

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA -
CIÊNCIA DO SOLO**

TESE

**Caracterização Funcional do Transportador de Nitrato
OsNPF4.11 (OsNRT1.2) e seus Efeitos sobre a Eficiência de
uso de Nitrogênio na Variedade de Arroz Nipponbare**

Leilson Novaes Arruda

2018



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

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO TRANSPORTADOR DE
NITRATO *OsNPF4.11* (*OsNRT1.2*) E SEUS EFEITOS SOBRE A
EFICIÊNCIA DE USO DE NITROGÊNIO NA VARIEDADE DE
ARROZ NIPPONBARE**

LEILSON NOVAES ARRUDA

Sob a Orientação da Professora

Sonia Regina de Souza

e Co-orientação do Professor

Carlos Alberto Bucher

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor** 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

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

A773c

Arruda, Leilson Novaes, 1986-

Caracterização Funcional do Transportador de Nitrato OsNPF4.11 (OsNRT1.2) e seus Efeitos sobre a Eficiência de uso de Nitrogênio na Variedade de Arroz Nipponbare / Leilson Novaes Arruda. - 2018.

80 f.: il.

Orientadora: Sonia Regina de Souza.

Coorientador: Carlos Alberto Bucher.

Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, 2018.

1. EUN. 2. Nutrição nitrogenada. 3. Oryza sativa L. .
I. Souza, Sonia Regina de, 1962-, orient. II. Bucher, Carlos Alberto, 1981-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo. IV. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, 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**

LEILSON NOVAES ARRUDA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciências do Solo.

TESE APROVADA EM 28/02/2018.

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

Manlio Silvestre Fernandes. Ph.D. UFRRJ

Luiz Mors Cabral. Dr. UFF

Fabíola de Sampaio Rodrigues Grazinoli Garrido. Dr. UFRRJ

Gilberto Sachetto Martins. Dr. UFRJ

DEDICATÓRIA

A Deus e a Nossa Senhora pelo amor incondicional, pelo dom da vida, por todas as oportunidades que me foram dadas e por conduzirem meus caminhos.

Aos meus pais Lenilson Cardoso Arruda e Josileia Novaes Arruda pelo esforço feito para que eu pudesse alcançar meus objetivos, pelo amor que me foi dado e por sempre me apoiarem em minhas decisões.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo;

A minha Orientadora Sonia Regina de Souza pela amizade, por ter me acolhido e orientado, pelos ensinamentos, conselhos e apoio na condução das pesquisas;

Ao meu Co-orientador Carlos Alberto Bucher pela amizade, orientação, ensinamentos, conselhos e apoio na condução das pesquisas;

Ao professor Leandro Azevedo Santos pela amizade, orientação, ensinamentos, conselhos e apoio na condução das pesquisas;

Ao professor Manlio Silvestre Fernandes pelos ensinamentos e por todo apoio que me foi dado;

A minha esposa Jennifer Villanova pelo amor, carinho, companheirismo que sempre me foi dado e pela paciência nos momentos de dificuldade;

A todos os meus amigos do laboratório de Nutrição Mineral de Plantas: Renan Braga, Leandro Martins, Rafael Rangel, Andressa Fabiane, Erinaldo Gomes, Juan Sebastian, Marcus Sperandio, Sabrina Dahamer, Erika Fernandes, Cassia Coelho, Marcela Jacques, Natalia Frasson, Orlando Tavares, Osmário Araújo, Vinicius Miranda, Luiziene Soares, Helder, Danilo e Mariam Stark pela amizade e pelo apoio na realização dos trabalhos;

Aos bolsistas de iniciação e estagiários Pedro Miller, Rayana Rocha, Bernardo, Caio, Laura, Aline Garcia e Thainá Fernandes pela amizade e pelo apoio na execução dos trabalhos;

A todos os funcionários do Departamento de solos pelos serviços prestados;

Ao CPGA-CS pela coordenação, apoio e atenção;

Ao CNPq e a FAPERJ pelo fomento;

A todos que de certa forma colaboraram para que este trabalho pudesse ser realizado.

BIOGRAFIA

Leilson Novaes Arruda nasceu na cidade de Araruama – RJ, em 19 de março de 1986. Concluiu o ensino médio no CIEP 258 Astrogildo Pereira – RJ em 2003. Iniciou o curso de graduação em Agronomia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em 2007, diplomando-se em 2012. Durante a graduação foi monitor das disciplinas Estatística Básica e Introdução a Estatística durante três semestres e posteriormente bolsista de Iniciação Científica por 18 meses no Laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal do Instituto de Biologia e por 1 ano no Centro Integrado de Manejo de Pragas estudando tolerância do tomateiro a *Neoleucinodes Elegantalís* sob a orientação dos professores Mauricio Ballesteiro Pereira e Elen de Lima Aguiar-Menezes. Em fevereiro de 2007 recebeu o título de Mestre em Agronomia – Ciências do Solo, pela UFRRJ, sob a orientação da Professora Sonia Regina de Souza. No mesmo ano ingressou no Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo pela UFRRJ, orientação da Professora Sonia Regina de Souza

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Primers utilizados para amplificação dos genes OsNRT1.2e OsNAR2.1, reconstrução dos sítios de recombinação attB1 e attB2 11
- Tabela 2.** Sequências dos primers forward e reverse usados nas reações de PCR em tempo real para os genes de três transportadores de nitrato de alta afinidade (OsNRT2.1 a 2.3), dois transportadores de nitrato de baixa afinidade (OsNRT1.1,1.2 e 1.5, OsNPF2.4 e 7.2), proteína NAR (OsNAR2.1 e 2.2) e os genes controle Actina (OsAct1), Ubquitina 5(OsUBQ5), Ubquitina 10 (OsUBQ10), β -Tubulina (Os β -TUB), Fator de alongamento (OsEF1 α) e Ubquitina (UBC), de arroz e números de acesso no banco de dados do Rice Genome Annotation Project(RGAP)..... 16
- Tabela 3.** Resumos dos testes realizados utilizando os métodos de transformação de TOKI et al. (2006) e Sahoo et al. (2011) com adaptações para a transformação da variedade de arroz Piauí. 22
- Tabela 4.** Produtividade, índice de esterilidade da espiguetta (IEE), número de perfilhos (N° perfilhos), altura do maior perfilho (Altura MP), massa fresca da parte aérea (MF Parte Aérea) e massa fresca da panícula (MF Panícula) das linhagens transformadas silenciando (L#63 e L#41) e superexpressando (Ox3 e Ox8) o transportador de NO₃⁻ OsNPF4.11 cultivadas em casa de vegetação sob dois tratamentos: 0 Kg N/ha (Sem adubação) e 100 Kg N/ha (Com adubação). 61
- Tabela 5.** Eficiência na absorção de N (EAbN), eficiência na utilização de N (EUtN) e eficiência no uso de N (EUN) das linhagens transformadas silenciando (L#63 e L#41) e superexpressando (Ox3 e Ox8) o transportador de NO₃⁻ OsNPF4.11 cultivadas em casa de vegetação adubadas com 100 Kg N/ha (tratamento com adubação)..... 64

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Sistemas de absorção de NO_3^- (NRT: Nitrate transporter) de alta (NRT2) e baixa afinidade (NRT1) em arroz *Oryza sativa* L. cHATS (constitutivos); e iHATS (induzíveis). Adaptado de: Souza e Fernandes (2006)..... 3
- Figura 2.** Esquema do experimento utilizando as linhagens silenciando o transportador de N-NO_3^- OsNPF4.11, cultivadas seis dias sob suprimento normal de N (2 mM N-NO_3^-) e em seguida passando seis dias sob baixo suprimento de N (0,2 mM N-NO_3^-). Todas as plantas foram coletadas no 18° DAG seis horas após a troca de solução nutritiva. DAG: dias após germinação, FI: força iônica..... 15
- Figura 3.** Esquema do primeiro experimento utilizando as linhagens superexpressando o transportador de N-NO_3^- OsNPF4.11, cultivadas seis dias sob suprimento normal de N (2 mM N-NO_3^-) e em seguida passando seis dias sob baixo suprimento de N (0,2 mM N-NO_3^-). Todas as plantas foram coletadas no 18° DAG seis horas após a troca de solução nutritiva. DAG: dias após germinação, FI: força iônica. 17
- Figura 4.** Esquema do experimento para avaliação da expressão gênica dos transportadores de nitrato, parâmetros radiculares e frações solúveis em plantas de arroz cultivadas sob dois níveis de N-NO_3^- . DAG: dias após germinação, FI: força iônica. Baixo suprimento de N (0,2 mM N-NO_3^-), Suprimento normal de N (2 mM N-NO_3^-). 18
- Figura 5.** Esquema utilizado no teste 6 para transformação da variedade de arroz Piauí. Fostestado a indução dos calos no claro e no escuro, os meios AAM e MRA para a ressuspensão da bactéria, os meios de seleção N6DH e MSM e os meios de regeneração de parte aérea V e VI e VII. 23
- Figura 6.** Transformação das plantas de arroz da variedade Nipponbare. A: calos embriogênicos da região do escutelo de sementes de arroz da variedade Nipponbare germinadas em meio contendo 2,4-D. B: calos embriogênicos da região do escutelo de sementes de arroz da variedade Nipponbare em processo de regeneração da parte aérea em meio contendo Citocinina e ANA. C e D: calos embriogênicos da região do escutelo de sementes de arroz da variedade Nipponbare em processo de regeneração de raiz. E: plantas de arroz da variedade Nipponbare totalmente regeneradas sendo cultivadas em casa de vegetação para a obtenção das sementes. 24
- Figura 7.** Estabilidade média da expressão dos controles endógenos OsbTUB, OsACT, OsUBQ10, OsUBQ5, OsEF1 α e OsUBC, nas folhas e raízes das plantas WT e das linhagens silenciando e superexpressando o transportador de NO_3^- OsNPF4.11. 25
- Figura 8.** Expressão gênica relativa do transportador de nitrato OSNPF4.11 em raízes (A) e folhas (B) das plantas WT e das linhagens transformadas L#63, L#41, L#47 e L#70, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de N-NO_3^- por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. As barras indicam o erro padrão da média 26
- Figura 9.** Expressão gênica relativa dos transportadores de nitrato em raízes e folhas das plantas WT e das linhagens transformadas L#63 e L#41, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de N-NO_3^- por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis 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..... 27

- Figura 10.** Expressão gênica relativa dos transportadores de nitrato em raízes e folhas das plantas WT e das linhagens transformadas L#63 e L#41, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis 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..... 29
- Figura 11.** Expressão gênica relativa das proteínas acessórias OsNAR2.1 e OsNAR2.2, e das enzimas da via de assimilação de nitrato OsNIA1 e OsGS2 em raízes e folhas das plantas WT e das linhagens transformadas L#63 e L#41, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis 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..... 31
- Figura 12.** Teores de nitrato ($N-NO_3^-$) e amônio ($N-NH_4^+$) na folhas, bainhas e raízes das plantas WT e das linhagens transformadas L#63 e L#41, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis 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..... 33
- Figura 13.** Conteúdo de nitrato ($N-NO_3^-$) nas folhas, bainhas e raízes das plantas WT e das linhagens transformadas L#63 e L#41, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis 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..... 34
- Figura 14.** Teores de N-amino e porcentagem de açúcares solúveis na folhas, bainhas e raízes das plantas WT e das linhagens transformadas L#63 e L#41, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis 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..... 35
- Figura 15.** Massa fresca de raiz e parte aérea, e relação raiz/parte aérea das plantas WT e das linhagens transformadas L#63, L#41 e L#70, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis 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..... 36
- Figura 16.** Parâmetros radiculares: comprimento, área de superfície, diâmetro médio, volume radicular, número de pontas e pontas por milímetro de raiz obtidos de raízes intactas, utilizando o software WinRizo Arabdopsis, das plantas WT e das linhagens transformadas L#63 e L#41, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis 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..... 37
- Figura 17.** Parâmetros radiculares: comprimento, área de superfície, volume radicular e número de pontas dentro das classes de diâmetro: de 0 a 1,50 mm, 1,50 a 3,50 mm e maior que 3,50 mm, obtidos de raízes intactas, utilizando o software WinRizo Arabdopsis, das plantas WT e das linhagens transformadas L#63 e L#41, cultivadas sob

suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis 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. 39

Figura 18. Expressão gênica relativa do transportador de nitrato OSNPF4.11 em raízes das plantas WT e das linhagens transformadas, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. As barras indicam o erro padrão da média..... 40

Figura 19. Massa fresca de raiz e parte aérea, e relação raiz/parte aérea das plantas WT e das linhagens transformadas, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis 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. 41

Figura 20. Teores de nitrato ($N-NO_3^-$) e amônio ($N-NH_4^+$) na folhas, bainhas e raízes das plantas WT e das linhagens transformadas, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis 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. 42

Figura 21. Teores de N-amino e porcentagem de açúcares solúveis na folhas, bainhas e raízes das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3, Ox4 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis 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 43

Figura 22. Parâmetros radiculares: comprimento, área de superfície, diâmetro médio, volume radicular, número de pontas e pontas por milímetro de raiz obtidos de raízes intactas, utilizando o software WinRizo Arabdopsis, das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3, Ox4 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis 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. 45

Figura 23. Parâmetros radiculares: comprimento, área de superfície, volume radicular e número de pontas dentro das classes de diâmetro: de 0 a 1,50 mm, 1,50 a 3,50 mm e maior que 3,50 mm, obtidos de raízes intactas, utilizando o software WinRizo Arabdopsis, das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3, Ox4 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis 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. 46

Figura 24. Análise de Western Blot a partir de proteínas extraídas das raízes das plantas WT e das linhagens transformadas superexpressando o transportador de NO_3^- OsNPF4.11. 47

Figura 25. Expressão gênica relativa dos transportadores de nitrato em raízes (A, C, E e G) e folhas (B, D, F e H) das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 ou 2mM de $N-NO_3^-$ por doze dias como única fonte de N, coletadas no 24° DAG após três 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. 48

- Figura 26.** Expressão gênica relativa dos transportadores de nitrato em raízes (A, C e E) e folhas (B, D e F) das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 ou 2mM de $N-NO_3^-$ por doze dias como única fonte de N, coletadas no 24° DAG após três horas da troca de solução nutritiva. As barras indicam o erro padrão da média. 50
- Figura 27.** Expressão gênica relativa das proteínas acessórias OsNR2.1 e OsNAR2.2, e da enzima de assimilação de NO_3^- OsNIA1 em raízes (A, C e E) e folhas (B, D e F) das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 ou 2mM de $N-NO_3^-$ por doze dias como única fonte de N, coletadas no 24° DAG após três horas da troca de solução nutritiva. As barras indicam o erro padrão da média. 51
- Figura 28.** Atividade das enzimas do metabolismo de N: GS, NADH-GOGAT e GDH aminação e desaminação, em raízes (A, C, E e G) e folhas (B, D, F e H) das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 ou 2mM de $N-NO_3^-$ por doze dias como única fonte de N, coletadas no 24° DAG após três 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. 53
- Figura 29.** Teores de $N-NO_3^-$ (A, C e E) e $N-NH_4^+$ (B, D e F) na folhas, bainhas e raízes das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 ou 2mM de $N-NO_3^-$ por doze dias como única fonte de N, coletadas no 24° DAG após três 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. 56
- Figura 30.** Conteúdo de $N-NO_3^-$ na folhas, bainhas e raízes das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 ou 2mM de $N-NO_3^-$ por doze dias como única fonte de N, coletadas no 24° DAG após três 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. 57
- Figura 31.** Teores de N-amino (A, C e E) e porcentagem de açúcares solúveis (B, D e F) na folhas, bainhas e raízes das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 ou 2mM de $N-NO_3^-$ por doze dias como única fonte de N, coletadas no 24° DAG após três 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. 59
- Figura 32.** Massa fresca de raiz e parte aérea, e relação raiz/parte aérea das plantas WT e das linhagens transformadas, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 ou 2mM de $N-NO_3^-$ por doze dias como única fonte de N, coletadas no 24° DAG após três 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. 60
- Figura 33.** Porcentagem de N-total (A, C e E), conteúdo de N (B, D e F), porcentagem de proteína nos grãos (G) e conteúdo de proteína nos grãos (H), das linhagens transformadas silenciando (L#63 e L#41) e superexpressando (Ox3 e Ox8) o transportador de NO_3^- OsNPF4.11 cultivadas em casa de vegetação sob dois tratamentos: 0 Kg N/ha (Sem adubação) e 100 Kg N/ha (Com adubação). 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. 63

LISTA DE SÍMBOLOS

AMT	Família de Genes para os Transportadores de NH_4^+
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
cDNA	DNA Complementar
CT	Ciclo Limite (Cycle Threshold)
DAG	Dia Após a Germinação
DEPC	Dietilpirocarbonato (Diethylpyrocarbonate)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
DO	Densidade Óptica
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (Ethylenediamine Tetraacetic Acid)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUN	Eficiência no Uso de Nitrogênio
FAD	Flavina Adenina Dinucleótido
FD	Ferredoxina
GOGAT	Glutamina Oxoglutarato Aminotransferase
GS	Glutamina Sintetase
HATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidade (<u>H</u> igh <u>A</u> ffinity <u>T</u> ransport System)
HCL	Ácido Clorídrico
K_M	Constante de Michaelis e Menten
LATS	Sistema de Transporte de Baixa Afinidade (<u>L</u> ow <u>A</u> ffinity <u>T</u> ransport System)
LiCl	Cloreto de Lítio
MoCo	Molibdênio – Cobalto
mRNA	RNA Mensageiro
N	Nitrogênio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotideo reduzida
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato reduzida
NaOAc	Acetato de Sódio
NAR	Proteína que se associa aos HATS (Nitrogen Assimilation Related)
NH_4^+	Amônio
NiR	Nitrito Redutase
NO_3^-	Nitrato
NR	Nitrato Redutase
NRT1	Família de Genes dos Transportadores de NO_3^- de Baixa Afinidade(Nitrate Transporter 1)
NRT2	Família de Genes dos Transportadores de NO_3^- de Alta Afinidade(Nitrate Transporter 2)
NTES	Tampão NaCl/Tris/EDTA/SDS
PCR	Reação em cadeia de Polimerase (Polimerase Chain Reaction)
RNA	Ácido Ribonucleico (Ribonucleic Acid)
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (Sodium Dodecyl Sulfate)
VCL_3	Cloreto de Vanádio III
V_{\max}	Velocidade Máxima de absorção

RESUMO

Arruda, Leilson Novaes. **Caracterização funcional do transportador de nitrato OsNPF4.11 (OsNRT1.2) e seus efeitos sobre a eficiência de uso de nitrogênio na variedade de arroz Nipponbare**. 2018. 80f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

O nitrogênio (N) é um dos elementos mais requeridos pelas plantas, sendo constituinte das principais moléculas dos sistemas biológicos. Portanto, grandes quantidades são aplicadas no solo com o intuito de maximizar a produtividade. Entretanto até 70% do N aplicado pode ser perdido por diferentes processos. Assim, Reduzir as quantidades de fertilizantes nitrogenados e encontrar variedades com maior eficiência no uso de nitrogênio (EUN) são os principais objetivos atualmente da nutrição de plantas. Dentre as estratégias para aumentar a eficiência de uso de N foi proposto no presente trabalho silenciar e superexpressar o transportador de nitrato OsNPF4.11 em arroz da variedade Nipponbare. Para tal fim após a obtenção das linhagens transformadas foram realizados três experimentos em fitotrôn e um em casa de vegetação. As linhagens silenciando o OsNPF4.11 apresentam uma menor expressão dos transportadores de alta afinidade na raiz, porém nas folhas o oposto foi observado, onde as linhagens transformadas apresentaram maiores valores de expressão em relação as plantas WT. A superexpressão do OsNPF4.11 também afetou a expressão dos transportadores de alta afinidade, onde na raiz (tato em alta como baixa disponibilidade de NO_3^-) e nas folhas (sob baixa disponibilidade) as plantas transformadas apresentaram uma redução na expressão dos mesmos. Tanto a redução quanto o aumento nos níveis de expressão do OsNPF4.11 afetou negativamente a absorção de NO_3^- , assim como o transporte do mesmo da raiz para a parte aérea acarretando em plantas menores e com uma menor biomassa total. Além da absorção, as alterações na expressão do OsNPF4.11 também afetaram a remobilização do N para os grãos, acarretando um maior número de espiguetas estéreis e uma menor produção, e assim uma menor EUN.

Palavras chave: EUN. Nutrição nitrogenada. *Oryza sativa L.*

ABSTRACT

Arruda, Leilson Novaes. **Functional characterization of the nitrate transporter OsNPF4.11 (OsNRT1.2) and its effects on nitrogen use efficiency in Nipponbare rice variety**. 2018. 80p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Nitrogen (N) is one the most required elements by plants, being constituent of the main molecules of biological systems. Therefore, large quantities are applied to the soil in order to maximize productivity. However up to 70% of the applied N can be lost by different processes. Reducing Nitrogen fertilizer input and finding varieties with a high nitrogen use efficiency (NUE) are the main goals of plant nutrition. Among the strategies to increase NUE, was proposed in this work the knockdown and over expression of OsNPF4.11 nitrate transporter in Nipponbare rice variety. For this purpose, after obtaining the transgenic lines were carried out three experiments in growth chamber and one in a greenhouse. In the root of knockdown plants, the high affinity nitrate transporters were down regulated, but in the leaves the opposite was observed, in the transgenic plants high affinity nitrate transporters were up regulated. Over expression of OsNPF4.11 also affected the expression of high affinity nitrate transporters. In the root (both low and high nitrate availability) and in the leaves (under low nitrate availability) high affinity nitrate transporters were down regulated. Both the reduction and the increase in the expression levels of OsNPF4.11 negatively affected the nitrate uptake, as well as the root to shoots transport, resulting in short plants with a lower total biomass. In addition to the absorption, changes in the OsNPF4.11 expression also affected the N remobilization to the grains, resulting in a greater number of sterile spikelets and a lower yield, and thus a lower EUN.

Key words: Nitrogen nutrition. NUE. *Oryza sativa* L.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Absorção de NO ₃ ⁻	3
2.2 Redução e Assimilação do NO ₃ ⁻	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Produção do Material Vegetal	10
3.2 Extração de DNA e RNA	10
3.3 Síntese de cDNA	11
3.4 Superexpressão do Gene OsNRT1.2 (OsNPF4.11)	11
3.4.1 Amplificação do gene de interesse	11
3.4.2 Purificação do gene com os sítios de recombinação	11
3.4.3 Reação BP recombinação entre os sítios attB do gene e attP do vetor pDONR221 para a obtenção do vetor de entrada	11
3.4.4 Reação LR: recombinação entre os vetores de entrada e o vetor de destino	12
3.5 Construção do Cassete de Expressão para Silenciamento do Gene OsNPF4.11	12
3.6 Preparo de Células Competentes para Eletroporação (DH5α)	12
3.7 Meio YEB para Cultivo de Agrobacterium tumefaciens	13
3.8 Preparo de Agrobacterium tumefaciens Competente	13
3.9 Transformação de Agrobacterium tumefaciens	13
3.10 Transformação de Arroz da variedade Piauí Mediada por Agrobacterium tumefaciens	13
3.11 Transformação de Arroz da variedade Nipponbare Mediada por Agrobacterium tumefaciens	14
3.12 Análise das Linhagens Transformadas Silenciando o Transportador OsNPF4.11	14
3.12.1 Extração de DNA e RNA	15
3.12.2 Síntese de cDNA	15
3.12.3 Reações de PCR em tempo real	15
3.12.4 Análise das frações nitrogenadas e açúcares solúveis	17
3.12.5 Análise dos parâmetros radiculares	17
3.13 Primeiro Experimento Utilizando as Linhagens Transformadas Superexpressando o Transportador OsNPF4.11	17
3.13.1 Extração de DNA e RNA	17
3.13.2 Síntese de cDNA	17
3.13.3 Reações de PCR em tempo real	18
3.13.4 Análise das frações nitrogenadas e açúcares solúveis	18
3.13.5 Análise dos parâmetros radiculares	18

3.14 Segundo Experimento Utilizando as Linhagens Transformadas Superexpressando o Transportador OsNPF4.11	18
3.14.1 Extração de DNA e RNA.....	18
3.14.2 Síntese de cDNA.....	19
3.14.3 Reações de PCR em tempo real.....	19
3.14.4 Análise das frações nitrogenadas e açúcares solúveis	19
3.14.5 Extração de proteína para a análise da atividade de enzimas do metabolismo de N	19
3.14.6 Atividade da Glutamina Sintetase.....	19
3.14.7 Atividade da Glutamato Sintase (NADH-GOGAT)	19
3.14.8 Determinação da atividade da Glutamato Desidrogenase (GDH) aminação e desaminação.....	19
3.14.9 Extração de proteína para a análise de Western Blot.....	20
3.14.10 Análise de Western Blot	20
3.15 Experimento em Casa de Vegetação para Análise de EUN.....	20
3.16 Análise Estatística	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Transformação de Arroz da variedade Piauí Mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	22
4.2 Transformação de Arroz da variedade Nipponbare Mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
4.3 Análise das Linhagens Transformadas Silenciando o Transportador OsNPF4.11	24
4.3.1 Seleção do controle endógeno mais estável para as análises de qRT-PCR.	24
4.3.2 Confirmação das linhagens de arroz silenciando o gene OsNPF4.11 por RT-qPCR.....	25
4.3.3 Análise da expressão de genes transportadores de NO ₃ ⁻	26
4.3.4 Análise das frações nitrogenadas e açúcares solúveis	32
4.3.5 Análise dos parâmetros morfológicos.....	36
4.3.6 Análise dos parâmetros radiculares usando o software WinRizo Arabdopsis.....	36
4.4 Primeiro Experimento com Linhagens Transformadas Superexpressando o Transportador OsNPF4.11	40
4.4.1 Confirmação das linhagens de arroz superexpressando o gene OsNPF4.11 por RT-qPCR.....	40
4.4.2 Análise dos parâmetros morfológicos.....	40
4.4.3 Análise das frações nitrogenadas e açúcares solúveis	41
4.4.4 Análise dos parâmetros radiculares usando o software WinRizo Arabdopsis.....	44
4.5 Segundo Experimento Utilizando as Linhagens Transformadas Superexpressando o Transportador OsNPF4.11	47
4.5.1 Análise de Western Blot	47
4.5.2 Análise da expressão de genes transportadores de NO ₃ ⁻	47
4.5.3 Análise de enzimas do metabolismo de nitrogênio.....	52

4.5.4	Análise das frações nitrogenadas e açúcares solúveis	54
4.5.5	Análise dos parâmetros morfológicos.....	59
4.6	Experimento em Casa de Vegetação	60
4.6.1	Análise dos parâmetros morfológicos.....	60
4.6.2	Análise de N-total e eficiência no uso de N.....	61
5	CONCLUSÕES.....	66
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
7	ANEXO.....	75

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado a base alimentar da população mundial, sendo a principal fonte de energia para mais da metade da população do planeta (Borém e Rangel, 2015). É um dos cereais de maior importância no mundo, principalmente nos países em desenvolvimento devido ao fornecimento de carboidratos e proteínas importantes na dieta alimentar da população, constituindo o alimento básico para aproximadamente 2,4 bilhões de pessoas (Cancellier et al., 2011; Fidelis et al., 2011), além de ser uma planta modelo para diversos estudos (Shi et al., 2010).

O Brasil ocupa hoje a nona posição no ranking mundial de países produtores de arroz, com uma produção de 12,3 milhões de toneladas na safra de 2016/17 e uma produtividade média de 6230 Kg.ha⁻¹ (Conab, 2017), destacando-se como o maior produtor fora do continente asiático (Borém e Rangel, 2015).

Devido ao consumo crescente nos últimos anos e a importância do arroz na dieta humana técnicas mais adequadas devem ser empregadas no seu cultivo com o intuito de melhorar a qualidade e aumentar a sua produção de forma sustentável (Cancellier et al., 2011; Fidelis et al., 2011).

Uma boa disponibilidade de N para plantas de arroz aumenta a área foliar, com consequente aumento na interceptação da radiação solar, aumentando a taxa fotossintética, influenciando diretamente no número de perfilhos, número de panículas, enchimento dos grãos, e produtividade (Cancellier et al., 2011; Fidelis et al., 2011).

O nitrogênio (N) é um dos nutrientes de maior demanda para as plantas, com participação em quase todos os processos biológicos (Kong et al., 2013). Aproximadamente 80% da atmosfera é constituída de N, porém esse N se encontra em uma forma muito estável (N₂) indisponível para as plantas. Alguns microrganismos são capazes de fixar esse N atmosférico na forma de NH₄⁺, que pode ser absorvido pelas plantas (Maathuis, 2009).

No solo a maior parte do N (acima de 98%) se encontra na matéria orgânica, a qual está indisponível para as plantas. Apenas uma pequena fração se encontra na forma inorgânica, disponível para as plantas (Dechorgnat et al., 2011). A forma inorgânica em que o N se encontra no solo depende das condições ambientais. Em condições aeradas, o nitrato (NO₃⁻) é a maior fonte de N, porém em sistema de arroz inundado a difusão de oxigênio pelas raízes, devido a tecidos especializados denominados aerênquimas que facilitam essa difusão, ocorre o processo de nitrificação em sua rizosfera e com isso ocorre a absorção de NO₃⁻ pelas plantas de arroz mesmo nestas condições, tendo um significativo efeito positivo no desenvolvimento do vegetal (Kirk e Kronzucker, 2005).

Já em condições de anaerobiose o NH₄⁺ é a principal forma de N disponível no solo (Funayama et al., 2013), porém quando absorvido em grandes quantidades, o NH₄⁺ pode se tornar tóxico para as plantas (Britto et al., 2001), tendo esse nutriente a absorção e o metabolismo altamente regulado nas plantas (Sonoda et al., 2003).

Devido à grande demanda de N para o crescimento vegetal (1~2% da massa seca) grandes quantidades são aplicadas ao solo com o intuito de maximizar a produção. Entretanto, até 70% do N aplicado pode ser perdido para a atmosfera ou por lixiviação para o lençol freático, lagos e rios, causando sérios problemas ambientais (Shi et al., 2010; Masclaux-Daubresse et al., 2010), não sendo recuperado pelas plantas. Deste modo, reduzir a quantidade de fertilizante aplicado e encontrar plantas com maior eficiência no uso de nitrogênio (EUN) é um dos principais objetivos da nutrição de plantas.

Como contextualizado, a agricultura moderna, apesar de produtiva, destaca-se pelo uso intensivo de fertilizantes nitrogenados os quais podem trazer sérios danos ambientais além de

ser um dos principais gastos na produção. Assim, espera-se com esse estudo identificar a contribuição do transportador de NO_3^- *OsNTR1.2* (*OsNPF4.11*) para o sistema de alta e baixa afinidade de absorção de nitrato e caracterizar o seu papel nos mecanismos de adaptação de plantas a ambientes de baixa disponibilidade de nitrogênio. Esses conhecimentos poderão ser utilizados para a obtenção de cultivares mais produtivas e com menor uso de adubos nitrogenados, minimizando assim os custos de produção e problemas ambientais.

