de absorção de água e nutrientes devido ao aumento na superfície de contato raiz-solo, caracterizando um maior volume de solo a ser explorado (Rangel, 2018).

Além do mais, Koevoets et al. (2016) explicam que na determinação da área de superfície radicular deve ser levado em consideração a classificação das plantas, pois se são eudicotiledôneas estas apresentam uma raiz principal e raízes laterais de várias ordens, em contrapartida as monocotiledôneas apresentam em adição raízes seminais (raiz primária e seminal, ditas embrionárias), e raízes adventícias (raízes pós-embrionárias).

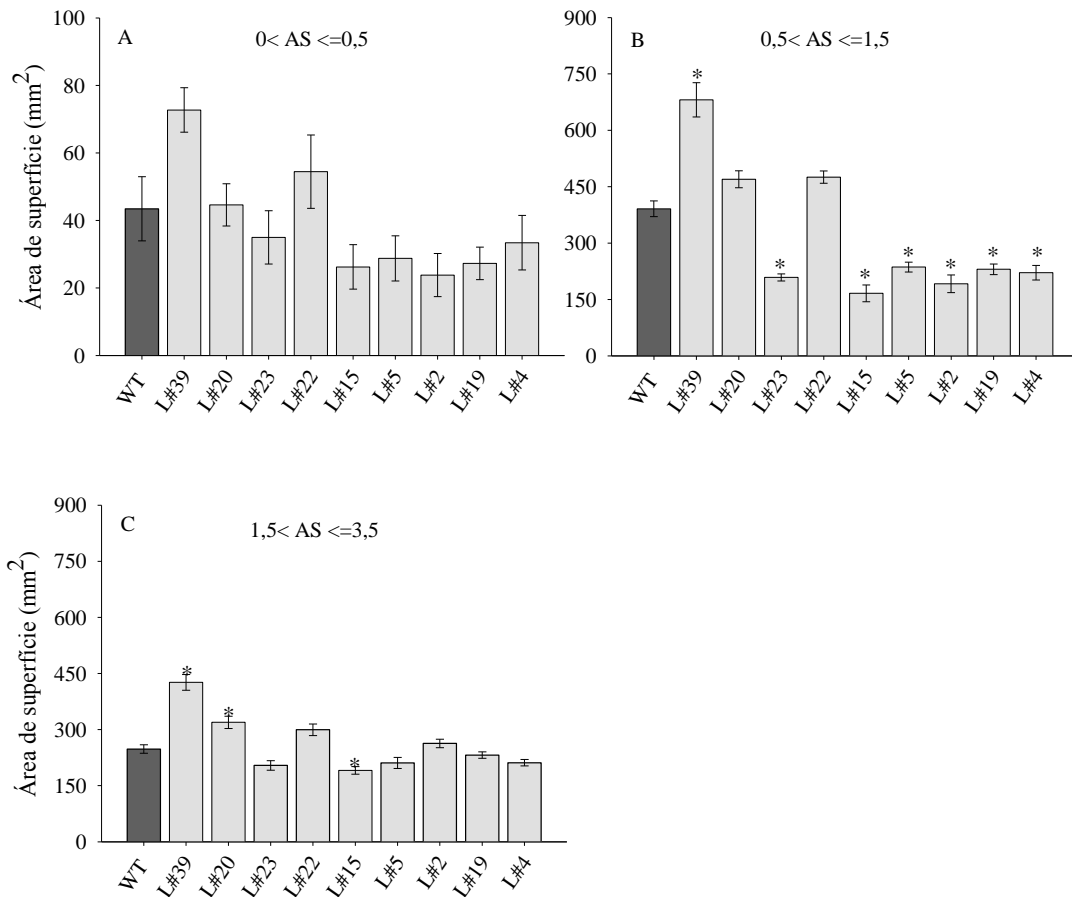


Figura 12. Parâmetro radicular: área de superfície, dentro das classes de diâmetro: A) menor que 0,5 mm (muito finas), B) 0,5 a 1,50 mm (raízes finas), C) 1,50 a 3,50 mm (medianamente espessas), obtidos de raízes intactas, utilizando o software *WinRhizo Arabidopsis* (2012b), das plantas WT e das 9 linhagens transformadas cultivadas sob fornecimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ durante 13 dias. A coleta foi realizada 4 horas após a troca da solução nutritiva. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média.

Quando avaliado o volume radicular em milímetros cúbicos (mm^3) observa-se uma diferença significativa entre plantas WT e as linhagens nas classes de diâmetro de raízes finas

(0,5 a 1,50 mm) (Figura 13B) e medianamente espessas (1,50 a 3,50 mm) (Figura 13C), não tendo sido observado diferença estatística na classe de raízes muito finas (diâmetro menor que 0,5 mm) (Figura 13A).

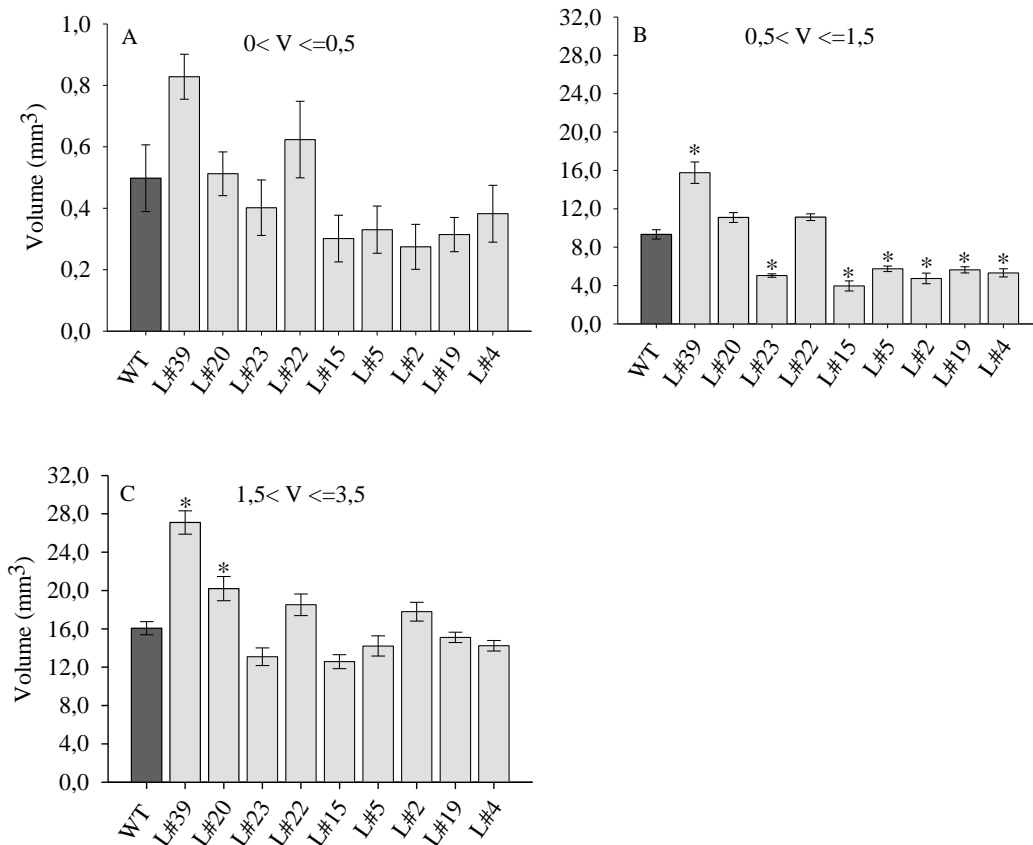


Figura 13. Parâmetro radicular: volume, dentro das classes de diâmetro: A) menor que 0,5 mm (muito finas), B) 0,5 a 1,50 mm (raízes finas), C) 1,50 a 3,50 mm (medianamente espessas), obtidos de raízes intactas, utilizando o software *WinRhizo Arabidopsis* (2012b), das plantas WT e das 9 linhagens transformadas cultivadas sob fornecimento constante com 0,2 mM de N-NO_3^- durante 13 dias. A coleta foi realizada 4 horas após a troca da solução nutritiva. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média.

Quando avaliado o número de pontas, foi observada uma diferença significativa entre plantas WT e as linhagens nas classes de diâmetro de raízes finas (0,5 a 1,50 mm) (Figura 14B) e medianamente espessas (1,50 a 3,50 mm) (Figura 14C). As linhagens apresentaram menor número de pontas. Não foi observado diferença estatística na classe de raízes muito finas (diâmetro menor que 0,5 mm) (Figura 14A).

De acordo com Rangel (2018), o número de pontas no sistema radicular indica a emissão de raízes laterais, assim, quanto maior o número de pontas maior a emissão de raízes laterais, aumentando a capacidade exploratória do sistema radicular no solo. Associado a este fato, a formação de pelos radiculares pode incrementar a área de superfície das raízes primárias e laterais, resultando em um incremento na densidade de raízes laterais/comprimento. Todos estes processos estão relacionados à regulação da arquitetura radicular (López-Bucio et al., 2003).

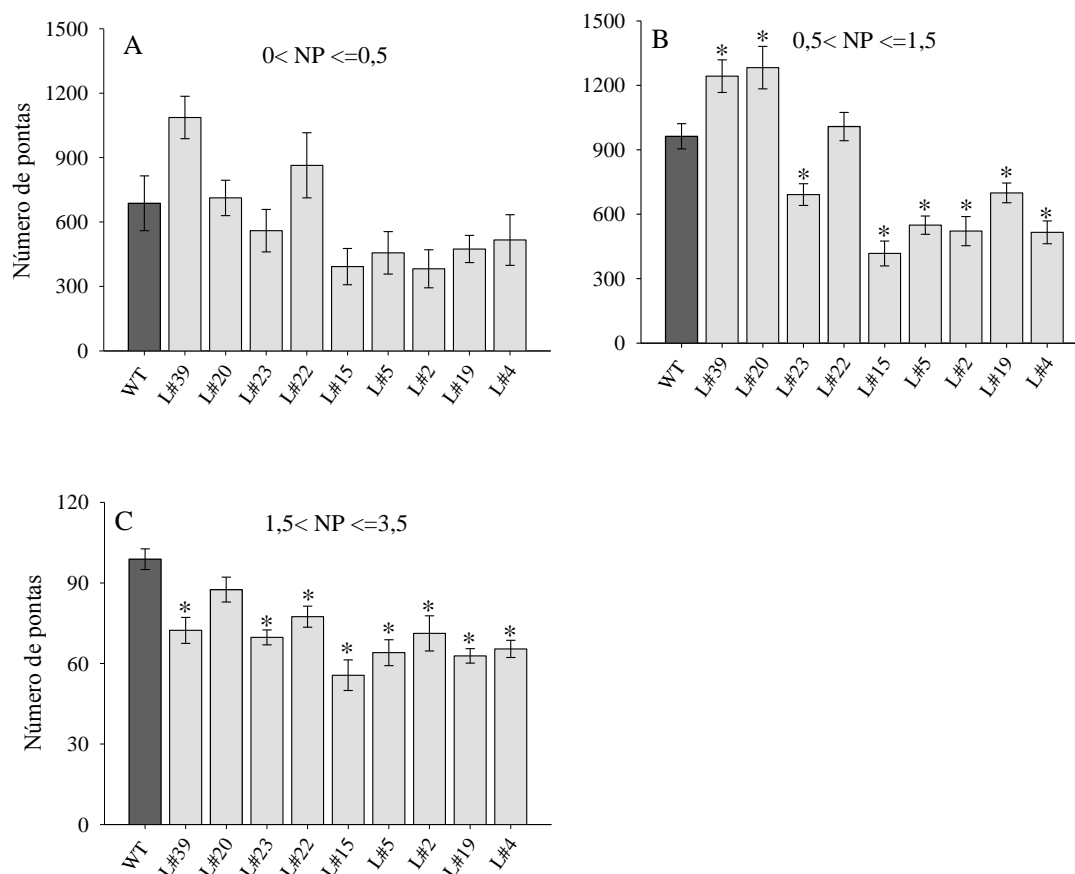


Figura 14. Parâmetro radicular: número de pontas, dentro das classes de diâmetro: A) menor que 0,5 mm (muito finas), B) 0,5 a 1,50 mm (raízes finas), C) 1,50 a 3,50 mm (medianamente espessas), obtidos de raízes intactas, utilizando o software *WinRhizo Arabidopsis* (2012b), das plantas WT e das 9 linhagens transformadas cultivadas sob fornecimento constante com 0,2 mM de N-NO_3^- durante 13 dias. A coleta foi realizada 4 horas após a troca da solução nutritiva. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média.

Avaliar a arquitetura radicular é um importante aspecto no desenvolvimento das plantas e na sua plasticidade para uma grande variedade de condições abióticas, como a intensidade luminosa e o fotoperíodo, além de ser um importante parâmetro na aquisição de nutrientes (Zhu et al., 2011; Koevoets et al., 2016; Kadam et al., 2017). Para determinar a arquitetura do sistema radicular é necessário a determinação de 4 componentes fundamentais para o arranjo espacial das raízes, que são eles: comprimento, número, posição e angulação dos componentes radiculares, sendo possível determinar o volume de solo explorado (Koevoets et al., 2016).

A baixa disponibilidade de nutrientes geralmente limita o crescimento das plantas. Plantas sob deficiência de fósforo desenvolvem um sistema radicular mais raso e, em compensação, investem fortemente no crescimento de raízes laterais. No entanto, plantas sob deficiência de nitrogênio investem mais no aprofundamento radicular e não limitam o alongamento lateral do sistema radicular (López-Bucio et al., 2003; Gruber et al., 2013; Koevoets et al., 2016). Em *Arabidopsis*, um incremento da disponibilidade de nitrato (10 mM)

reduz o alongamento das raízes laterais e limita o alongamento primário das raízes, ao passo que a baixa concentração (10 μ M) induz o alongamento radicular lateral e primário (Zhang & Forde, 1998).

De acordo com Nacry et al. (2013), as plantas possuem três diferentes respostas quanto à disponibilidade de N no meio: a primeira, regulação da raiz no sistema de absorção de N; a segunda, a plasticidade da arquitetura do sistema radicular; e a terceira, a rápida modulação do crescimento da parte aérea, sendo que as três respostas não apresentam o mesmo objetivo. As duas primeiras geralmente resultam em uma melhoria na absorção de N quando sob baixa disponibilidade, com transportadores de membrana de alta afinidade, aumentando o forrageamento pelo sistema radicular (Bouguyon et al., 2015). E a terceira resposta visa atender rapidamente a demanda por N na planta para evitar deficiências de N quando a disponibilidade de N no meio está se tornando crítica.

Sendo assim, embora tenham distintos objetivos, as três respostas compartilham em comum uma ação combinada de controle interno e externo de sinais que são frequentemente associados com o local e vias sistêmicas de sinalização (Nacry et al., 2013; Forde, 2014). Os mecanismos regulatórios envolvidos na resposta às mudanças a disponibilidade de N, são múltiplos, e sugerem uma rede regulatória complexa, que também envolve a regulação hormonal (López-Bucio et al., 2003; Krouk et al., 2010; Forde, 2014; Kiba & Krapp, 2016; Xuan et al., 2017).

Muitos trabalhos têm sido discutidos o progresso dos estudos no entendimento dos genes e as vias de sinalização que regulam a absorção de N e a modulação da morfologia radicular (Krapp et al., 2014; Lezhneva et al., 2014; Kiba & Krapp, 2016). A aplicação de nitrato pode determinar inúmeras mudanças por ser um íon de sinalização, em que, além de seu papel como nutriente, o nitrato atua como uma potente molécula sinalizadora, que independente de sua assimilação, controla numerosos aspectos do desenvolvimento e do metabolismo das plantas (Crawford, 1995; Nacry et al., 2013; Krapp et al., 2014; Kiba & Krapp, 2016).

Porém, os mecanismos que atuam no alongamento das raízes primárias ainda são controversos, pois ao mesmo tempo em que promove o crescimento das raízes primárias, pode também ter um efeito inibitório dependendo da concentração de nitrato no meio de cultivo (Trevisan et al., 2014). No tocante à essencialidade do nutriente, o nitrato serve como uma molécula de sinalização para quebra de dormência das sementes (Alboresi et al., 2005), indução do crescimento da parte aérea (Rahayu et al., 2005), regulação do desenvolvimento de raízes laterais (Zhang & Forde, 2000; López-Bucio et al., 2003), efeito sobre o tempo de florescimento (Yuan et al., 2016) e ainda coordena a expressão de genes relacionados ao nitrato (Wang et al., 2012).

O NPF6.3 é um regulador chave no desenvolvimento radicular, capaz de modular positivamente a expressão de outro transportador de nitrato, o NRT2.1 (Krouk et al., 2010; Bouguyon et al., 2015). Remans et al. (2006) buscando elucidar o papel do NPF6.3 no desenvolvimento radicular, verificaram que plantas transgênicas silenciando o gene ANR1, que possui papel chave na via de sinalização, não responderam a disponibilidade de nitrato, resultando em uma baixa proliferação de raízes laterais.

O silenciamento do gene *OsNRT2.4* não alterou a densidade de raízes laterais em relação à WT, porém resultou no menor alongamento das raízes laterais (Figura 10A, Figura 11), menor área de superfície (Figura 10B, Figura 12), menor volume (Figura 10C, Figura 13) e menor número de pontas (Figura 10D, Figura 14). Com base nestes resultados é possível sugerir que o *OsNRT2.4*, assim como *OsNPF6.3*, também possui papel na regulação do crescimento radicular, estando especificamente envolvido no crescimento de raízes laterais.

4.3 Efeito do Silenciamento do Gene *OsNRT2.4* sobre os Metabólitos Solúveis, Padrão de Expressão das Enzimas do Metabolismo de N e Transportadores de NO_3^- de Alta Afinidade – Experimento III

4.3.1 Avaliação dos metabólitos solúveis – NO_3^- , NH_4^+ , N-amino e açúcares solúveis

A partir dos resultados da expressão gênica, dos parâmetros morfológicos e radiculares, foi possível selecionar duas linhagens como alvos para o terceiro experimento: as linhagens L#5 e L#39 com silenciamento de 65% e 83%, respectivamente (Figura 15).

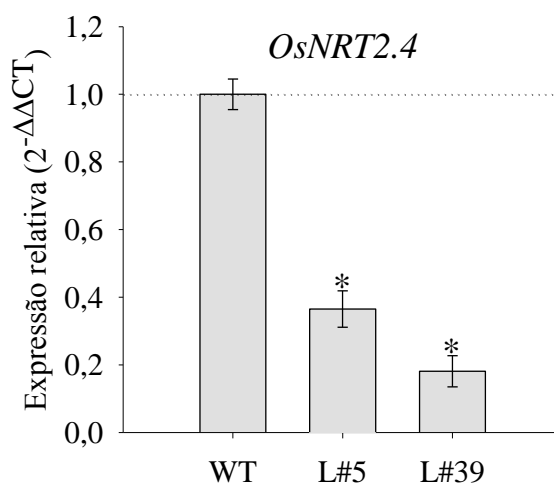


Figura 15. Expressão gênica relativa de raízes de plantas WT e linhagens de arroz selecionadas da variedade Nipponbare obtidas após o procedimento de transformação de plantas via *Agrobacterium tumefaciens* em raízes das plantas WT e das linhagens transformadas, cultivadas sob fornecimento constante de 0,2 mM de N-NO_3^- por 6 dias, coletadas no 21° DAG após 4 horas da troca de solução nutritiva. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média. DAG: dias após a germinação. Todos os níveis de expressão do *OsNRT2.4* foram normalizados para a expressão do *OsUBC* e *OseEF-1 α* .

Com o intuito de investigar as possíveis modificações causadas pelo silenciamento do gene *OsNRT2.4* sobre as plantas quando cultivadas sob baixa disponibilidade de N, as duas linhagens com baixa expressão do *OsNRT2.4* foram selecionadas e utilizadas para avaliar o efeito sobre a massa fresca nas diferentes partes e na absorção de NO_3^- , NH_4^+ , N-amino e açúcares solúveis nos diferentes tecidos.

Analisando o gráfico de massa fresca (Figura 16), foi possível verificar que o silenciamento gênico resultou em uma redução significativa da massa de raízes, nas linhagens transformadas em relação às plantas WT, somente no tratamento com ressuprimento (Figura 16A). Ao analisar o gráfico de massa fresca da parte aérea (Figura 16B), observa-se uma diferença significativa somente para a linhagem L#5 no tratamento sob fornecimento constante de N (0,1 mM N-NO_3^-). Não foi observado diferença estatística na relação raiz/parte aérea das plantas WT e as linhagens transformadas (Figura 16C), em ambos os tratamentos.

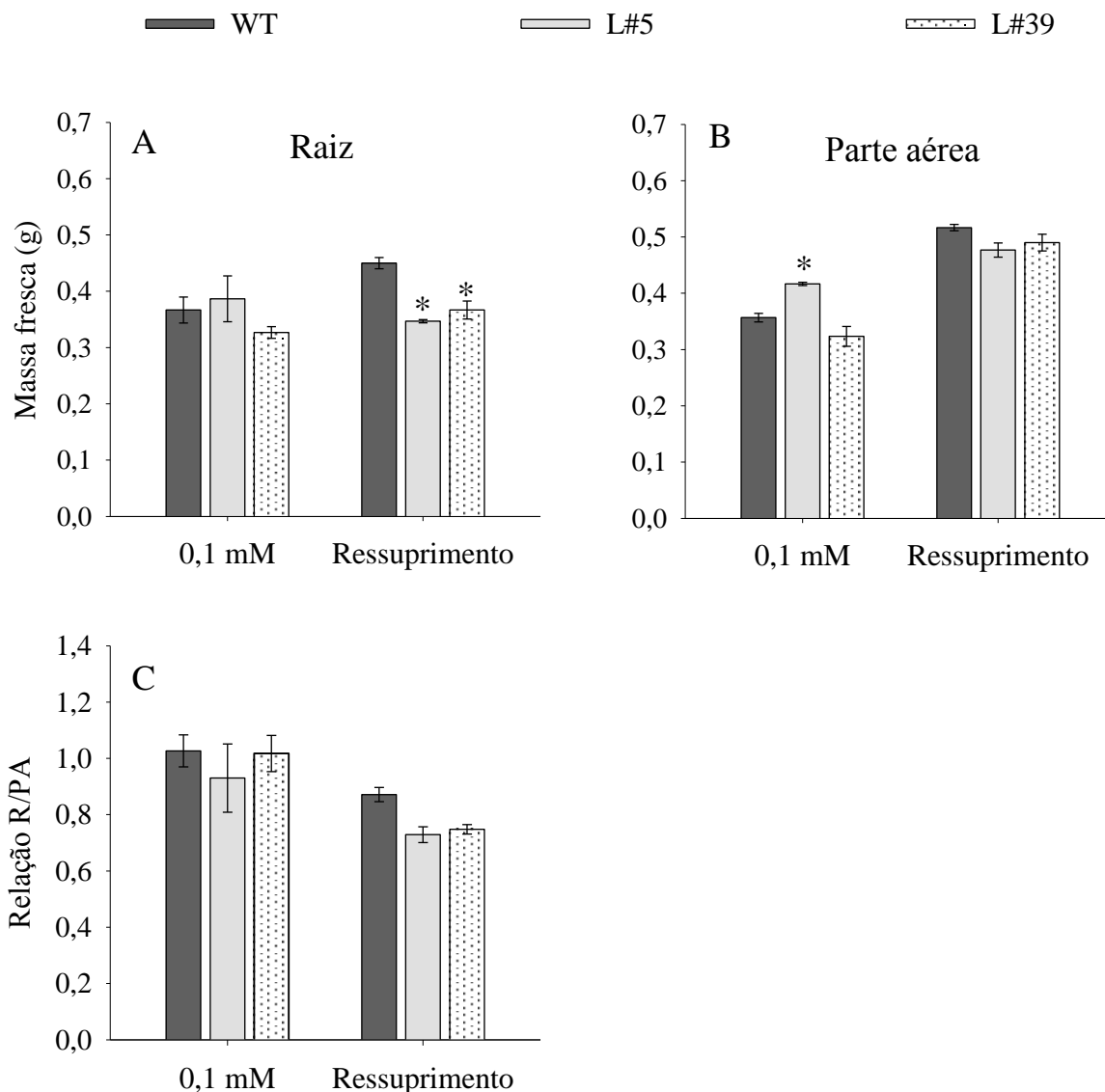


Figura 16. Massa fresca em gramas de A) raiz e B) parte aérea, C) relação raiz/parte aérea das plantas WT e linhagens de arroz transformadas L#5 e L#39. As plantas foram cultivadas sob fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO₃⁻, e aos 13 DAG foram submetidas aos tratamentos. Tratamento 1: fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO₃⁻ Tratamento 2: consistiu na privação de N por um período de 4 dias com ressuprimento de 0,1 mM N-NO₃⁻ quatro horas antes da coleta. Aos 17 DAG foi realizada a coleta quatro horas após a troca da solução nutritiva. DAG: dias após a germinação. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet (p<0,05). As barras indicam o erro padrão da média.

Quando comparado o peso fresco nos diferentes tecidos, raiz e parte aérea, e nos diferentes tratamentos, percebe-se um incremento no tratamento de ressuprimento tanto para as plantas WT quanto para as linhagens transformadas em ambos os tecidos analisados.

Além disso, nota-se também um pequeno ajuste na massa fresca da parte aérea em relação a raiz no tratamento de ressuprimento, resultando em uma menor relação raiz/parte aérea das plantas WT e as linhagens transformadas no mesmo tratamento. Contudo, analisando a relação raiz/parte aérea no tratamento de fornecimento constante de N (0,1 mM

N-NO₃⁻), observa-se um pequeno ajuste quando comparado ao tratamento de ressuprimento, indicando que as plantas investiram mais em sistema radicular sob fornecimento constante, e quando privadas de N durante 3 dias com posterior ressuprimento, investiram mais em parte aérea.

Sabe-se que quando as plantas estão sob baixa disponibilidade de nitrogênio, o status nutricional da planta bem como a regulação hormonal, desencadeiam uma série de mudanças morfológicas no sistema radicular (Kiba & Krapp, 2016). De acordo com os autores López-Bucio et al. (2003) e Araya et al. (2015), quando as plantas estão sob uma leve limitação de N ocorre um maior investimento em sistema radicular, ao passo que, em uma condição de ausência ou elevada concentração de N, ocasiona o encurtamento das raízes primárias e uma redução proporcional no número de raízes laterais.

Além do mais, de acordo com os autores Nacry et al. (2013), as plantas possuem diferentes respostas a disponibilidade de N no meio, dentre elas, a rápida modulação do crescimento da parte aérea, visando atender rapidamente a demanda por N na planta, para evitar deficiências de N quando a disponibilidade deste nutriente no meio está se tornando crítica.

Quando avaliado o conteúdo de N-amino na raiz (Figura 17A) percebe-se que este diferiu estatisticamente entre plantas WT e a L#5 em ambos os tratamentos. Entretanto, o mesmo não ocorre na parte aérea (Figura 17C), pois difere estatisticamente somente no tratamento de dose constante. Não houve diferença estatística quanto ao conteúdo de açúcares solúveis na raiz (Figura 17B), ocorrendo somente na parte aérea no tratamento de dose constante (Figura 17D).

Correlacionando os dados de N-amino e açúcares solúveis, quando ocorre um incremento nos teores de N-amino, por consequência, os teores de açúcares solúveis são reduzidos, e vice-versa, em ambos os tecidos analisados.

O grande acúmulo de N-amino que ocorreu nas raízes das linhagens, e na parte aérea para as plantas WT e as linhagens em ambos os tratamentos, e avaliando os teores de N-amino e açúcares solúveis, percebe-se uma correlação negativa. De acordo com o trabalho de Fernandes (1978), isso é devido ao intenso processo de mobilização de esqueletos de carbono que deve estar ocorrendo para que a planta possa evitar possíveis efeitos tóxicos em razão da presença de NH₄⁺ livre nos tecidos vegetais, colocando-o assim, na forma de amidas. Este efeito é confirmado pela redução nos teores de açúcares solúveis, que são fontes de esqueletos de carbono utilizados na síntese de ácidos orgânicos para assimilação do nitrogênio absorvido.