Este trabalho teve como objetivo verificar como o transportador *OsNPF4.11* contribui para a absorção de nitrato no sistema de alta e baixa afinidade de arroz da variedade Nipponbare, caracterizando sua participação para a adaptação de plantas a ambientes sob baixa disponibilidade de nitrogênio, assim como avaliar se a superexpressão do gene *OsNPF4.11* pode melhorar a habilidade das plantas em absorver N-NO_3^- em condições de baixo e alto suprimento e verificar se o silenciamento do *OsNPF4.11* influencia na habilidade das plantas em absorver N-NO_3^- em condições de baixo e alto suprimento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Absorção de NO_3^-

A absorção de NO_3^- pelas raízes é realizada por proteínas pertencentes à família multigênica *NRT1* e *NRT2*, e a redução do NO_3^- e a síntese de aminoácidos são realizadas por três principais enzimas: nitrato redutase (NR), nitrito redutase (NIR) e glutamina sintetase (GS) (Castaings et al., 2011).

Os transportadores de NO_3^- podem ser constitutivos ou induzidos pela presença de seu substrato NO_3^- , e são classificados em dois sistemas de transporte de acordo com a sua afinidade pelo substrato: sistema de transporte de alta afinidade (HATS – High Affinity Transport System) e sistema de transporte de baixa afinidade (LATS - Low Affinity Transport System) (Cerezo et al., 2001).

Os sistemas de transporte de NO_3^- são constituídos de duas principais famílias de transportadores, *NRT1* e *NRT2*. Os membros da família *NRT1* participam do LATS e os membros da família *NRT2* participam do HATS. O LATS atua em concentrações externas geralmente superiores a 1mM de NO_3^- enquanto o HATS pode atuar numa ampla faixa de concentração (Cerezo et al., 2001) (Figura 1).

Recentes estudos têm demonstrado que os membros da família *NRT1* podem também transportar solutos com distintas funções fisiológicas, tais como hormônios (ácido abscísico (ABA) e auxina (IAA), glucosinolatos, peptídeos e aminoácidos (von Wittgenstein et al., 2014; Léran et al., 2014). Devido a isso, Léran et al. (2014) propuseram uma nomenclatura unificada dos transportadores da família *NRT1*, no qual os mesmos foram divididos em oito subfamílias NPF1 a NPF8 (*NRT1* *PTRFAMILY*). Da mesma forma von Wittgenstein et al. (2014) propuseram uma separação filogenética dos transportadores da família *NRT1* em 10 supergrupos (de A a J) os quais compartilham funções comuns.

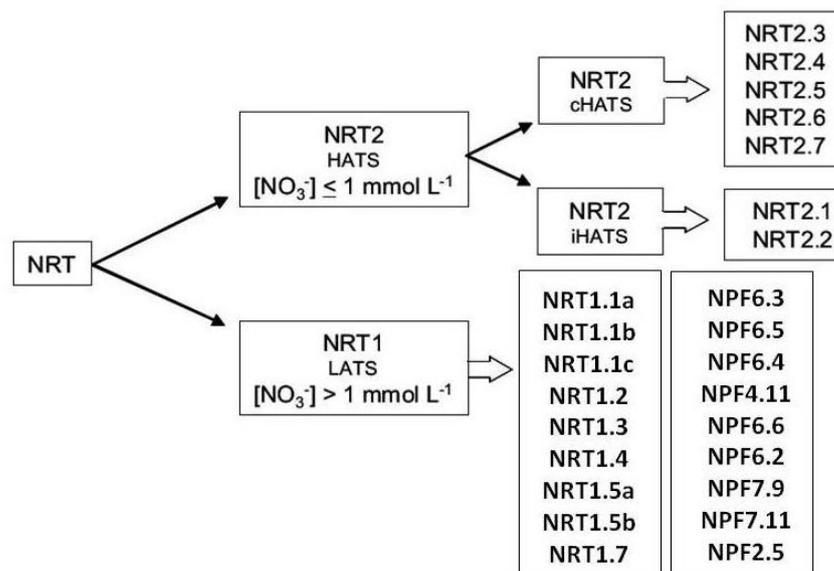


Figura 1. Sistemas de absorção de NO_3^- (NRT: Nitrate transporter) de alta (NRT2) e baixa afinidade (NRT1) em arroz *Oryza sativa* L. cHATS (constitutivos); e iHATS (induzíveis). Adaptado de: Souza e Fernandes (2006).

Nos últimos anos, vários estudos com transportadores de N tem sido realizados com o intuito de identificar genes que podem ter um importante papel na absorção de N e contribuir para a eficiência no uso de nitrogênio (EUN), e esses estudos demonstraram que os transportadores de alta afinidade (HATS) tem um papel fundamental na eficiência de absorção sob baixa disponibilidade de N (Kiba e Krapp, 2016).

Expresso na epiderme, córtex e endoderme das células das partes maduras da raiz, o transportador *NRT2.1* está localizado na membrana plasmática e é um dos principais componentes do sistema HATS de plantas *Arabidopsis*, principalmente em baixas concentrações de nitrato. Um segundo gene da família *NRT2*, o *NRT2.2* tem sua localização no cromossomo I próximo ao *NRT2.1* em *Arabidopsis*, porém tem apenas uma pequena participação no HATS, exceto na perda do *NRT2.1* (Dechorgnat et al., 2011). Em *Arabidopsis thaliana* mutantes com a perda da função dos genes *AtNRT2.1* e *AtNRT2.2*, e assim, a interrupção simultânea desses transportadores resultou numa redução de até 80% no transporte de alta afinidade induzido por NO_3^- (IHATS) e de até 30% no transporte de alta afinidade constitutivo (CHATS) (Li et al., 2007) demonstrando a importância desses transportadores para o transporte de alta afinidade.

Em arroz, outro integrante do HATS, o *OsNRT2.3* produz dois diferentes transcritos em função de um splicing alternativo: *OsNRT2.3a* e *OsNRT2.3b* (Feng et al., 2011). Em plantas de arroz, o nocaute da expressão do *OsNRT2.3a* por RNA interferente impediu o carregamento de NO_3^- no xilema e reduziu o crescimento da planta em baixo suprimento de NO_3^- (0,5 mM), porém comprando com as plantas tipo selvagem a absorção de NO_3^- pelas raízes não foi afetada (Tang et al., 2012). Já em linhagens superexpressando o *OsNRT2.3b* sob o controle do promotor do gene da Ubiquitina, em condições de campo, houve um aumento na produção de grãos em aproximadamente 35 a 54%, e na EUN em até 80%, porém o mesmo não foi observado para as linhagens superexpressando o *OsNRT2.3a* nas mesmas condições (Fan et al., 2016).

Outro membro da família *NRT2*, o *OsNRT2.4*, em arroz, é expresso tanto nas raízes quanto na parte aérea, sendo expresso principalmente na base lateral das raízes primordiais e nas folhas, mas também foi detectada a sua expressão nas flores (Feng et al., 2011). Feng et al., 2011 observaram que ao cultivar plantas de arroz com auxina sintética NAA houve um aumento da expressão do *OsNRT2.4*, e que o contrário aconteceu com um inibidor do transporte de auxina NPA, o que sugere que esse gene pode ter uma importante função para o desenvolvimento da raiz lateral, assim como pode estar envolvido na sinalização de auxina. Plantas de arroz cultivadas com baixo suprimento de NO_3^- (0,15 mM) apresentaram alto nível de transcritos do *OsNRT2.4* nas raízes quando comparadas com plantas que receberam um alto suprimento (5mM), assim como a redução no suprimento de NO_3^- (5mM para 0,15mM) resultou em grande indução na síntese de transcritos desse transportador, indicando um possível envolvimento na adaptação ao baixo suprimento com NO_3^- (Bucher et al., 2014).

Em coleóptilos de arroz cultivados com 0,2 mM NO_3^- , *OsNRT2.4* houve forte indução após o início do tratamento com NO_3^- , atingindo aumento de expressão de mais de 20 vezes, indicando um papel importante desse transportador na absorção de NO_3^- sob baixa concentração (Takayanagi et al., 2011).

A absorção do nitrato é regulada tanto em nível transcricional como pós transcricional. Os transportadores *CHL1* (*NRT1.1*), *NRT1.2*, *NRT2.1*, *NRT2.2* são regulados transcricionalmente pelo nitrato, nitrito, amônio, glutamina, fonte de N, luz, sacarose, ritmo circadiano e pH. E a existência de uma forte correlação entre a abundância de transcritos desses genes e a atividade de absorção de nitrato sugere que a regulação transcricional representa um papel importante na modulação da atividade de absorção desse íon (Wang et al., 2012c). Como exemplo, o transportador *NRT2.1* tem sua expressão induzida pela baixa

disponibilidade ou pela ausência de N, e é reprimido em altas concentrações de N em uma via envolvendo o transportador *NRT1.1* (Kraiser et al., 2010).

Alguns transportadores da família *NRT2* requerem uma associação com a proteína NAR2 para o transporte de nitrato em faixas de concentração relativamente baixas. *OsNAR2.1* é expressa principalmente em células epidérmicas da raiz e tem sua expressão induzida por NO_3^- e reprimida por NH_4^+ (Feng et al., 2010). Liu et al (2015) analisando a região promotora do *OsNAR2.1* verificaram que a região entre -129pb a -1pb é necessária para uma ativação completa induzida por nitrato do *OsNAR2.1*, e que um fragmento de 20pb entre -191 pb a -172bp contém elementos-cis essenciais para aumentar a resposta do *OsNAR2.1* ao nitrato, onde este fragmento possui sequências conservadas entre vários promotores dos genes NAR2 em plantas superiores, e uma alta similaridade com elementos responsivos a NO_3^- (NRE).

Foi verificado que essa proteína interage com *NRT2.1*, *NRT2.2* e *NRT2.3a*, não só com a proteína, mas também com o RNA mensageiro (mRNA), e apresenta um papel importante na absorção de NO_3^- a baixas e altas concentrações (Xu et al., 2012). Recentemente Kotur et al. (2015) verificaram que em raízes de *Arabidopsis* o *AtNRT2.5* interage com a proteína *AtNAR2.1* formando, nas membranas, um complexo polipeptídico oligomérico de aproximadamente 150 kDa, o qual é um dos principais participantes do cHATS, e que tem um papel crítico na indução dos iHATS em plantas com deficiência de N.

Análise de expressão identificou que os transcritos de *AtNAR2.1* são modulados principalmente pela quantidade de N na planta (Guo et al., 2011). Em raízes de *Arabidopsis* os polipeptídeos de *NRT2.1* e *NAR2.1* interagem diretamente na membrana plasmática para constituir um oligômero que pode ser uma unidade funcional para um influxo de alta afinidade de NO_3^- (Yong et al., 2010). Em *Arabidopsis* o transportador de NO_3^- *AtNRT2.1* não é corretamente endereçado à membrana plasmática, sendo as *AtNAR2s* indispensáveis para o endereçamento dos *NRT2s* à membrana plasmática, indicando que as proteínas NAR2 não funcionam como transportadores, mas sim representando um papel facilitador para o endereçamento de alguns *NRT2* à membrana plasmática (Guo et al., 2011).

Plantas de arroz superexpressando o transportador *OsNRT2.1* sob o controle do promotor da Ubiquitina (*pUbi:OsNRT2.1*) ou do promotor da proteína acessória *OsNAR2.1* (*pOsNAR2.1:OsNRT2.1*) exibiram um aumento na produção de biomassa de até 38% comparado com plantas tipo selvagem. Porém as plantas *pUbi:OsNRT2.1* apresentaram reduções na produção de grãos de até 18,4%, na eficiência agrônômica no uso de N (de até 22%) e na eficiência fisiológica no uso de N (de até 71%), e um aumento na eficiência de recuperação N (de até 115%) (Chen et al., 2016). O contrário ocorreu para as plantas *pOsNAR2.1:OsNRT2.1* que apresentaram um aumento em todos os parâmetros acima mencionados comparados com as plantas tipo selvagem, indicando a importância da associação dessa proteína aos transportadores de alta afinidade para o transporte de NO_3^- sob baixa disponibilidade (Chen et al., 2016).

Outra proteína da família NAR2, *OsNAR2.2* é expressa principalmente sob baixa disponibilidade de NO_3^- . Bucher et al. (2014) observaram uma indução desse gene quando as plantas de arroz passaram de uma solução com 5 mM para uma com 0,15 mM de NO_3^- . Cai et al. (2008) observaram em plantas de arroz da variedade Nipponbare um aumento de expressão 0,5 h após o ressurgimento com 0,2 mM ou 2mM de NO_3^- , após as plantas passarem 5 dias em uma solução sem N. Da mesma forma Arruda (2014) observou uma maior expressão (de até 15 vezes) quando plantas de arroz de quatro variedades diferentes foram cultivadas constantemente com 0,2 mM de NO_3^- em comparação de quando foram cultivadas com 2 mM de NO_3^- .

Ao contrário da *OsNAR2.1*, a qual foi fortemente expressa nas raízes e teve uma fraca expressão na parte aérea, *OsNAR2.2* foi expressa constitutivamente tanto nas raízes quanto na parte aérea de plantas de arroz cultivadas com 200 μM de KNO_3 após um período de privação

de N, pré-tratadas ou não com 500 μM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por 20h (Araki e Hasegawa, 2006). Da mesma forma plantas de arroz da variedade Dongjin cultivadas sobre condições limitantes de N (0,072 mM de NH_4NO_3) apresentaram maiores níveis de expressão (aproximadamente o dobro) nas bainhas foliares comparadas com o tratamento controle (1,44 mM de NH_4NO_3) (Yang et al., 2015). Juntos esses resultados sugerem que ao contrário do *OsNAR2.1* que é um gene expresso principalmente nas raízes, o *OsNAR2.2* é expressa tanto nas raízes quanto na parte aérea. Ao contrário do que foi observado para a *OsNAR2.1*, para *OsNAR2.2* não foi constatado qualquer interação entre ela e os transportadores de alta afinidade *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNRT2.3a* (Feng et al., 2011).

Ao menos 80 genes pertencentes a família NPF são encontrados no genoma do arroz (Huang et al., 2018), onde o *OsNPF4.1* (SP1) apresentou um papel importante no alongamento das panículas em arroz (Li et al., 2009) e o *OsNPF8.20* (*OsPTR9*) apresentou um papel importante na absorção de NH_4^+ , formação das raízes laterais e no aumento da produção (Fang et al., 2013), porém seus substratos ainda permanecem desconhecidos.

Recentemente foi demonstrado que *OsNPF2.4* e *OsNPF2.2* estão envolvidos no transporte de longa distância de NO_3^- da raiz para a parte aérea (Xia et al., 2015; Li et al., 2015). Nocaute do *OsNPF2.4* reduziu a concentração de NO_3^- na seiva do xilema e a produção em plantas de arroz (Xia et al., 2015). *OsNPF2.2* é principalmente expresso células do parênquima ao redor do xilema, e plantas mutantes com o nocaute do *OsNPF2.2* apresentaram altos níveis de NO_3^- na raiz e redução no crescimento e desenvolvimento (Li et al., 2015).

Localizado na membrana do tonoplasto, *OsNPF7.2* é um transportador de NO_3^- de baixa afinidade, expresso principalmente nas zonas de alongamento e maturação da raiz, especialmente esclerênquima, córtex e estelo e tem um papel fundamental na alocação intracelular do NO_3^- nas raízes (Hu et al., 2016).

A maioria dos membros da família NPF caracterizados até agora são transportadores de baixa afinidade (HATs), com exceção do *OsNPF6.5* (*NRT1.1b*), o qual foi caracterizado como transportador de dupla afinidade (Hu et al., 2015). *OsNPF6.5* é um produto de um splicing alternativo do *OsNPF8.9* (*OsNRT1.1a*) (Huang et al., 2018), o qual é um transportador de NO_3^- de baixa afinidade e é constitutivamente expresso na maior parte das camadas externas da raiz, epiderme e pelos radiculares (Lin et al., 2000).

Em *Arabidopsis* o *AtNRT1.1* (*AtNPF6.3*) é um transportador de nitrato de dupla afinidade expresso no córtex, epiderme e endoderme da raiz, e está envolvido não só no sistema de alta como baixa afinidade. A regulação da atividade de transporte do *AtNPF6.3* ocorre pela fosforilação do resíduo de aminoácido treonina 101 (Thr101) regulada pela proteína kinase CIPK23 (*calcineurin B-like-interacting protein kinase*) (Wang et al., 2012c). Quando o resíduo Thr101 se encontra fosforilado o *AtNPF6.3* funciona como um transportador de alta afinidade (HATS), e quando desfosforilado o *AtNPF6.3* funciona como um transportador de baixa afinidade (LATS) (Kraiser et al., 2010).

O *AtNPF6.3* também está envolvido nos processos de sinalização os quais conduzem a mudanças no desenvolvimento das raízes, funciona como um sensor de nitrato para ativar a expressão de genes relacionados ao metabolismo do íon, mudança na germinação de sementes, facilita o transporte de auxina em uma via reprimida pelo nitrato e também reprime o crescimento de raízes laterais em baixa disponibilidade de nitrato (Dechorgnat et al., 2011).

Outro membro do sistema de baixa afinidade (LATS) com um distinto modelo de expressão é o *NRT1.2* (*AtNPF4.6*), onde em *Arabidopsis* não foi constatada sua expressão em todas as regiões da célula, tecidos ou órgãos, sendo apenas expresso especificamente nos pelos radiculares e na epiderme das pontas e regiões maduras da raiz, apresentando um K_M para o NO_3^- em torno de 6 mM em ovócito (Huang et al., 1999). Ao contrário da expressão induzida pelo nitrato do *AtNPF6.3*, o RNA mensageiro do *AtNPF4.6* acumula mesmo na

ausência de nitrato, demonstrando ser um componente constitutivo do LATS (Dechorgnat et al., 2011).

Kanno et al. (2012) identificaram que em *Arabidopsis thaliana* o *AtNPF4.6* está envolvido no transporte de ABA, onde foi denominado AIT1 (*transportador importador de ABA*), tendo um K_M pelo ABA de aproximadamente $5\mu\text{M}$, sendo importante para o fechamento estomático nas hastes das inflorescências. O AIT1 foi localizado principalmente na membrana plasmática e pode estar envolvido no carregamento/descarregamento de ABA nos vasos do xilema/floema (Kanno et al., 2012). Porém foi demonstrado que não há uma competição entre ABA e NO_3^- como substrato para o *AtNPF4.6*, e as reais funções desse transportador no transporte de ABA ainda continuam desconhecidas (Kanno et al., 2015)

Entretanto, em arroz, esse transportador ainda não foi caracterizado e a suas funções no transporte de nitrato e/ou hormônios permanecem desconhecidas.

2.2 Redução e Assimilação do NO_3^-

Após absorvido pelo sistema radicular o nitrato pode ser armazenado no vacúolo das células radiculares, reduzido e assimilado nas raízes, ou enviado para a parte aérea, onde poderá ser reduzido e assimilado ou acumulado no vacúolo (Souza e Fernandes, 2006).

A redução do nitrato ocorre em duas etapas, inicialmente o NO_3^- é reduzido a nitrito (NO_2^-), no citosol, pela ação da enzima nitrato redutase (NR) (Xu et al., 2012). A atividade da NR pode ocorrer no citoplasma tanto das raízes como das folhas, sendo de uma forma geral mais alta nas folhas, e é regulada principalmente pelo NO_3^- , luz e CO_2 . Quando em condições de escuro ou baixa concentração de CO_2 a NR se torna inativa, isso se dá devido a uma fosforilação realizada por proteínas quinases em um resíduo de serina localizado entre as subunidades prostéticas MoCo e FAD (Souza e Fernandes, 2006).

Em plantas de tabaco (*Nicotiana Plumbaginifolia*) a superexpressão da enzima NR sob o controle do promotor CaMV35S, a qual acarretou em aumento de até 154% na atividade da enzima em comparação com as plantas tipo selvagem, resultou num decréscimo de até 47% no conteúdo de NO_3^- nas folhas das plantas transformadas e um aumento no conteúdo de aminoácidos (causado principalmente pelo aumento, de até 133%, no conteúdo de glutamina comparado com as plantas tipo selvagem), porém nenhuma diferença foi observada no conteúdo total de N e na produção total de biomassa, assim como nada foi mencionado a respeito da NUE (Quilleré et al., 1994). Feil et al. (1993) analisando diferentes cultivares de milho encontrou correlações positivas entre a atividade da NR e produção de grãos, biomassa e absorção de N. E em plantas de arroz, a variedade Piauí, a qual é cultivada tradicionalmente sob baixo uso de insumos no Estado do Maranhão, apresentou uma maior atividade da NR quando cultivada sob baixa disponibilidade de NO_3^- (0,2 mM) comparada com a variedade melhorada IAC-47, assim como parâmetros cinéticos mais favoráveis a essa condição (alto $V_{\text{máx}}$ e baixo K_M), indicando uma maior adaptação dessa variedade a essa condição (Santos et al., 2011). Dessa forma podemos ver que a NR pode desempenhar um papel importante no aumento da NUE nos vegetais.

O NO_2^- produzido pela NR é então reduzido a amônio (NH_4^+), pela ação da enzima nitrito redutase (NiR). A reação ocorre por meio da transferência de seis elétrons da molécula de Ferredoxina reduzida (Fd_{red}) para o NO_3^- . A NiR é encontrada nos cloroplastos na parte aérea ou nos plastídios das células radiculares (Souza e Fernandes, 2006). A superexpressão da NiR em plantas de *N. Plumbaginifolia* e *A. thaliana*, sob o controle do promotor CaMV35S, embora tenha resultado em aumento na atividade da enzima, nenhuma diferença no fenótipo foi observada entre as plantas transformadas e a plantas tipo selvagem (Crété et al., 1997).

O amônio proveniente da redução do nitrato pela ação sequencial das enzimas nitrato redutase e nitrito redutase, ou diretamente absorvido por transportadores específicos (AMTs) presentes na membrana plasmática, é assimilado em aminoácidos por meio da via GS/GOGAT (Xu et al., 2012). A primeira etapa na assimilação do amônio é realizada por meio de uma reação dependente de adenosina trifosfato (ATP), catalisada pela enzima glutamina sintetase (GS). A enzima GS incorpora o NH_4^+ produzindo glutamina, e isso se dá pela ligação do NH_4^+ ao grupo carboxílico de uma molécula de glutamato, usando a energia fornecida pelo ATP (Souza e Fernandes, 2006). Existem duas isoformas de GS: uma citossólica (GS1) e uma localizada no cloroplasto (GS2) (Chardonnet et al., 2012). Nas folhas a principal isoforma é a GS2 que é essencial para reassimilar o amônio liberado pela fotorrespiração, já a isoforma GS1 é pouco abundante, sendo mais expressa nos tecidos vasculares, no caso do arroz nas células companheiras do floema, e é importante para a síntese de glutamina, a qual é a principal forma de nitrogênio transportada pelo floema (Ishiyama et al., 2004). Nas raízes a GS1 facilita a assimilação do amônio absorvido do solo ou originário da fixação biológica (Ishiyama et al., 2004). A proporção relativa em que as isoformas GS1 e GS2 são encontradas no tecido vegetal é influenciada por diversos fatores, dentre eles estágio de desenvolvimento e condições ambientais, tal como a luz (Souza e Fernandes, 2006).

Em função de seu importante papel na assimilação do N inorgânico a GS tem sido amplamente estudada. Por exemplo, a superexpressão da GS2 em plantas de tabaco, sob o controle do promotor da subunidade pequena da rubisco, acarretou numa diminuição dos níveis de amônio nas folhas e um aumento no conteúdo de glutamina e glutamato, assim como um aumento na biomassa das plantas transformadas em comparação com as plantas tipo selvagem (Migge et al., 2000). Também em plantas de tabaco, a superexpressão da GS1 acarretou em um aumento de 70% na massa seca de parte aérea e de 100% na massa seca de raiz, assim como um aumento de 50% na área foliar das plantas transformadas comparadas com as plantas controle (vetor vazio) quando cultivadas por 8 dias sem N (Fuentes et al., 2001). Também foram observadas correlações positivas entre a atividade da GS e biomassa, e atividade da GS e proteína solúvel na folha (Oliveira et al., 2002). A superexpressão em plantas de trigo da GS1 de feijão (*Phaseolus vulgaris*) sob o controle do promotor da subunidade pequena da rubisco de arroz, resultou em um aumento no conteúdo de N total e biomassa nos grãos, assim como um da biomassa das raízes e da espiga (Habash et al., 2001).

Plantas mutantes de arroz exibindo um nocaute no gene *OsGS1.1* apresentaram uma redução na biomassa, nos níveis de glutamina e aminoácidos da família do aspartato, um aumento no conteúdo de NH_4^+ , uma superacumulação de açúcares (Kusano et al., 2011), e também uma redução no enchimento dos grãos (Tabuchi et al., 2005) quando cultivadas com NH_4^+ como única fonte de N. Porém a reintrodução do cDNA do *OsGS1.1* sob o controle do próprio promotor (reversão fenotípica), com sucesso complementou a perda de função do *OsGS1.1* (Tabuchi et al., 2005), indicando a importância dessa enzima para a assimilação do N.

A segunda etapa da assimilação do amônio é realizada pela enzima GOGAT, a qual transfere o grupo amino da glutamina para o 2-oxoglutarato (α -cetoglutarato), formando duas moléculas de glutamato (Ishiyama et al., 2004), uma irá regenerar o ciclo (via GS/GOGAT) e a outra pode ser usada nas reações biossintéticas (Souza e Fernandes, 2006). Existem duas isoformas da enzima GOGAT: uma dependente de NADH (NADH-GOGAT) e outra dependente de FADH (FADH-GOGAT) (Xu et al., 2012). A NADH-GOGAT é encontrada principalmente em tecidos não verdes, como por exemplo raízes, nódulos e cotilédones em desenvolvimento. Já a isoforma FADH-GOGAT é predominantemente encontrada nos cloroplastos, sendo a principal forma de glutamato sintase encontrada nas folhas verdes de arroz (Souza e Fernandes, 2006). Plantas de tabaco superexpressando uma NADH-GOGAT de alfafa (*Medicago sativa*) sob o controle do promotor CaMV35S apresentaram uma maior

massa seca de parte aérea, e um maior conteúdo de carbono e N na parte aérea comparadas com as plantas controle quando cultivadas com 7,5 mM de NO_3^- ou NH_4^+ (Chichkova et al., 2001). Enquanto que plantas mutantes de arroz com a perda da função do gene *OsNADH-GOGAT2* devido a uma inserção do retrotransposons Tos 17 na região codificante, apresentaram uma redução na massa seca de parte aérea (de até 39%), peso de panícula (até 47%), número de espiguetas por panícula (até 39%) e no número de grãos cheios (até 25%), acarretando numa perda de produção, quando cultivadas em condições de alagamento comparadas com as plantas tipo selvagem (Tamura et al., 2011). Resultados similares foram encontrados em plantas mutantes onde a perda da função do gene *OsNADH-GOGAT1* acarretou numa redução da biomassa total e da produção em condições de alagamento (Tamura et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Produção do Material Vegetal

As sementes de arroz da variedade Piauí foram desinfestadas em uma solução de hipoclorito a 2% por 20 minutos sob agitação e em seguida foram lavadas dez vezes com água destilada. Depois de desinfestadas, as sementes foram colocadas para germinar na superfície de uma lâmina d'água de um vaso de 700 mL, sustentadas por gaze. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12horas/12horas (luz/escuro), fluxo de fótons fotossintéticos de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, umidade relativa do ar de 70% e temperatura de 28°C/24°C (diurna/noturna).

Após o nono dia após a germinação (DAG), as plantas foram submetidas a uma solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) com 1/2 de força iônica (FI) contendo 0, 2 mM de N-NO_3^- até o décimo quarto DAG, onde foram coletadas para a extração de DNA e RNA.

3.2 Extração de DNA e RNA

A extração de DNA e de RNA foi realizada simultaneamente utilizando a metodologia proposta por Gao et al. (2001) com modificações. Amostras de raízes foram maceradas em N_2 líquido e homogeneizadas em uma mistura contendo 800 μL de tampão NTES (0,2 M Tris-Cl pH 8,0; 25 mM EDTA; 0,3 M NaCl; 2% SDS), 600 μL de solução fenol:clorofórmio (1:1) e agitadas por 5-10 minutos. Após centrifugação a 18.000xg por 20 minutos a 4°C o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O DNA e RNA foram precipitados pela adição de 1/10 volume de acetato de sódio 2 M pH 4,8 ($\text{NaOAc}_{\text{DEPC}}$) e 1 volume de isopropanol puro gelado. A seguir a mistura foi mantida a -80°C por 1 hora seguida de centrifugação a 18.000xg por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 μL de etanol_{DEPC} 70% gelado seguido de centrifugação a 18000xg por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi solubilizado em 500 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ e o RNA foi precipitado de forma seletiva pela adição de 500 μL de cloreto de lítio 4 M pH 4,8 ($\text{LiCl}_{\text{DEPC}}$). As amostras foram mantidas em gelo e na geladeira por uma noite e a seguir centrifugadas a 18.000xg por 20 minutos. O sobrenadante, contendo DNA, foi transferido para um novo tubo de 2 mL para a precipitação do DNA pela adição de 1/10 volume de acetato de sódio 2 M pH 4,8 ($\text{NaOAc}_{\text{DEPC}}$) e 1 volume de isopropanol puro gelado, armazenado a -80°C por uma noite, em seguida centrifugado a 18000xg por 20 minutos, e o precipitado foi dissolvido em 450 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$, 50 μL de $\text{NaOAc}_{\text{DEPC}}$ e 800 μL de etanol absoluto gelado, precipitado a -80 °C por 30 minutos e em seguida centrifugado a 18.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante (após precipitação do DNA e RNA) foi descartado e o precipitado lavado com 500 μL etanol 70% gelado e em seguida centrifugados a 18000xg por 10 minutos. O etanol fo iretirado com o auxílio de uma pipeta semi-automática para não desfazer o precipitado e os tubos mantidos abertos no gelo para a evaporação total de etanol por aproximadamente 10 minutos. O precipitado foi dissolvido em 40 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ e armazenados a - 80° C. A qualidade do DNA extraído foi verificada em espectrofotômetro por meio das relações A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} e visualização em gel de agarose (1%) com GelRed™ (Biotium).

3.3 Síntese de cDNA

Após a extração de RNA, procedeu a síntese de cDNA da seguinte forma: amostras de 0,5 µg de RNA total foram tratadas com DNase I (Sigma-Aldrich) seguindo as recomendações do fabricante. A síntese do cDNA (reação de transcrição reversa) foi realizada utilizando a enzima SuperScript® III Reverse Transcriptase (LifeTechnologies) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.4 Superexpressão do Gene *OsNRT1.2* (*OsNPF4.11*)

3.4.1 Amplificação do gene de interesse

O gene *OsNPF4.11* foi amplificado do cDNA da variedade Piauí, obtido de acordo com o item 6.3, utilizando a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Life Technologies). Para clonagem desse gene nos vetores para superexpressão em arroz, foi utilizado o sistema Gateway de clonagem (Invitrogen), que se baseia em reações de recombinação sítios específicos. A síntese do cDNA (transcrição reversa) foi realizada a partir do RNA total de raízes de plantas de arroz cultivadas em solução nutritiva, como descrito acima. A primeira reação de PCR foi realizada com primers híbridos que anelam no início e final do gene e leva a metade do sítio de recombinação. A segunda reação foi realizada com um segundo par de primers para a formação dos sítios de recombinação completos, attB1 e attB2 (Tabela 1).