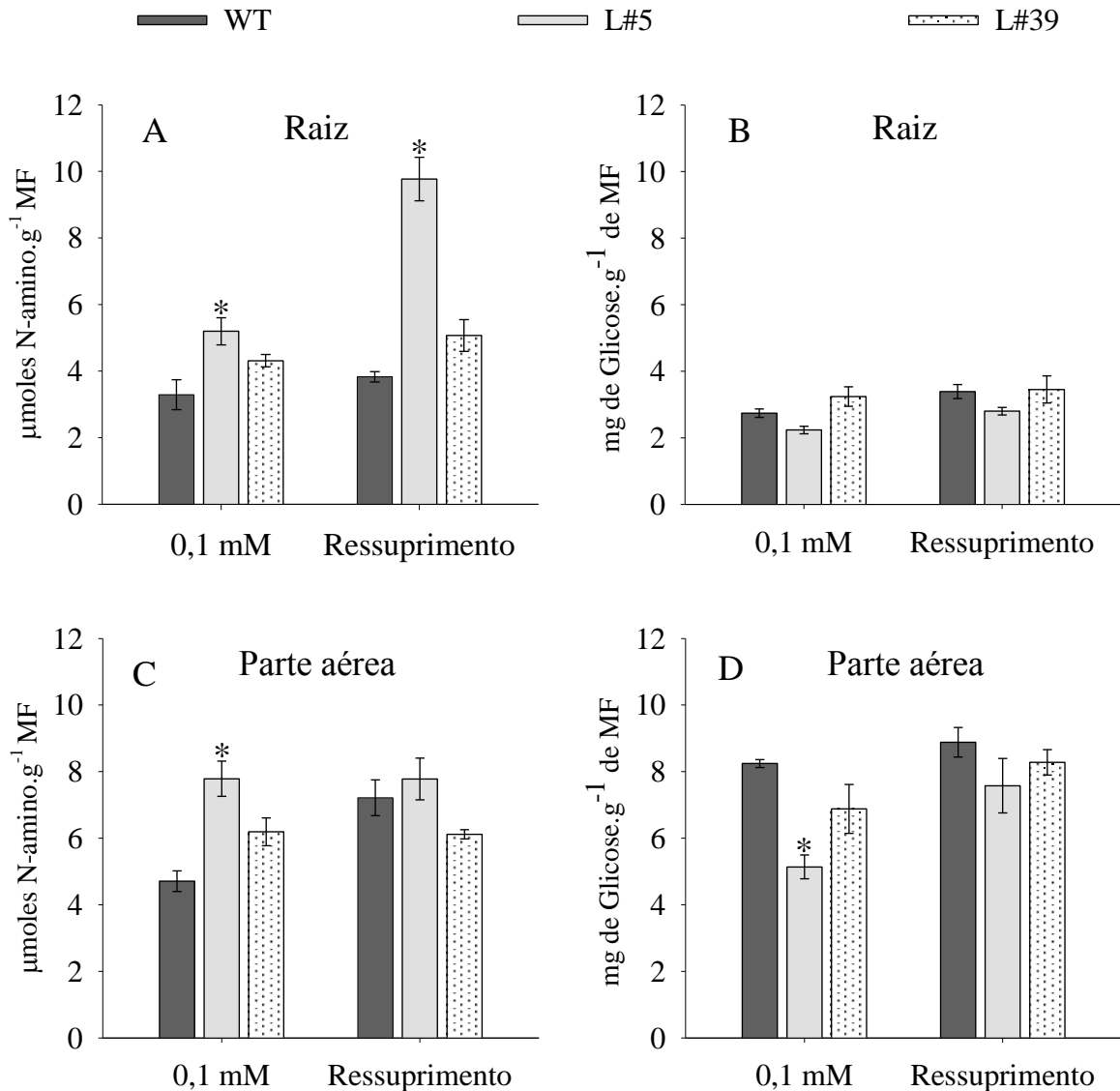


Figura 17. Metabólitos solúveis: A e C) Teores de N-amino em gramas/massa fresca (MF), B e D) teores de glicose em miligramas/massa fresca (MF) das plantas WT e linhagens de arroz transformadas L#5 e L#39. As plantas foram cultivadas sob fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO_3^- , e aos 13 DAG foram submetidas aos tratamentos. Tratamento 1: fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO_3^- ; Tratamento 2: consistiu na privação de N por um período de 4 dias com ressuprimento de 0,1 mM N-NO_3^- quatro horas antes da coleta. Aos 17 DAG foi realizada a coleta quatro horas após a troca da solução nutritiva. DAG: dias após a germinação. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média.

Os teores de NO_3^- foram significativamente superiores nas raízes das linhagens quando comparados às plantas WT (Figura 18A), ao passo que na parte aérea nota-se menores teores de nitrato (Figura 18C), ambos sob o tratamento de dose constante (0,1 mM N-NO_3^-). Quando analisado o tratamento de ressuprimento, em que ocorreu uma privação de N por 4 dias e posterior suprimento com baixa dose de N (0,1 mM N-NO_3^-), não foi observada diferença estatística entre as plantas WT e as linhagens em ambos os tecidos analisados, embora ocorra

um maior incremento no acúmulo de NO_3^- nas raízes quando comparado a parte aérea. Avaliando os teores de NH_4^+ foram significativamente maiores nas linhagens sob os diferentes tratamentos quando avaliados nos diferentes tecidos (Figura 18B e D).

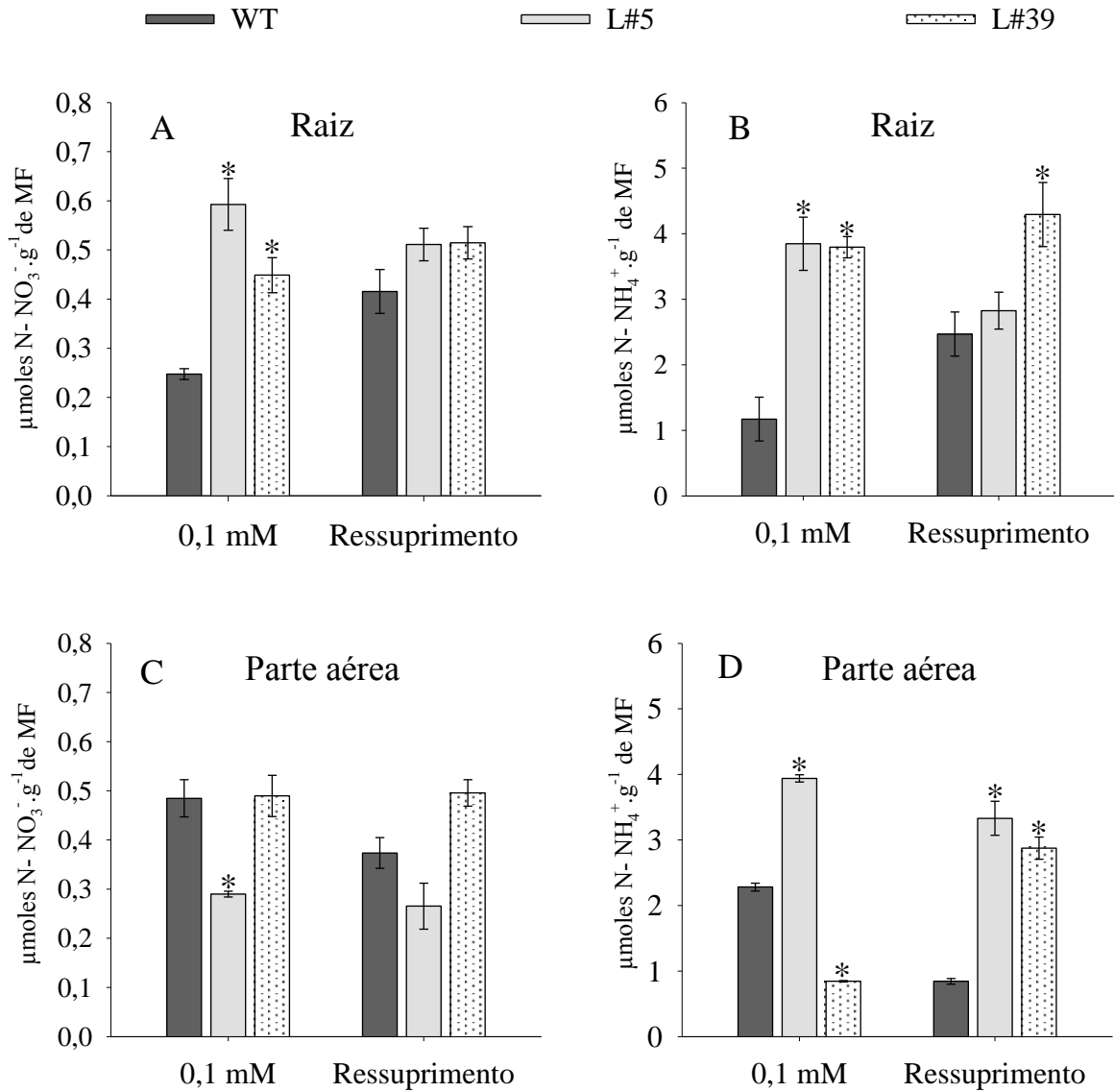


Figura 18. Metabólitos solúveis: A e C) Teores de N-NO_3^- em micro moles/gramas de massa fresca (MF), B e D) teores de NH_4^+ em micro moles/gramas de massa fresca (MF) das plantas WT e linhagens de arroz transformadas L#5 e L#39. As plantas foram cultivadas sob fornecimento constante de $0,1 \text{ mM}$ de N-NO_3^- , e aos 13 DAG foram submetidas aos tratamentos. Tratamento 1: fornecimento constante de $0,1 \text{ mM}$ de N-NO_3^- ; Tratamento 2: consistiu na privação de N por um período de 4 dias com ressuprimento de $0,1 \text{ mM}$ N-NO_3^- quatro horas antes da coleta. Aos 17 DAG foi realizada a coleta quatro horas após a troca da solução nutritiva. DAG: dias após a germinação. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média.

Enfatizando o conteúdo de nitrato em ambos os tecidos, no tratamento de dose constante nas raízes, as linhagens apresentam um incremento de aproximadamente 4x, diferindo significativamente da WT, enquanto que na parte aérea ocorre uma redução de aproximadamente 2x no acúmulo de NO_3^- quando comparado linhagens e WT.

Inclusive, percebe-se uma relação entre os conteúdos de nitrato, N-amino e açúcares solúveis na parte aérea, em que, observa-se maior conteúdo de açúcares solúveis e menor conteúdo de N-amino para as plantas WT, indicando que o nitrato absorvido do meio está permanecendo de forma inalterada, sendo acumulado nos vacúolos quando sob o tratamento de dose constante. O mesmo não é observado para as linhagens, pois apresentam um comportamento inverso, com uma redução de aproximadamente 2x no acúmulo de NO_3^- na parte aérea, resultando em menores teores de açúcares solúveis e maior teor de N-amino.

Comparando estes resultados com o que foi relatado por Wei et al. (2018) nota-se que o nocaute do gene *OsNRT2.4* interferiu na absorção do nitrato nas linhagens, bem como a concentração total de N absorvido foi significativamente menor nas raízes quando comparado a parte aérea, diferentemente dos resultados encontrados neste trabalho, visto que ocorreu um maior acúmulo de nitrato nas raízes e menor acúmulo na parte aérea.

As plantas desenvolveram mecanismos para lidar com a limitação e a privação de nitrogênio, e além das principais mudanças adaptativas da arquitetura do sistema radicular (López-Bucio et al., 2003; Koevoets et al., 2016), as características de absorção de NO_3^- são reguladas em resposta à disponibilidade de N no meio (Nacry et al., 2013; Kiba & Krapp, 2016).

Estudos fisiológicos levaram à conclusão de que pelo menos três sistemas de absorção de NO_3^- são responsáveis pelo influxo de NO_3^- nas raízes (Kotur & Glass, 2015). Dois sistemas são de transporte de alta afinidade (HATS), o constitutivo, ativo em plantas que não foram supridas com NO_3^- , e o induzido pelo fornecimento de NO_3^- . Além desses sistemas, existe o sistema de transporte de baixa afinidade (LATS) constitutivo, com atividade de absorção em função da concentração externa de NO_3^- .

As linhagens obtidas através do silenciamento gênico, apresentaram um comportamento diferente das plantas WT. O aumento do crescimento vegetativo no tratamento com ressurgimento de N- NO_3^- na parte aérea (Figura 16B) indica uma resposta rápida que ocorre em decorrência da detecção do nutriente no meio, este mesmo fenômeno pode ser indicativo de maior influxo de NO_3^- , que ocorre principalmente nos transportadores de alta afinidade, NRT2 e NAR2 (Kiba et al., 2012). O mesmo tem sido sugerido por outros autores (Okamoto et al. 2003; Cai et al., 2008; Yan et al., 2011; Kiba et al., 2012; Lezhneva et al., 2014).

Remans et al. (2006) verificaram que um sinal de demanda de nitrogênio é transmitido a partir do lado do sistema radicular com baixa disponibilidade de N para o lado que possui elevado teor de nitrogênio, aumentando, assim, a proliferação de raízes laterais, a expressão de NRT2.1 e a absorção de nitrato.

4.3.2 Expressão das enzimas do metabolismo de nitrogênio

A expressão relativa das enzimas do metabolismo de N (Figura 19) foi avaliada nas raízes e na parte aérea, e apresentou diferença significativa entre as plantas WT e as linhagens em ambos os tecidos analisados e nos tratamentos, baixa dose (0,1 mM) e ressurgimento (privação de N durante 4 dias com ressurgimento durante 4 horas e pH mantido a 5,5).

A expressão da isoforma *OsGS1;1* foi significativamente menor em ambos os tecidos avaliados para as linhagens quando comparadas as plantas WT (Figura 19A, B), enquanto a expressão da isoforma *OsGS2* foi significativamente menor na raiz e maior na parte aérea para as linhagens quando comparadas as plantas WT (Figura 19C, D).

Em plantas superiores, a glutamina sintetase (GS) é uma enzima chave na assimilação do amônio, que pode ser derivado da fertilização nitrogenada, redução do nitrato, e fotorrespiração, em glutamina (Tabuchi et al., 2005). As plantas possuem duas isoenzimas de GS: a GS1 citosólica e a GS2 cloroplástica (ou plastidial) (Tabuchi et al., 2005). Nos cereais, as isoformas da isoenzima GS1 são igualmente importantes para o desenvolvimento de plantas e rendimento das sementes (Tabuchi et al., 2005; Bao et al., 2014). E a GS2 estaria restrita aos tecidos verdes (Prinsi et al., 2009; Prinsi & Espen, 2015).

Nas plantas, foram identificados múltiplos genes para a GS1 e somente um gene que codifica para a GS2. Em arroz, por exemplo, já foram identificados três genes que codificam para a isoenzima GS1 (*OsGS1;1*, *OsGS1;2* e *OsGS1;3*), e um gene que codifica para a isoenzima GS2 (*OsGS2*) (Tabuchi et al., 2005). Em trigo foram identificados três genes GS1 e um gene GS2 (Hu et al., 2018). Em arábida foram detectados 5 genes para GS1 (*GS1;1*, *GS1;2*, *GS1;3*, *GS1;4* e *GS1;5*) e um gene GS2 (Schmid et al., 2005), e o mesmo número de genes foram detectados em milho (Li et al., 1993; Martin et al., 2006).

Ao analisar a expressão das isoformas GS1 (*GS1;1-1;4*) e GS2 em plântulas de *Arabidopsis thaliana*, Dragičević et al. (2016) verificaram que as isoformas citosólicas apresentaram uma expressão um pouco maior nas raízes quando comparado a parte aérea, destacando a importância das isoformas na assimilação de N nas raízes. Além disso, os transcritos da *GS1;2* foram abundantes em ambos os tecidos analisados. E a GS2 apresentou uma expressão superior na parte aérea.

Em *Arabidopsis*, a função do *AtGS1.2* ocorre na reassimilação do amônio durante a remobilização de N a partir de reservas das sementes (Guan et al., 2014), além de ser importante para o crescimento das plantas e para a homeostase do amônio sob o suprimento não limitante de N (Lothier et al., 2011) e contribui para o rendimento das sementes (Guan et al., 2014). Em contraste, *AtGS1.1* afeta a resposta do desenvolvimento da raiz primária ao N exógeno durante a germinação de sementes (Guan et al., 2014).

Em milho, a isoforma *GS1;1* atua no córtex das raízes, *GS1;2* possui atuação no floema, *GS1;3* influencia no número de grãos, *GS1;4* influencia no tamanho dos grãos e *GS1;5* possui atuação na epiderme foliar, enquanto o gene *GS2* possui expressão nas folhas jovens atuando na reassimilação do amônio e síntese de glutamina para o crescimento vegetativo (Martin et al., 2006).

Os trabalhos publicados pelos autores Tabuchi et al. (2005) e Tabuchi et al. (2007) verificaram que a *OsGS1;1* foi expressa em todos os órgãos, raiz, limbo foliar, bainha e espiguetas, com uma expressão maior no limbo foliar no estágio vegetativo. Além disso, detectaram também elevada expressão da isoforma *OsGS1;2* nas raízes supridas com NH_4^+ no estágio de plântulas, enquanto o *OsGS1;3* foi expresso especificamente nas espiguetas.

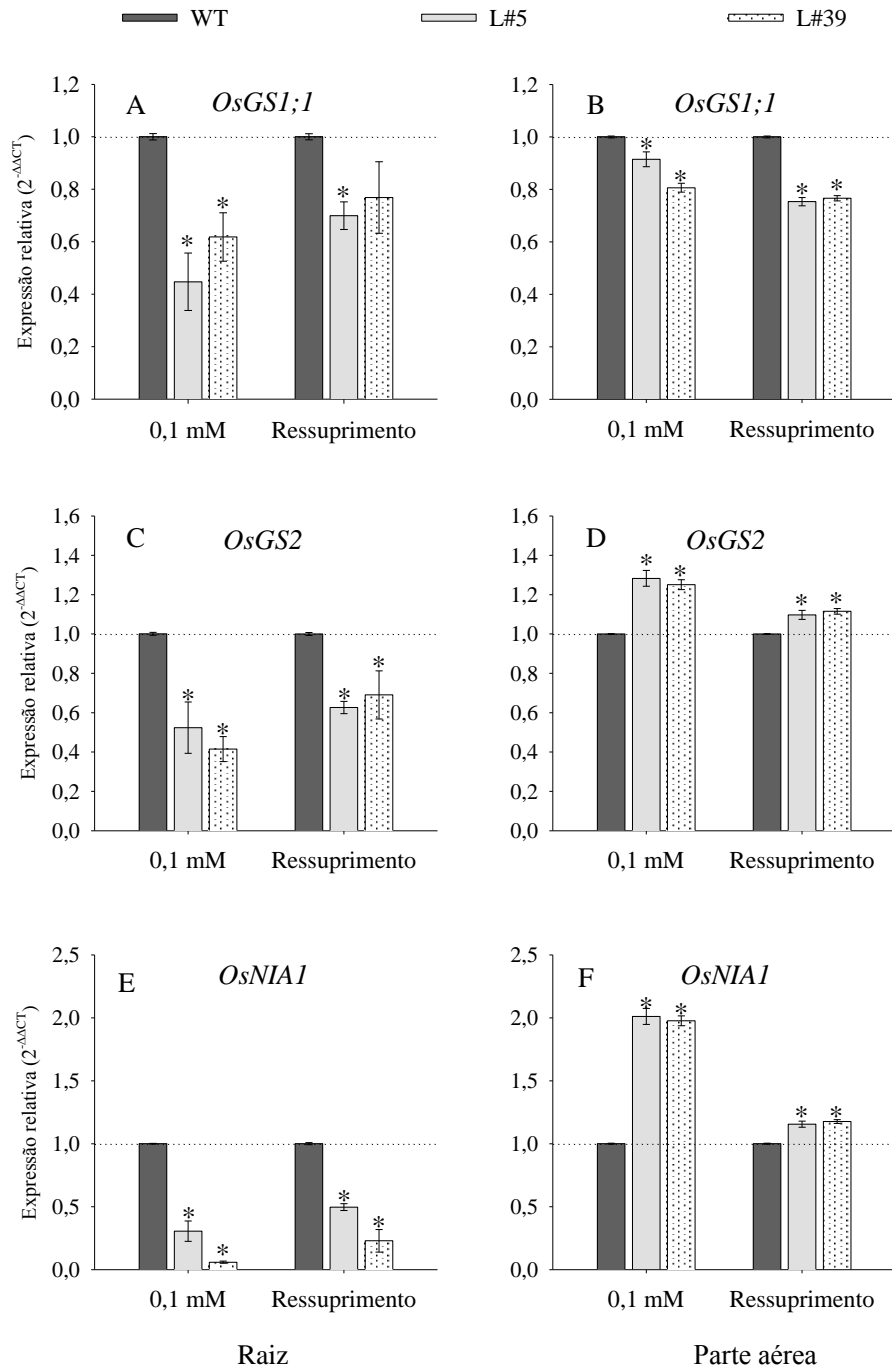


Figura 19. Expressão gênica relativa das enzimas do metabolismo de N: A, B) *OsGS1;1*, C, D) *OsGS2*, E, F) enzima de assimilação de NO_3^- , *OsNIA1*, em raiz e parte aérea das plantas WT e das linhagens de arroz transformadas L#5 e L#39. As plantas foram cultivadas sob fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO_3^- , e aos 13 DAG foram submetidas aos tratamentos. Tratamento 1: fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO_3^- Tratamento 2: consistiu na privação de N por um período de 4 dias com ressuprimento de 0,1 mM N-NO_3^- quatro horas antes da coleta. Aos 17 DAG foi realizada a coleta quatro horas após a troca da solução nutritiva. DAG: dias após a germinação. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média. Todos os níveis de expressão do *OsNRT2.4* foram normalizados para a expressão do *OsUBC* e *OseEF-1a*.

Em adição, a isoforma cloroplástica (ou plastidial) GS2 atua na assimilação do amônio, como também, na reassimilação do amônio que é gerado via fotorrespiração em tecidos fotossintéticos, sendo essencial em plantas superiores para a sobrevivência sob condições fotorrespiratórias (Krapp, 2015; Prinsi & Espen, 2015).

Linhagens transgênicas de trigo (*Triticum aestivum*), superexpressando o gene *TaGS2-2Ab*, apresentaram incrementos significativos na atividade de GS e GS2 nas folhas, sob alto e baixo fornecimento de N, além dos incrementos em todos os parâmetros agrônômicos avaliados (rendimento de grãos, número de grãos, peso de 1000 grãos), bem como, o alongamento das raízes primárias e o aumento no número de raízes laterais. Além disso, a superexpressão do *TaGS2-2Abpro::TaGS2-2Ab* regulou positivamente a expressão dos genes *TaNRT2.1* e *TaNPF6.3* (Hu et al., 2018).

As linhagens L#5 e L#39, cultivadas sob os diferentes tratamentos, apresentaram redução no nível de expressão da isoforma *OsGS1;1* em ambos os tecidos analisados. Associando estes resultados aos teores de amônio, nota-se que a menor expressão da isoforma resultou em um maior teor de amônio nas raízes. Em contrapartida, o nível de expressão da *OsGS2*, que atua na conversão do amônio em glutamina dentro do cloroplasto ou plastídeo, está em concordância com os teores de N-amino avaliados nos diferentes tecidos, em que a menor expressão na raiz também resultou em menor acúmulo de N-amino, assim como, a maior expressão na parte aérea resultou em um maior acúmulo de N-amino.

Estes resultados sugerem que o silenciamento do *OsNRT2.4* regula negativamente a expressão do gene *OsGS1;1* em ambos os tecidos analisados, enquanto que, a expressão do *OsGS2* é regulada negativamente na raiz e positivamente na parte aérea, confirmando a sua maior atuação nos tecidos verdes da planta.

A expressão da isoforma *OsNIA1* foi significativamente menor nas raízes e maior na parte aérea quando comparada as plantas WT e linhagens (Figura 19E, F). O maior nível de expressão da isoforma *OsNIA1* na parte aérea, em ambos os tratamentos, confirma que a enzima nitrato redutase possui uma maior atuação nos tecidos verdes nas plantas de arroz.

O nitrato é uma das maiores fontes de nitrogênio para as plantas. Ele é assimilado por meio de sua redução pela enzima nitrato redutase (NR) e outras enzimas que levam a produção de aminoácidos e compostos nitrogenados (Souza & Fernandes, 2018). A enzima nitrato redutase é a primeira enzima a atuar sobre o nitrato assim que este entra no citosol, podendo ser imediatamente reduzido a nitrito, transportado para os plastídeos e convertido a NH_4^+ pela ação da enzima nitrito redutase (Krapp, 2015; Souza & Fernandes, 2018). A enzima nitrato redutase está localizada no citosol tanto de células radiculares quanto da parte aérea.

A enzima nitrato redutase é regulada positivamente pelo nitrato, luz e carboidratos, além disso, a presença de nitrato no citosol induz os genes para a nitrato redutase (*NIA*) (Yanagisawa, 2014). O excesso de nitrato no citosol (reservatório metabólico ou *pool* indutor) induz o nitrato ser enviado de forma rápida para o vacúolo (reservatório de reserva ou *pool* substrato), reduzindo a atividade da NR (Souza & Fernandes, 2018). Estudos recentes em *Arabidopsis* verificaram que existem muitos fatores de transcrição envolvidos na regulação da expressão gênica do *NIA1* e *NIA2* (Konishi & Yanagisawa, 2013; Marchive et al., 2013; Yanagisawa, 2014).

No estudo realizado por Huaranca Reyes et al. (2018) foi sugerido a existência de um mecanismo de regulação dependente da combinação do acúmulo de açúcar e a disponibilidade de nitrato, isso porque, a disponibilidade de nitrato parece ter um papel chave na modulação de curto prazo (2h), enquanto, o acúmulo de açúcar (especialmente sacarose e glicose) poderia desempenhar o papel principal na modulação de longo prazo da NR (24h).

4.3.3 Expressão dos transportadores de NO_3^- de alta afinidade

Para investigar a função do gene *OsNRT2.4*, foi utilizada a técnica de silenciamento gênico via amiRNA, considerada uma ferramenta alternativa eficiente para o silenciamento de genes endógenos com alta especificidade (Ossowski et al. 2008; Tiwari, 2014; Yao et al., 2018) e realizado com sucesso em plantas modelo incluindo *Arabidopsis thaliana* (Zhang et al., 2018), *Nicotiana tabacum* (Ai et al., 2011), *Oryza sativa* (Swab et al., 2006; Warthmann et al., 2008; Yao et al., 2018; Zhang et al., 2018), *Chlamydomonas reinhardtii* (Sablok et al., 2011; Wang et al., 2017) e *Physcomitrella patens* (Khraiwesh et al., 2008).

Ao avaliar a especificidade da técnica do microRNA artificial em uma espécie de monocotiledônea *Brachypodium*, Carbonell et al. (2015) verificaram o acúmulo de altos níveis do miR390 quando expresso a partir de um precursor quimérico OsMIR390-AtL, além de ter afetado o fenótipo das plantas, como a redução da altura, alteração da arquitetura, folhas retorcidas nos estágios iniciais de desenvolvimento e redução no tamanho das inflorescências quando comparado ao controle. Quando realizado real time por RT-qPCR todos os transcritos de mRNA tiveram seus níveis de expressão significativamente reduzidos, indicando uma alta efetividade no silenciamento gênico.

O padrão de expressão do *OsNRT2.4* em arroz, nas linhagens L#5 e L#39, foi avaliado por RT-PCR semiquantitativa para entender a função deste gene em arroz. Os resultados revelaram que o *OsNRT2.4* foi expresso com baixo nível em ambas as linhagens avaliadas, sendo o silenciamento maior nas raízes (Figura 20) quando comparado ao controle (plantas WT).