Tabela 1. Primers utilizados para amplificação dos genes *OsNRT1.2* e *OsNAR2.1*, e construção dos sítios de recombinação attB1 e attB2

Gene	Primers	Sequência
Gene /	NPF4.11 attB1	5'- AAAAAGCAGGCTACATGGAGGACGGTGCGGCGGC-3'
½ attBs	NPF4.11 attB2	5'- AGAAAGCTGGGTATCCCTTGATGACCCCGGCGTT -3'

3.4.2 Purificação do gene com os sítios de recombinação

Depois de amplificado o gene com os sítios de recombinação é recomendada a purificação do produto amplificado para remoção do excesso de “*primers*” e dímeros de “*primers*”. Esses “*primers*” e seus dímeros podem recombinar eficientemente com o vetor doador na reação BP e aumentar o “*background*” depois da transformação em *E. coli*.

Foi utilizado o PEG 8000/MgCl₂ para purificação, que pode remover fragmentos de até 300 pb. A purificação foi feita com cerca de 90 µL de reação da PCR, para aumentar a quantidade de produto de PCR recuperado. Aos 90 µL do produto amplificado contendo os sítios attB foram adicionados 270 µL de Tris-HCl-EDTA (TE) pH 8,0 e 180 µL de PEG (8000) contendo MgCl₂ (30 mM). Esta mistura foi agitada em vórtex, e em seguida, centrifugada a 10.000g por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi então retirado cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta do lado oposto ao da formação do precipitado. O precipitado foi dissolvido em 16 µL de TE pH 8,0 e a qualidade do produto recuperado foi visualizada em gel de agarose (1%).

3.4.3 Reação BP recombinação entre os sítios attB do gene e attP do vetor pDONR221 para a obtenção do vetor de entrada

Após a amplificação dos genes com os sítios de recombinação attB, a sua inserção no vetor do sistema gateway é realizada através de uma reação de recombinação entre os sítios

attB que flanqueiam o gene e os sítios attP do vetor pDONR 221 (Invitrogen). Esta reação recebe o nome se "Reação BP". O mesmo procedimento será utilizado para a clonagem do promotor e do peptídeo de fusão ao gene. Neste trabalho foi utilizado o promotor do gene RCc3 que dirige a expressão específica na raiz. O gene foi fusionado ao "tag" de HA (3xHA) para posteriores análises da presença e níveis da proteína nos tecidos da planta. Estes três vetores, constituem os vetores de entrada (pENTR-RCc3; pENTR-NPF; pENTR-3xHA) para posterior montagem do cassete de expressão.

A reação BP foi realizada utilizando o kit "Gateway® BP Clonase II Enzyme Mix" (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, a reação BP foi utilizada para transformação de células competentes de *E. coli* (DH5 α), a fim de caracterizar os clones.

3.4.4 Reação LR: recombinação entre os vetores de entrada e o vetor de destino

Depois da obtenção de todos os vetores de entrada nas reações BP, é necessário o uso de um vetor de destino, ou seja, aquele que vai permitir a recombinação coordenada dos três vetores de entrada na reação de recombinação múltipla, também chamada de reação LR, pois envolve a recombinação entre sítios attL e attR entre os vetores doadores e o vetor de destino. O vetor de destino utilizado foi o pH7m34GW, que leva o agente de seleção das plantas transformadas, resistência a higromicina.

A reação de LR foi realizada utilizando o kit "Gateway LR Clonase II Plus Enzyme Mix" (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. A confirmação da clonagem foi feita por digestão dos plasmídios com enzimas de restrição.

3.5 Construção do Cassete de Expressão para Silenciamento do Gene *OsNPF4.11*

Foram construídos dois distintos microRNAs artificiais (amiRNA) específicos para o gene *OsNRT1.2*. Para tal, foi utilizada a plataforma WMD3 - Web MicroRNA Designer projetada pelo Dr. Weigel (Max Planck Institute for Developmental Plant Biology: <http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>). Como resultado a plataforma fornece *primers* contendo os amiRNAs. Esses *primers* foram utilizados em reações de PCR com o vetor pNW55 para substituição do osa-MIR528 presente nesse vetor pelo amiRNA desejado, mantendo a estrutura do anterior.

O produto de PCR foi digerido com as enzimas de restrição BanHI e KpNI e transferido para o vetor binário IRS154 onde o amiRNA ficará sob o controle do promotor da ubiquitina de milho (UBIL:amiRNA-*OsNPF*) e leva o gene da higromicina fosfotransferase (*hpt*) para resistência a higromicina.

3.6 Preparo de Células Competentes para Eletroporação (DH5 α)

O estoque de *E. coli* DH5 α foi riscado em meio LB sólido e incubado durante a noite a 37°C. Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB sólido e mantida sob agitação constante a 150 rpm durante a noite. No dia seguinte, 3 mL da cultura fresca foram inoculados em 300 mL de meio LB líquido acondicionado em erlenmeyer de 2 L e transferido para agitador orbital constante a 200 rpm a 37°C até a cultura atingir uma DO₆₀₀ entre 0,5 a 0,8. Depois de atingida a DO₆₀₀, alíquotas de 50 mL da solução de células foram acondicionadas em seis tubos falcon e mantidas em descanso no gelo por 30 min. Em seguida as células foram precipitadas a 4.000 x g. por 15 min. a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram cuidadosamente solubilizadas em 50 mL de água destilada estéril gelada, para retirada do excesso de sais. As células foram novamente precipitadas como descrito acima e solubilizadas em 25 mL de água destilada estéril gelada. As células foram então acondicionadas em três tubos falcon de 50 mL e novamente precipitadas como já descrito. O

precipitado de cada tubo foi solubilizado em 2 mL de glicerol (10%) gelado e as células transferidas para um único tubo. Finalmente, as células foram precipitadas e solubilizadas em 550 μL de glicerol (10%) gelado. A suspensão de células foi dividida em alíquotas de 50 μL , acondicionadas em microtubos de 1,5 mL e mantidas em freezer -80°C para uso posterior.

3.7 Meio YEB para Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

Para 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 MgSO_4 , pH 7,4. Para meios sólidos, foi adicionado agar (1,5%).

3.8 Preparo de *Agrobacterium tumefaciens* Competente

O estoque de *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) foi riscado em meio YEB sólido contendo Rifamicina (Rf) 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ e Gentamicina (Gm) 40 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, e incubado a 28°C por 24 horas. Com o auxílio de uma alça flambada apenas uma colônia isolada foi transferida para um tubo falcon de 50 mL contendo 3 mL 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 foi 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 150 rpm, até atingir uma DO_{600} de aproximadamente 0,6. A cultura foi então dividida em dois tubos falcon de 50mL e incubada no gelo por 20 minutos. A seguir, as células foram precipitadas a 1.000 x g. por 5 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado solubilizado em 500 μL de uma solução contendo CaCl_2 (20 mM) e glicerol (10%). As células foram divididas em alíquotas de 100 μL acondicionadas em microtubos estéreis de 1,5 mL e mantidas em freezer a -80°C para uso posterior.

3.9 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Serão estudadas as seguintes construções: RCc3:*OsNPF4.11.3:3xHAe UBIL:amiRNA-OsNPF4.11*. Depois de caracterizadas as construções estas foram inseridas em *Agrobacterium tumefaciens* estirpe LBA4404 com descrito a seguir.

Foi adicionado 1 μg de plasmídio a 100 μL de *Agrobacterium* competente, a mistura foi homogeneizada suavemente e incubada no gelo por 30 minutos. As células com o plasmídio foram congeladas em nitrogênio líquido por cinco minutos e em seguida incubada a 37°C em banho-Maria por mais cinco minutos. Após este tempo, foi adicionado 1mL de meio YEB, e as células mantidas a 28°C , com agitação constante a 150 rpm durante duas horas. A transformação (1mL) foi plaqueada em meio YEB sólido com os antibióticos correspondentes a construção (Sp/Sm) mais Rf-Rifamicina (100 $\mu\text{g/mL}$) e Gm-Gentamicina (40 $\mu\text{g/mL}$). Estes dois últimos antibióticos são referentes à resistência genômica e plasmidial da *Agrobacterium* LBA4404 armada. As placas foram incubadas a 28°C até o aparecimento de colônias (dois a três dias). A transformação foi confirmada por PCR de colônia.

3.10 Transformação de Arroz da variedade Piauí Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Para a transformação das plantas de arroz da variedade Piauí foram testados dois métodos de transformação de TOKI et al. (2006) e Sahoo et al. (2011) com adaptações.

As sementes de arroz foram descascadas e em seguida desinfestadas com 40 mL de etanol 70% e uma solução contendo 2,5% de hipoclorito e 0,05% de tween 20. Após a desinfestação as sementes foram colocadas em placas de petri contendo meio N6D durante 15 dias a 32°C com ou sem luz constante (5000 lux) para a produção dos calos

embriogênicos. Os calos com alta atividade de divisão foram inoculados com *Agrobacterium tumefaciens*, anteriormente ressuspensa em meio de ressuspensão, e então transferidos para placas contendo meio N6D-As recoberto por papel filtro umedecido com 0,5 mL de meio de ressuspensão, e assim permanecendo por três a sete dias a 25°C no escuro. Após esse período os calos foram lavados com água estéril e com uma solução contendo 200 mg.L⁻¹ de Timentim para matar a *Agrobacterium*, transferidos para um meio de seleção e incubados por 32°C por duas semanas. Os calos resistentes com alta atividade de divisão foram transferidos para o meio de regeneração de parte aérea, e incubados a 28°C.

3.11 Transformação de Arroz da variedade Nipponbare Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Para transformação de plantas de arroz foi utilizado o método de transformação de TOKI et al. (2006) com adaptações.

As sementes de arroz foram descascadas e em seguida desinfestadas com 40 mL de etanol 70% e uma solução contendo 2,5% de hipoclorito e 0,05% de tween 20. Após a desinfestação as sementes foram colocadas em placas de petri contendo meio N6D durante 15 dias a 32°C com luz constante (5000 lux) para a produção dos calos embriogênicos. Os calos com alta atividade de divisão foram inoculados com *Agrobacterium tumefaciens*, anteriormente ressuspensa em meio de ressuspensão, e então transferidos para placas contendo meio N6D-As recoberto por papel filtro umedecido com 0,5 mL de meio de ressuspensão, e assim permanecendo por três dias a 25°C no escuro. Após esse período os calos foram lavados com água estéril e com uma solução contendo 200 mg.L⁻¹ de Timentim para matar a *Agrobacterium*, transferidos para um meio de seleção e incubados por 32°C por duas semanas. Os calos resistentes com alta atividade de divisão foram transferidos para o meio de regeneração de parte aérea, e incubados a 28°C até o aparecimento das primeiras plântulas (2 a 3 semanas). Logo após a formação das plântulas, as mesmas foram transferidas para o meio de indução de raízes. Após a regeneração das raízes e parte aérea as plantas foram colocadas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12horas/12horas (luz/escuro), fluxo de fótons fotossintéticos de 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, umidade relativa do ar de 70% e temperatura de 28°C/24°C (diurna/noturna), para aclimação por um período de 1 a 2 semanas. Após esse período as plantas foram levadas para casa de vegetação para obtenção das sementes. A composição dos meios utilizados encontra-se detalhada no anexo I.

Todas as linhagens transgênicas de arroz obtidas passarão por avaliação visando identificar aquelas com apenas uma cópia do gene. Uma análise de segregação será feita para estimar o número de inserções (espera-se que linhagens com apenas uma cópia do gene apresente segregação 3:1 na geração T2). Para confirmação, uma análise de PCR em tempo real será também realizada.

As plantas que sofrem o procedimento de transformação são chamadas de T0, as sementes destas plantas dão origem as diferentes linhagens chamadas de T1, e as sementes das linhagens T1 dão origem à geração T2 onde já é possível observar a segregação. Com o cultivo das sementes das plantas da geração T2 separadamente já é possível identificar quem é heme ou homozigota na geração T3. Para as análises serão escolhidas apenas as linhagens com uma única cópia do gene, porém com diferentes níveis de expressão do gene em estudo.

3.12 Análise das Linhagens Transformadas Silenciando o Transportador *OsNPF4.11*

Após a obtenção das sementes das linhagens transformadas, as linhagens transgênicas foram cultivadas em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12h/12h (luz/escuro), fluxo de fótons fotossintéticos de 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, umidade relativa do ar de 70% e temperatura de 28°C/24°C (diurna/noturna).

As sementes foram germinadas na superfície de uma lâmina d'água de um vaso de 700 mL, sustentadas por gaze. No sexto dia após a germinação (DAG), as plantas foram submetidas a uma solução de Hoagland & Arnom (1950) com 1/2 de força iônica contendo 2mM de N-NO_3^- por seis dias. No 12° DAG as plantas foram submetidas a uma nova solução com 1/2 de força iônica contendo 0,2 mM de N-NO_3^- assim permanecendo até o 18° DAG. No 18° DAG, seis horas após a troca de solução, todas as plantas foram coletadas (Figura 2).

Após coletadas as plantas foram pesadas e o peso fresco da parte aérea e raiz, assim como a relação raiz/parte aérea foram obtidos. Amostras de raízes foram coletadas e armazenadas a -80°C para as análises de expressão gênica do transportadores de NO_3^- . Amostra de raízes e parte aérea foram coletadas, armazenadas em etanol 80% para posterior extração da fração solúvel e determinação dos teores de metabólitos solúveis. Raízes intactas das plantas WT e das linhagens transformadas foram coletadas para análise dos parâmetros radiculares utilizando o software WinRizo Arabdopsis (2012).

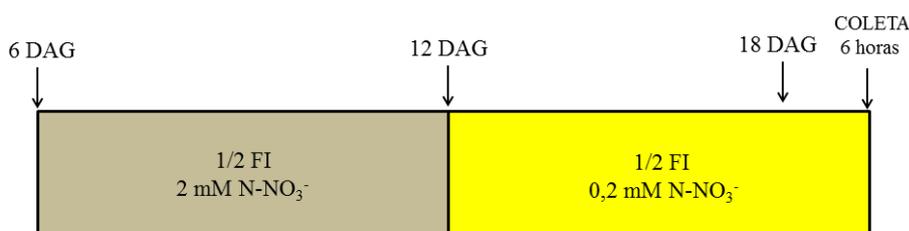


Figura 2. Esquema do experimento utilizando as linhagens silenciando o transportador de N-NO_3^- *OsNPF4.11*, cultivadas seis dias sob suprimento normal de N (2 mM N-NO_3^-) e em seguida passando seis dias sob baixo suprimento de N (0,2 mM N-NO_3^-). Todas as plantas foram coletadas no 18° DAG seis horas após a troca de solução nutritiva. DAG: dias após germinação, FI: força iônica.

3.12.2 Extração de DNA e RNA

A extração de DNA e RNA foi feita como descrito no item 3.2.

3.12.3 Síntese de cDNA

Amostras de 0,5 μg de RNA total foram tratadas com DNase I (Sigma-Aldrich) seguindo as recomendações do fabricante e a síntese de cDNA realizada com o kit “*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits*” (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.12.4 Reações de PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, de acordo com as recomendações do fabricante: 2 μL da mistura de *primers forward+reverse* (0,12 μM cada); 2 μL de 5x *HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX)* (Solis Biodyne) e 2 μL da reação de síntese de cDNA diluída 1:10. A mistura foi agitada por 1 minuto em agitador de placas, centrifugada a 4000 rpm por 3 minutos e levada para o aparelho de PCR em tempo real “*Step One Plus Real Time PCR System*” (Applied Biosystems). Os primers para os genes estudados que codificam os transportadores de nitrato foram desenhados utilizando-se o programa *Primer Express2.0* (Applied Biosystems) (Tabela 1).

Foi realizada uma análise preliminar por meio do software geNorm-V3.5 (Vandesompele et al., 2002) par a escolha do controle endógeno mais adequado para normalização da expressão gênica. Os controles endógenos utilizados encontram-se na Tabela 1. A expressão gênica foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Tabela 2. Sequências dos *primers forward* e *reverse* usados nas reações de PCR em tempo real para os genes de três transportadores de nitrato de alta afinidade (*OsNRT2.1* a *2.3*), dois transportadores de nitrato de baixa afinidade (*OsNRT1.1,1.2* e *1.5*, *OsNPF2.4* e *7.2*), proteína NAR (*OsNAR2.1* e *2.2*) e os genes controle Actina (*OsAct1*), Ubiquitina 5 (*OsUBQ5*), Ubiquitina 10 (*OsUBQ10*), β -Tubulina (*OsTUB*), Fator de alongamento (*OsEF1 α*) e Ubiquitina (UBC), de arroz e números de acesso no banco de dados do Rice Genome Annotation Project(RGAP).

Gene	Nº acesso	Forward primer	Reverse primer
<i>OsNRT2.1</i>	LOC_Os02g02190	5'-CGCCGCAACGTCATCAA-3'	5'-GCGTGTATCATCGAGTCGAACT-3'
<i>OsNRT2.2</i>	LOC_Os02g02170	5'-CGCCGCAACGTCATCAA-3'	5'-AAACGGTAACAAAACGTTCAACAG-3'
<i>OsNRT2.3</i>	LOC_Os01g50820	5'-ACGGAGACCGGGATCAAGTA-3'	5'-CCCCTGCGGGGAAGTAGATG-3'
<i>OsNAR2.1</i>	LOC_Os02g38230	5'-AAGACGCAGGTGTTCTCTCC-3'	5'-ACTTCACCGTGCTTGGGC-3'
<i>OsNAR2.2</i>	LOC_Os04g40410	5'-ACGATCATGGCTCGGTTTG-3'	5'-CAAGCACCGAGAACTACAAGGA-3'
<i>OsNRT1.1(OsNPF6.4)</i>	LOC_Os03g01290	5'-CGAGGTTGGTGCATTTTGTG-3'	5'-GCCGTGGTGTCTCTTTTTTTT-3'
<i>OsNRT1.2(OsNPF4.11)</i>	LOC_Os06g38294	5'-CAATCTGTAATGCAGGGTAACTGTT-3'	5'-AGCATCCTCAAGACCACCAA-3'
<i>OsNRT1.5</i>	LOC_Os02g46460	5'-ACGCGACTGTTACTGACCAC-3'	5'-CAGTCGGCAATGCACAGAAG-3'
<i>OsNPF2.4</i>	LOC_Os03g48180	5'-TAGGATTAAGTGGGTGAGG-3'	5'-GTCAAACAGCAAGTAGCG-3'
<i>OsNPF7.2</i>	LOC_Os02g47090	5'-AAGACACTGACCTCTTCGGC-3'	5'-CGCCGCGTTTCTTATCCTTG-3'
<i>OsTUB</i>	LOC_Os01g59150	5'-GCTGACCACACCTAGCTTTGG-3'	5'-AGGGAACCTTAGGCAGCATGT-3'
<i>OsUBQ10</i>	LOC_Os02g06640	5'-TGGTCAGTAATCAGCCAGTTTGG-3'	5'-GCACCACAAATACTTGACGAACAG-3'
<i>OsUBC</i>	LOC_Os02g42314	5'-CCGTTTGTAGAGCCATAATTGCA-3'	5'-AGGTTGCCTGAGTCACAGTTAAGT-3'
<i>OsEF1α</i>	LOC_Os03g08020	5'-CTCTTGGTCGTTTTGCCGTG-3'	5'-TGCAGATATGGAAAGCACCCT-3'
<i>OsACT1</i>	LOC_Os03g50885	5'-CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA-3'	5'-CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA-3'
<i>OsUBC5</i>	LOC_Os01g22490	5'-ACCACTTCGACCGCCACTACT-3'	5'-ACGCCTAAGCCTGCTGGTT-3'

3.12.5 Análise das frações nitrogenadas e açúcares solúveis

Amostras de material coletado foram homogeneizadas em etanol 80%, trituradas e filtradas com a auxílio de papel filtro e gaze, e após partição com clorofórmio (Fernandes, 1984) a fração solúvel obtida foi utilizada para a determinação dos teores de N-amino livre (Yemm & Cocking, 1955), $N-NO_3^-$ (Miranda et al., 2001), $N-NH_4^+$ (Felker, 1977) e açúcares solúveis (Yemm & Willis, 1957).

3.12.6 Análise dos parâmetros radiculares

Para as análises dos parâmetros radiculares as raízes serão escaneadas e as imagens serão analisadas utilizando o *software WinRizo Arabdopsis* (2012). Serão obtidos os seguintes parâmetros: número de bifurcações, número de pontas, diâmetro médio, área de superfície e volume.

3.13 Primeiro Experimento Utilizando as Linhagens Transformadas Superexpressando o Transportador *OsNPF4.11*

Após a obtenção das sementes das linhagens transformadas (como descrito no item 6.14), as linhagens transgênicas superexpressando o transportador de nitrato *OsNPF4.11* foram cultivadas como descrito no item 3.11.

Após coletadas as plantas foram pesadas e o peso fresco da parte aérea e raiz, assim como a relação raiz/parte aérea foram obtidos. Amostras de raízes foram coletadas e armazenadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para as análises de expressão gênica do transportador de nitrato *OsNPF4.11*. Amostra de raízes e parte aérea foram coletadas, armazenadas em etanol 80% para posterior extração da fração solúvel e determinação dos teores de metabólitos solúveis. Raízes intactas das plantas WT e das linhagens transformadas foram coletadas para análise dos parâmetros radiculares utilizando o software *WinRizo Arabdopsis* (2012).

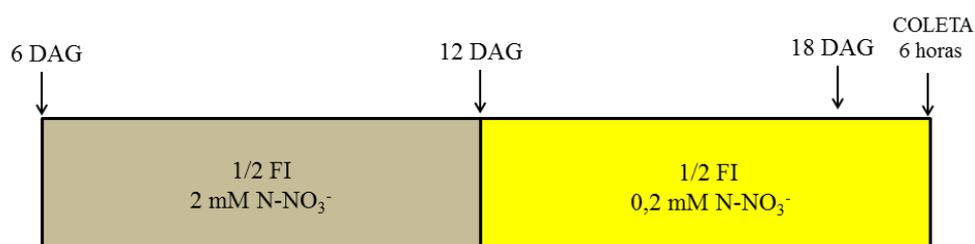


Figura 3. Esquema do primeiro experimento utilizando as linhagens superexpressando o transportador de $N-NO_3^-$ *OsNPF4.11*, cultivadas seis dias sob suprimento normal de N ($2\text{ mM } N-NO_3^-$) e em seguida passando seis dias sob baixo suprimento de N ($0,2\text{ mM } N-NO_3^-$). Todas as plantas foram coletadas no 18º DAG seis horas após a troca de solução nutritiva. DAG: dias após germinação, FI: força iônica.

3.13.1 Extração de DNA e RNA

A extração de DNA e RNA foi feita como descrito no item 3.2.

3.13.2 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada como descrito no item 3.11.3.

3.13.3 Reações de PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas como descrito no item 3.11.4.

3.13.4 Análise das frações nitrogenadas e açúcares solúveis

Análise das frações nitrogenadas e açúcares solúveis foram realizadas como descrito no item 3.11.5.

3.13.5 Análise dos parâmetros radiculares

Análise dos parâmetros radiculares foram realizadas como descrito no item 3.11.6.

3.14 Segundo Experimento Utilizando as Linhagens Transformadas Superexpressando o Transportador *OsNPF4.11*

Após uma prévia seleção das linhagens transformadas (experimento descrito no item 3.12), as sementes de arroz das linhagens selecionadas foram desinfestadas em uma solução de hipoclorito a 2% por 20 minutos sob agitação e em seguida serão lavadas dez vezes com água destilada. Depois de desinfestadas, as sementes foram colocadas para germinar na superfície de uma lâmina d'água de um vaso de 700 mL, sustentadas por gaze. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12horas/12horas (luz/escuro), fluxo de fótons fotossintéticos de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, umidade relativa do ar de 70% e temperatura de $28^{\circ}\text{C}/24^{\circ}\text{C}$ (diurna/noturna).

No décimo segundo dia após a germinação (DAG), as plantas foram submetidas a uma solução nutritiva de Hoagland e Arnom (1950) com 1/2 de força iônica (FI) contendo 2 mM de N-NO_3^- (suprimento normal de nitrogênio) ou 0,2 mM de N-NO_3^- (baixo suprimento) até o vigésimo quinto DAG.

No 24º DAG, 3 horas após a troca de solução (às 8 horas da manhã), as plantas foram coletadas e as amostras de raízes e parte aérea foram utilizadas para as análises expressão gênica dos transportadores de nitrato, atividade das enzimas: Glutamina sintetase, Glutamato sintase, Glutamato desidrogenase, parâmetros radiculares e frações solúveis (Figura 3). As amostras vegetais foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C até a extração de proteína, DNA e RNA total.

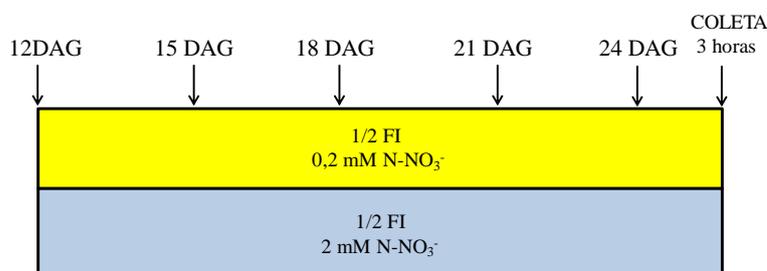


Figura 4. Esquema do experimento para avaliação da expressão gênica dos transportadores de nitrato, parâmetros radiculares e frações solúveis em plantas de arroz cultivadas sob dois níveis de N-NO_3^- . DAG: dias após germinação, FI: força iônica. Baixo suprimento de N ($0,2 \text{ mM N-NO}_3^-$), Suprimento normal de N (2 mM N-NO_3^-).

3.14.1 Extração de DNA e RNA

A extração de DNA e RNA foi feita como descrito no item 3.2.

3.14.2 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada como descrito no item 3.11.3.

3.14.3 Reações de PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas como descrito no item 3.11.4.

3.14.4 Análise das frações nitrogenadas e açúcares solúveis

Análise das frações nitrogenadas e açúcares solúveis foram realizadas como descrito no item 3.11.5.

3.14.5 Extração de proteína para a análise da atividade de enzimas do metabolismo de N

Amostras de tecido armazenadas a -80°C foram maceradas com nitrogênio líquido e homogeneizada em tampão de extração composto por 50 mmol L^{-1} de Tris-Cl pH=8,0, 1 mmol L^{-1} de EDTA, 1,5% de polivinilpirrolidona (PVPP), 10 mmol L^{-1} de dithiothreitol (DTT), 30% de glicerol e 1 mmol L^{-1} de fenil-metil-sulfonil fluoreto (PMSF), na proporção 3:1 (tampão: amostra). O extrato bruto foi centrifugado a 14.000g durante 30 min e o sobrenadante (extrato protéico) armazenado no freezer a -80°C . O conteúdo de proteína foi determinado como descrito por BRADFORD (1976), usando albumina de soro bovino como padrão.

3.14.6 Atividade da glutamina sintetase

A atividade foi realizada como descrito por FARDEN e ROBERTSEN (1980). A atividade foi realizada em $500\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução contendo 50 mmol L^{-1} de Imidazol-HCl pH 7,5, 5 mmol L^{-1} de hidroxilamina neutralizada com Tris, 20 mmol L^{-1} de MgCl_2 , 25 mmol L^{-1} de L-glutamato, 5 mmol L^{-1} de β -mercaptoetanol e 5 mmol L^{-1} de ATP. O controle da reação foi realizado sem a adição de ATP no meio de reação. A reação foi iniciada pela adição de $50\text{ }\mu\text{g}$ de proteína já incluídos nos $500\text{ }\mu\text{L}$ da reação e conduzida a 30°C durante 30 min. A reação foi paralisada pela adição de $350\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução composta por 4% (p/v) de ácido tricloroacético – TCA e 3,2% (p/v) de cloreto férrico anidro – FeCl_3 preparada em HCl $0,5\text{ mmol L}^{-1}$. O γ -glutamil monohidroxamato (GHD) foi colorimetricamente determinado em $\lambda=540\text{ nm}$.

3.14.7 Atividade da Glutamato Sintase (NADH-GOGAT)

A análise da atividade de Glutamato sintase, foi feita como descrito por SCHIAVON et al., (2008). A atividade foi feita em ensaios contendo 25 mM de Hepes-NaOH (pH 7,5), 2 mM de L-glutamina, 1 mM de ácido alfa-cetoglutárico, 0,1 mM de NADH, 1 mM Na_2EDTA e $12\text{ }\mu\text{L}$ de extrato de enzima em $200\text{ }\mu\text{L}$ de volume final. O monitoramento da oxidação de NADH é medida colorimetricamente em OD= 340 nm. A atividade foi expressa pela taxa de alteração da densidade óptica pelo tempo.

3.14.8 Determinação da atividade de Glutamato Desidrogenase (GDH) aminação e desaminação

A atividade foi realizada como descrito por Turano et al. (1996). Na reação de aminação, a atividade da GDH foi determinada em $500\text{ }\mu\text{L}$ de solução contendo 100 mM de Tris-HCl pH 8,0; 50 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 13 mM de α -cetoglutarato; 0,25 mM de NADH; 1 mM de CaCl_2 e 50 μg de proteína. A reação foi iniciada com a adição da proteína e a cinética

da atividade é determinada em dois minutos com registro a cada 5 segundos. A atividade foi expressa pela taxa de decréscimo da densidade óptica com o tempo a 340 nm. Na reação de desaminação, a atividade da GDH foi determinada em 500 µL de uma solução contendo 100 mM de Tris-HCl pH 9,3; 35 mM de L-glutamato; 0,25 mM de NAD⁺; 1 mM de CaCl₂ e 50 µg de proteína. A reação foi iniciada com a adição da proteína e a cinética é a mesma da reação de aaminação. A atividade foi expressa pela taxa de alteração da densidade óptica pelo tempo a 340 nm.

3.14.9 Extração de proteína para a análise de Western Blot

Amostras de raízes (5 g de massa fresca) foram trituradas com um mixer em 20 mL do meio de extração contendo: Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 8,0), sacarose 250 mmol L⁻¹, glicerol 100 mL L⁻¹, KI 150 mmol L⁻¹, cloreto de colina 100 mmol L⁻¹, EGTA 2 mmol L⁻¹, EDTA 2 mmol L⁻¹, polivinilpirrolidona (PVP) 10 g L⁻¹, fenil-metil-sulfonil fluoreto (PMSF) 1 mmol.L⁻¹, ditioneitol (DTT) 5 mmol L⁻¹, 2-mercaptoetanol 5 mmol L⁻¹ e 5 g L⁻¹ de albumina. O extrato foi filtrado em quatro camadas de gaze e em seguida submetido a uma centrifugação de 3.600 g por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e novamente centrifugado a 8.000 g por 10 minutos. O material resultante, denominado fração microsomal foram congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80°C para posterior análise.