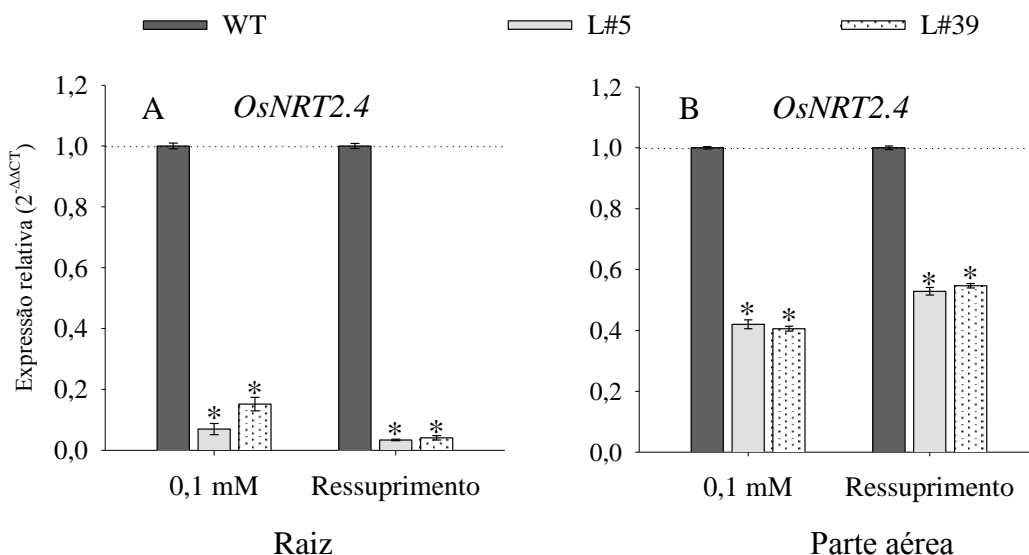


Figura 20. Expressão gênica relativa do gene *OsNRT2.4* em A) raiz e B) parte aérea das plantas WT e das linhagens de arroz transformadas L#5 e L#39. As plantas foram cultivadas sob fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO_3^- , e aos 13 DAG foram submetidas aos tratamentos. Tratamento 1: fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO_3^- Tratamento 2: consistiu na privação de N por um período de 4 dias com ressuprimento de 0,1 mM N-NO_3^- quatro horas antes da coleta. Aos 17 DAG foi realizada a coleta quatro horas após a troca da solução nutritiva. DAG: dias após a germinação. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média. Todos os níveis de expressão do *OsNRT2.4* foram normalizados para a expressão do *OsUBC* e *OseEF-1a*.

Uma grande dificuldade encontrada nos estudos de transportadores de nitrato está ainda na caracterização de suas propriedades de transporte (Krapp et al., 2014). Wei et al. (2018) investigando a cinética de absorção de NO_3^- , injetaram em oócitos o *OsNRT2.4*, e verificaram que a expressão transcricional do *OsNRT2.4* ocorreu tanto em baixo quanto em alto suprimento de nitrato, igualmente o mesmo resultado foi relatado anteriormente por Feng et al. (2011) e Yan et al. (2011), constatando a função de um transportador de nitrato de dupla afinidade.

Avaliando a influência do silenciamento na expressão de outros genes, foi verificado um aumento significativo, em ambas as linhagens, na expressão dos genes *OsNRT2.1* (Figura 21A) e *OsNAR2.1* (Figura 21B) sob o fornecimento constante de 0,1 mM (baixo suprimento), sugerindo que os NRT2 podem desempenhar um papel importante quando sob baixa dose e/ou deficiência de nitrogênio.

Ao avaliar plantas mutantes silenciando o *osnar2.1*, Yan et al. (2011) verificaram que a expressão dos genes *OsNRT2.3b* e *OsNRT2.4* em raízes supridas por baixo fornecimento de N (0,2 mM N- NO_3^-), não apresentou diferença estatística entre as plantas WT e as linhagens, enquanto que o nível de expressão do *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNRT2.3a* decresceu, revelando que seus respectivos transportadores requerem *OsNAR2.1* como proteína acessória na absorção de nitrato.

Associando aos resultados encontrados nesse trabalho, o elevado nível de expressão do gene *OsNAR2.1* quando sob silenciamento gênico do *OsNRT2.4*, indica que a proteína NAR2.1 não atua como proteína acessória para o *OsNRT2.4*, pois, caso contrário, teria apresentado níveis de expressão similares aos do gene *OsNRT2.4*. Estes fatos corroboram também com os resultados de Wei et al. (2018), em que foi constatado que o *OsNRT2.4* não requer a proteína *OsNAR2.1* para incrementar a absorção de NO_3^- .

A análise de expressão dos transportadores de alta afinidade (*OsNRT2.1* e *OsNAR2.1*) mostrou que a expressão destes genes foi aumentada nas linhagens quando comparado a WT. Dessa maneira, pode ser inferido que estes transportadores estão contribuindo para o aumento no conteúdo de nitrato nas raízes, como uma atuação compensatória devido o silenciamento do gene *OsNRT2.4*, contribuindo assim, para a absorção quando sob baixo fornecimento de N.

No experimento de indução de NO_3^- com baixo suprimento (0,1 mM) revelou que as isoformas *OsGS1;1* (Figura 19A) e *OsNIA1* (Figura 19E) foram significativamente reprimidas na raiz, sendo possível inferir que estas isoformas podem mediar a sinalização do NO_3^- . A descoberta de plantas que são deficientes na atividade da NR foi fundamental para descobrir os efeitos de sinalização do nitrato, uma vez que o acúmulo de nitrato, exibe uma sinalização aprimorada por nitrato (Beever & Hageman, 1969; Alboresi et al., 2005).

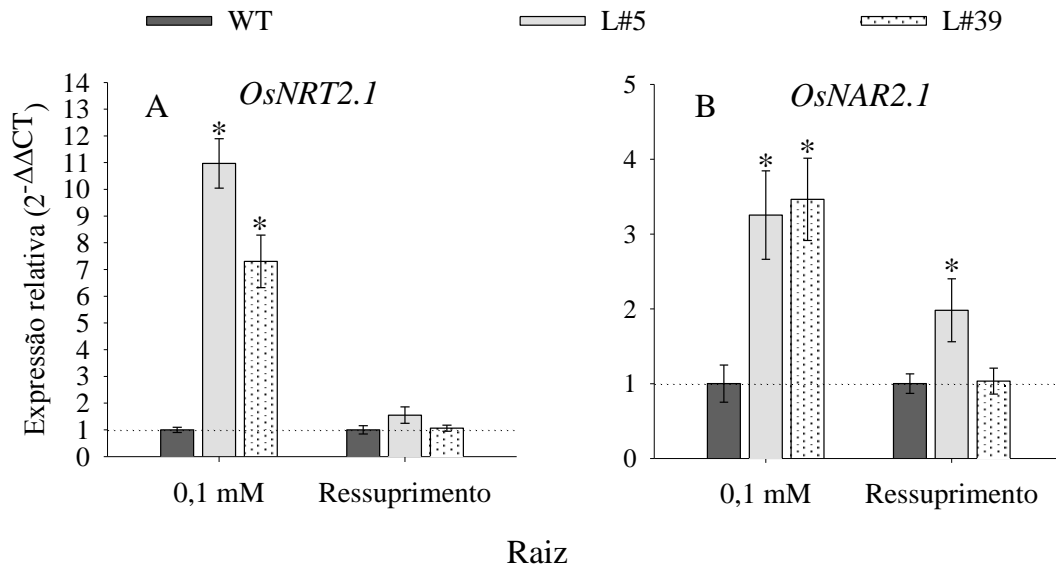


Figura 21. Expressão gênica relativa do gene A) *OsNRT2.1* e B) *OsNAR2.1* em raiz das plantas WT e das linhagens de arroz transformadas, L#5 e L#39. As plantas foram cultivadas sob fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO_3^- , e aos 13 DAG foram submetidas aos tratamentos. Tratamento 1: fornecimento constante de 0,1 mM de N-NO_3^- . Tratamento 2: consistiu na privação de N por um período de 4 dias com ressuprimento de 0,1 mM N-NO_3^- quatro horas antes da coleta. Aos 17 DAG foi realizada a coleta quatro horas após a troca da solução nutritiva. DAG: dias após a germinação. Asterisco (*) indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média. Todos os níveis de expressão do *OsNRT2.4* foram normalizados para a expressão do *OsUBC* e *OseEF-1a*.

Muitos membros da família NRT2 são incapazes de transportar NO_3^- sozinhos, sendo necessário uma proteína acessória, NAR2.1 para o transporte de nitrato. Em arroz, dos quatro membros da família NRT2, três precisam da *OsNAR2.1* na aquisição de NO_3^- pelas raízes (*OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNRT2.3a*) (Miller et al., 2007; Feng et al., 2011; Yan et al., 2011). A proteína NAR2.1 pertence à família NAR2, que também pode ser nomeada de NRT3 (Miller et al., 2007). Atua como uma proteína acessória para os transportadores, NRT2.1, NRT2.2 e NRT2.3, sendo necessária para o transporte de nitrato de alta afinidade (HATS) em raízes de plantas (Feng et al., 2011; Yan et al., 2011).

Ao utilizar estudos funcionais em oócitos, Kotur et al. (2012) mostraram que a absorção de nitrato foi estimulada pela coexpressão de NAR2.1 em 2 vezes mais apenas para NRT2.1, NRT2.2 e NRT2.5, com incrementos significativos para todas as coinejeções de NRT2 associado a NAR2.1.

Dois dos transportadores de nitrato, NPF6.3 (antigo NRT1.1) e o NRT2.1, têm papéis importantes na detecção e sinalização de nitrato (Ho et al., 2009; Gojon et al., 2011; Bouguyon et al., 2012), regulando o desenvolvimento de raízes laterais e a arquitetura do sistema radicular em resposta ao suprimento de nitrato (Krouk et al., 2010; Bouguyon et al., 2015; O'Brien et al., 2016; Kiba & Krapp, 2016; Pellizzaro et al., 2017; Rashid et al., 2018; Wen & Kaiser, 2018).

O NPF6.3 (antigo NRT1.1) é um regulador chave no desenvolvimento radicular, capaz de modular positivamente a expressão de outro transportador de nitrato, o NRT2.1, que é um importante componente no sistema de absorção de nitrato de alta afinidade (Krouk et al., 2010; Bouguyon et al., 2015; Kiba & Krapp, 2016).

NRT2.1 é o alvo central na sinalização sistêmica por demanda de N, sendo induzido pelo baixo fornecimento de N e, quando isso ocorre, parece estimular a produção de etileno, fitohormônio que influencia no crescimento radicular (Zheng et al., 2013), mas juntos, NPF6.3 e o NRT2.1, têm papéis importantes na detecção e sinalização de nitrato (Ho et al., 2009; Gojon et al., 2011; Bouguyon et al., 2012). Outro exemplo da atuação do NPF6.3 está associado a quebra de dormência das sementes (Alboresi et al., 2005).

De acordo com os resultados encontrados, o silenciamento do *OsNRT2.4* afetou não somente a expressão *OsNRT2.1* e *OsNAR2.1*, como também influenciou na dormência das sementes, tendo sido necessário o desenvolvimento de um protocolo adaptado para a “quebra de dormência”.

A dormência das sementes depende de uma série de fatores, incluindo as condições de crescimento da planta mãe, condições de estocagem e condições ambientais (Menezes et al., 2009). Além destes, os efeitos fisiológicos, genéticos e bioquímicos também possuem um importante papel na determinação da dormência e germinação de sementes (Alboresi et al., 2005), bem como um desequilíbrio, por exemplo, entre hormônios, afeta diretamente a dormência das sementes, pois enquanto o ácido abscísico promove a dormência, o ácido giberélico promove uma melhor germinação das sementes (David et al., 2016).

Resultados publicados por Foley & Fennimore (1998) sugerem que a dormência em sementes de arroz está ligada a uma associação entre bases genéticas e fatores ambientais, a qual pode ser controlada por diversos genes de origem materna e nuclear. A remoção de inibidores localizados no complexo casca-pericarpo e a entrada de O₂ na casca são uma importante estratégia para reduzir a dormência das sementes (Ketring et al., 1973; Amaral, 1992; Menezes et al., 2009).

É importante ressaltar que com o silenciamento do gene *OsNRT2.4*, ocorreu um aumento significativo na expressão dos genes *OsNRT2.1* e *OsNAR2.1*, genes envolvidos na absorção de nitrato. A sincronização no aumento do padrão de expressão do *OsNRT2.1* e *OsNAR2.1* ocasionado pelo silenciamento do *OsNRT2.4* indica que existe uma relação entre esses três genes. Estes resultados podem indicar que o *OsNRT2.4* reprime a atuação do *OsNRT2.1* e *OsNAR2.1*.

Ademais, por meio da análise filogenética realizada pelos autores Araki & Hasegawa et al. (2006) e, Cai et al. (2008), revelaram que o *OsNRT2.4*, em arroz, está relativamente mais perto do gene *AtNRT2.7* (que desempenha um papel específico no acúmulo de nitrato no vacúolo das sementes (Chopin et al., 2007)) e do gene *AtNRT2.5*, em *Arabidopsis*. De acordo com Kiba & Krapp (2016), o padrão de expressão do gene *AtNRT2.5* indica ser responsável pela absorção de nitrato direto do solo, além de ser expresso preferencialmente nas partes mais jovens do sistema radicular em plantas adultas, enquanto que o *AtNRT2.1* desempenha um papel na absorção do nitrato proveniente do apoplasto e é fortemente expresso nas partes mais velhas do sistema radicular tanto em plântulas quanto em plantas adultas.

Os estudos realizados pelos autores Chopin et al. (2007) e David et al. (2014) relatam a função do *AtNRT2.7*, que desempenha um papel específico no acúmulo de nitrato no vacúolo das sementes, sendo um fator importante na germinação das sementes, podendo ser útil para melhorar as taxas de germinação nas sementes das culturas. Além disso, segundo os autores Kotur et al. (2012), o *AtNRT2.7* em *Arabidopsis* não requer a proteína *AtNAR2.1* para o transporte de nitrato.

Ao realizar o estudo de localização, Feng et al. (2011) verificaram que *OsNAR2.1* e *OsNRT2.1*, além de serem expressos abundantemente nas células das raízes primárias e laterais, também foram detectados no embrião, mas não houve expressão na cariopse. Em contrapartida, *OsNRT2.4* foi expresso principalmente na base dos primórdios das raízes laterais, além de ter sido verificada sua expressão também nas extremidades da cariopse, e nos

tecidos vasculares da antera, e não foi detectada expressão no embrião (Feng et al., 2011; Wei et al., 2018). Embora o *OsNAR2.1* e *OsNRT2.1* estejam localizados no embrião, como demonstrado pelos autores supracitados, e suas expressões tenham sido elevadas nas linhagens L#5 e L#39, ainda assim, o silenciamento do gene *OsNRT2.4* afetou a germinação das sementes.

Como o NPF6.3, um regulador chave no desenvolvimento radicular, é capaz de modular positivamente a expressão do NRT2.1, e está associado a quebra de dormência nas sementes, mesmo com a elevada expressão do NRT2.1, a dormência das sementes foi mantida, podendo existir um sinergismo entre esses transportadores e o *OsNRT2.4*. Estes fatos sugerem que o gene *OsNRT2.4*, relativamente próximo ao *AtNRT2.7*, pode ter em plantas de arroz um importante papel na quebra de dormência das sementes.

Este estudo fornece evidências da atuação do transportador *OsNRT2.4* na sinalização para a quebra de dormência das sementes, pois, além do estabelecimento de um protocolo de quebra de dormência, foi relatado um menor acúmulo de NO_3^- na parte aérea nas linhagens avaliadas quando comparado as plantas WT, e um acúmulo mais expressivo nas raízes (Figura 18A, C), um indicativo do efeito similar ao NRT2.7.

Com os resultados encontrados, o transportador *OsNRT2.4* afeta a absorção e o fluxo interno de N (efluxo), visto que possui um importante papel na regulação da morfologia e arquitetura radicular. Ademais, evidências encontradas neste trabalho sugerem a sua atuação na sinalização para a quebra de dormência das sementes.

5 CONCLUSÕES

O silenciamento do gene *OsNRT2.4* não afeta o crescimento da parte aérea e a profundidade radicular das linhagens em arroz, ditos parâmetros morfológicos, apresentando apenas uma redução na biomassa produzida quando comparada a WT.

Com base nos resultados que foram sendo discutidos ao longo deste estudo, foi possível verificar que *OsNRT2.4* possui um papel na modulação do crescimento radicular, estando especificamente envolvido no crescimento de raízes laterais sob baixo suprimento de nitrato, confirmando a hipótese deste estudo.

Além do mais, diante dos resultados encontrados, pode-se inferir a participação do *OsNRT2.4* no transporte de NO_3^- da raiz para a parte aérea (efluxo), bem como no metabolismo de N, afetando a absorção, o acúmulo e a assimilação de N, sugerindo seu envolvimento na resposta de crescimento tanto nas raízes quanto na parte aérea, quando sob baixo fornecimento de nitrato.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma grande dificuldade encontrada nos estudos de transportadores de nitrato está ainda na caracterização de suas propriedades de transporte. O aumento no conteúdo de nitrato na raiz e sua respectiva redução na parte aérea proporcionado pelo silenciamento do *OsNRT2.4* nas linhagens avaliadas, confere ao transportador uma possível característica de atuação tanto no efluxo quanto no influxo de nitrato. A germinação das sementes foi afetada pelo silenciamento do gene *OsNRT2.4*, fornecendo evidências da atuação do transportador *OsNRT2.4* na sinalização para a quebra de dormência das sementes.

Todas essas inferências, se confirmadas, podem revelar uma característica *transceptor* do gene *OsNRT2.4*, isto é, além de poder regular o transporte de NO_3^- da raiz para a parte aérea (efluxo), também poderá ser comprovada a sua atuação na absorção (influxo) e na sinalização, tornando-se necessário mais estudos para verificar a função deste gene nas plantas, sendo importante ainda, avaliar possíveis modificações sobre as características agronômicas.

Frente a esse cenário, será um grande progresso entender os diferentes mecanismos regulatórios que estão associados a proteína transportadora de nitrato, *OsNRT2.4*, que regulam a absorção de N e a arquitetura radicular em arroz, possibilitando ampliar a rede de conhecimento a cerca dos transportadores de alta afinidade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AI, T.; ZHANG, L.; GAO, Z.; ZHU, C. X.; GUO, X. Highly efficient virus resistance mediated by artificial microRNAs that target the suppressor of PVX and PVY in plants. **Plant Biology**, v. 13, p. 304-316, 2011.
- 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.
- ALBORESI, A.; GESTIN, C.; LEYDECKER, M.-T.; BEDU, M.; MEYER, C.; TRUONG, H.-N. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. **Plant, Cell and Environment**, v. 28, p. 500-512, 2005.
- ALMAGRO, A.; LIN, S. H.; TSAY, Y. F. Characterization of the *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.6 reveals a role of nitrate in early embryo development. **The Plant Cell**, v. 20, p. 3289-3299, 2008.
- AMARAL, A. S. Aspectos da dormência em sementes de arroz. **Lavoura arrozeira**, v. 45, p. 3-6, 1992.
- ANDRIEU, A.; BREITLER, J. C.; SIRÉ, C.; MEYNARD, D.; GANTET, P.; GUIDERDONI, E. An in planta, *Agrobacterium*-mediated transient gene expression method for inducing gene silencing in rice (*Oryza sativa* L.) leaves. **Rice**, v. 5, p. 23-34, 2012.
- ARAKI, R. & HASEGAWA. Expression of rice (*Oryza sativa* L.) genes involved in high-affinity nitrate transport during the period of nitrate induction. **Breeding Science**, v. 56, p. 295-302, 2006.
- ARRUDA, L. N.; BUCHER, C. A.; RANGEL, R. P.; SOUZA, A. F. F.; FERNANDES, M. S.; 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, p. 1-8, 2018.
- BALDRICH, P. & SAN SEGUNDO, B. MicroRNAs in rice innate immunity. **Rice**, v. 9, p. 1-6, 2016.
- BAO, A.; ZHAO, Z.; DING, G.; SHI, L.; XU, F.; CAI, H. Accumulated expression level of cytosolic glutamine synthetase 1 Gene (*OsGSI;1* or *OsGSI;2*) alter plant development and the carbon–nitrogen metabolic status in rice. **PloS One**, v. 9, e95581, 2014.
- BAPTISTA, J. A.; FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Cinética de absorção de amônio e crescimento radicular das cultivares de arroz agulha e bico ganga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1325-1330, 2000.
- BASUCHAUDHURI, P. Nitrogen nutrition in rice. **Indian Journal of Plant Sciences**, v. 4, p. 28-37, 2015.

- BEEVERS, L. & HAGEMAN, R. H. Nitrate reduction in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.20, p. 495-522, 1969.
- BLOOM, A. J. The increasing importance of distinguishing among plant nitrogen sources. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 25, p. 10-16, 2015.
- BOUGUYON, E.; GOJON, A.; NACRY, P. Nitrate sensing and signaling in plants. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 23, p. 648-654, 2012.
- BOUGUYON, E.; BRUN, F.; MEYNARD, D.; KUBES, M.; PERVENT, M.; LERAN, S.; LACOMBE, B.; KROUK, G.; GUIDERDONI, E.; ZAŽÍMALOVÁ, E.; HOYEROVÁ, K.; NACRY, P.; GOJON, A. Multiple mechanisms of nitrate sensing by *Arabidopsis* nitrate transceptor NRT1.1. **Nature Plants**, v. 1, p. 1-8, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. **Mapa/ACS**, 399p., 2009.
- BREDEMEIER, C. & MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, p. 365-372, 2000.
- BUCHER, Carlos Alberto. **Avaliação através de RT-PCR da expressão dos genes que codificam para enzimas de assimilação de nitrogênio em variedades de arroz**. 2007. 37f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2007.
- BUCHER, C. A.; SANTOS, L. A.; NOGUEIRA, E. M.; 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 Soil Science**, v. 177, p. 395-403, 2014.
- BUCHNER, P. & HAWKESFORD, M. J. Complex phylogeny and gene expression patterns of members of the nitrate transporter 1/peptide transporter family (NPF) in wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 5697-5710, 2014.
- CAI, C.; WANG, J.-Y.; ZHU, Y.-G.; SHEN, Q.-R.; LI, B.; TONG, Y.-P.; LI, Z.-S. Gene structure and expression of the high-affinity nitrate transport system in rice roots. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, p. 443-451, 2008.
- CARBONELL, A.; FAHLGREN, N.; MITCHELL, S.; COX, K. L. JR, REILLY, K. C.; MOCKLER, T. C. AND CARRINGTON, J. C. Highly specific gene silencing in a monocot species by artificial microRNAs derived from chimeric miRNA precursors. **The Plant Journal**, v. 82, p. 1061-1075, 2015.
- CHEN, J.; ZHANG, Y.; TAN, Y.; ZHANG, M.; ZHU, L.; XU, G.; FAN, X. Agronomic nitrogen-use efficiency of rice can be increased by driving OsNRT2.1 expression with the OsNAR2.1 promoter. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, p. 1-11, 2016.

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**, v. 19, p. 1590-1602, 2007.

COELHO, C. P.; SANTOS, L. A.; RANGEL, R. P.; SPERANDIO, M. V. L.; BUCHER, C. A.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Rice varieties exhibit different mechanisms for nitrogen use efficiency (NUE). **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, p. 342-352, 2016.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acessado em: 02 de out. 2018. **CONAB**, 2018.

CRAWFORD, N. M. Nitrate: Nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell**, v. 7, p. 859-868, 1995.

DAVID, L. C.; DECHORGNAT, J.; BERQUIN, P.; ROUTABOUL, J. M.; DEBEAUJON, I.; DANIEL-VEDELE, F.; FERRARIO-MÉRY, S. Proanthocyanidin oxidation of *Arabidopsis* seeds is altered in mutant of the high-affinity nitrate transporter NRT2.7. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 885-893, 2014.

DAVID, L. C.; BERQUIN, P.; KANNO, Y.; SEO, M.; DANIEL-VEDELE, F.; FERRARIO-MÉRY, S. N availability modulates the role of NPF3.1, a gibberellin transporter, in GA-mediated phenotypes in *Arabidopsis*. **Planta**, v. 244, p. 1315-1328, 2016.

DRAGIĆEVIĆ, M.; SIMONOVIĆ, A.; BOGDANOVIĆ, M.; SUBOTIĆ, A.; GHALAWENJI, N.; DRAGIĆEVIĆ, I.; TODOROVIĆ, S. Differential regulation of Gs-Gogat gene expression by plant growth regulators in *Arabidopsis* seedlings. **Archives of Biological Sciences**, v. 68, p. 399-404, 2016.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoTocantins/adu_bacao_calagem.htm. Acessado em: 02 de set. 2016. **EMBRAPA**, 2004.

FAN, X.; NAZ, M.; FAN, X.; XUAN, W.; MILLER, A. J.; XU, G. Plant nitrate transporters: from gene function to application. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, p. 2463-2475, 2017.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Proceedings of the FAO International Symposium on the Role of Agricultural Biotechnologies in Sustainable Food Systems and Nutrition. **FAO**, 284p., 2016.

FELKER, P. Micro determination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v. 49, p. 1080-1080, 1977.

FENG, H.; YAN, M.; FAN, X.; LI, B.; SHEN, Q.; MILLER, A. J.; XU, G. Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 2319-2332, 2011.

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

FERNANDES, M. S. N carriers, light and temperature influences on the free amino acid pool composition of rice plants. **Turrialba**, v. 33, p. 297-301, 1983.

FERNANDES, M. S. Efeitos de fontes e níveis de nitrogênio sobre a absorção e assimilação de N em arroz. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 2, p. 1-6, 1990.

FERREIRA, Leandro Martins. **Caracterização funcional do transportador de amônio OsAMT1.3 e seu efeito sobre a nutrição nitrogenada em plantas de arroz**. 2013. 55f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2013.

FERREIRA, L. M.; SOUZA, V. M.; TAVARES, O. C. H.; ZONTA, E.; SANTA-CATARINA, C.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S.; SANTOS, L. A. *OsAMT1.3* expression alters rice ammonium uptake kinetics and root morphology. **Plant Biotechnology Reports**, v. 9, p. 221-229, 2015.

FERREIRA, Leandro Martins. **Características morfológicas, fisiológicas e transcriptoma em variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) contrastantes quanto a tolerância ao estresse hídrico**. 2017. 110f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2017.

FOLEY, M. E. & FENNIMORE, S. A. Genetic basis for seed dormancy. **Seed Science Research**, v. 8, p. 173-182, 1998.

FORDE, B. G. Nitrogen signalling pathways shaping root system architecture: an update. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 21, p. 30-36, 2014.

FREDES, I.; MORENO, S.; DÍAZ, F. P.; GUTIÉRREZ, R. A. Nitrate signaling and the control of Arabidopsis growth and development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 47, p. 112-118, 2019.

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.

GASPARIS, S.; KAŁA, M.; PRZYBOROWSKI, M.; ORCZYK, W.; NADOLSKA-ORCZYK, A. Artificial microRNA-based specific gene silencing of grain hardness genes in polyploid cereals appeared to be not stable over transgenic plant generations. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-13, 2017.

GOJON, A.; KROUK, G.; PERRINE-WALKER, F.; LAUGIER, E. Nitrate transceptor(s) in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 2299-2308, 2011.

GRiSP. Global Rice Science Partnership. Rice Almanac. **GRiSP**, 4ed., 283p., 2013.