3.14.10 Análise de Western Blot

Para confirmar o nível de expressão da proteína, após a obtenção da fração microsomal como descrito no item acima, foi realizado a análise de Westen Blot para a imunodeteção do "tag" de HA (3xHA) ligado a proteína, usando o iBind Western Starter Kit (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante.

Inicialmente amostras de 20 µg de proteína total foram misturadas na proporção 1:1 (v/v) em tampão de amostra 2X composto por: 125mM de Tris-HCl pH 6,8, 20% (v/v) glicerol, 4% SDS, 10% β-mercaptoetanol e 0,01% de azul de bromofenol. A mistura foi imediatamente aquecida a 85°C durante três minutos. Uma breve centrifugação a 17.000xg foi aplicada para precipitação de materiais insolúveis na amostra. As amostras foram aplicadas em mini-gel TGX 10% (BioRad) no aparato mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad) a 100V por 90 min. Foi utilizado o marcador *Magic Mark XP Western Protein* (Thermo Fischer) que pode ser detectado por quimioluminescência.

A transferência das proteínas do gel para membrana PVDF foi realizada usando o kit *mini PVDF transfer pack* (BioRad) no equipamento Trans-Blot Turbo (BioRad) durante 3 min a 2,5 A constante. Após a transferência, o imunoblotting foi realizado usando o dispositivo *iBind Western System* (Life Technologies) seguindo as recomendações do fabricante. Foi utilizado o anticorpo primário contra o tag de HA produzido em camundongo na diluição de 1:1.000 (1µg/mL) e o anticorpo secundário contra o IgG de camundongo produzido em cabra conjugado com a peroxidase (HRP) na concentração de 1:10.000 (0,1 µg/mL). A detecção por quimioluminescência foi realizada usando o kit *Super Signal™ West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fischer) seguindo as recomendações do fabricante.

3.15 Experimento em Casa de Vegetação para Análise de EUN

As sementes de arroz foram desinfestadas em uma solução de hipoclorito a 2% por 20 minutos sob agitação e em seguida serão lavadas dez vezes com água destilada. Depois de desinfestadas, as sementes foram colocadas para germinar na superfície de uma lâmina d'água de um vaso de 700 mL, sustentadas por gaze em câmara de crescimento, com fotoperíodo de

12horas/12horas (luz/escuro), fluxo de fótons fotossintéticos de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, umidade relativa do ar de 70% e temperatura de $28^{\circ}\text{C}/24^{\circ}\text{C}$ (diurna/noturna). Após germinadas as mudas foram transferidas para casa de vegetação onde foram plantadas em vasos de 9 L contendo o horizonte A (0-20 cm) de um Chernossolo. O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com dois tratamentos (duas doses de N) e com 4 repetições por tratamento. Metade das plantas receberam uma dose de $50 \text{ Kg de N.ha}^{-1}$ no plantio na forma de NO_3^- e uma outra dose de $50 \text{ Kg de N.ha}^{-1}$ na antese (tratamento com adubação), a outra metade permaneceu sem N até a coleta (tratamento sem adubação). A coleta foi realizada no estágio final de maturidade dos grãos. Amostras da bainha, folha e dos grãos foram coletadas, secas em estufa e utilizadas para a análise de N-total de acordo com o protocolo de (Tedesco, 1983).

Foram determinados os seguintes parâmetros de EUN: eficiência de absorção de N (EAbN), eficiência de utilização de N (EUtN) e eficiência de uso de N (EUN) de acordo com o protocolo de Moll et al. (1981).

3.16 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias analisadas pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$), utilizando o programa estatístico R (R Development Core Team, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Transformação de Arroz da variedade Piauí Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Inicialmente o trabalho tinha como objetivo a transformação da variedade Piauí, a qual é tradicionalmente cultivada no estado do Maranhão sob baixa disponibilidade de insumos, apresentando assim características de adaptação a baixa disponibilidade de N de grande interesse, como a maior expressão dos transportadores de alta afinidade relacionados com um maior influxo de N-NO₃⁻ em baixa dose de N (Arruda 2014; Bucher et al. 2014; Sperandio et al. 2014). Assim como uma maior expressão do *OsNPF4.11* sob baixa disponibilidade de NO₃⁻ em comparação com a variedade melhora IAC-47 (Bucher et al. 2014).

Para a transformação das plantas de arroz da variedade Piauí foram realizados alguns testes utilizando os métodos de transformação de TOKI et al. (2006) e Sahoo et al. (2011) com adaptações, como descrito no item 3.10. Foram realizados seis testes de transformação, como descrito na Tabela 3 e Figura 5, para variedade Piauí, porém sem sucesso de reprodução do protocolo, tendo como principal dificuldade as etapas de transformação e regeneração, ou seja, em todos os testes não foram observados calos transformados (exceto no teste 5 que foi observado apenas 1, o qual veio morrer logo em seguida), então por não haver calos transformados, não houve calos regenerados.

Todos os meios utilizados encontram-se no Anexo I. Devido a dificuldade encontrada para transformar as plantas de arroz da variedade Piauí, nesse estudo foi apenas realizada a transformação das plantas de arroz da variedade Nipponbaire de acordo com o protocolo de Toki et al. (2006).

Tabela 3. Resumos dos testes realizados utilizando os métodos de transformação de TOKI et al. (2006) e Sahoo et al. (2011) com adaptações para a transformação da variedade de arroz Piauí.

Teste	Procedimentos	Nº de plantas obtidas
1	Foi utilizado o meio AAM para a ressuspensão da bactéria, o meio N6DH para a seleção dos calos transformados e os meios de regeneração de parte aérea I e II com o fitôrmônio BAP	0
2	Foi utilizado o meio AAM para a ressuspensão da bactéria, o meio N6DH para a seleção dos calos transformados e os meios de regeneração de parte aérea I e II com o fitôrmônio BAP	0
3	Foi utilizado o meio AAM para a ressuspensão da bactéria, o meio N6DH para a seleção dos calos transformados e os meios de regeneração de parte aérea I e II sem o fitôrmônio BAP	0
4	Foi utilizado o meio AAM para a ressuspensão da bactéria, o meio N6DH para a seleção dos calos transformados e os meios de regeneração de parte aérea III e IV	0
5	Foi testada a indução dos calos no claro e no escuro, os meios AAM e MRA para a ressuspensão da bactéria, os meios de seleção N6DH e MSM e os meios de regeneração de parte aérea V e VI e VII, de acordo com o esquema abaixo.	0
6	Foi utilizado o meio AAM para a ressuspensão da bactéria, o meio N6DH para a seleção dos calos transformados e os meios de regeneração de parte aérea I e II. Foi variado os dias de co-cultivo em 3, 5 e 7 dias.	0

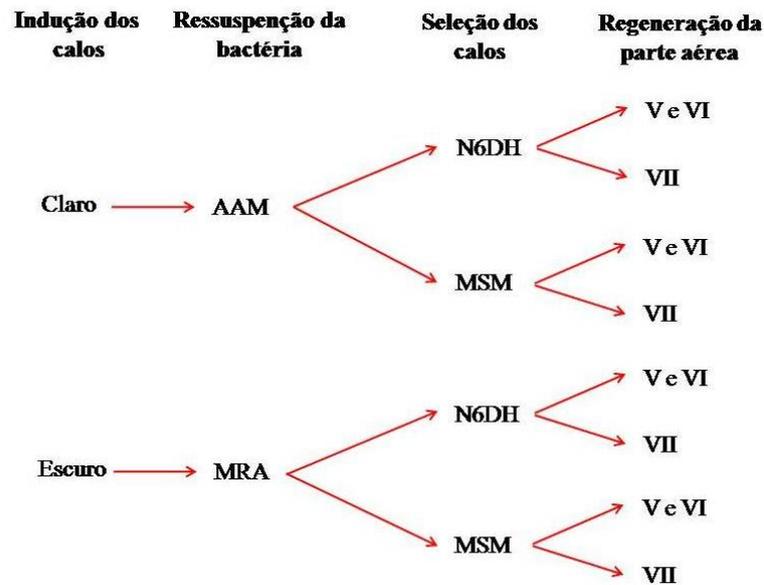


Figura 5. Esquema utilizado no teste 6 para transformação da variedade de arroz Piauí. Foi testado a indução dos calos no claro e no escuro, os meios AAM e MRA para a ressuspensão da bactéria, os meios de seleção N6DH e MSM e os meios de regeneração de parte aérea V e VI e VII.

4.2 Transformação de Arroz da variedade Nipponbare Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Foram obtidas 78 linhagens da variedade Nipponbare contendo o amiRNA 13 e 23 linhagens com o gene *OsNPF4.11* sob controle do promotor Rcc3 (Figura 6). Após a obtenção das sementes foi feita a sua seleção, em que, inicialmente todas as linhagens com poucas ou quase nenhuma produção de semente foram descartadas. As restantes foram analisadas como se segue.

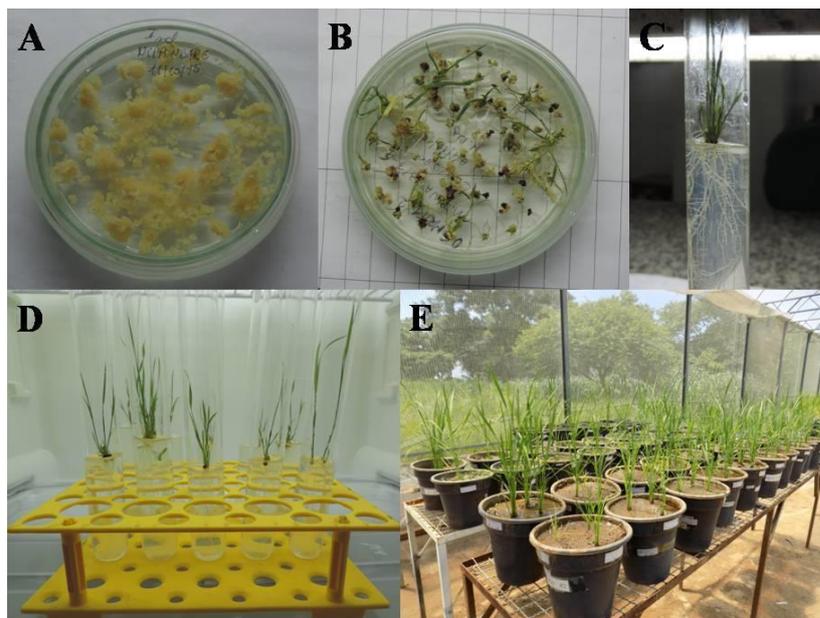


Figura 6. Transformação das plantas de arroz da variedade Nipponbare. A: calos embriogênicos da região do escutelo de sementes de arroz da variedade Nipponbare germinadas em meio contendo 2,4-D. B: calos embriogênicos da região do escutelo de sementes de arroz da variedade Nipponbare em processo de regeneração da parte aérea em meio contendo Citocinina e ANA. C e D: calos embriogênicos da região do escutelo de sementes de arroz da variedade Nipponbare em processo de regeneração de raiz. E: plantas de arroz da variedade Nipponbare totalmente regeneradas sendo cultivadas em casa de vegetação para a obtenção das sementes.

4.3 Análise das Linhagens Transformadas Silenciando o Transportador OsNPF4.11

4.3.1 Seleção do controle endógeno mais estável para as análises de qRT-PCR.

8

Para a seleção do controle endógeno mais estável foi utilizado o método proposto por Vandesompele et al (2002). Resumidamente para cada gene de referência o menor valor de Ct observado foi subtraído do Ct de cada amostra e a diferença exponenciada com base 2. Os valores de expressão (variando entre 0 e 1) foram então analisados utilizando o aplicativo para excel geNorm V3.5 e os valores de estabilidade média da expressão gênica (M) obtidos. Os resultados encontram-se na Figura 7.

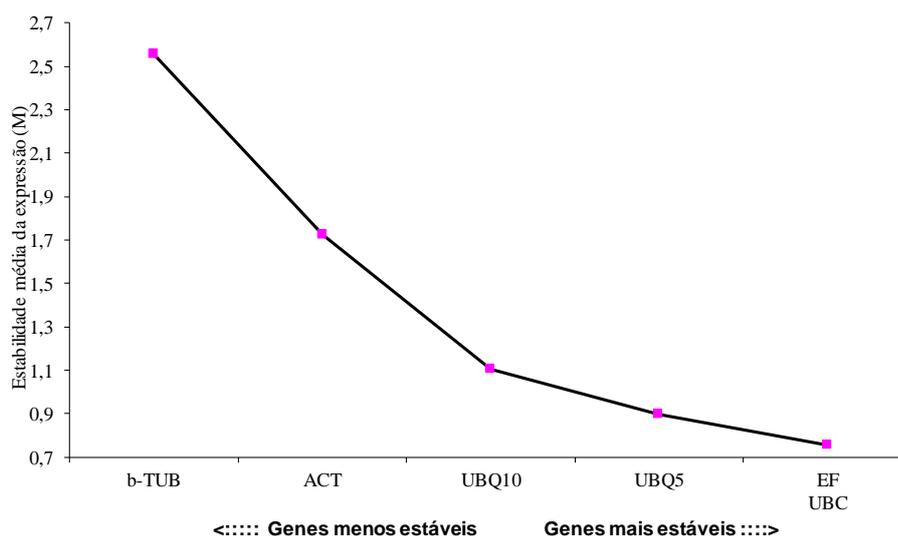


Figura 7. Estabilidade média da expressão dos controles endógenos *OsbtTUB*, *OsACT*, *OsUBQ10*, *OsUBQ5*, *OsEF1 α* e *OsUBC*, nas folhas e raízes das plantas WT e das linhagens silenciando e superexpressando o transportador de NO_3^- *OsNPF4.11*.

Como podemos observar na Figura 7 os genes menos estáveis (maiores valores de estabilidade média) foram os genes *OsbtTUB* e *OsACT1*, e os genes mais estáveis *OsEF1 α* e *OsUBC*. Por apresentar maior estabilidade, no presente estudo foi utilizado como controle endógeno em todos os cálculos de expressão, o gene *OsEF1 α* .

4.3.2 Confirmação das linhagens de arroz silenciando o gene *OsNPF4.11* por RT-qPCR

Das 78 linhagens obtidas contendo o amiRNA 13, após a seleção pela produção de sementes, oito linhagens foram utilizadas em um experimento como descrito no item 3.11. A RT-qPCR foi realizada para analisar o padrão de expressão do gene *OsNPF4.11* nas raízes das plantas WT e das linhagens transformadas cultivadas com 0,2 mM de NO_3^- por seis dias. Das oito linhagens apenas 4 apresentaram uma redução na expressão do transportador *OsNPF4.11*, as outras 4, ao invés de uma redução, apresentaram um aumento de expressão e foram descartadas. Nas raízes a linhagem L#47 apresentou uma redução de apenas 20% e foi descartada (Figura 8A). A linhagem L#70 apresentou uma redução de expressão de 30% nas raízes, porém nas folhas não apresentou diferença de expressão em relação as plantas WT, e também foi descartada para as análises subsequentes (Figura 8B). As linhagens L#41 e L#63 apresentaram uma redução de expressão 42% e 40% nas raízes e de 47% e 45% nas folhas, respectivamente em relação as plantas WT (Figura 8), e foram usadas nas análises subsequentes.

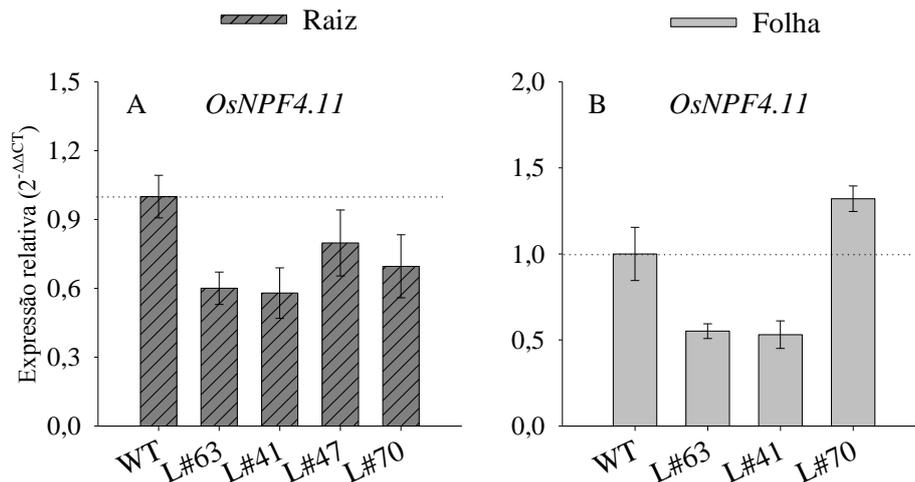


Figura 8. Expressão gênica relativa do transportador de nitrato *OsNPF4.11* em raízes (A) e folhas (B) das plantas WT e das linhagens transformadas L#63, L#41, L#47 e L#70, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de N-NO₃⁻ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. As barras indicam o erro padrão da média

4.3.3 Análise da expressão de genes transportadores de NO₃⁻

A fim de verificar o efeito do silenciamento do *OsNPF4.11* sob os transportadores de NO₃⁻, foi avaliada a expressão gênica dos transportadores de baixa (*OsNRT1.1*, *OsNRT1.5*, *OsNPF2.4* e *OsNPF7.2*) e alta (*OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNRT2.3*) afinidade e das proteínas regulatórias NAR (*OsNAR2.1* e *OsNAR2.2*) por PCR em tempo real.

As linhagens transformadas com redução nos níveis de expressão do *OsNPF4.11* apresentaram significativamente um aumento de expressão do *OsNRT1.5* nas folhas em comparação as plantas WT (Figura 9D). Nas raízes esse efeito foi apenas observado na L#63 (Figura 9C). Em *Arabidopsis*, *AtNRT1.5* é um transportador de NO₃⁻ de baixa afinidade, podendo mediar tanto influxo quanto efluxo, localizado na membrana plasmática e expresso nas células do periciclo da raiz próximo ao xilema, tendo um K_m pelo NO₃⁻ de aproximadamente 6 mM em pH 5,5 (Lin et al., 2008). O nocaute do *AtNRT1.5* causou um aumento da concentração de NO₃⁻ na seiva do xilema e reduziu a taxa de transporte desse íon da raiz para a parte aérea, sugerindo o que esse gene participa do carregamento de NO₃⁻ no xilema (Lin et al., 2008).

Para o gene *OsNPF2.4*, apenas a linhagem L#63 apresentou um pequeno aumento de expressão, tanto nas raízes como nas folhas (Figura 9E e F). Em arroz, *OsNPF2.4* é um transportador de baixa afinidade localizado na membrana plasmática e é expresso principalmente na epiderme, no parênquima do xilema e nas células companheiras do floema, tendo um Km pelo NO₃⁻ de aproximadamente 3,1 mM em pH 5,5 (Xia et al. 2014). Plantas de arroz com nocaute do *OsNPF2.4*, apresentaram uma redução na concentração de NO₃⁻ na seiva do xilema, afetando negativamente o transporte a longa distância, da raiz para a parte aérea, de NO₃⁻ (Xia et al. 2014). Porém quando o mesmo foi superexpresso, o transporte a longa distância foi aumentado (Xia et al. 2014), indicando a importância desse transportador para o transporte de NO₃⁻ a longa distância em plantas de arroz.

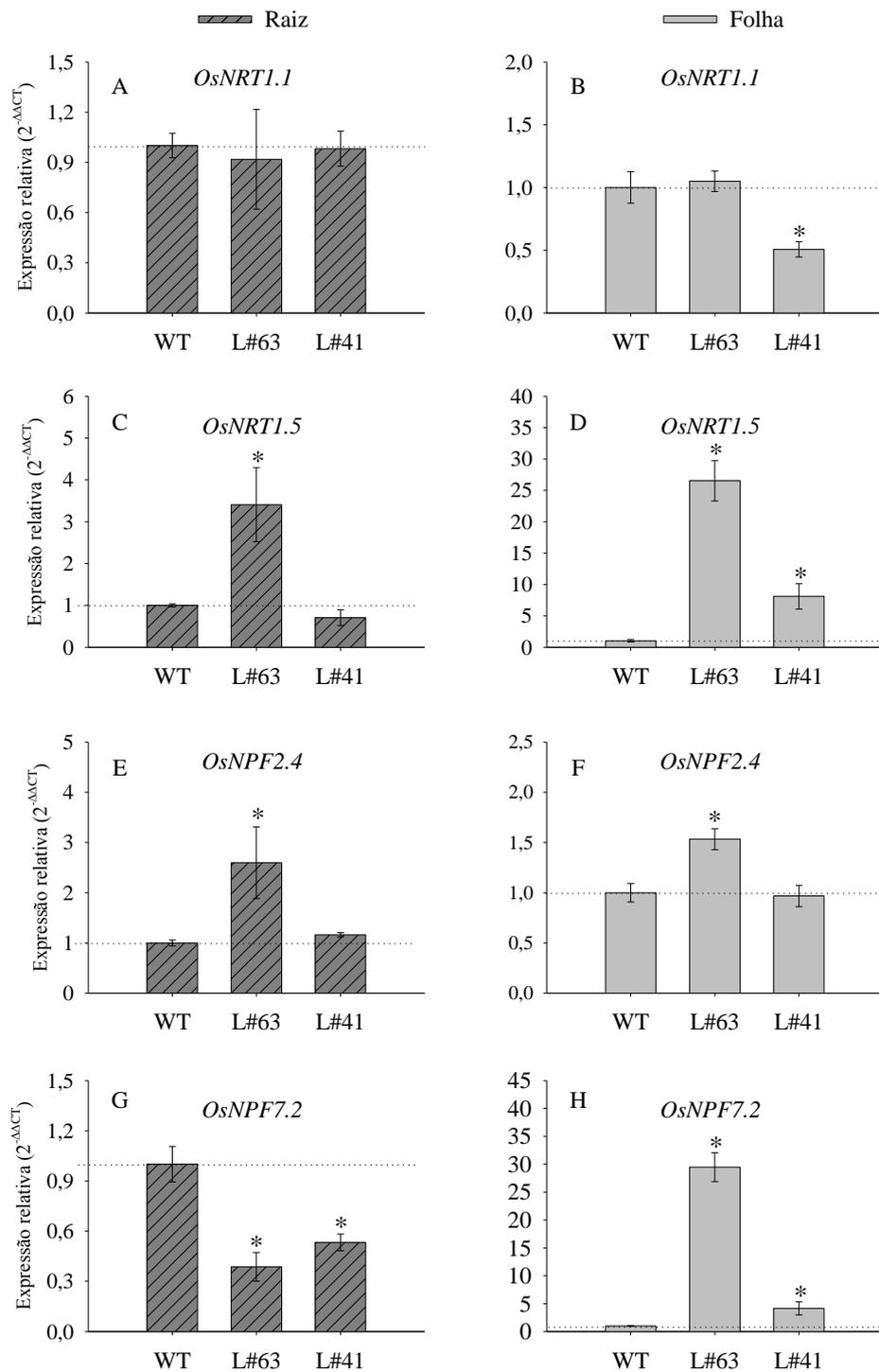


Figura 9. Expressão gênica relativa dos transportadores de nitrato em raízes e folhas das plantas WT e das linhagens transformadas L#63 e L#41, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de N-NO_3^- por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. 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.

Já com relação ao gene *OsNPF7.2*, nas raízes das linhagens transformadas foi observada uma redução de expressão de até 52% em comparação com as plantas WT (Figura 9G), porém o oposto foi observado nas folhas, onde houve um aumento significativo de até

aproximadamente 30 vezes (Figura 9H). Em arroz *OsNPF7.2* é um transportador de NO_3^- de baixa afinidade localizado na membrana do tonoplasto, expresso principalmente nas zonas de alongamento e maturação da raiz, especialmente esclerênquima, córtex e estelo. Porém também foi detectada e expressão no coleótilo e nas folhas (Hu et al., 2016). Nocaute do *OsNPF7.2* retardou o crescimento de arroz sob altas concentrações de NO_3^- , mas não alterou a concentração de N ou NO_3^- nas raízes e parte aérea, nem a concentração de NO_3^- no xilema (Hu et al., 2016).

Como podemos observar na Figura 10, todas as linhagens apresentaram aumento de expressão dos transportadores de alta afinidade (*OsNRT2.1*, *2.2* e *2.3*) nas folhas, porém nas raízes o oposto ocorreu para o transportador *OsNRT2.3*, onde as linhagens transformadas apresentaram uma redução de expressão de até aproximadamente 90% em relação as plantas WT (Figura 10E). Com relação aos transportadores *OsNRT2.1* e *2.2* nas raízes, apenas a linhagem L#63 apresentou redução de expressão em relação as plantas WT (Figura 10A e C).

Os transportadores de alta afinidade (NRT2.1, 2.2 e 2.3) são de extrema importância para a absorção de N sob baixa disponibilidade (sistema HATS). Plantas mutantes de *Arabidopsis* com uma completa deleção do gene *AtNRT2.1* em conjunto com a deleção da região 3' do gene *AtNRT2.2* apresentaram em relação as plantas wild-type uma forte redução na atividade do HATS, apresentando uma redução de 73% na V_{max} (Filleur et al., 2001). Li et al. (2006), também utilizando plantas de *Arabidopsis* mutantes, constataram que a interrupção conjunta da atividade dos transportadores *AtNRT2.1* e *AtNRT2.2* resultou em uma redução no transporte de alta afinidade induzido pela presença de NO_3^- (iHATS) em mais de 80%, enquanto que para o sistema de alta afinidade constitutivo (cHATS) houve uma redução de 30%.

Feng et al. (2011), constataram que em arroz o gene *OsNRT2.3* sofre um splicing alternativo dando origem a duas proteínas: *OsNRT2.3a* e *OsNRT2.3b*, onde o *OsNRT2.3a* é expresso principalmente nas raízes, sendo induzido por NO_3^- e reprimido por NH_4^+ , e o *OsNRT2.3b* é expresso principalmente na parte aérea, com uma fraca expressão nas raízes independente da forma e concentração de N fornecida. Os primers utilizados nesse trabalho são capazes de detectar a isoforma *OsNRT2.3a*.

OsNRT2.3a é um transportador de NO_3^- localizado na membrana plasmática e é predominantemente expresso nas células do estelo das raízes, particularmente nas células do parênquima do xilema (Tang et al., 2012). Sob baixo suprimento (0,5 mM) de NO_3^- , o nocaute do *OsNRT2.3a* impediu o carregamento de NO_3^- no xilema e reduziu o crescimento das plantas, porém não interferiu na absorção de desse elemento (Tang et al., 2012). Já em *Arabidopsis* o *AtNRT2.3* é expresso principalmente na parte aérea, porém também pode ser detectado em raízes (Orsel et al., 2002). Plantas de *Arabidopsis* quando cultivadas sob baixa disponibilidade de NO_3^- (0,5 mM) tiveram um aumento na expressão do *AtNRT2.3* de 6 vezes (Orsel et al., 2002).

Assim como os transportadores de alta afinidade, as proteínas acessórias *OsNAR2.1* e *2.2*, as linhagens apresentaram um aumento de expressão nas folhas em relação as plantas WT, sendo este mais acentuado na proteína *OsNAR2.2*, onde o aumento chegou até aproximadamente 31 vezes (Figura 11B e D). Porém nas raízes foi apenas observado para a proteína *OsNAR2.1* uma redução de expressão de até aproximadamente 77% na L#63 (Figura 11A). Com relação a proteína *OsNAR2.2*, nas raízes não foram observadas diferenças significativas (Figura 12C).

Esse padrão de expressão da proteína NAR2.1 similar aos dos transportadores de alta afinidade ocorre em função de que já foi demonstrado que a proteína NAR2.1 interage com os transportadores *OsNRT2.1*, *2.2* e *2.3a*, não só com a proteína, mas também com o mRNA, tornando-os funcionais para o transporte de NO_3^- (Yan et al., 2011; Feng et al., 2011). Estudos recentes com *Arabidopsis* demonstraram que existe a formação de um complexo com uma

massa molecular de aproximadamente 150 kDa formado de duas unidades de AtNAR2.1 e duas de AtNRT2.1 (Yong et al., 2010). Esses mesmos autores sugerem que apenas o complexo AtNAR2.1/AtNRT2.1 está envolvido no HATS e não apenas a forma monomérica do AtNRT2.1. Essa hipótese ainda é apoiada pelo fato de que a injeção conjunta de mRNA do AtNAR2.1 e AtNRT2.1 em ovócitos de sapo aumentaram o acúmulo de ^{15}N em 536% comparados com o controle (Kotur et al., 2011).

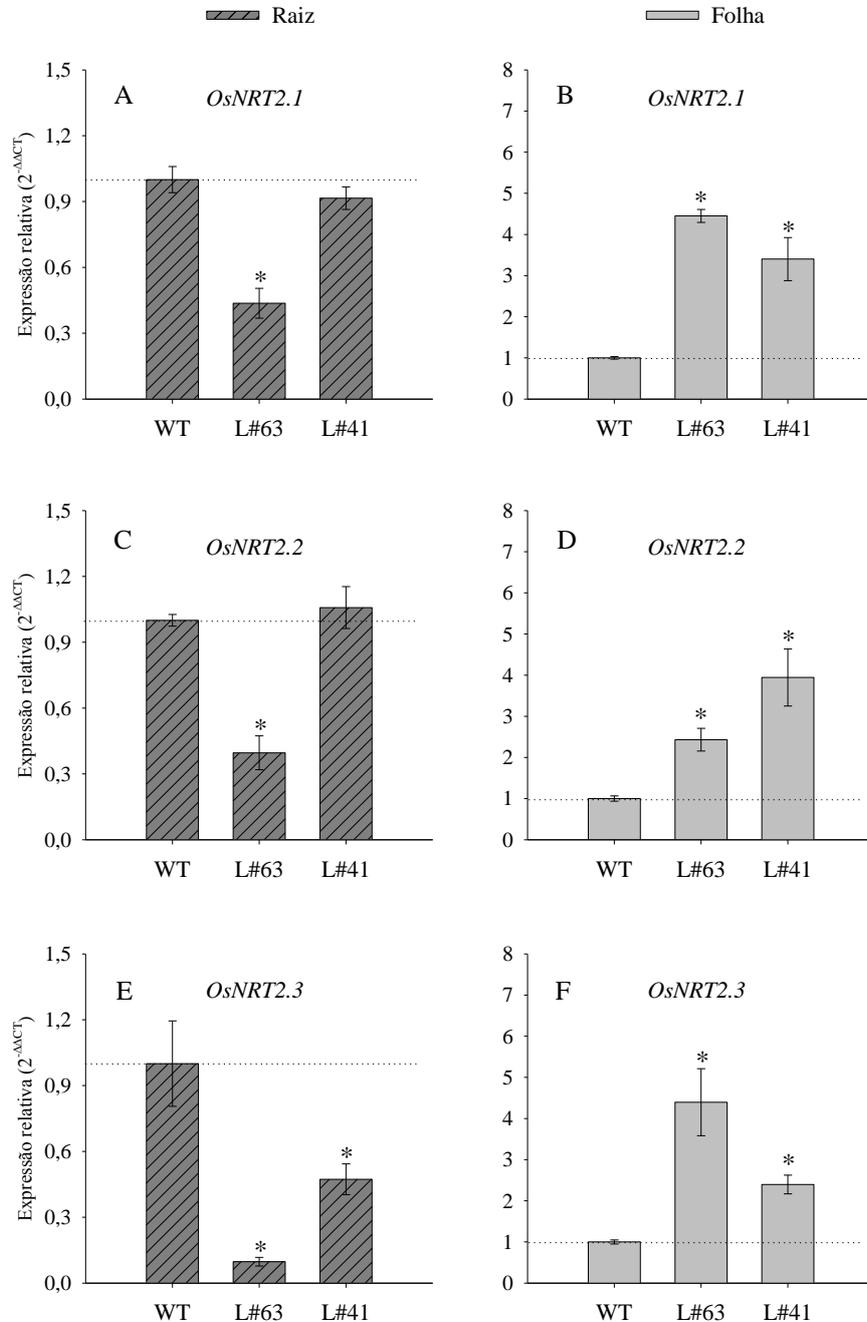


Figura 10. Expressão gênica relativa dos transportadores de nitrato em raízes e folhas das plantas WT e das linhagens transformadas L#63 e L#41, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de N-NO_3^- por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. 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

Ao contrário do que já foi demonstrado para a proteína OsNAR2.1, não foi constatada ainda nenhuma evidencia de interação entre a OsNAR2.2 e os transportadores OsNRT2. Simultaneamente a injeção de mRNA de OsNAR2.2 e OsNRT2.1 em ovócitos não resultou em aumento significativo na absorção de ^{15}N , o mesmo ocorreu para OsNRT2.3a e b, sugerindo que não há interação entre essas proteínas (Feng et al., 2011).