- GRUBER, B. D.; GIEHL, R. F. H.; FRIEDEL, S.; von WIRÉN, N. Plasticity of the Arabidopsis root system under nutrient deficiencies. **Plant Physiology**, v. 163, p. 161-179, 2013.
- GUAN, M.; MØLLER, I. S.; SCHJOERRING, J. K. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms play specific roles for seed germination and seed yield structure in Arabidopsis. **Journal Experimental Botany**, v. 55, p. 1311-1324, 2014.
- HAYNES, R. J. & GOH, K. M. Ammonium and nitrate nutrition of plants. **Biological Reviews**, v. 53, p. 465-510, 1978.
- HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **The Plant Journal**, v. 6, p. 271-282, 1994.
- HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUBO, T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology**, v. 35, p. 205-218, 1997.
- HIEI, Y. & KOMARI, T. Agrobacterium-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. **Nature Protocols**, v. 3, p. 824-834, 2008.
- HIEI, Y.; ISHIDA, Y.; KOMARI, T. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 628-638, 2014.
- HIREL, B.; GOUIS, J. L.; NEY, B.; GALLAIS, A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 2339-2358, 2007.
- 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, p. 1184-1194, 2009.
- HODGE, A.; ROBINSON, D.; FITTER, A. Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen? **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 304-308, 2000.
- HU, M.; ZHAO, X.; LIU, Q.; HONG, X.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; SUN, L.; LI, H.; TONG, Y. Transgenic expression of plastidic glutamine synthetase increases nitrogen uptake and yield in wheat. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, p.1858-1867, 2018.
- HUARANCCA REYES, T.; SCARTAZZA, A.; POMPEIANO, A.; CIURLI, A.; LU, Y.; GUGLIELMINETTI, L.; YAMAGUCHI, J. Nitrate reductase modulation in response to changes in C/N balance and nitrogen source in Arabidopsis. **Plant & Cell Physiology**, v. 59, p. 1248-1254, 2018.

ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 745-750, 1996.

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.

KADAM, N. N.; TAMILSELVAN, A.; LAWAS, L. M. F.; QUINONES, C.; BAHUGUNA, R. N.; THOMSON, M. J.; DINGKUHN, M.; MUTHURAJAN, R.; STRUIK, P. C.; YIN, X.; JAGADISHA, S.V. K. Genetic control of plasticity in root morphology and anatomy of rice in response to water deficit. **Plant Physiology**, v. 174, p. 2302-2315, 2017.

KANT, S. Understanding nitrate uptake, signaling and remobilization for improving plant nitrogen use efficiency. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 74, p. 89-96, 2018.

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, p. 1-10, 2013.

KECHID, M.; DESBROSSES, G.; ROKHSI, W.; VAROQUAUX, F.; DJEKOUN, A.; TOURAINÉ, B. The *NRT2.5* and *NRT2.6* genes are involved in growth promotion of arabidopsis by the plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196. **New Phytologist**, v. 198, p. 514-524, 2013.

KETRING, A. L. Germination inhibitors. **Seed Science and Technology**, v. 1, p. 305-324, 1973.

KHRAIWESH, B.; OSSOWSKI, S.; WEIGEL, D.; RESKI, R.; FRANK, W. Specific gene silencing by artificial microRNAs in *Physcomitrella patens*: an alternative to targeted gene knockouts. **Plant Physiology**, v. 148, p. 684-693, 2008.

KIBA, T., FERIA-BOURRELLIER, A. B.; LAFOUGE, F.; LEZHNEVA, L.; BOUTET-MERCEY, S.; ORSEL, M.; BRÉHAUT, V.; MILLER, A.; DANIEL-VEDELE, F.; SAKAKIBARA, H.; KRAPP, A. The Arabidopsis nitrate transporter *NRT2.4* plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. **The Plant Cell**, v. 24, p. 245-258, 2012.

KIBA, T. & KRAPP, A. Plant nitrogen acquisition under low availability: regulation of uptake and root architecture. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, p. 707-714, 2016.

KICHEY, T.; HIREL, B.; HEUMEZ, E.; DUBOIS, F.; LE GOUIS, J. In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilization to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. **Field Crop Research**, v. 102, p. 22-32, 2007.

KOEVOETS, I. T.; VENEMA, J. H.; ELZENGA, J. T. M.; TESTERINK, C. Roots withstanding their environment: exploiting root system architecture responses to abiotic stress to improve crop tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1335-1354, 2016.

KONISHI, M. & YANAGISAWA, S. Arabidopsis NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling. **Nature Communications**, v. 4, p. 1-9, 2013.

KOTUR, Z.; MACKENZIE, N.; RAMESH, S.; TYERMAN, S. D.; KAISER, B. N.; GLASS, A. D. M. Nitrate transport capacity of the Arabidopsis thaliana NRT2 family members and their interactions with AtNAR2.1. **New Phytologist**, v. 194, p. 724-731, 2012.

KOTUR, Z. & GLASS, A. D. M. A 150 kDa plasma membrane complex of AtNRT2.5 and AtNAR2.1 is the major contributor to constitutive high- affinity nitrate influx in Arabidopsis thaliana. **Plant, Cell and Environment**, v. 38, 1490-1502, 2015.

KRAPP, A.; DAVID, L. C.; CHARDIN, C.; GIRIN, T.; MARMAGNE, A.; LEPRINCE, A. S.; CHAILLOU, S.; FERRARIO-MÉRY, S.; MEYER, C.; DANIEL-VEDELE, F. Nitrate transport and signaling in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 789-798, 2014.

KRAPP, A. Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 25, p. 115-122, 2015.

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 Phytologist**, v. 145, p. 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, p. 927-937, 2010.

KURATA, N.; NONOMURA, K.-I.; HARUSHIMA, Y. Rice Genome Organization: the Centromere and Genome Interactions. **Annals of Botany**, v. 90, p. 427-435, 2002.

LAM-SÁNCHEZ, A.; SANTOS, J. E.; TAKAMURA, K.; TREPTOW, R. M. O.; OLIVEIRA, J. E. D. Estudos Nutricionais com arroz (*Oryza sativa*, L.). **Alimentos e Nutrição**, v. 5, p. 37-48, 1994.

LAUGIER, E.; BOUGUYON, E.; MAURIÈS, A.; TILLARD, P.; GOJON, A.; LEJAY, L. Regulation of high-affinity nitrate uptake in roots of arabidopsis depends predominantly on posttranscriptional control of the NRT2.1/NAR2.1 transport system. **Plant Physiology**, v. 158, p. 1067-1078, 2012.

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 transporter1/peptide transporter family members in plants. **Trends in Plant Science**, v. 19, p. 5-9, 2014.

LEZHNEVA, L.; KIBA, T.; FERIA-BOURRELLIER, A. B.; LAFOUGE, F.; BOUTET-MERCEY, S.; ZOUFAN, P.; SAKAKIBARA, H.; DANIEL-VEDELE, F.; KRAPP, A. The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants. **The Plant Journal**, v. 80, p. 230-241, 2014.

LI, H.; HU, B.; CHU, C. Nitrogen use efficiency in crops: lessons from Arabidopsis and rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, p. 2477-2488, 2017.

LI, M. G.; VILLEMUR, R.; HUSSEY, P. J.; SILFLOW, C. D.; GANTT, J. S.; SNUSTAD, D. P. Differential expression of six glutamine synthetase genes in *Zea mays*. **Plant Molecular Biology**, v. 23, p. 401-407, 1993.

LI, W.; YAN, M.; HU, B.; PRIYADARSHANI, S. V. G. N.; HOU, Z.; OJOLO, S. P.; XIONG, J.; ZHAO, H.; QIN, Y. Characterization and the expression analysis of nitrate transporter (NRT) gene family in pineapple. **Tropical Plant Biology**, v. 11, p. 177-191, 2018 (a).

LI, Y.; XIAO, J.; CHEN, L.; HUANG, X.; CHENG, Z.; HAN, B.; ZHANG, Q.; WU, C. Rice Functional Genomics Research: Past Decade and Future. **Molecular Plant**, v. 11, p. 359-380, 2018 (b).

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.

LÓPEZ-BUCIO, J.; CRUZ-RAMÍREZ, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. The role of nutrient availability in regulating root architecture. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 280-287, 2003.

LOTHIER, J.; GAUFICHON, L.; SORMANI, R.; LEMAÎTRE, T.; AZZOPARDI, M.; MORIN, H.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. The cytosolic glutamine synthetase *GLN1;2* plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in Arabidopsis rosettes when nitrate supply is not limiting. **Journal Experimental Botany**, v. 62, p. 1375-1390, 2011.

MARCHESAN, E.; GROHS, M.; SANTOS, D. S.; FORMENTINI, T. C.; SILVA, L. S.; SARTORI, G. M. S.; FERREIRA, R. B. Fontes alternativas à ureia no fornecimento de nitrogênio para o arroz irrigado. **Ciência Rural**, v. 41, p. 2053-2059, 2011.

MARCHIVE, C.; ROUDIER, F.; CASTAINGS, L.; BRÉHAUT, V.; BLONDET, E.; COLOT, V.; MEYER, C.; KRAPP, A. Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants. **Nature Communications**, v. 4, p. 1-9, 2013.

MARTIN, A.; LEE, J.; KICHEY, T.; GERENTES, D.; ZIVY, M.; TATOUT, C.; DUBOIS, F.; BALLIAU, T.; VALOT, B.; DAVANTURE, M.; TERCÉ-LAFORGUE, T.; QUILLERÉ, I.; COQUE, M.; GALLAIS, A.; GONZALEZ-MORO, M.-B.; BETHENCOURT, L.;

HABASH, D. Z.; LEA, P. J.; CHARCOSSET, A.; PEREZ, P.; MURIGNEUX, A.; SAKAKIBARA, H.; EDWARDS, K. J.; HIREL, B. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. **The Plant Cell**, v. 18, p. 3252-3274, 2006.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; REISDORF-CREN, M.; ORSEL, M. Leaf nitrogen remobilization for plant development and grain filling. **Plant Biology**, v. 10, p. 23-36, 2008.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany**, v. 105, p. 1141-1157, 2010.

MENEZES, N. L.; FRANZIN, S. M.; BORTOLOTTI, R. P. Dormência em sementes de arroz: causas e métodos de superação. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 7, p. 35-44, 2009.

MILLER, A. J.; FAN, X.; ORSEL, M.; SMITH, S. J.; WELLS, D. M. Nitrate transport and signaling. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, 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.

MORÈRE-LE PAVEN, M.-C.; VIAU, L.; HAMON, A.; VANDECASTEELE, C.; PELLIZZARO, A.; BOURDIN, C.; LAFFONT, C.; LAPIED, B.; LEPETIT, M.; FRUGIER, F.; LEGROS, C.; LIMAMI, A. M. Characterization of a dual-affinity nitrate transporter MtNRT1.3 in the model legume *Medicago truncatula*. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 5595-5605, 2011.

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.

NESTER, E. W. Agrobacterium: nature's genetic engineer. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 730-745, 2015.

NEVES, Marcela Jacques de Lemos. **Silenciamento gênico por amiRNA do transportador OsAMT1.3 e seu efeito sobre a eficiência de absorção de amônio em arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2014. 34f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

O'BRIEN, J. A.; VEGA, A.; BOUGUYON, E.; KROUK, G.; GOJON, A.; CORUZZI, G.; GUTIÉRREZ, R. A. nitrate transport, sensing, and responses in plants. **Molecular Plant**, v. 9, p. 837-856, 2016.

OKAMOTO, M.; VIDMAR, J. J.; GLASS, A. D. M. Regulation of NRT1 and NRT2 gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, p. 304-317, 2003.

OSSOWSKI, S.; SCHWAB, R.; WEIGEL, D. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. **The Plant Journal**, v. 53, p. 674-690, 2008.

PATEL, M.; DEWEY, R. E.; QU, R. Enhancing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation efficiency of perennial ryegrass and rice using heat and high maltose treatments during bacterial infection. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 114, p. 19-29, 2013.

PELLIZZARO, A.; CLOCHARDA, T.; PLANCHETA, E.; LIMAMIA, A. M.; MORÈRE-LE PAVEN, M.-C. Identification and molecular characterization of *Medicago truncatula* *NRT2* and *NAR2* families. **Physiologia Plantarum**, v. 154, p. 256-269, 2015.

PELLIZZARO, A.; ALIBERT, B.; PLANCHET, E.; LIMAMI, A. M.; MORÈRE-LE PAVEN, M.-C. Nitrate transporters: an overview in legumes. **Planta**, v. 246, p. 585-595, 2017.

PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F.; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? **Plant and Soil**, v. 174, p. 3-28, 1995.

PRINSI, B.; NEGRI, A. S.; PESARESI, P.; COCUCCI, M.; ESPEN, L. Evaluation of protein pattern changes in roots and leaves of *Zea mays* plants in response to nitrate availability by two-dimensional gel electrophoresis analysis. **BioMed Central Plant Biology**, v. 9, p. 1-17, 2009.

PRINSI, B. & ESPEN, L. Mineral nitrogen sources differently affect root glutamine synthetase isoforms and amino acid balance among organs in maize. **BioMed Central Plant Biology**, v. 15, p. 1-13, 2015.

RAHAYU, Y. S.; WALCH-LIU, P.; NEUMANN, G.; RÖMHELD, V.; von WIRÉN, N.; BANGERTH, F. Root-derived cytokinins as long-distance signals for NO₃⁻ induced stimulation of leaf growth. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 1143-1152, 2005.

RANGEL, Rafael Passos. **Morfologia, arquitetura radicular e metabolismo de nitrogênio em variedades de arroz sob baixa disponibilidade de amônio**. 2014. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

RANGEL, Rafael Passos. **Arquitetura radicular e tolerância à seca em plantas de arroz com elevada expressão de citocinina oxidase nas raízes**. 2018. 49f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

RASHID, M.; BERA, S.; MEDVINSKY, A. B.; SUN, G.-Q.; LI, B.-L.; CHAKRABORTY, A. Adaptive regulation of nitrate transporter NRT1.1 in fluctuating soil nitrate conditions. **iScience**, v. 2, p. 41-50, 2018.

REMANS, T.; NACRY, P.; PERVENT, M.; FILLEUR, S.; DIATLOFF, E.; MOUNIER, E.; TILLARD, P.; FORDE, B. G.; GOJON, A. The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 19206-19211, 2006.

ROSSIELLO, R. O. P.; ARAÚJO, A. P.; MANZATTO, C. V.; FERNANDES, M. S. Comparação dos métodos fotoelétrico e da interseção na determinação de área, comprimento e raio médio radicular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, p. 633-638, 1995.

SABLOK, G.; PÉREZ-QUINTERO, Á. L.; HASSAN, M.; TATARINOVA, T. V.; LÓPEZ, C. Artificial microRNAs (amiRNAs) engineering - On how microRNA-based silencing methods have affected current plant silencing research. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 406, p. 315-319, 2011.

SAHOO, K. K.; TRIPATHI, A. K.; PAREEK, A.; SOPORY, S. K.; PAREEK, S. L. S. An improved protocol for efficient transformation and regeneration of diverse indica rice cultivars. **Plant Methods**, v. 7, p. 49-59, 2011.