Com relação as enzimas envolvidas no processo de assimilação de NO_3^- (*OsNIA1* e *OsGS2*), foi apenas observado um pequeno aumento de expressão de aproximadamente 1,5 vezes para a *OsGS2* na L#41(Figura 11E-H).

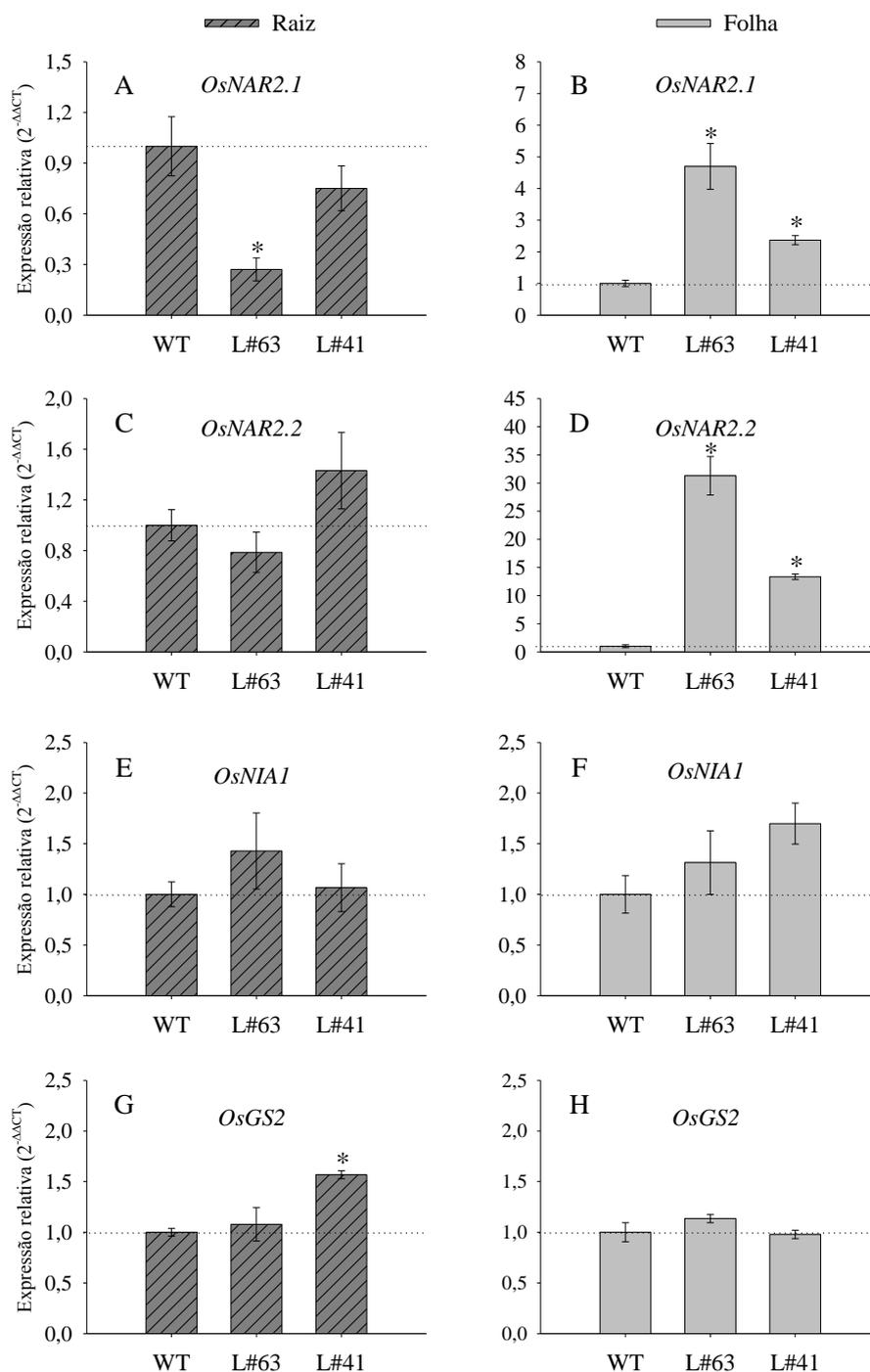


Figura 11. Expressão gênica relativa das proteínas acessórias *OsNAR2.1* e *OsNAR2.2*, e das enzimas da via de assimilação de nitrato *OsNIA1* e *OsGS2* em raízes e folhas das plantas WT e das linhagens transformadas L#63 e L#41, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis 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

4.3.4 Análise das frações nitrogenadas e açúcares solúveis

As linhagens transformadas apresentaram uma grande redução nos teores de NO_3^- nas folhas em relação as plantas WT (Figura 12E), o mesmo não ocorreu nas raízes e nas bainhas (Figura 12A e C). Essa redução dos teores de NO_3^- nas folhas, pode ser em função da redução de expressão do *OsNRT2.3*, pois foi constatado que em plantas WT o *OsNRT2.3a* contribuiu com 74% do nitrato transportado da raiz para a parte aérea, quando as mesmas se encontravam sob baixa disponibilidade de NO_3^- (Tang et al., 2012), e também como já mencionado, plantas com nocaute do *OsNRT2.3a* apresentaram uma redução no transporte de NO_3^- da raiz para a parte aérea (Tang et al., 2012).

Embora o NO_3^- possivelmente não foi enviado para a parte aérea, como pode ser observado, as plantas transformadas não apresentaram um acúmulo nas raízes, como já relatado em estudos anteriores onde o mesmo ocorreu (Lin et al., 2008; Tang et al., 2012; Xia et al. 2014), isso possivelmente se dá pelo fato que as plantas transformadas também tiveram uma redução na absorção desse íon, como pode ser observado na Figura 13, onde as linhagens apresentaram um menor conteúdo de NO_3^- nos tecidos.

Durante o estágio vegetativo as folhas funcionam como dreno para o N, havendo então uma maior demanda de N pelas folhas em relação as raízes (Huang et al., 2018), desta forma numa tentativa de suprir a falta de N nas folhas, as plantas transformadas modularam a expressão de alguns genes aqui observados de modo a favorecer o transporte de NO_3^- da raiz para a parte aérea (o qual está sendo defectivo nessas plantas).

Com relação aos teores de NH_4^+ as linhagens transformadas apresentaram uma redução nas raízes e nas bainhas (Figura 12B e D). Após absorvido pelas raízes o NO_3^- pode ser acumulado nos vacúolos, enviado para a parte aérea ou reduzido a NH_4^+ e em seguida assimilado em aminoácidos pela via GS-GOGAT (Huang et al., 2018). Desta forma essa redução nos teores de NH_4^+ pode ser em função de uma menor assimilação do NO_3^- pelas plantas, tendo em vista uma menor absorção do mesmo, o que corrobora com os menores teores de N-amino também encontrados nesses tecidos (Figura 14A e C).

Na folha a linhagens L#63 apresentou um aumento significativo nos teores de NH_4^+ , porém o oposto ocorreu com a linhagem L#41, onde a mesma apresentou uma redução significativa (Figura 12F). Essa diferença encontra entre as linhagens nos teores de NH_4^+ pode ser em função do estresse provocado pela falta de N. Dado que o N é elemento móvel, sob deficiência de N, as plantas podem reciclar o N das folhas mais velhas para as folhas mais novas para sustentar o crescimento e desenvolvimento dos tecidos. Então tendo em vista que na L#63 o estresse pode ter sido mais acentuado, isso pode ser observado pela menor expressão dos transportadores de alta afinidade, esses maiores teores de NH_4^+ observados podem ser em função de uma maior remobilização de N. Durante o processo de degradação de proteínas, como o que ocorre em folhas senescentes, aminoácidos são gerados e transportados via floema, porém alguns desses aminoácidos gerados são ainda mais degradados gerando NH_4^+ livre nas células (Bernard e Habash, 2009)

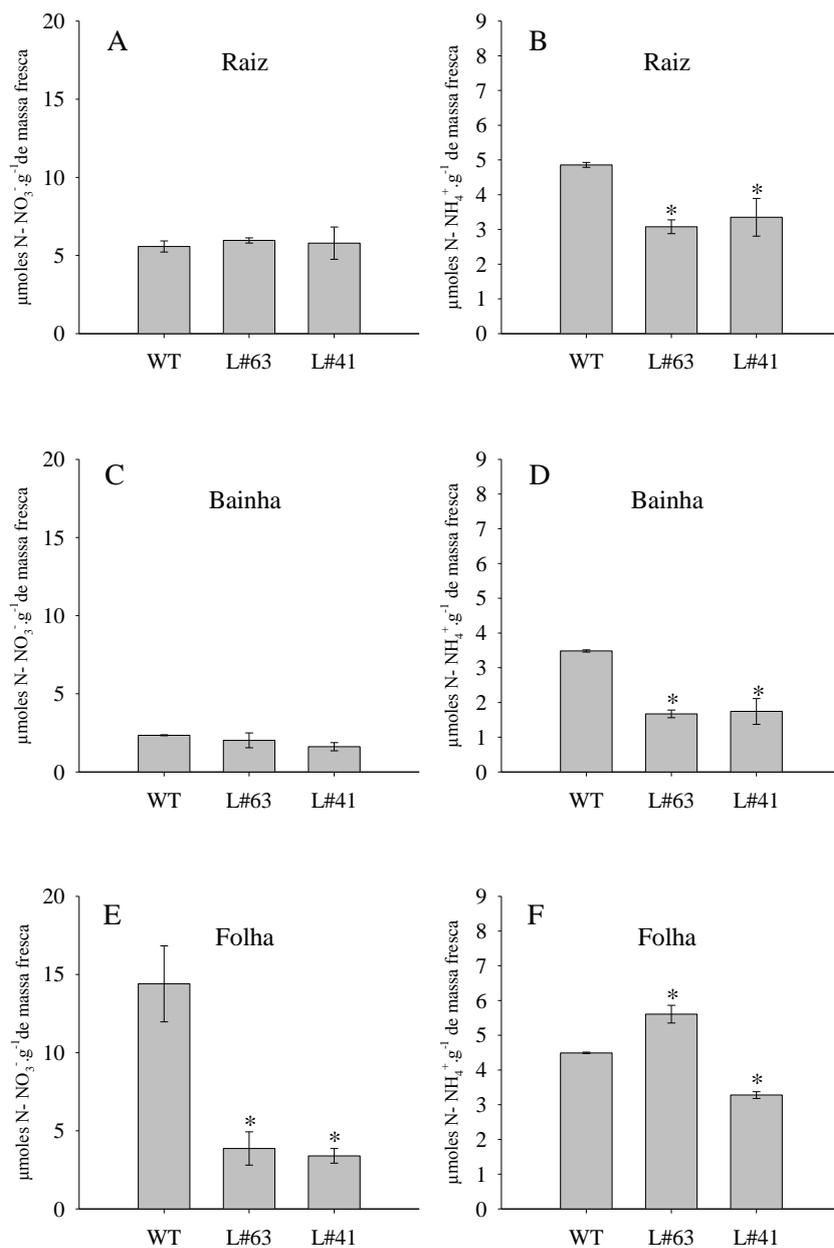


Figura 12. Teores de nitrato (N-NO₃⁻) e amônio (N-NH₄⁺) na folhas, bainhas e raízes das plantas WT e das linhagens transformadas L#63 e L#41, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de N-NO₃⁻ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. 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

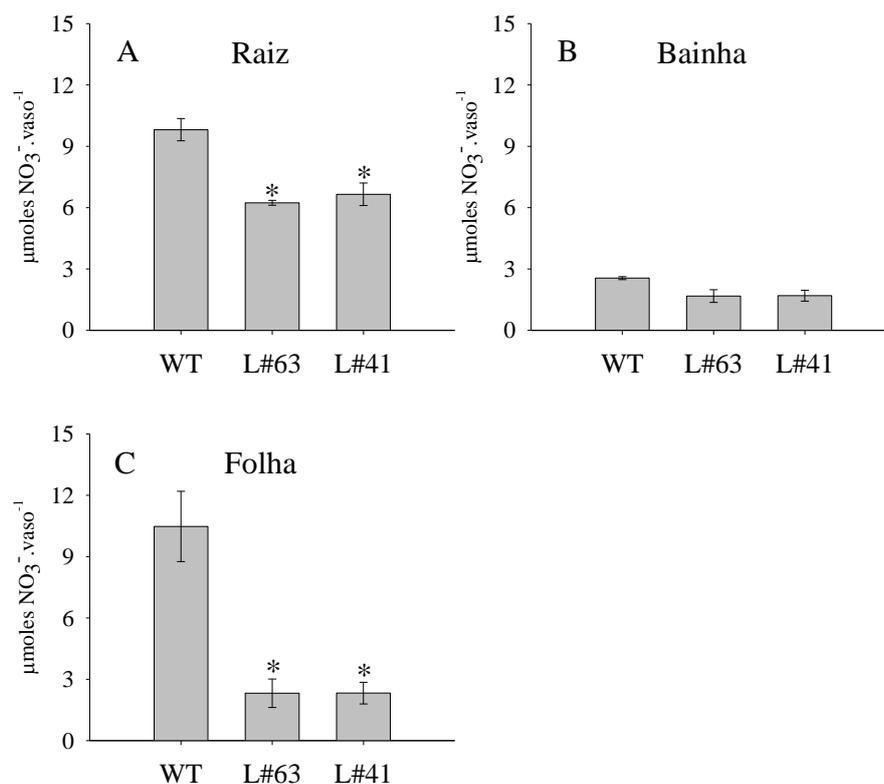


Figura 13. Conteúdo de nitrato (N-NO₃⁻) nas folhas, bainhas e raízes das plantas WT e das linhagens transformadas L#63 e L#41, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de N-NO₃⁻ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18^o DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. Asterisco indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet (p<0,05). As barras indicam o erro padrão da média

Todas as linhagens transformadas também apresentaram uma redução nos teores de açúcares solúveis nas raízes e bainha (Figura 14B e D). Na folha não foram observadas diferenças significativas (Figura 14F).

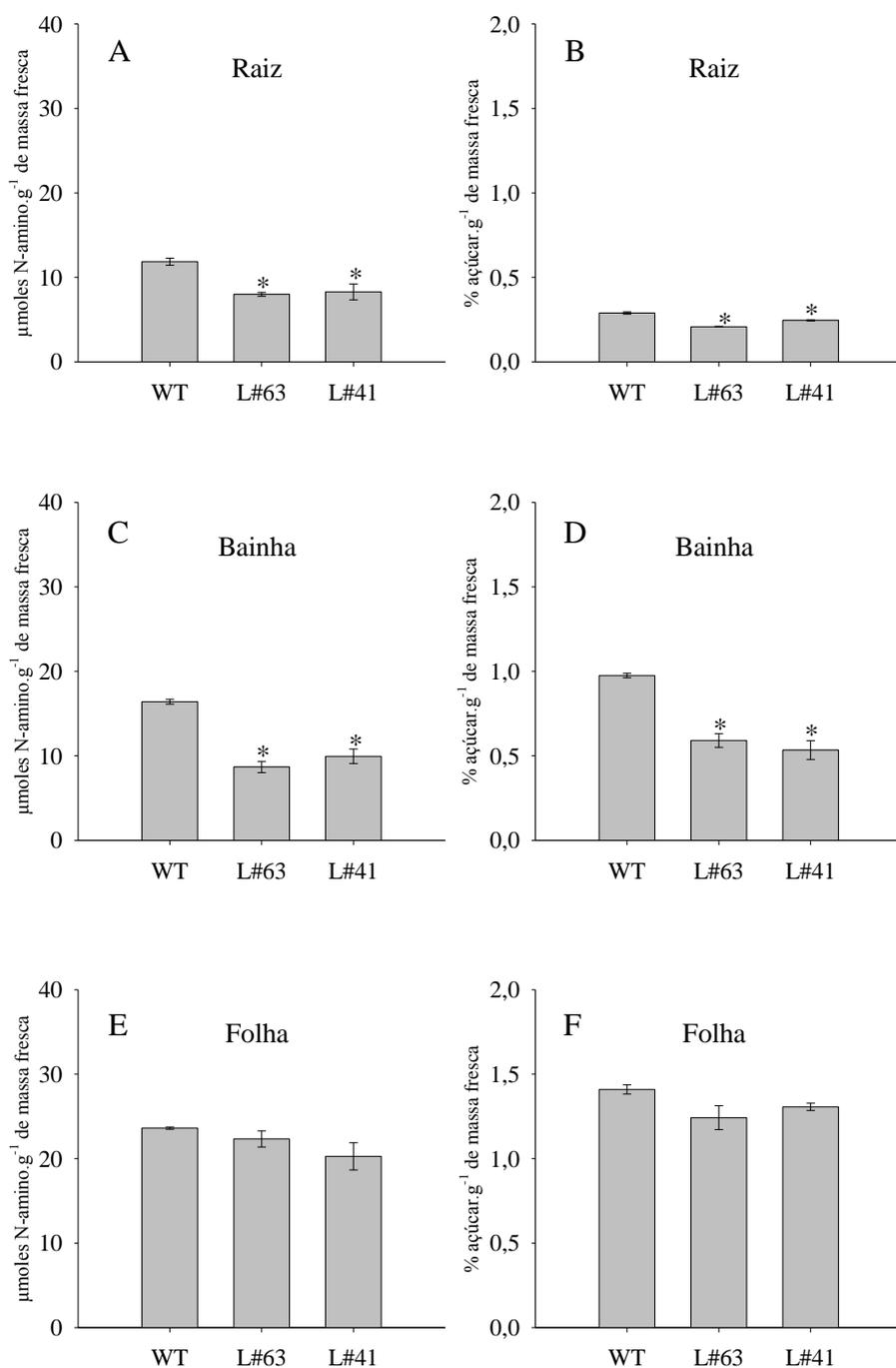


Figura 14. Teores de N-amino e porcentagem de açúcares solúveis na folhas, bainhas e raízes das plantas WT e das linhagens transformadas L#63 e L#41, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de N-NO_3^- por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis horas da troca de solução 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.

4.3.5 Análise dos parâmetros morfológicos

Houve uma redução significativa (de até 41%) na massa fresca de raiz nas linhagens transformadas em relação as plantas WT (Figura 15A). Com relação a massa fresca de parte aérea (Figura 15B) apenas a L#41 não apresentou redução significativa em relação a WT. E na relação raiz/parte aérea (R/PA), apenas a L#63 apresentou uma redução significativa em relação as plantas WT (Figura 15C).

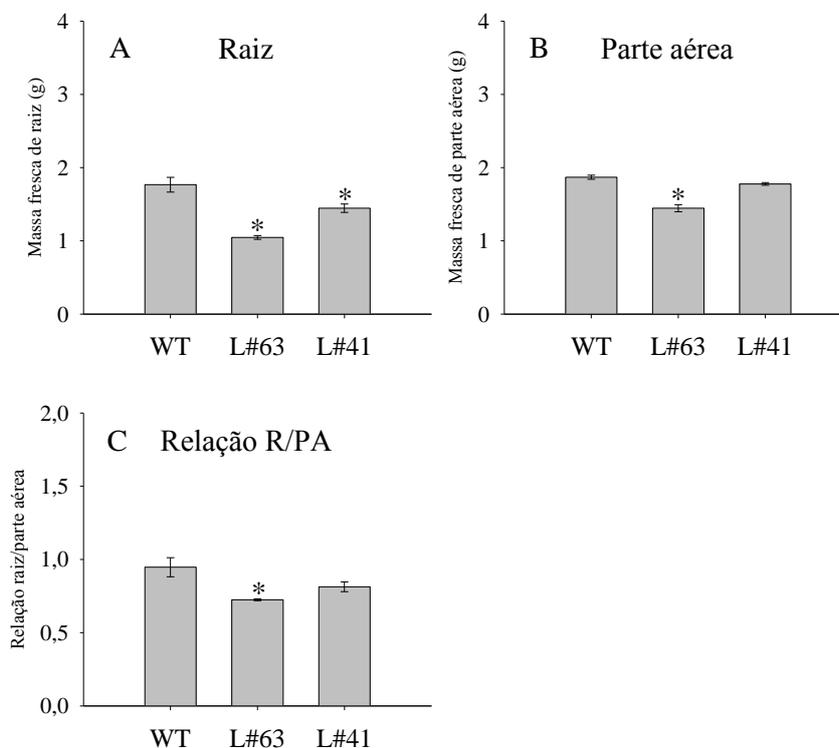


Figura 15. Massa fresca de raiz e parte aérea, e relação raiz/parte aérea das plantas WT e das linhagens transformadas L#63, L#41 e L#70, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de N-NO_3^- por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. 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

Esse menor desenvolvimento das plantas transformadas em relação as plantas WT pode ter ocorrido em função de uma menor absorção e/ou assimilação do NO_3^- . Já foi observado por Wang et al. (2004) que plantas de *Arabidopsis* com uma deleção no principal gene da NR (NiA2), tiveram seu crescimento totalmente comprometido quando crescidas em meio com NO_3^- como única fonte de N. Assim como já foi demonstrado que plantas sob deficiência de N apresentaram um menor acúmulo de biomassa (Zhao et al., 2004).

4.3.6 Análise dos parâmetros radiculares usando o software WinRizo *Arabidopsis*

Foram obtidos os seguintes parâmetros radiculares comprimento, área de superfície, diâmetro médio, volume, número de pontas e pontas por centímetro de raiz (Figura 16). Apenas a linhagem L#63 apresentou uma redução significativa nos parâmetros acima citados,

com exceção do parâmetro pontas por centímetro de raiz, a qual apresentou um aumento significativo (Figura 16F), e do parâmetro diâmetro médio, o qual não foram encontrados diferenças significativas entre as linhagens transformadas e as plantas WT (Figura 16C).

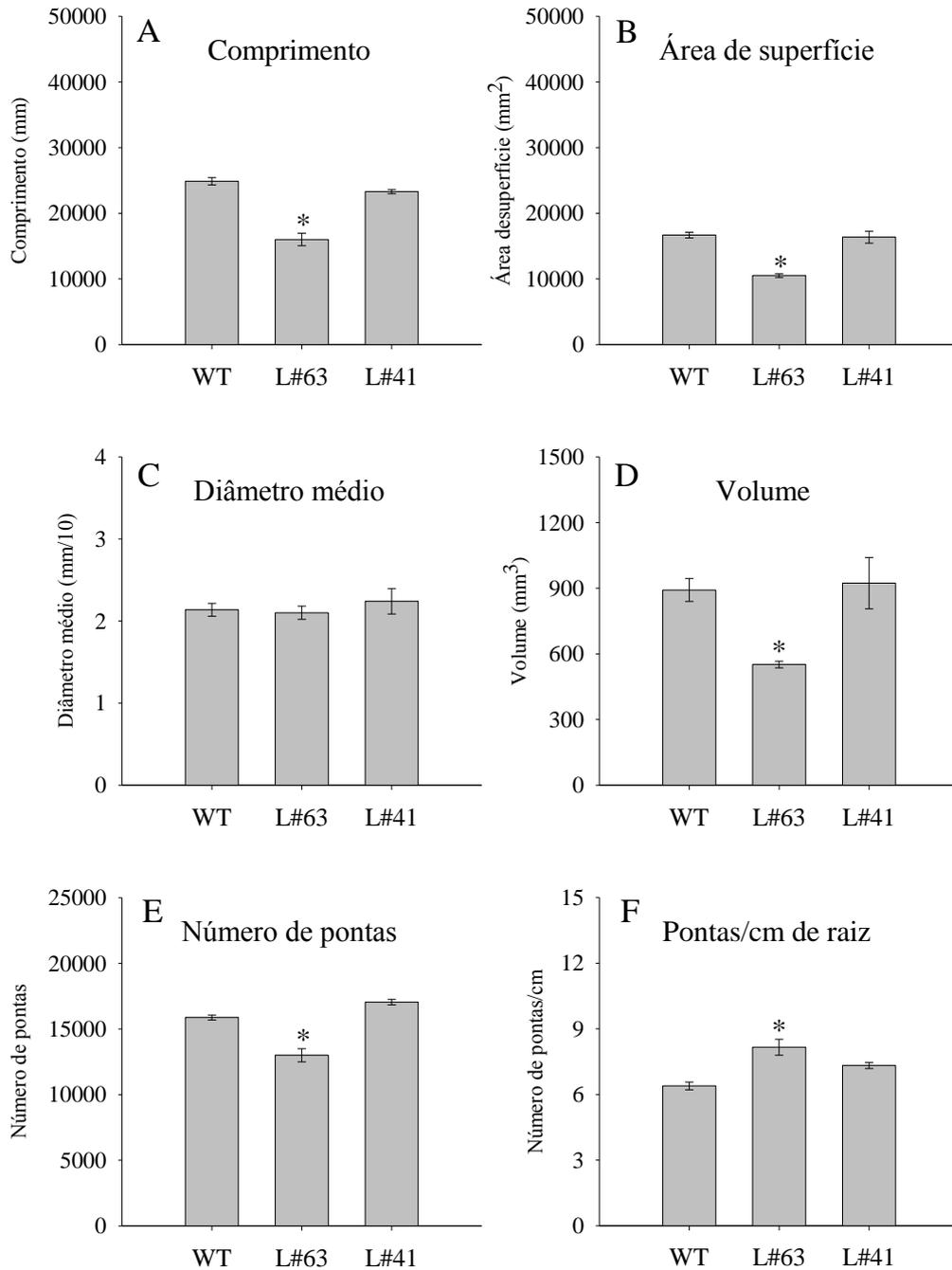


Figura 16. Parâmetros radiculares: comprimento, área de superfície, diâmetro médio, volume radicular, número de pontas e pontas por milímetro de raiz obtidos de raízes intactas, utilizando o software WinRizo Arabdopsis, das plantas WT e das linhagens transformadas L#63 e L#41, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis 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.

O mesmo ocorreu com os parâmetros radiculares comprimento, área de superfície, volume radicular e número de pontas dentro das seguintes classes de diâmetro: de 0 a 1,50 mm, 1,50 a 3,50 mm e maior que 3,50 mm, onde apenas a linhagem L#63 apresentou uma redução significativa, com exceção dos parâmetros volume maior que 3,50 mm ($V > 3,50$, Figura 17I), número de pontas entre 1,50 e 3,50 mm e maior que 3,50 mm ($1,50 < NP < 3,50$ e $NP > 3,50$, Figura 17L e M).

As plantas podem melhorar a absorção de nutrientes através da modulação do crescimento e da arquitetura radicular, de modo que ao aumentar a superfície de absorção das raízes e direcionado o crescimento em direção as áreas mais ricas em nutrientes no solo, as plantas são capazes de se adaptar a disponibilidade do nutriente no solo (Kiba e Krapp, 2016)

Vários genes estão envolvidos na regulação da arquitetura radicular em plantas, dentre eles o complexo de absorção de alta afinidade NRT2.1-NAR2.1 participa na regulação do desenvolvimento de raízes laterais, de modo que sob condições limitantes de NO_3^- , ambos genes são reguladores da iniciação do crescimento das raízes laterais (Wang et al., 2012). Um aumento na expressão do gene NRT2.1 resulta em um aumento na acumulação da proteína NRT2.1, assim essa proteína pode servir como tradutor de sinal para ativar a absorção de NO_3^- e reprimir a iniciação de raízes laterais (Little et al., 2005). Desta forma o aumento no número de pontas por centímetro de raiz encontrado na L#63 pode estar correlacionado com a menor expressão do *OsNRT2.1* observada. Porém esta linhagem apresentou uma redução na maioria dos parâmetros radiculares observados, isso pode ser em função do maior efeito sofrido por essa linhagem pela redução de expressão do *OsNPF4.11*, onde essa redução pode ter significativamente afetado o desenvolvimento de plantas de arroz.

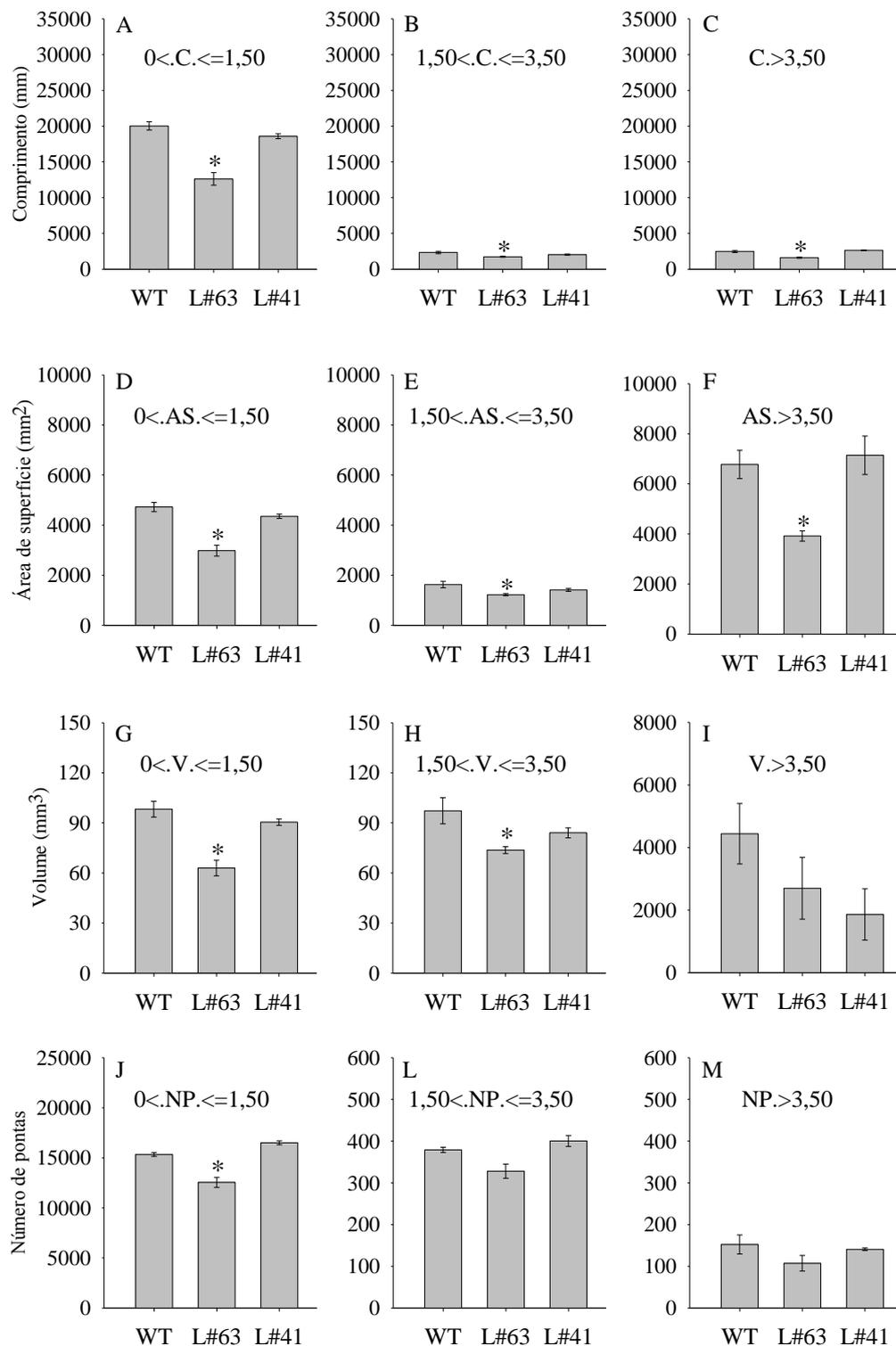


Figura 17. Parâmetros radiculares: comprimento, área de superfície, volume radicular e número de pontas dentro das classes de diâmetro: de 0 a 1,50 mm, 1,50 a 3,50 mm e maior que 3,50 mm, obtidos de raízes intactas, utilizando o software WinRizo Arabdopsis, das plantas WT e das linhagens transformadas L#63 e L#41, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de N-NO₃⁻ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis 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.

4.4 Primeiro Experimento com Linhagens Transformadas Superexpressando o Transportador *OsNPF4.11*

4.4.1 Confirmação das linhagens de arroz superexpressando o gene *OsNPF4.11* por RT-qPCR

A RT-qPCR foi realizada para analisar o padrão de expressão do gene *OsNPF4.11* nas raízes das plantas WT e das linhagens transformadas cultivadas com 0,2 mM de NO_3^- por seis dias. Houve um aumento significativo de expressão de até aproximadamente 66 vezes nas linhagens mutantes em comparação com as plantas WT, demonstrando que o *OsNPF4.11* foi superexpresso nas raízes das linhagens transformadas (Figura 18).

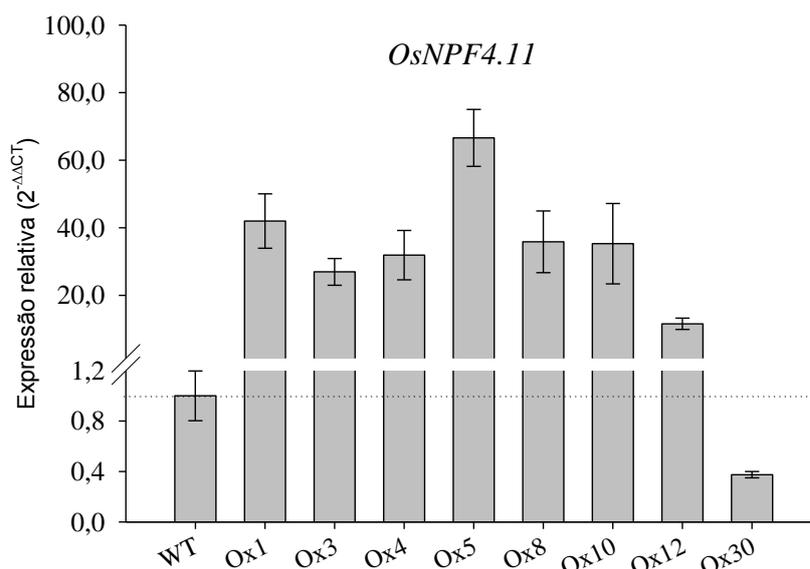


Figura 18. Expressão gênica relativa do transportador de nitrato *OSNPF4.11* em raízes das plantas WT e das linhagens transformadas, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de N-NO_3^- por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. As barras indicam o erro padrão da média

4.4.2 Análise dos parâmetros morfológicos

Houve diferença significativa entre as plantas WT e as linhagens transformadas no peso fresco da parte aérea e raiz (Figura 19A e B), nas linhagens transformadas houve uma redução de até 85% no peso fresco de raiz e de até 83% no peso fresco de parte aérea.

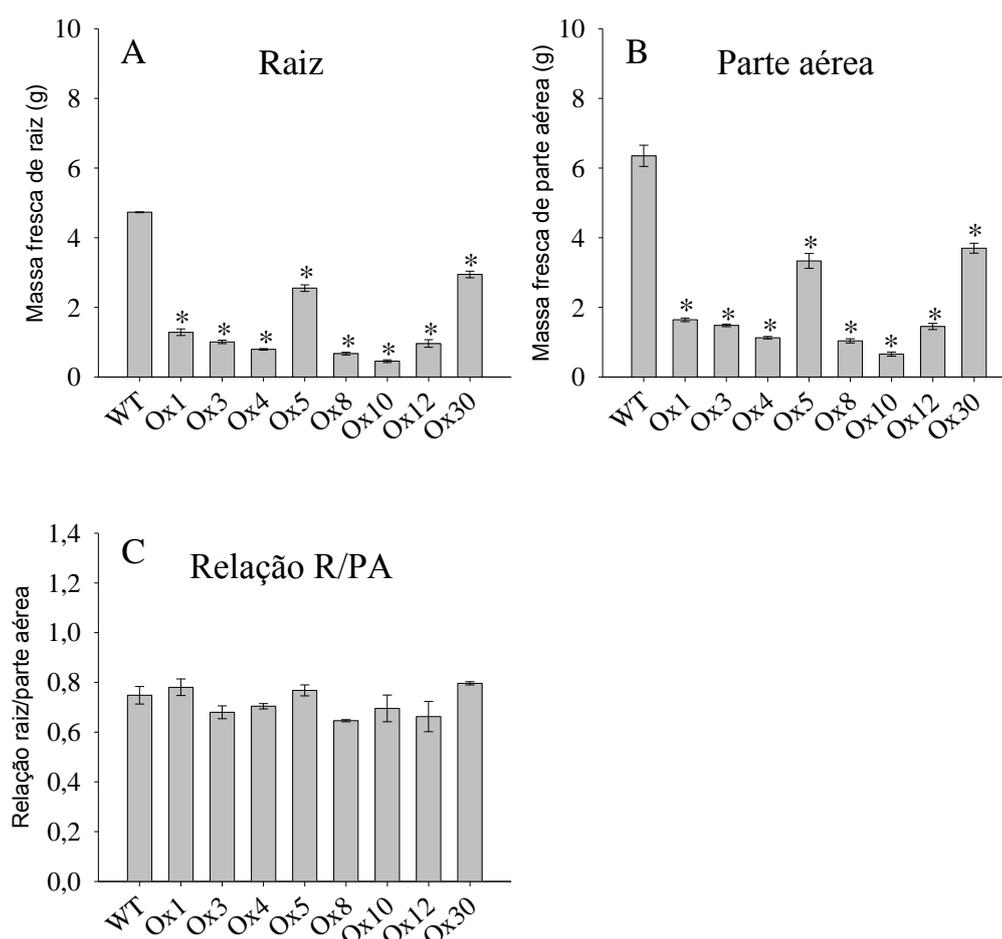


Figura 19. Massa fresca de raiz e parte aérea, e relação raiz/parte aérea das plantas WT e das linhagens transformadas, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de N-NO_3^- por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. Asterisco indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média.

4.4.3 Análise das frações nitrogenadas e açúcares solúveis

As linhagens transformadas apresentaram maiores teores de NO_3^- na raiz em comparação com as plantas WT (Figura 20A), uma diferença de até aproximadamente 13 vezes. Na bainha apenas as linhagens Ox8 e Ox10 apresentaram diferenças significativas em comparação com a WT (Figura 20C). Na folha apenas as linhagens Ox1 e Ox12 apresentaram diferenças significativas (Figura 20E).

Os teores de NH_4^+ das linhagens transformadas foram inferiores as plantas WT nas raízes (Figura 20B), exceto nas linhagens Ox1 e Ox10 que não apresentaram diferenças significativas em relação a WT. Na bainha apenas a Ox4 apresentou diferenças em relação a WT (Figura 20D) e na folha apenas a L#1 (Figura 20F).

Tendo em vista os resultados até aqui apresentados foram eliminadas as linhagens Ox5, Ox30 e Ox12 por apresentarem padrões de expressão muito diferentes das demais, assim como padrões de crescimento. De acordo com as análises de NO_3^- e NH_4^+ , foram selecionadas as linhagens Ox3, Ox4 e Ox8 por apresentarem padrões mais homogêneos entre si, para dar continuidade as análises.

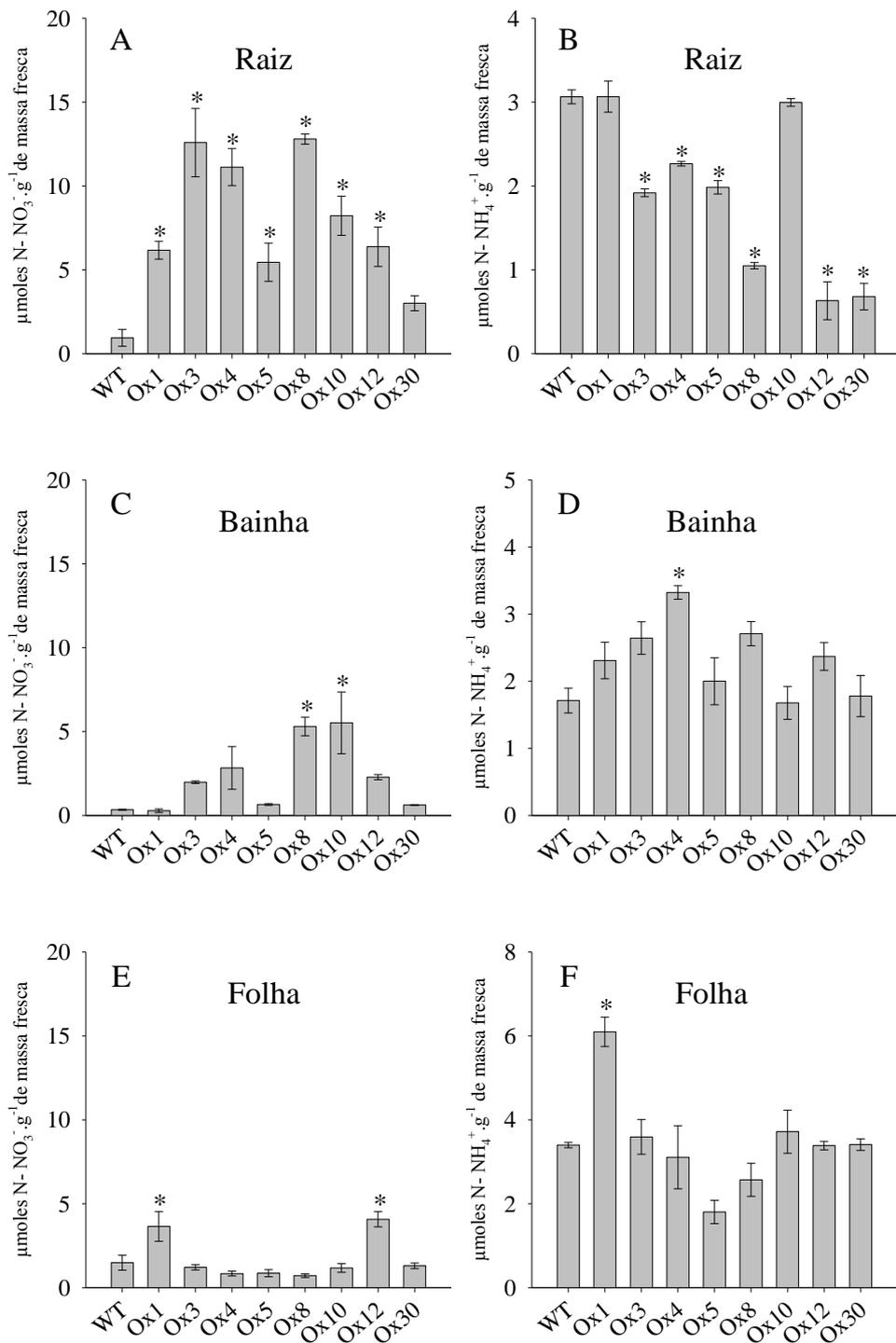


Figura 20. Teores de nitrato (N-NO_3^-) e amônio (N-NH_4^+) na folhas, bainhas e raízes das plantas WT e das linhagens transformadas, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de N-NO_3^- por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. Asterisco indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média.

Na raiz, a Ox4 apresentou um pequeno incremento (aproximadamente 1,3x) nos teores de N-amino, diferindo significativamente da WT (Figura 21A), porém o mesmo não foi

observado nas linhagens Ox3 e Ox8. Na bainha todas as linhagens apresentaram maiores teores comparadas com a WT (Figura 21C). A linhagem Ox4 também apresentou uma pequena redução na porcentagem de açúcar solúvel nas raízes (Figura 21B). Na bainha um pequeno aumento foi observado nas linhagens Ox4 e Ox8 em comparação com as plantas WT (Figura 21D).

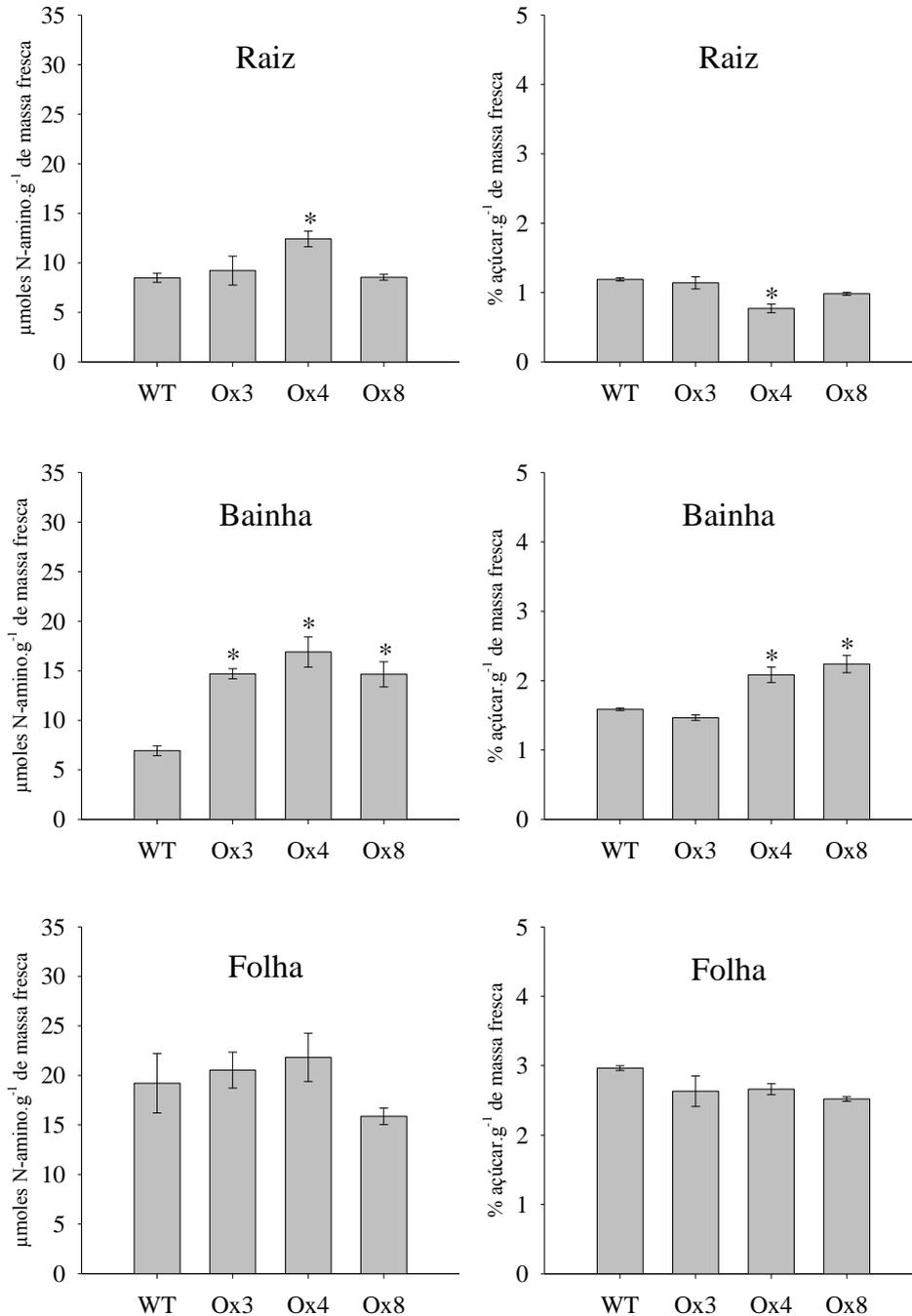


Figura 21. Teores de N-amino e porcentagem de açúcares solúveis na folhas, bainhas e raízes das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3, Ox4 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18^o DAG após seis horas da troca de 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

Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que a superexpressão do *OsNPF4.11* nas raízes de plantas de arroz acarretou em um maior acúmulo de NO_3^- nesse órgão, onde o mesmo provavelmente não foi enviado para a parte aérea. Estudos anteriores demonstraram que o nocaute de transportadores envolvidos no carregamento do xilema, pode alterar a translocação de NO_3^- a longa distância, acarretando em um acúmulo de NO_3^- nas raízes e uma redução no crescimento das plantas (Tang et al., 2012; Lin et al., 2008; Li et al., 2015), desta forma o aumento na expressão do *OsNPF4.11* pode ter influenciado na expressão de transportadores envolvidos no carregamento do xilema, acarretando assim no fenótipo observado.

4.4.4 Análise dos parâmetros radiculares usando o software WinRizo Arabdopsis

Houve redução significativa nas linhagens transformadas em relação as plantas WT e em quase todos os parâmetros radiculares, exceto diâmetro médio (Figura 22). Diferenças significativas também não foram observadas quanto ao número de pontas por centímetro (cm) de raiz (Figura 22F), indicando que apesar de uma redução no sistema radicular, a densidade de raízes laterais por milímetro e o diâmetro médio permaneceram inalterados.

Após absorvido pelo sistema radicular o nitrato pode ser armazenado no vacúolo das células radiculares, reduzido e assimilado nas raízes, ou enviado para a parte aérea, onde poderá ser reduzido e assimilado ou acumulado no vacúolo (Souza e Fernandes, 2006). Tendo em vista que a enzima Nitrato Redutase (NR) é citosólica, a redução do nitrato é principalmente realizada no citoplasma, desta forma o NO_3^- acumulado no vacúolo precisa ser remobilizado para o citoplasma para ser então assimilado e reduzido, assim a EUN em plantas está intimamente relacionada com a capacidade de reutilização do NO_3^- do vacúolo (Zhang et al., 2012). Por meio do estudo de plantas transgênicas, já foi demonstrado que uma redução na assimilação do N acarretou em uma redução na biomassa em plantas de arroz (Kusano et al., 2011) e que um aumento na assimilação acarretou em um aumento na biomassa das plantas, assim como um aumento na massa seca de raiz e de parte aérea em plantas de trigo e tabaco (Migge et al., 2000; Fuentes et al., 2001; Habash et al., 2001).

Em *Brassica napus* foram analisados dois genótipos, um com alta e outro com baixa EUN, e foi observado que o genótipo com uma alta EUN apresentou uma menor concentração de NO_3^- nas raízes e uma maior concentração na parte aérea em relação ao genótipo com baixa EUN, sugerindo uma maior mobilização de NO_3^- das raízes para a parte aérea no genótipo com alta EUN (Han et al., 2016). De acordo com esses autores uma maior translocação de NO_3^- da raiz para a parte aérea pode contribuir para uma maior EUN, o que corrobora com os resultados aqui encontrados onde as linhagens transformadas tiveram um maior acúmulo de NO_3^- nas raízes, não sendo o mesmo enviado para a parte aérea, o que pode ter prejudicado o crescimento das plantas.

Os parâmetros radiculares comprimento, área de superfície, volume radicular e número de pontas dentro das seguintes classes de diâmetro: de 0 a 1,50 mm, 1,50 a 3,50 mm e maior que 3,50 mm apresentaram um uma redução (de até mais de 50%) nas linhagens transformadas em relação as plantas WT (Figura 23).

O status interno de N pode alterar a arquitetura do sistema radicular, Zhang e Forde (1998) demonstram que o crescimento da raiz lateral é inibido por elevadas concentrações internas de N, do mesmo modo Scheible et al. (1997) encontraram correlação inversa altamente significativa entre os níveis de NO_3^- na parte aérea e o crescimento radicular. Na Figura 22 observamos que um aumento nos teores internos de NO_3^- na raiz em função do aumento na expressão do *OsNPF4.11* pode ter influenciado na arquitetura do sistema radicular, uma provável hipótese é que, como mencionado anteriormente, pelo fato de o NO_3^-

ter sido acumulado nos vacúolos das raízes das plantas transformadas, o mesmo não foi assimilado e/ou enviado para a parte aérea comprometendo de um modo geral no crescimento das plantas. Esses resultados serão melhores discutidos a frente.

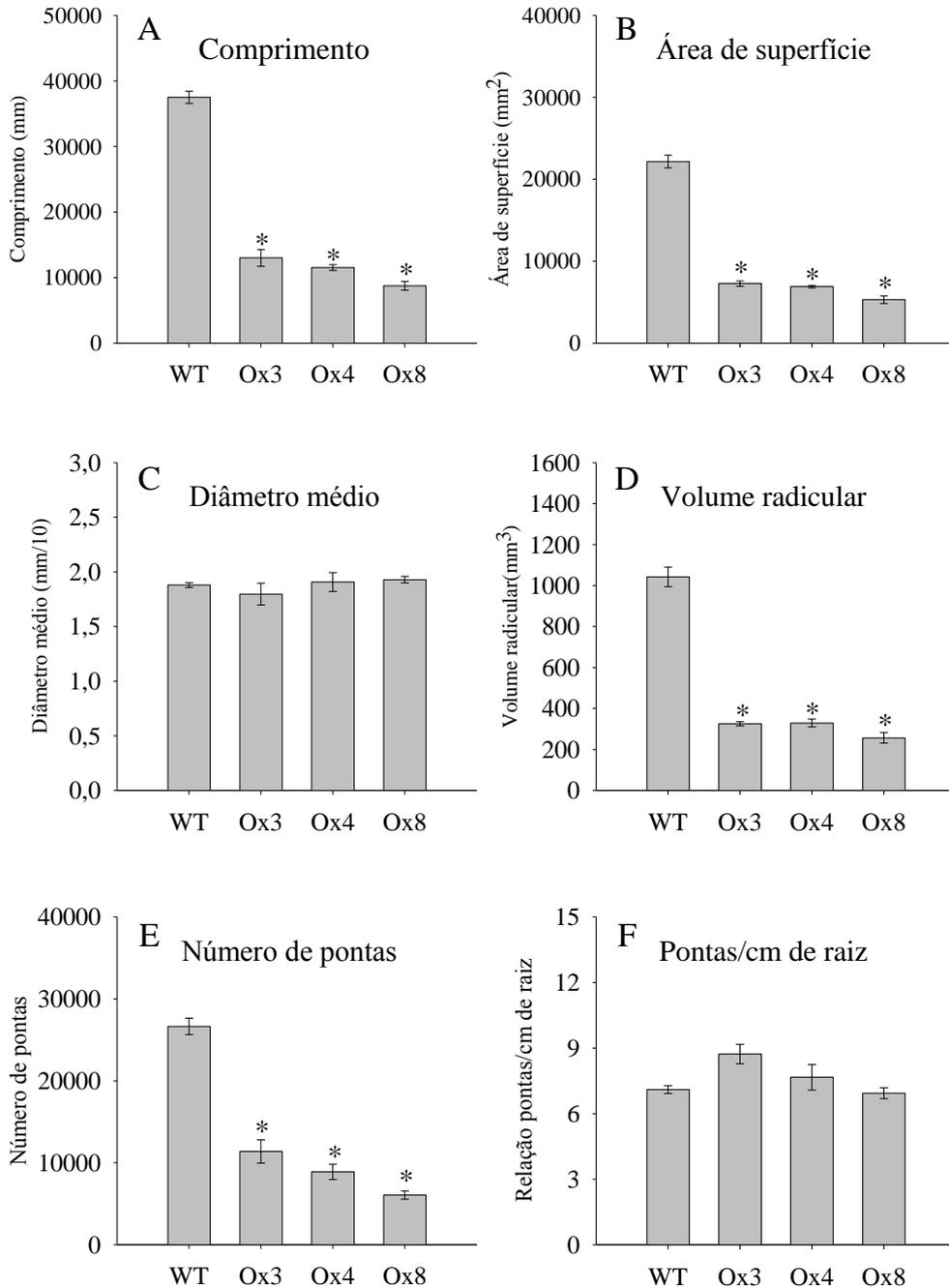


Figura 22. Parâmetros radiculares: comprimento, área de superfície, diâmetro médio, volume radicular, número de pontas e pontas por milímetro de raiz obtidos de raízes intactas, utilizando o software WinRizo Arabdopsis, das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3, Ox4 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis 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.

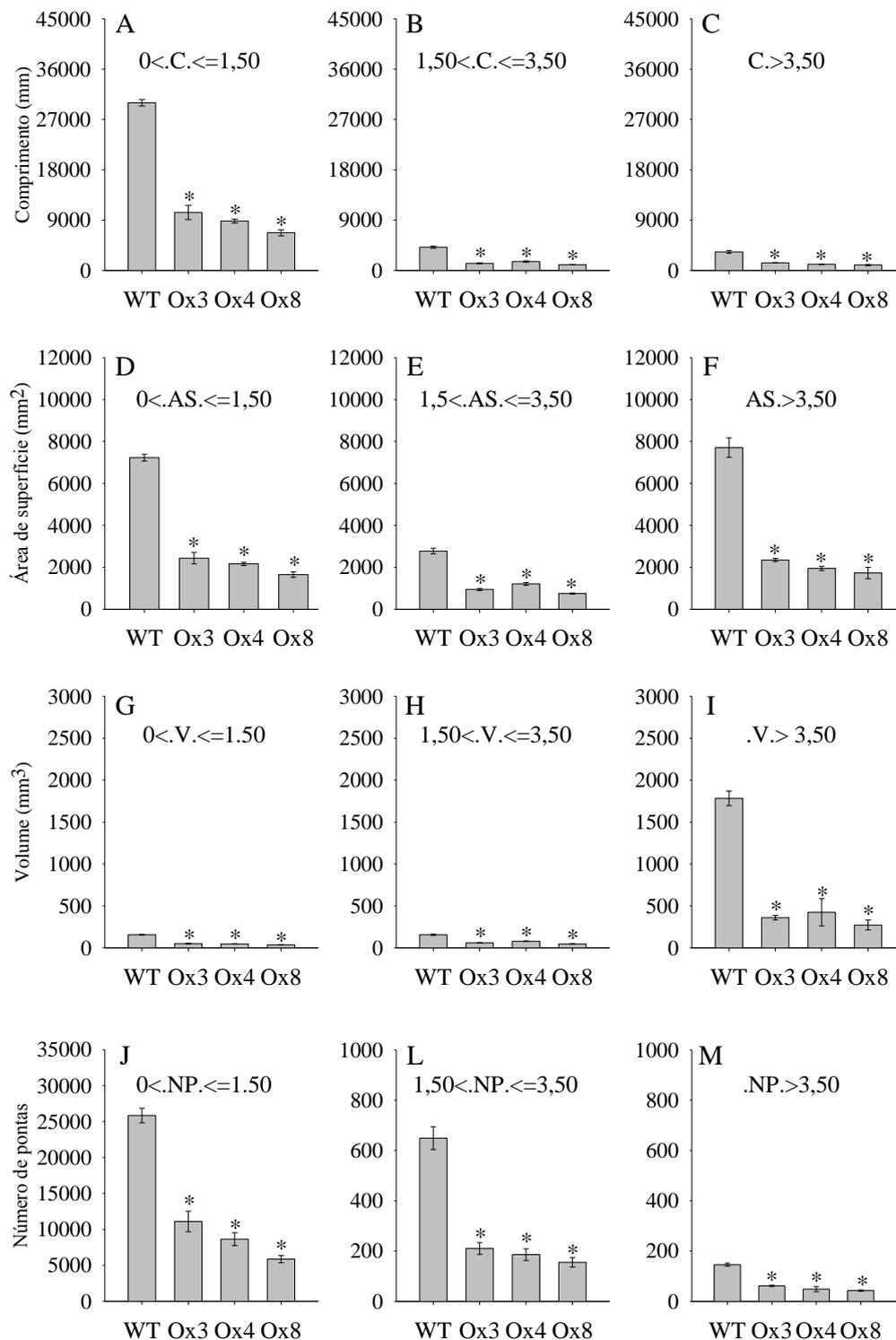


Figura 23. Parâmetros radiculares: comprimento, área de superfície, volume radicular e número de pontas dentro das classes de diâmetro: de 0 a 1,50 mm, 1,50 a 3,50 mm e maior que 3,50 mm, obtidos de raízes intactas, utilizando o software WinRizo Arabdopsis, das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3, Ox4 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis 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.

4.5 Segundo Experimento Utilizando as Linhagens Transformadas Superexpressando o Transportador *OsNPF4.11*

Em função da maior homogeneidade encontrada nos resultados observados no experimento anterior (item 4.4), foram escolhidas as linhagens Ox3 e Ox8 para dar continuidade aos experimentos.

4.5.1 Análise de Western Blot

O transportador *OsNPF4.11* é uma proteína de aproximadamente 60 kDa (UniProt Consortium, 2016), e com o intuito de saber se ela estava sendo corretamente superexpressa ou não nas raízes das linhagens transformadas foi realizado a análise de Western Blot, que é usado para detectar a presença de uma proteína específica, para a imunodeteccção do "tag" de HA (3xHA) ligado a proteína, e o perfil de expressão proteica mostrado na Figura 24 deixa evidente a superexpressão desse transportador, ou seja, a proteína pode apenas ser detectada nas linhagens transformadas.