SAMARAPPULI, D. P.; JOHNSON, B. L.; KANDEL, H.; BERTI, M. T. Biomass yield and nitrogen content of annual energy/forage crops preceded by cover crops. **Field Crops Research**, v. 167, p. 31-39, 2014.

SANTOS, L. A.; BUCHER, C. A.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Metabolismo de nitrogênio em arroz sob níveis decrescentes de nitrato. **Agronomia**, v. 39, p. 28-33, 2005.

SANTOS, A. M.; 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, p. 215-220, 2009 (a).

SANTOS, L. A.; BUCHER, C. A.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Effects of Nitrogen Stress on Proton-Pumping and Nitrogen Metabolism in Rice. **Journal of Plant Nutrition**, v. 32, p. 549-564, 2009 (b).

SANTOS, Leandro Azevedo. **Efeito da superexpressão dos fatores de transcrição *ZmDof1* e *OsDof25* sobre a eficiência de uso de nitrogênio em Arabidopsis**. 2009. 81f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

SCHMID, M.; DAVISON, T. S.; HENZ, S. R.; PAPE, U. J.; DEMAR, M.; VINGRON, M.; SCHÖLKOPF B, WEIGEL, D, LOHMANN, J. U. A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. **Nature Genetics**, v. 37, p. 501-506, 2005.

SCHWAB, R.; OSSOWSKI, S.; RIESTER, M.; WARTHMAN, N.; WEIGEL, D. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 18, p. 1121-1133, 2006.

SHIMAMOTO, K. & KYOZUKA, J. Rice as a model for comparative genomics of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 399-419, 2002.

SHRI, M.; RAI, A.; VERMA, P. K.; MISRA, P.; DUBEY, S.; KUMAR, S.; VERMA, S.; GAUTAM, N.; TRIPATHI, R. D.; TRIVEDI, P. K.; CHAKRABARTY, D. An improved Agrobacterium-mediated transformation of recalcitrant indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Protoplasma**, v. 250, p. 631–636, 2013.

SMITH, S. & DE SMET, I. Root system architecture: insights from *Arabidopsis* and cereal crops. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 367, p. 1441-1452, 2012.

SOUZA, Sonia Regina de. **Efeito da aplicação foliar de nitrogênio pós-antese sobre as enzimas de assimilação de N e acúmulo de proteína em grãos de arroz**. 1995. 178f. Tese de Doutorado. (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 1995.

SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L.; FERNANDES, M. S. Nitrogen remobilization during the reproductive period in two Brazilian rice varieties. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, p. 2049-2063, 1998.

SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L.; FERNANDES, M. S.; MAGALHÃES, J. R. Effects of supplemental nitrogen on nitrogen-assimilation enzymes, free amino nitrogen, soluble sugars and crude protein of rice. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v.30, p. 711-724, 1999.

SOUZA, S. R. & FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R.; SANTOS, L. A. (Ed). **Nutrição Mineral de Plantas**. 2. ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, cap. 9, p. 309-375, 2018.

SPERANDIO, Marcus Vinícius Loss. **Análise da expressão dos genes *OsNRT1.1* (A, B e C) e efeito do silenciamento das isoformas *OsA2* e *OsA7* de PM H⁺-ATPases na absorção de nitrogênio em arroz**. 2015. 121f. Tese de Doutorado. (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

SUN, L.; LIN, C.; DU, J.; SONG, Y.; JIANG, M.; LIU, H.; ZHOU, S.; WEN, F.; ZHU, C. Dimeric artificial microRNAs mediate high resistance to RSV and RBSDV in transgenic rice plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 126, p. 127-139, 2016.

TABUCHI, M.; SUGIYAMA, K.; ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; SATO, T.; TAKAHASHI, H.; YAMAYA, T. Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking *OsGS1;1*, a cytosolic glutamine synthetase 1;1. **The Plant Journal**, v. 42, p. 641-651, 2005.

TABUCHI, M.; ABIKO, T.; YAMAYA, T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 2319-2327, 2007.

THE WORLD BANK. Disponível em: <http://data.worldbank.org/topic/agriculture-and-rural-development?end=2013&start=2002>. Acessado em: 03 de set. **THE WORLD BANK**, 2016.

TILMAN, D. Global environmental impacts of agriculture expansion; the need for sustainable and efficient practices. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 5995-6000, 1999.

TILMAN, D.; FARGIONE, J.; WOLFF, B.; D'ANTONIO, C.; DOBSON, A.; HOWARTH, R.; SCHINDLER, D.; SCHLESINGER, W. H.; SIMBERLOFF, D.; SWACKHAMER, D. Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science**, v. 292, p. 281-284, 2001.

TIWARI, M.; SHARMA, D.; TRIVEDI, P. K. Artificial microRNA mediated gene silencing in plants: progress and perspectives. **Plant Molecular Biology**, v. 86, p. 1-18, 2014.

TREVISAN, S.; MANOLI, A.; QUAGGIOTTI, S. NO signaling is a key component of the root growth response to nitrate in *Zea mays* L. **Plant Signaling & Behavior**, v. 9, e28290, 2014.

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.

USDA. United States Department of Agriculture. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>. Acessado em: 02 de out. 2018. **USDA**, 2018.

WANG, Y. Y.; HSU, P. K.; TSAY, Y. F. Uptake, allocation and signaling of nitrate. **Trends in Plant Science**, v.17, p. 458-467, 2012.

WANG, C.; CHEN, X.; LI, H.; WANG, J.; HU, Z. Artificial miRNA inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase increases fatty acid production in a green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, p. 1-11, 2017.

WARTHMAN, N.; CHEN, H.; OSSOWSKI, S.; WEIGEL, D.; HERVÉ, P. Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice. **PLoS One**, v. 3, e1829, 2008.

WEI, J.; ZHENG, Y.; FENG, H.; QU, H.; FAN, X.; YAMAJI, N.; MA, J. F.; XU, G. *OsNRT2.4* encodes a dual-affinity nitrate transporter and functions in nitrate-regulated root growth and nitrate distribution in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, p. 1095-1107, 2018.

WEN, Z. & KAISER, B. N. Unraveling the functional role of NPF6 transporters. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-8, 2018.

WINRHIZO *ARABIDOPSIS*. **Régent Instruments**, Quebec, Canadá Inc., 2012 (b).

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. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, p. 317-331, 2014.

- XUAN, W.; BEECKMAN, T.; XU, G. Plant nitrogen nutrition: sensing and signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 39, p. 57-65, 2017.
- YAN, M.; FAN, X.; FENG, H.; MILLER, A. J.; SHEN, Q.; XU, G. Rice OsNAR2.1 interacts with OsNRT2.1, OsNRT2.2 and OsNRT2.3a nitrate transporters to provide uptake over high and low concentration ranges. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, p. 1360-1372, 2011.
- YANAGISAWA, S. Transcription factors involved in controlling the expression of nitrate reductase genes in higher plants. **Plant Science**, v. 229, p. 167-171, 2014.
- YAO, M.; AI, T.-B.; MAO, Q.; CHEN, F.; LI, F.-S.; TANG, L. Downregulation of *OsAGO17* by artificial microRNA causes pollen abortion resulting in the reduction of grain yield in rice. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 35, p. 25-32, 2018.
- YEMM, E. W. & COCKING, E. C. The determination of amino-acid with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.
- YEMM, E. W. & WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, p. 508-514, 1954.
- YUAN, S.; ZHANG, Z.-W.; ZHENG, C.; ZHAO, Z.-Y.; WANG, Y.; FENG, L.-Y.; NIU, G.; WANG, C.-Q.; WANG, J.-H.; FENG, H.; XU, F.; BAO, F.; HU, Y.; CAO, Y.; MA, L.; WANG, H.; KONG, D.-D.; XIAO, W.; LIN, H.-H.; HE, Y. *Arabidopsis* cryptochrome 1 functions in nitrogen regulation of flowering. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, p. 7661-7666, 2016.
- ZHANG, H. & FORDE, B. An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. **Science**, v. 279, p. 407-409, 1998.
- ZHANG, H. & FORDE B. G. Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 51-59, 2000.
- ZHANG, N.; ZHANG, D.; CHEN, S. L.; GONG, B.-Q.; GUO, Y.; XU, L.; ZHANG, X.-N.; LI, J.-F. Engineering artificial microRNAs for multiplex gene silencing and simplified transgenic screen. **Plant Physiology**, v. 178, p. 989-1001, 2018.
- ZHENG, D.; HAN, X.; AN, Y. I.; GUO, H.; XIA, X.; YIN, W. The nitrate transporter NRT2.1 functions in the ethylene response to nitrate deficiency in *Arabidopsis*. **Plant, Cell & Environment**, v. 36, p. 1328-1337, 2013.
- ZHU, J.; INGRAM, P. A.; BENFEY, P. N.; ELICH, T. From lab to field, new approaches to phenotyping root system architecture. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, p. 310-317, 2011.

8 ANEXOS

8.1 Composição dos Meios de Cultivo Utilizados para Transformação de Arroz de acordo com os Protocolos de Toki et al. (2006) e Sahoo et al. (2011) Modificados

1-Meio de Indução de Calos - N6D – 500 mL

- 50 mL N6 Macro (10X)
- 5 mL N6 Micro (100X)
- 10 mL Fe-EDTA (100X)
- 5mL de N6-vitaminas (100X)
- 0,050 g Mio-inositol
- 10 mL de 2,4D a 100 mg L^{-1}
- 0,15 g Casaminoácidos
- 1,439 g Prolina
- 15 g Sacarose
- Ajustar pH para 5,8 com KOH 1M
- Avolumar para 500 mL com H₂O destilada
- 2 g de gelrite
- Autoclavar a 121 °C por 15min

Obs.: A estocagem pode ser feita a 25 °C no escuro, por não mais que 5 dias.

2-Meio de Co- Cultivo de Calos - N6D-As – 500 mL

- 50 mL N6 Macro (10X)
- 5 mL N6 Micro (100X)
- 5 mL Fe-EDTA (100X)
- 5 mL de N6-vitaminas (100X)
- 0,050 g Mio-inositol
- 10 mL de 2,4D a 100 mg L^{-1}
- 0,15 g Casaminoácidos
- 15 g Sacarose
- 5 g Glicose
- Ajustar pH para 5,2 com KOH 1M
- Avolumar para 500 mL com H₂O destilada
- 2 g de gelrite
- Autoclavar a 121 °C por 15 minutos
- Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar 0,75 mL de acetoseringona a $19,2 \text{ mg mL}^{-1}$ (conc. final de $28,8 \text{ mg L}^{-1}$).

Obs.: A estocagem pode ser feita a 25 °C no escuro, por não mais que 5 dias.

3-Meio AB para o Cultivo de *Agrobacterium* -200 mL

- 1 g Glicose
- 3 g Bacto-Agar
- 10 mL de Sais AB (20X)
- 10 mL de Tampão AB (20X)
- Avolumar para 200 mL com H₂O destilada

- Autoclavar a 121 °C por 15 min
- Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar os antibióticos referentes à construção gênica e verter 40 mL de meio por placa.

Obs.: As placas podem ser armazenadas na geladeira a 4 °C por não mais que 5 dias.

4-Meio AAM para Ressuspensão da *Agrobacterium* – 200 mL

- 10 mL AA Macro (20X)
- 2 mL Fe-EDTA - Sigma (100X)
- 2 mL B5 Micro (100X)
- 2 mL B5-vitaminas (100X)
- 20 mL de AA aminoácidos (10X)
- 0,1 g Casaminoácidos
- 13,7 g Sacarose
- 7,2 g Glicose
- Ajustar pH para 5,2 com KOH 1M
- Avolumar para 200 mL com H₂O destilada
- Autoclavar a 121 °C por 15 min
- Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar 0,3 mL de acetoseringona a 19,2 mg mL⁻¹ (conc. final de 28.8 mg L⁻¹).

5-Meio de Seleção dos Calos - N6DH- 500 mL

- 50 mL N6 Macro (10X)
- 5 mL N6 Micro (100X)
- 5 mL Fe-EDTA (100X)
- 5 mL de N6-vitaminas (100X)
- 0,050 g Mio-inositol
- 10 mL de 2,4D a 100 mg L⁻¹
- 0,15 g Casaminoácidos
- 1,439 g Prolina
- 15 g Sacarose
- Ajustar pH para 5,8 com KOH 1M
- Avolumar para 500 mL com H₂O destilada
- 2 g de gelrite
- Autoclavar a 121 °C por 15min
- Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar 0,5 mL de Higromicina 1000X (conc. final de 50 mg L⁻¹), 100mg de timentim (conc. final 200 mg L⁻¹).

Obs.: A estocagem pode ser feita a 25 °C no escuro, por não mais que 5 dias.

6-Meio de Regeneração de parte aérea (RE-III) – 500 mL

- 50 mL de MS Macro (10X)
- 5 mL Fe-EDTA (100X)
- 0,5 mL MS Micro (1000X)
- 5 mL de MS vitaminas modificado
- 1,0 g Casaminoácidos
- 15g Sacarose
- 15 g Sorbitol
- Ajustar pH para 5,8 com KOH

- Avolumar para 500 mL com H₂O destilada
- 2 g gelrite
- Autoclavar 121 °C por 15 min
- Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar 0,5 mL de cinetina 1000X (conc. final de 2 mg L⁻¹), 0,5 mL de ANA 1000X (conc. final de 0,02 mg L⁻¹), 0,5 mL de Higromicina 1000X (conc. final de 50 mg L⁻¹).

Obs.: A estocagem pode ser feita a 25 °C no escuro, por não mais que 5 dias.

7-Meio de Regeneração de raiz (HF) – 500 mL

- 50 mL de MS Macro (10X)
- 5 mL Fe-EDTA (100X)
- 0,5 mL MS Micro (1000X)
- 5 mL de MS vitaminas modificado
- 15g Sacarose
- Ajustar pH para 5,8 com KOH
- Avolumar para 500 mL com H₂O destilada
- 2g de gelrite
- Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar 0,5 mL de Higromicina 1000X (conc. final de 50 mg L⁻¹).

Obs.: A estocagem pode ser feita a 25 °C no escuro, por não mais que 5 dias.