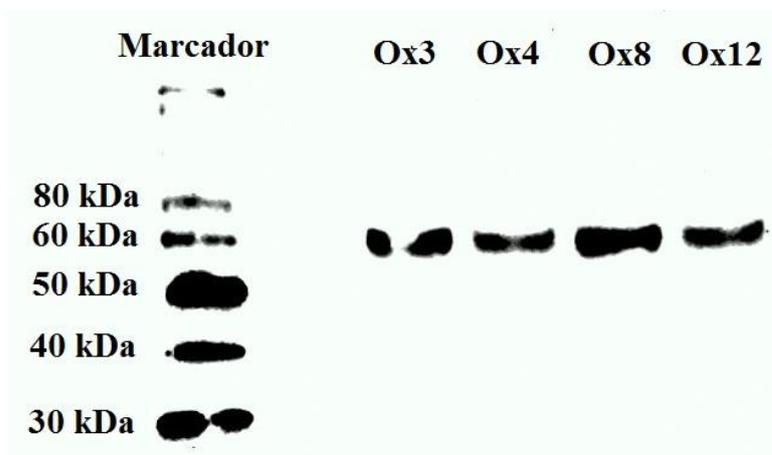


Figura 24. Análise de Western Blot a partir de proteínas extraídas das raízes das plantas WT e das linhagens transformadas superexpressando o transportador de NO_3^- *OsNPF4.11*.

4.5.2 Análise da expressão de genes transportadores de NO_3^-

Como podemos observar na Figura 25C, houve uma redução de expressão do transportador *OsNRT1.1* nas raízes em ambos os tratamentos estudados. Porém nas folhas não foram observadas diferenças significativas (Figura 25D).

Com relação aos transportadores envolvidos no carregamento do xilema (Lin et al., 2008; Xia et al., 2014), houve um aumento significativo de expressão do *OsNRT1.5* nas raízes em relação as plantas WT tanto no tratamento com 0,2 mM constante quanto no tratamento com 2 mM constante (Figura 25E), já nas folhas, apenas a Ox8 no tratamento 2 mM constante apresentou um aumento significativo em relação as plantas WT (Figura 25F). Não foram observadas nas raízes grandes diferenças de expressão para o transportador *OsNPF2.4*, apenas um pequeno incremento de aproximadamente 2 vezes na Ox3 no tratamento 0,2 mM constante, e de pouco mais de uma vez para a Ox8 no tratamento 2 mM constante (Figura 25G). Porém nas folhas houve um aumento significativo de expressão nas linhagens transformadas em ambos os tratamentos (Figura 25H).

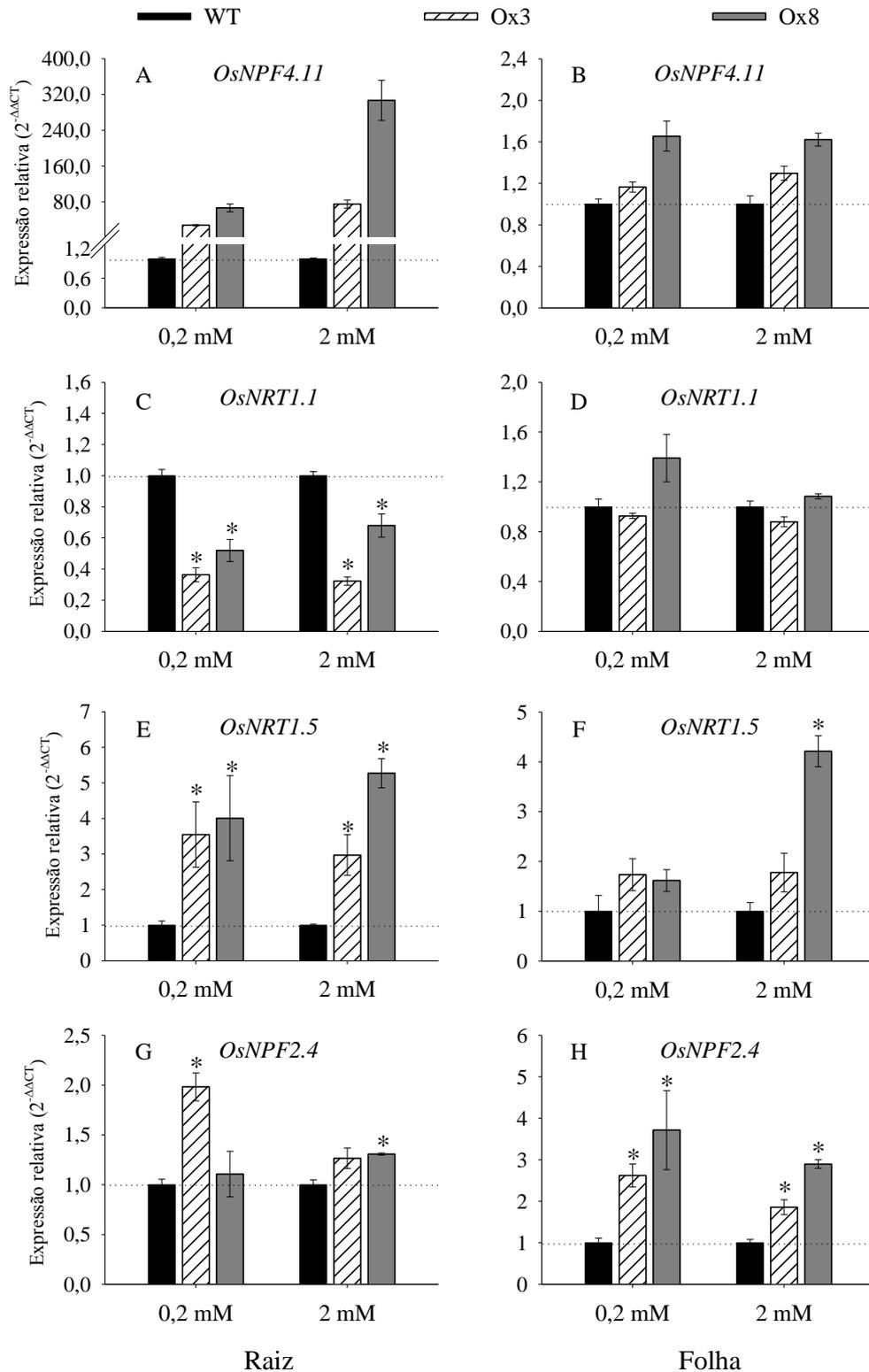


Figura 25. Expressão gênica relativa dos transportadores de nitrato em raízes (A, C, E e G) e folhas (B, D, F e H) das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 ou 2mM de N-NO₃⁻ por doze dias como única fonte de N, coletadas no 24° DAG após três horas 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.

Já com relação ao transportador *OsNPF7.2*, o qual está localizado na membrana do tonoplasto (Hu et al., 2016), nas raízes houve uma redução significativa de expressão (de até aproximadamente 75%) em ambas as linhagens nos dois tratamentos estudados (Figura 26A). Nas folhas, no tratamento com 2 mM constante, houve um aumento de expressão (de até aproximadamente 4 vezes) nas linhagens transformadas, porém no tratamento com 0,2 mM constante apenas a Ox3 apresentou um aumento significativo de expressão (Figura 26B).

Ambos transportadores de alta afinidade estudados (*OsNRT2.1* e 2.3) apresentaram uma redução de expressão nas raízes das linhagens transformadas, tanto no tratamento com 0,2 mM quanto 2 mM constante (Figura 26C e E). Nas folhas apenas no tratamento com 0,2 mM constante foram observadas reduções significativas nos níveis de expressão dos transportadores *OsNRT2.1* e 2.3 nas linhagens transformadas, sendo esta redução mais drástica no transportador *OsNRT2.1*, chegando até aproximadamente 99% (Figura 26D e E).

Da mesma forma que os transportadores de alta afinidade *OsNRT2.1* e 2.3, nas linhagens transformadas a proteína *NAR2.1* também apresentou uma redução de expressão nas raízes em ambos os tratamentos (Figura 27A), e nas folhas no tratamento com 0,2 mM constante (Figura 27B). Já nas folhas no tratamento com 2 mM constante as linhagens apresentaram comportamentos distintos em relação as plantas WT, a Ox3 apresentou uma redução significativa e a Ox8 um aumento significativo de expressão (Figura 27B).

Diferente da proteína *OsNAR2.1*, nas raízes, a proteína *OsNAR2.2* apresentou uma redução significativa em ambas as linhagens apenas no tratamento com 0,2 mM constante (Figura 27C). No tratamento com 2 mM constante o inverso ocorreu, ambas as linhagens apresentaram um pequeno aumento, porém sendo apenas significativo na Ox8 (Figura 27C). Nas folhas foram apenas observadas diferenças significativas no tratamento com 2 mM constante, onde a Ox3 apresentou uma redução de expressão em relação as plantas WT (Figura 27D).

Há duas prováveis teorias, a primeira seria de que a superexpressão do *OsNPF4.11* teria afetado a expressão do *OsNRT1.1* e esse por sua vez afetado a expressão dos transportadores de alta afinidade. Como já foi visto por Ho et al. (2009) o *OsNRT1.1* funciona como um sensor o qual controla a expressão dos transportadores de alta afinidade.

A segunda seria que o *OsNPF4.11*, assim como *OsNRT1.1* também poderia funcionar como um sensor, de modo que o aumento na sua expressão teve efeito sobre a expressão dos outros transportadores de NO_3^- . Essa teoria é suportada pelo fato de que no experimento realizado com as plantas silenciando o *OsNPF4.11*, nas raízes, a redução de expressão do mesmo também afetou a expressão dos outros transportadores de NO_3^- , porém nenhuma diferença de expressão entre as plantas transformadas e as plantas WT foi vista com relação ao *OsNRT1.1*.

Com relação ao gene da nitrato redutase (*OsNIA1*), nas raízes apenas a Ox3 apresentou uma redução significativa (Figura 27E), no entanto nas folhas, nos dois tratamentos, ambas as linhagens apresentaram uma redução significativa em relação as plantas WT (Figura 27F), chegando a uma redução de até aproximadamente 70%.

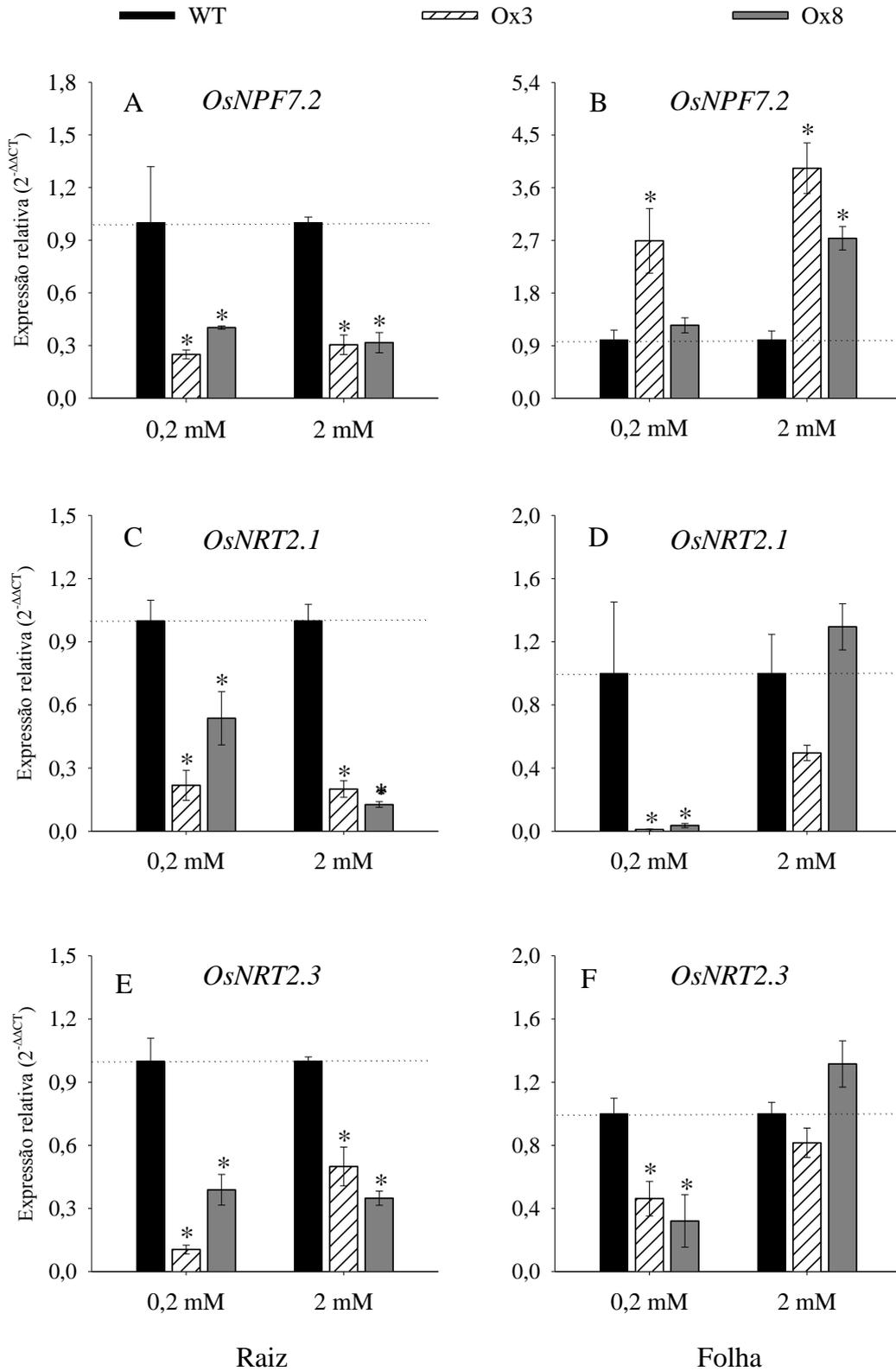


Figura 26. Expressão gênica relativa dos transportadores de nitrato em raízes (A, C e E) e folhas (B, D e F) das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 ou 2mM de $N-NO_3^-$ por doze dias como única fonte de N, coletadas no 24º DAG após três horas da troca de solução nutritiva. As barras indicam o erro padrão da média.

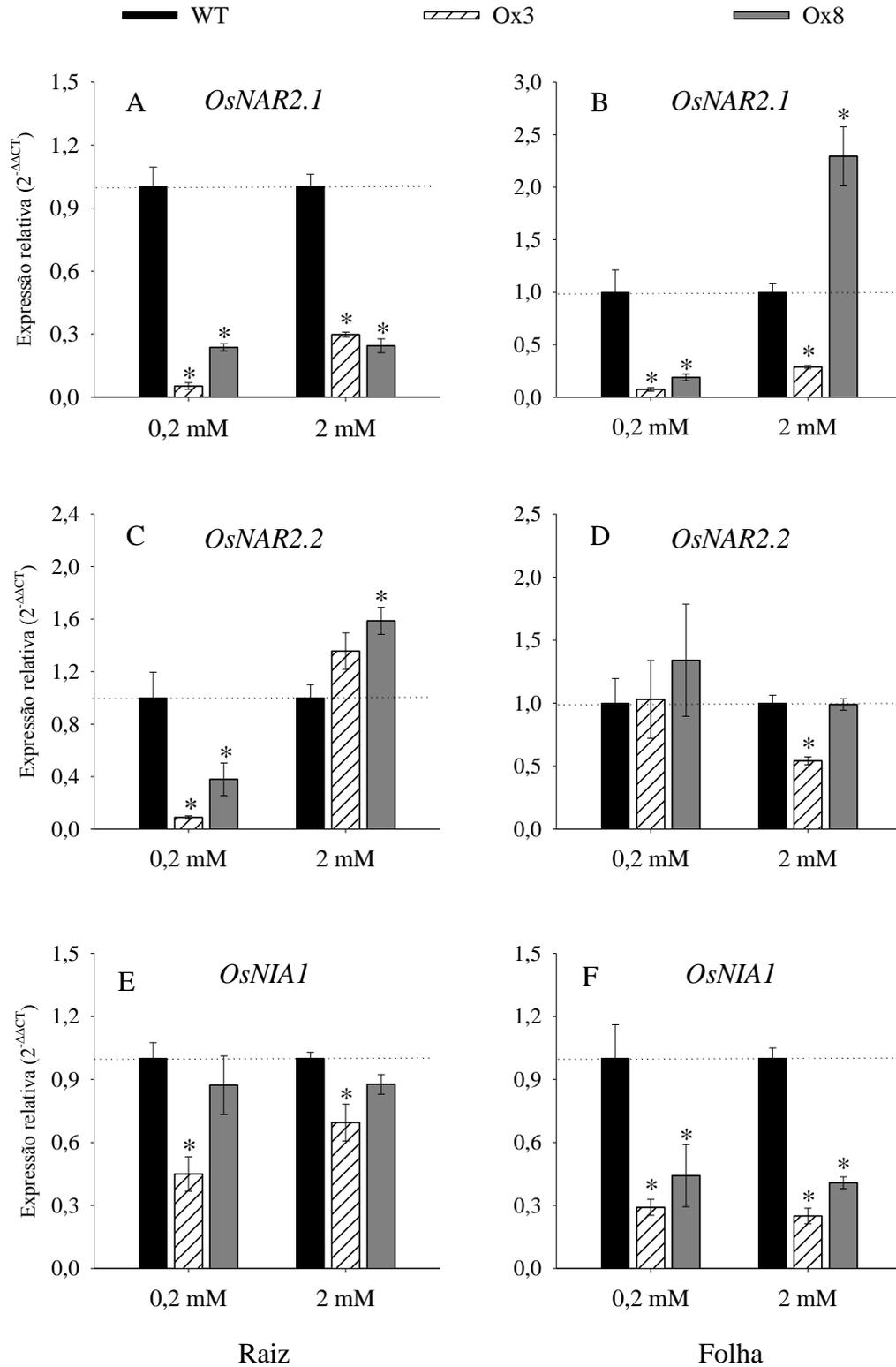


Figura 27. Expressão gênica relativa das proteínas acessórias *OsNR2.1* e *OsNAR2.2*, e da enzima de assimilação de NO_3^- *OsNIA1* em raízes (A, C e E) e folhas (B, D e F) das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 ou 2mM de N-NO_3^- por doze dias como única fonte de N, coletadas no 24° DAG após três horas da troca de solução nutritiva. As barras indicam o erro padrão da média.

4.5.3 Análise de enzimas do metabolismo de nitrogênio

Como pode ser observado na Figura 28A, nas raízes houve um aumento significativo da atividade da enzima GS nas linhagens transformadas em relação as plantas WT em ambos os tratamentos, porém nas folhas foi observado na Ox8 uma redução na atividade no tratamento com 0,2 mM constante e na Ox3 no tratamento com 2 mM constante (Figura 28B).

O arroz possui três genes homólogos, porém distintos para a glutamina sintetase citosólica (OsGS1;1, OsGS1;2 e OsGS1;3) e um para a plastidial (OsGS2). OsGS1;1 é constitutivamente expressa, apresentando um maior perfil de expressão na lamina foliar, e é importante para a remobilização do N durante a senescência natural. OsGS1;2 é constitutivamente expressa nas células superficiais das raízes e é responsável pela assimilação primária do NH_4^+ . OsGS1;3 é exclusivamente expressa na espiguetta, indicando sua importância no enchimento dos grãos e na germinação das sementes. OsGS2 está presente nos plastídios e é expressa tanto nas raízes como nas folhas e está envolvida na assimilação do NH_4^+ proveniente da redução do NO_3^- , assim como é essencial para reassimilar o amônio liberado pela fotorrespiração (Ishiyama et al., 2004; Masclaux-Daubresse et al., 2010; Huang et al., 2018). No presente trabalho foi analisado a atividade global da GS incluindo todas as isoformas.

Já com relação a enzima NADH-GOGAT, nas raízes foi observada uma menor atividade nas linhagens transformadas em ambos tratamentos (Figura 28C). Porém nas folhas o oposto ocorreu, todas as linhagens apresentaram um aumento significativo em relação as plantas WT nos dois tratamentos estudados (Figura 28D). Em arroz existem três isoformas da GOGAT, uma ferredoxina dependente e outras duas NADH dependentes. OsFd-GOGAT é localizada predominantemente nos cloroplastos das folhas, sendo importante na reassimilação do NH_4^+ proveniente da fotorrespiração no cloroplasto (Masclaux-Daubresse et al., 2010; Huang et al., 2018). OsNADH-GOGAT é localizada principalmente em plastídios de tecidos não fotosintéticos, como raízes, tecidos de folhas estioladas e células companheiras (Masclaux-Daubresse et al., 2010), sendo a OsNADH-GOGAT1 é expressa principalmente nas células superficiais da raiz e é importante para a assimilação primária do NH_4^+ e a OsNADH-GOGAT2 principalmente expressa nos tecidos vasculares de folhas maduras e é importante no processo de geração da glutamina em folhas senescentes para a remobilização do N através do floema para a panícula durante a senescência natural (Yamaya e Kusano, 2014; Huang et al., 2018).

Foi também analisada a atividade da enzima GDH tanto no sentido de aminação (Figura 28E e F), quanto de desaminação (Figura 28G e H). Em arroz existem duas isoformas de GDH, uma localizada na mitocôndria e dependente de NADH como doador de elétrons e uma outra localizada nos cloroplastos dependente de NADPH (Souza e Fernandes, 2006). A GDH pode atuar tanto no sentido de aminação, promovendo a aminação redutiva reversível do α -cetogluturato, formando glutamato, quanto no sentido de desaminação, catalisando a oxidação do glutamato a α -cetogluturato, fornecendo assim esqueletos de carbono para o ciclo de Krebs sob condições de limitação de carbono (Souza e Fernandes, 2006). No sentido de aminação, nas raízes apenas a Ox8 no tratamento com 2 mM constante apresentou um aumento significativo na atividade em relação as plantas WT (Figura 28E). Já nas folhas nos dois tratamentos ambas as linhagens apresentaram um aumento significativo em relação as plantas WT (Figura 28F). Não foram observadas diferenças significativas no tratamento com 0,2 mM tanto nas raízes (Figura 28E), quanto nas folhas (Figura 28F).

No sentido de desaminação, nas linhagens transformadas, foi apenas observado um aumento significativo nas raízes no tratamento com 2 mM constante (Figura 28G). Nas raízes no tratamento com 0,2 mM e nas folhas em ambos tratamentos não foram observadas diferenças significativas (Figura 28G e H).

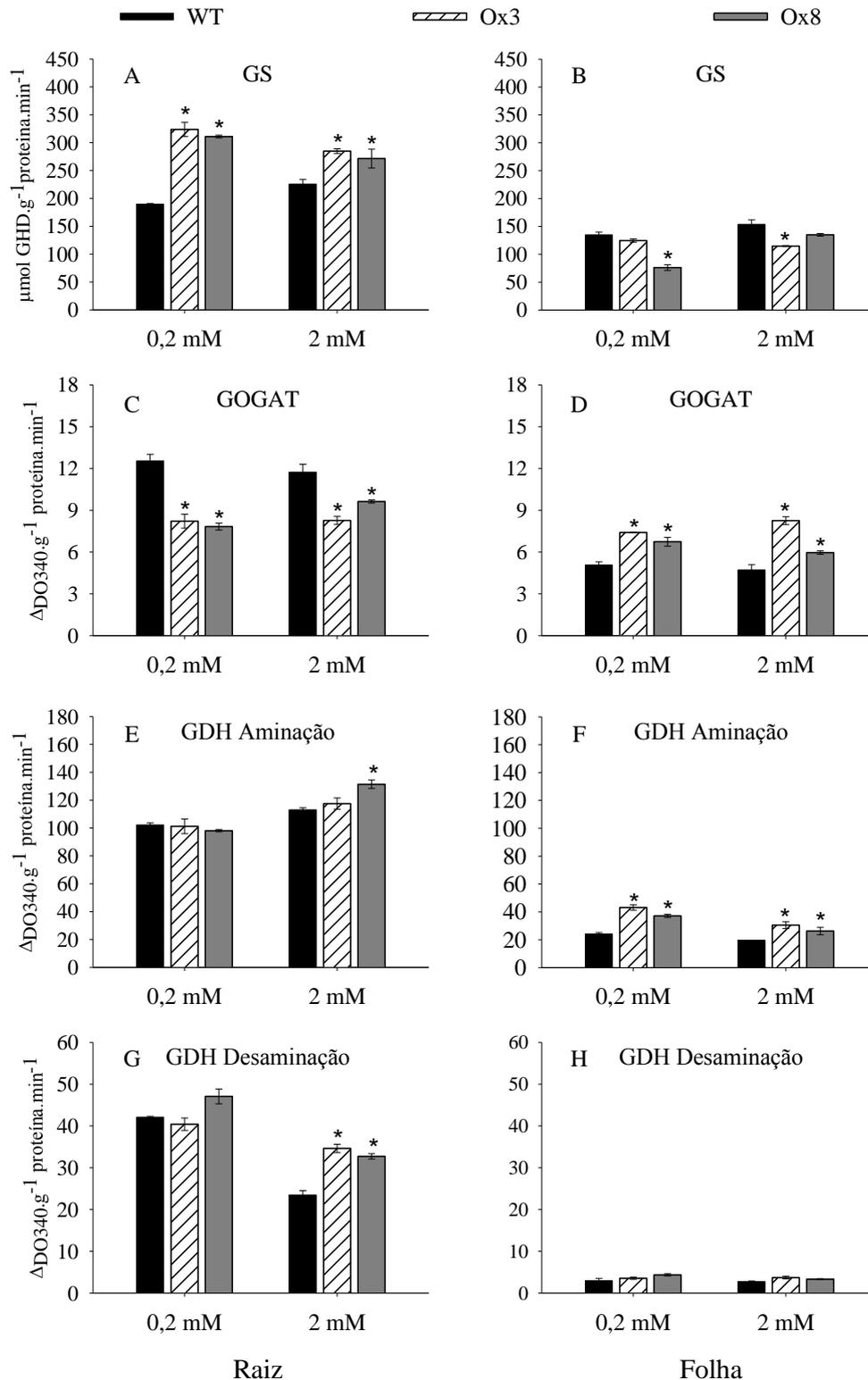


Figura 28. Atividade das enzimas do metabolismo de N: GS, NADH-GOGAT e GDH aminoação e desaminação, em raízes (A, C, E e G) e folhas (B, D, F e H) das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 ou 2mM de N-NO₃⁻ por doze dias como única fonte de N, coletadas no 24° DAG após três 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.

4.5.4 Análise das frações nitrogenadas e açúcares solúveis

Embora tenha sido observado uma menor expressão dos transportadores de alta afinidade, assim como uma menor expressão das proteínas NAR2.1 e NAR2.2, como podemos observar na Figura 29A, no tratamento com 0,2 mM constante não foram observadas diferenças significativas nos teores de NO_3^- nas raízes entre as linhagens transformadas e as plantas WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). Porém nas bainhas foi observada uma pequena redução na Ox8 em relação as plantas WT (Figura 29C), e nas folhas foi observada em ambas as linhagens uma redução significativa nos teores (Figura 29E). Isso provavelmente ocorreu pelo fato de que as linhagens transformadas apresentaram uma redução na expressão do *OsNRT2.3a* nas raízes, e como já foi demonstrado por Tang et al. (2012) esse transportador é o principal responsável pelo transporte a longa distância de NO_3^- , da raiz para a parte aérea, quando o mesmo se encontra sob baixa disponibilidade. Desta forma isso pode ter gerado um acúmulo de NO_3^- nas raízes das plantas transformadas, igualando assim os teores das plantas WT.

Uma outra teoria seria de que a superexpressão do *OsNPF4.11* teria contribuído para a absorção de NO_3^- , porém quando cultivadas com 2 mM constante (faixa de atuação dos NPF), as linhagens transformadas apresentaram menores teores de NO_3^- nas raízes em relação as plantas WT (Figura 29A), o que torna essa teoria muito pouco provável. Pelo contrário, uma forte evidência de que as plantas transformadas apresentaram uma menor absorção de NO_3^- em relação as plantas WT é que com relação ao conteúdo de N- NO_3^- nos tecidos, as duas linhagens tiveram nos dois tratamentos e em todos os tecidos, um menor conteúdo comparado com as plantas WT (Figura 30), corroborando assim com o fato de que a superexpressão do transportador *OsNPF4.11* afetou significativamente a absorção desse íon, isso pode ter ocorrido em função da redução nos níveis de expressão dos transportadores de alta afinidade e das proteínas NAR.

Já foi demonstrado que em plantas de *Arabidopsis* a deleção do gene *NRT2.1* resultou em uma redução na absorção e na acumulação de NO_3^- nas plantas mutantes (Little et al., 2005), assim como a interrupção conjunta dos transportadores de alta afinidade (*AtNRT2.1* e *2.2*) reduziu significativamente o influxo de NO_3^- nas plantas mutantes em relação as plantas WT, causando uma redução de até aproximadamente 70% no HATS (Cerezo et al., 2001; Filleur et al., 2001; Li et al., 2007). Também Yan et al. (2011) observaram que o silenciamento do *OsNAR2.1* por RNA interferente resultou na supressão da expressão dos transportadores *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNRT2.3a* nas plantas mutantes, e que não só o transporte de alta como baixa afinidade foram altamente comprometidos.

Uma outra evidencia de uma menor absorção de NO_3^- pelas plantas transformadas é em relação a expressão do gene da nitrato redutase (*NIA1*), onde nas raízes as linhagens transformadas apresentaram uma igual ou menor expressão, e nas folhas uma menor expressão em comparação com as plantas WT. Klein et al. (2000) caracterizando o modelo de expressão da Nitrato redutase observou que a mesma foi reprimida sob baixa disponibilidade de NO_3^- e induzida sob alta disponibilidade.

As duas linhagens transformadas apresentaram nas raízes, em ambos tratamentos estudados, teores mais elevados de N- NH_4^+ em relação as plantas WT (Figura 29B). Na bainha, apenas no tratamento com 0,2 mM constante foram observadas diferenças significativas entre as linhagens e as plantas WT, onde as linhagens apresentaram teores mais elevados (Figura 29D). Já na folha, o efeito foi similar ao das raízes, onde nos dois tratamentos estudados, as duas linhagens apresentaram maiores teores em relação as plantas WT (Figura 29F).

Os teores mais elevados de NH_4^+ pode ser em função do estresse ocasionado pela menor absorção de N pelas plantas transformadas, de modo que para suprir a demanda por N, o mesmo

está sendo remobilizado, gerando assim NH_4^+ . Como já mencionado anteriormente, durante o processo de degradação de proteínas, como o que ocorre em folhas senescentes, aminoácidos são gerados e transportados via floema, porém alguns desses aminoácidos gerados são ainda mais degradados gerando NH_4^+ livre nas células (Bernard e Habash, 2009). Uma evidência de que os maiores teores de NH_4^+ observado é em função de um provável estresse sofrido pelas linhagens transformadas e não de uma maior assimilação pelas mesmas, é que nas folhas foi observado uma maior atividade da NADH-GOGAT, porém uma menor ou uma igual atividade da GS e uma menor expressão da NIA1, a qual é responsável pela assimilação primária do NO_3^- . Além disso, foi observado uma maior atividade da GDH no sentido de aminação nas plantas transformadas. Já foi demonstrado que em folhas senescentes ocorre uma redução na atividade da GS e da GOGAT, concomitante com um aumento na atividade de aminação da GDH, assim como plantas tolerantes a salinidade e ao amônio, apresentaram um aumento na atividade da GDH no sentido de aminação, indicando que a GDH é uma proteína responsiva ao estresse (Skopelitis et al., 2006).

Também foi observado que as plantas transformadas apresentaram uma maior atividade da GS nas raízes, porém uma menor atividade da NADH-GOGAT, a qual é principal forma da GOGAT encontrada nos plastídios das raízes, responsável pela assimilação do NH_4^+ proveniente da redução do NO_3^- (Masclaux-Daubresse et al., 2010) e uma menor ou igual expressão da NIA1. Desta forma a maior atividade da GS observada nas raízes, pode ser de isoformas responsáveis por reassimilar o N de remobilização (OsGS1;1), proveniente, por exemplo, do catabolismo de aminoácidos.

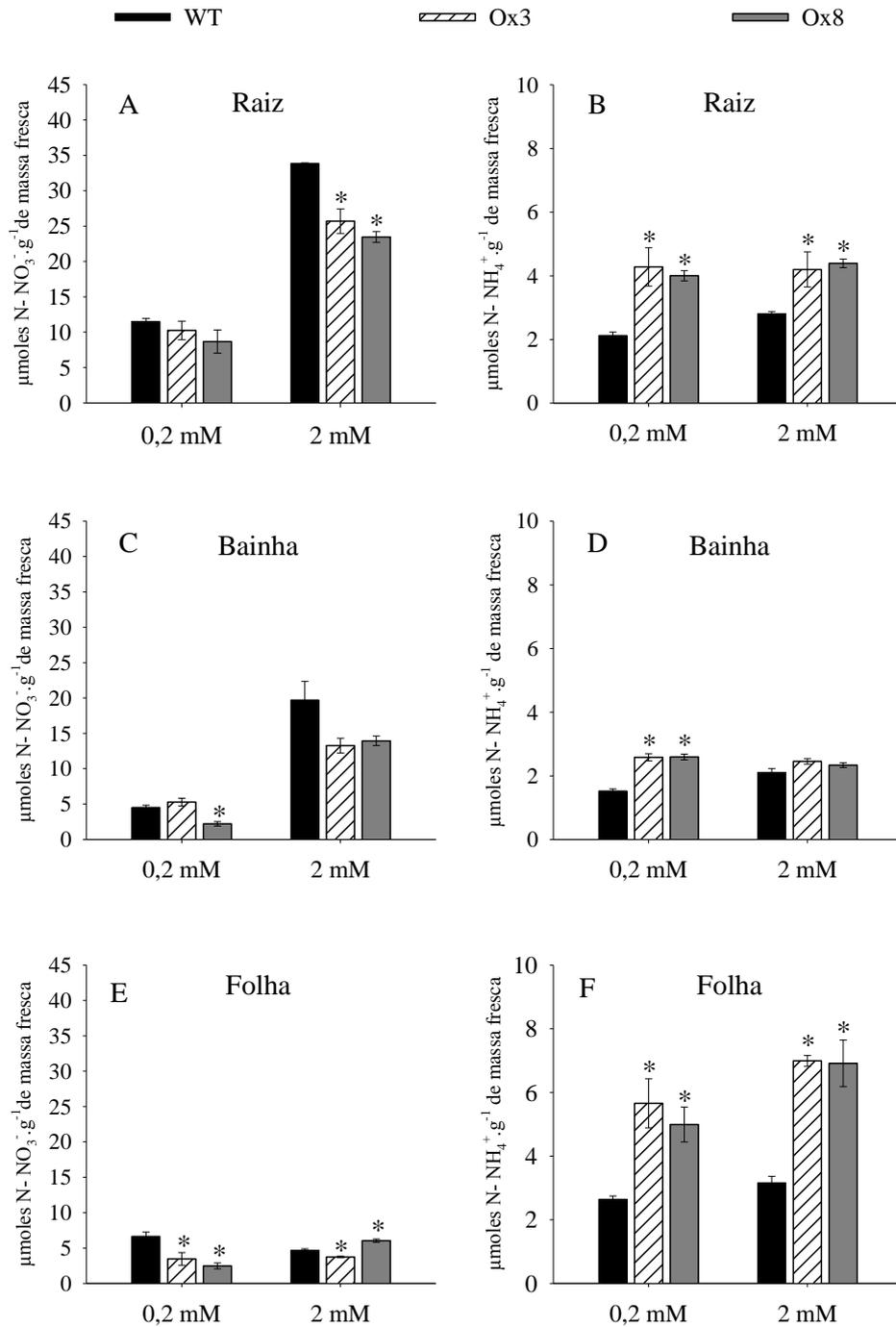


Figura 29. Teores de N-NO_3^- (A, C e E) e N-NH_4^+ (B, D e F) na folhas, bainhas e raízes das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 ou 2mM de N-NO_3^- por doze dias como única fonte de N, coletadas no 24° DAG após três horas da troca de solução 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.

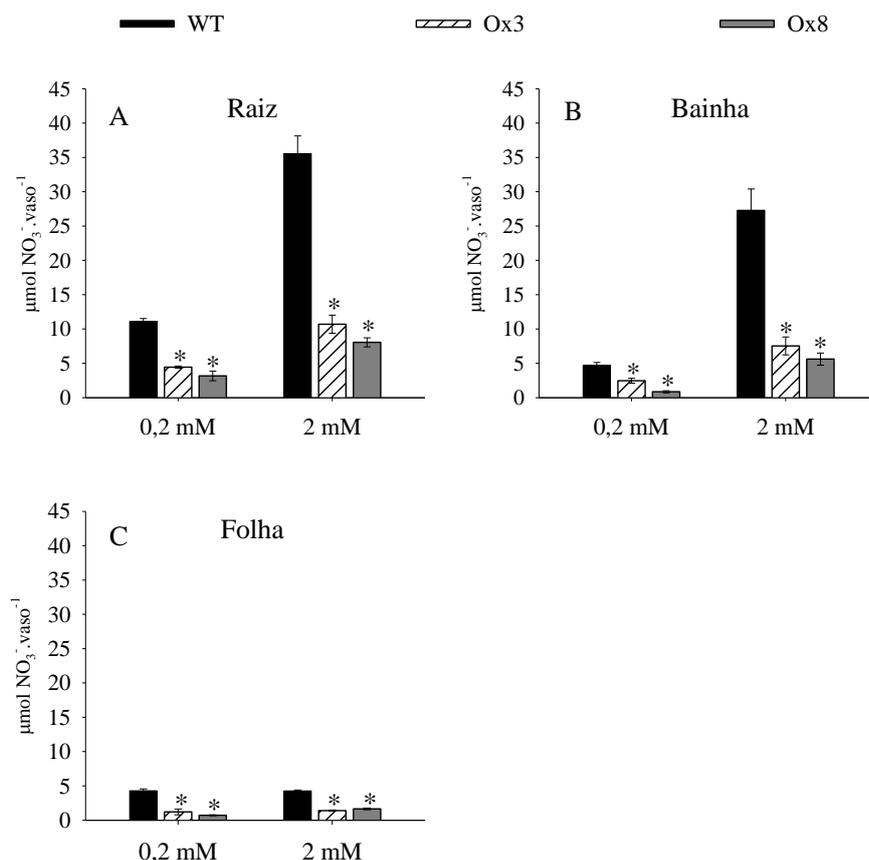


Figura 30. Conteúdo de N-NO_3^- na folhas, bainhas e raízes das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 ou 2mM de N-NO_3^- por doze dias como única fonte de N, coletadas no 24° DAG após três horas da troca de solução nutritiva. Asterisco indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média.

Na raiz, no tratamento com 0,2 mM constante ambas as linhagens apresentaram teores mais elevados de N-amino em comparação com as plantas WT (Figura 31A). Já no tratamento com 2 mM constante não foram observadas diferenças significativas (Figura 31A). Na bainha houve apenas um pequeno aumento na Ox3 no tratamento com 0,2 mM e na Ox8 no tratamento com 2 mM constante (Figura 31C). Porém nas folhas em ambos tratamentos as duas linhagens apresentaram teores mais elevados em relação as plantas WT (Figura 31E).

Como já mencionado anteriormente não há indícios no presente trabalho de que os maiores teores de N-amino sejam decorrentes de uma maior assimilação do NO_3^- pelas plantas transformadas em relação as plantas WT. Os maiores teores de N-amino observados podem ser em função de uma maior remobilização do N nas plantas transformadas em função do estresse ocasionado pela falta de N. Vários estudos mostram que o estresse provocado pela deficiência de N pode causar alterações no metabolismo de proteínas e aminoácidos nas raízes, como já observado em plantas de trigo (Moller et al., 2011). Sob condições limitantes de N, várias mudanças fisiológicas e bioquímicas podem ocorrer no metabolismo vegetal, incluindo, remobilização das folhas velhas para as partes reprodutivas, diminuição do crescimento e fotossíntese e acúmulo de antocianina (Kant et al., 2011). Sob determinadas condições de estresse as plantas podem apresentar um acúmulo de aminoácidos, como já demonstrado que plantas de tomate sob estresse hídrico apresentaram uma redução nos teores de proteína e um aumento nos teores de aminoácidos livres nas folhas, isso em função de um

aumento na remobilização do N para suprir a demanda dos órgãos em desenvolvimento (Bauer et al., 1997). Além do acúmulo de aminoácidos em função da remobilização do N, plantas sob estresse também apresentam altos teores de aminoácidos responsivos a estresse, como por exemplo a prolina (Rai, 2002). Esses aminoácidos podem desempenhar diversas funções nas plantas, como por exemplo regulação osmótica, regulação do transporte de íons, desintoxicação de metais pesados, etc (Rai, 2002). Porém para melhores conclusões seriam necessárias análises do perfil completo dos aminoácidos, utilizando, por exemplo, Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

No que diz respeito aos teores de açúcares solúveis, nas raízes apenas no tratamento com 0,2 mM constante foram observadas diferenças significativas, onde as linhagens transformadas apresentaram menores teores em comparação com as plantas WT (Figura 31B). Na bainha apenas a Ox3 no tratamento com 0,2 mM constante apresentou uma pequena redução em relação as plantas WT (Figura 31D). Na folha, embora não significativo, todas as linhagens, em ambos os tratamentos, apresentaram teores de açúcares solúveis inferiores as plantas WT (Figura 31F).

O metabolismo de carbono e N estão estreitamente ligados um com o outro, de modo que para a assimilação do N é fornecido do metabolismo carbono ATP, poder redutor, e esqueletos de carbono através da fotossíntese, fotorrespiração e respiração (Huang et al., 2018). Desta forma uma provável hipótese para os menores teores de açúcares observados pode ser em função de que esses metabólitos podem estar sendo usados para a reassimilação do N.

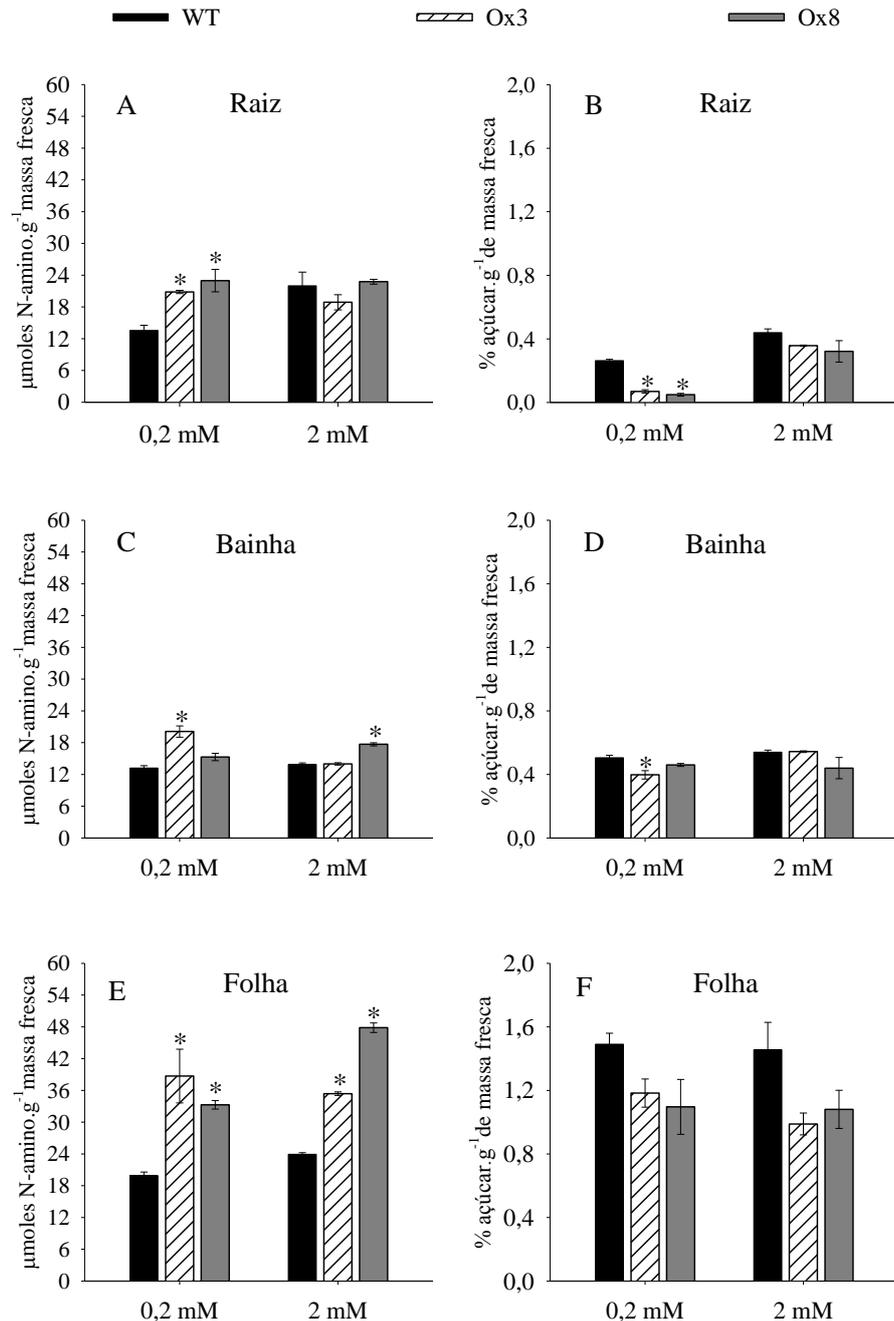


Figura 31. Teores de N-amino (A, C e E) e porcentagem de açúcares solúveis (B, D e F) na folhas, bainhas e raízes das plantas WT e das linhagens transformadas Ox3 e Ox8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 ou 2mM de N-NO_3^- por doze dias como única fonte de N, coletadas no 24° DAG após três 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.

4.5.5 Análise dos parâmetros morfológicos

Para corroborar ainda mais com a ideia de que as plantas transformadas estavam sob estresse em função de uma menor absorção de NO_3^- pelas mesmas, e que como podemos observar na Figura 32, houve uma redução na massa fresca de raiz (Figura 32A) e parte aérea (Figura 32B) nas linhagens transformadas em relação as plantas WT, em ambos os

tratamentos estudados. O N é um dos elementos minerais requeridos em maior quantidade pelas plantas e o que mais limita o crescimento (Souza e Fernandes, 2006), de modo que a deficiência do mesmo pode acarretar em sérias limitações no crescimento das plantas.

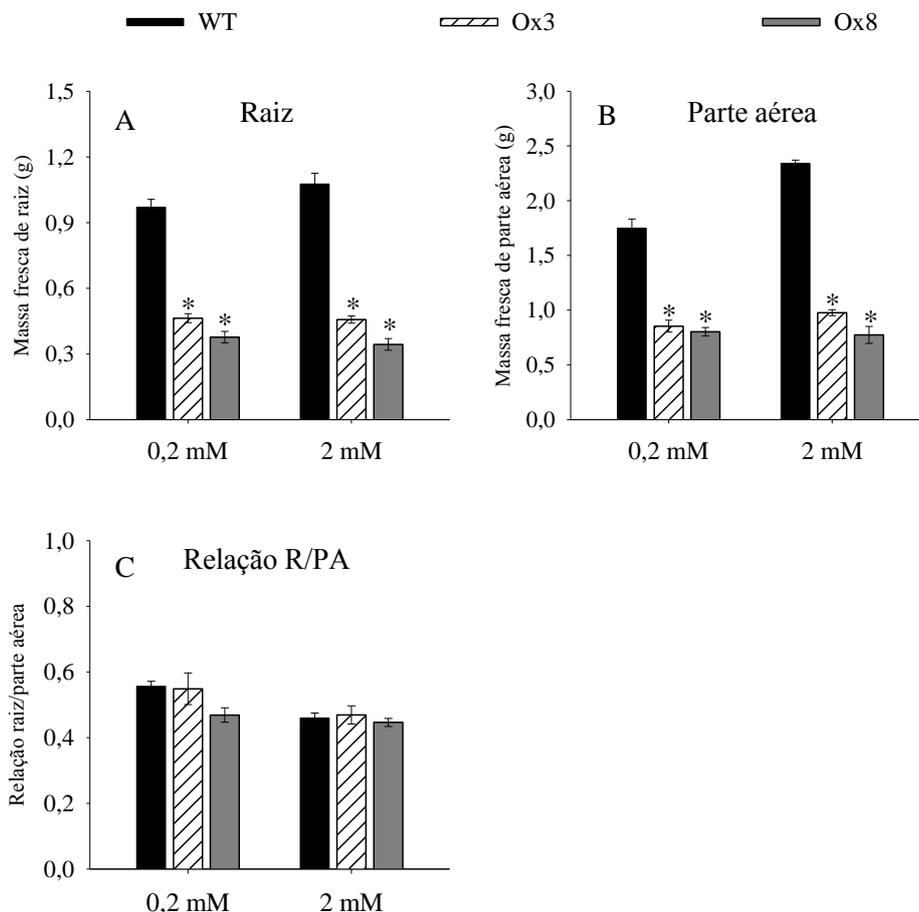


Figura 32. Massa fresca de raiz e parte aérea, e relação raiz/parte aérea das plantas WT e das linhagens transformadas, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 ou 2mM de N-NO₃⁻ por doze dias como única fonte de N, coletadas no 24° DAG após três horas da troca de solução nutritiva. Asterisco indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet (p<0,05). As barras indicam o erro padrão da média.

4.6 Experimento em Casa de Vegetação

4.6.1 Análise dos parâmetros morfológicos

Independente do tratamento (com ou sem adubação), todas as linhagens, com exceção da L#41 quando cultivada sem adubação, apresentaram uma menor produtividade em relação as plantas WT (Tabela 5). Isso pode ter ocorrido em função de um menor número de espiguetas férteis, pois como pode ser observado na Tabela 5, todas as linhagens, com exceção da L#41 quando cultivada sem adubação, apresentaram um maior índice de esterilidade da espiguetas (IEE) quando comparadas com as plantas WT.

De um modo geral, tanto o aumento (superexpressão) quando a redução (silenciamento) nos níveis de expressão do *OsNPF4.11* resultou em plantas menores, pois como podemos observar na Tabela 5, todas as linhagens, com exceção da L#41 quando cultivada sem

adubação, apresentaram uma menor altura do maior perfilho em relação as plantas WT em ambas as condições de cultivo (com e sem adubação).

Plantas com um porte mais baixo, assim como um menor enchimento dos grãos e como consequência uma maior esterilidade das espiguetas e uma menor produção, pode ser em função de uma menor absorção e/ou remobilização do N pelas linhagens transformadas. Freitas et al. (2007) e Buzetti et al (2006) observaram em diferentes cultivares de arroz um aumento de produtividade de acordo com o aumento na dose de N, assim como já foi demonstrado que há uma correlação positiva entre as doses de N aplicada e a altura das plantas (Buzetti et al., 2006; Lopes et al., 2017). Também plantas defectivas na assimilação do N apresentaram uma redução na massa seca de parte aérea (de até 39%), peso de panícula (até 47%), número de espiguetas por panícula (até 39%) e no número de grãos cheios (até 25%), acarretando numa perda de produção (Tamura et al., 2011). Desta forma a menor absorção de N pelas plantas transformadas pode ter afetado o status interno de N nas plantas, resultando assim nas características observadas.

Tabela 4. Produtividade, índice de esterilidade da espiguetas (IEE), número de perfilhos (N° perfilhos), altura do maior perfilho (Altura MP), massa fresca da parte aérea (MF Parte Aérea) e massa fresca da panícula (MF Panícula) das linhagens transformadas silenciando (L#63 e L#41) e superexpressando (Ox3 e Ox8) o transportador de NO_3^- *OsNPF4.11* cultivadas em casa de vegetação sob dois tratamentos: 0 Kg N/ha (Sem adubação) e 100 Kg N/ha (Com adubação).

Linhagem	Produtividade (ton/ha)	IEE (%)	N° Perfilhos	Altura MP (cm)	MF Parte Aérea (g)	MF Panícula (g)
Sem adubação						
WT	3,62	31,28	4,00	41,07	17,99	11,43
L#63	1,67*	67,45*	5,83*	33,97*	19,92	7,63*
L#41	2,86	42,60	5,33	36,53	18,46	9,90
Ox3	1,23*	61,05*	4,50	34,02*	16,45	6,64*
Ox8	2,01*	49,78*	5,33	33,83*	12,07*	6,89*
Com adubação						
WT	5,21	35,13	5,83	44,33	18,69	14,69
L#63	1,59*	78,45*	7,33	32,97*	14,87	7,72*
L#41	3,50*	55,59*	7,17	34,93*	16,86	11,80*
Ox3	1,90*	73,25*	7,00	39,10*	20,88	9,24*
Ox8	2,21*	75,15*	6,33	36,13*	15,66	8,74*

* Asterisco indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$)

4.6.2 Análise de N-total e eficiência no uso de N

Quando cultivadas com adubação, todas as linhagens apresentaram um maior teor de N nas bainhas, folhas e grãos, assim como um maior teor de proteína nos grãos (Figura 33A, C, E e G). Quando cultivadas sem adubação nenhuma diferença significativa foi observada, exceto na Ox8 com relação ao teor de N nas folhas, onde a mesma apresentou maiores teores (Figura 33C).

No que diz respeito ao conteúdo de N, quando as plantas foram cultivadas sem adubação, apenas foram observadas diferenças significativas nos grãos, onde todas as linhagens, com exceção da L#41, apresentaram um menor conteúdo em relação as plantas WT (Figura 33F). Nesta mesma condição as linhagens, com exceção da L#41, também apresentaram um menor conteúdo de proteína nos grãos (Figura 33H). Quando cultivadas com adubação, na bainha apenas a Ox3 apresentou um maior conteúdo de N em relação as plantas WT (Figura 33B). Na folha, com exceção da L#63, todas as linhagens apresentaram um maior conteúdo de N (Figura 33D). Em relação ao conteúdo de N nos grãos, assim como o conteúdo

de proteína nos grãos, com exceção da L#41, todas as linhagens apresentaram uma redução em relação as plantas WT (Figura 33F e H).

O maior conteúdo de N observado nas folhas das linhagens transformadas quando as mesmas foram adubadas pode ser em função de uma menor remobilização do N para os grãos, resultando no menor conteúdo de N nos grãos observados, independente se as plantas foram adubadas ou não.

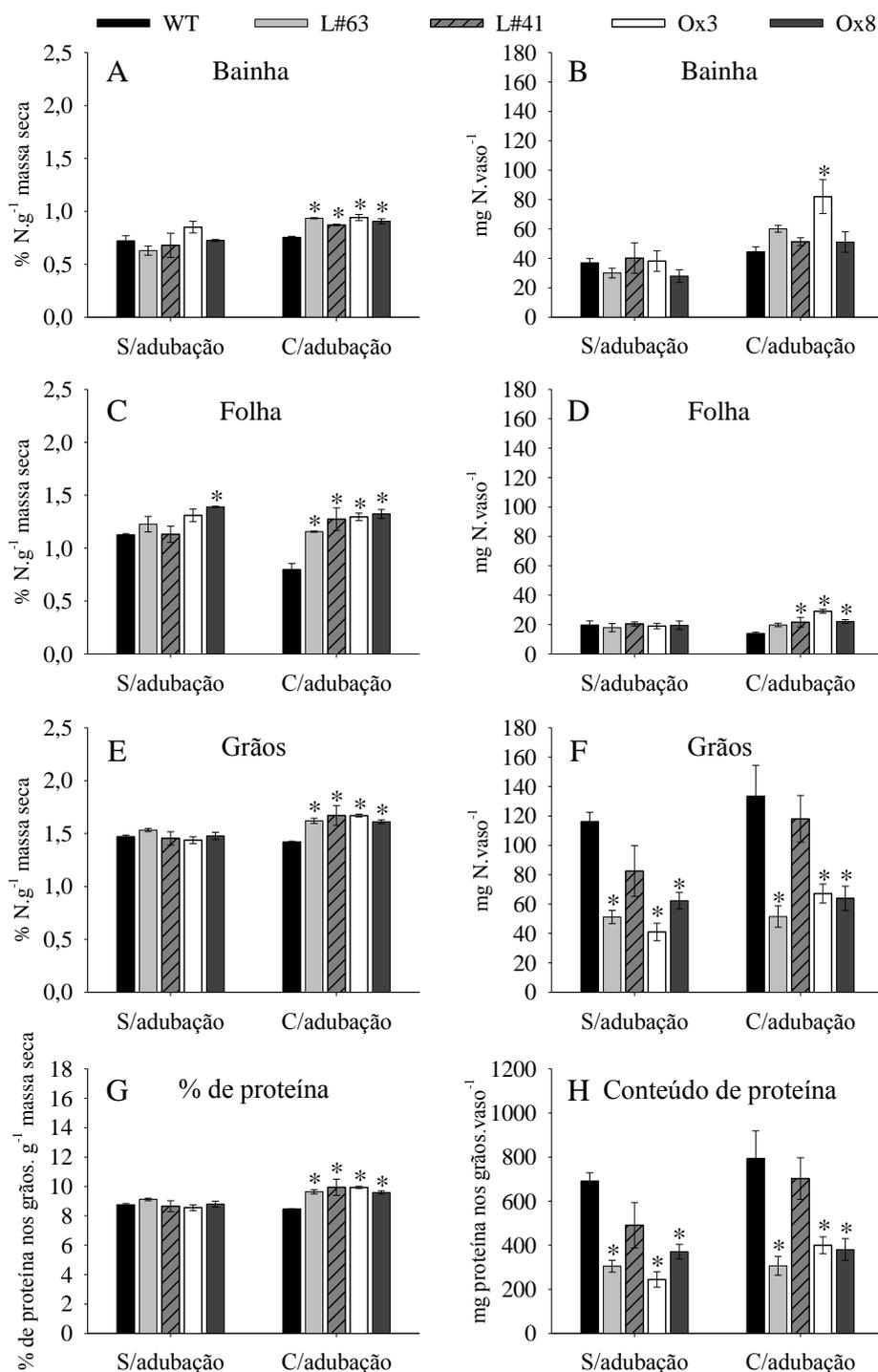


Figura 33. Porcentagem de N-total (A, C e E), conteúdo de N (B, D e F), porcentagem de proteína nos grãos (G) e conteúdo de proteína nos grãos (H), das linhagens transformadas silenciando (L#63 e L#41) e superexpressando (Ox3 e Ox8) o transportador de NO_3^- *OsNPF4.11* cultivadas em casa de vegetação sob dois tratamentos: 0 Kg N/ha (Sem adubação) e 100 Kg N/ha (Com adubação). 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.

Durante a senescência as folhas funcionam como fonte de N para o enchimento dos grãos, o qual é transportado via floema principalmente na forma de aminoácidos após a degradação das proteínas existentes nas folhas (Huang et al., 2018). Em arroz até 80% do N

presente nos grãos é derivado das folhas (Kant et al.,2011). Plantas com deficiência na remobilização do N das folhas para os grãos apresentaram panículas menores, um maior índice de esterilidade da espiguetas e uma menor produtividade (Yamaya e Kusano, 2014). Desta forma os resultados aqui encontrados sugerem que de alguma forma a alteração nos níveis de expressão do OsNPF4.11 influenciou na remobilização do N das folhas para os grãos durante a senescência natural das plantas.

Apenas foram calculadas as eficiências de absorção, utilização e uso de N quando as plantas foram cultivadas com adubação, pois foi admitido como desprezível o teor de N disponível no solo (0%), desta forma ao se proceder os cálculos o resultado de todas as eficiências seria 0.

Todas as linhagens apresentaram uma menor EUN em relação as plantas WT, porém apenas as linhagens L#63 e Ox8 apresentaram uma menor EAbN em relação as plantas WT (Tabela 6). Todas as linhagens, com exceção da L#41, também apresentaram um menor EUtN em relação as plantas WT (Tabela 6).

Tabela 5. Eficiência na absorção de N (EAbN), eficiência na utilização de N (EUtN) e eficiência no uso de N (EUN) das linhagens transformadas silenciando (L#63 e L#41) e superexpressando (Ox3 e Ox8) o transportador de NO_3^- *OsNPF4.11* cultivadas em casa de vegetação adubadas com 100 Kg N/ha (tratamento com adubação).

Linhagem	EAbN(mg N planta/ Kg N aplicado)	EUtN(mg N grãos/Kg N aplicado)	EUN (Kg grãos por planta/Kg N aplicado)
Com adubação			
WT	1,92	1,33	26,03
L#63	1,31*	0,52*	7,96*
L#41	1,91	1,18	17,52*
Ox3	1,78	0,67*	9,49*
Ox8	1,37*	0,64*	9,61*

* Asterisco indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$)

Como função de múltiplas interações entre fatores ambientais e genéticos, a NUE é inerentemente complexa, assim como sua definição, podendo significar coisas diferentes em diferentes contextos, os quais incluem Eficiência no uso de N (EUN) (biomassa total ou grão produzido por unidade de N aplicado), Eficiência na absorção de N (EAbN) (capacidade das raízes em adquirir N do solo), Eficiência na assimilação de N (EAN) (fração do N adquirido a ser convertido em biomassa total ou produção de grãos), Taxa de recuperação aparente de N (TRA) (taxa de aumento líquido do N total absorvido pela planta, com e sem fertilização nitrogenada, pela quantidade total de N aplicado), Eficiência agrônômica do N aplicado (EA) (taxa de aumento líquido no peso dos grãos, com e sem fertilização nitrogenada, pela quantidade total de N aplicado), Eficiência no uso fisiológico de N (EUfN) (taxa de aumento líquido no peso dos grãos por aumento líquido no N absorvido, com e sem fertilização nitrogenada), Eficiência no transporte de N (ETN) (taxa de N total transportado para a parte aérea pelo N total na planta) e Eficiência na remobilização de N (ERN) (taxa de N remobilizado de folhas fonte ou em senescência para folhas dreno ou grãos (sementes) em desenvolvimento) (Xu et al., 2012).

Na tentativa de quantificar a EUN nas plantas várias definições e métodos de avaliação foram desenvolvidos ao longo dos anos, em milho Moll et al. (1981) definiu NUE como sendo a razão entre a massa seca de grãos e o N aplicado no solo. Esses autores relataram também que existem dois componentes primários para a EUN: Eficiência de absorção, a qual

é a razão entre o N total na planta na maturidade e o N aplicado no solo, e a Eficiência de utilização definida como sendo a razão entre a massa seca de grãos e o N total na planta na maturidade.

A menor EUN observada pelas linhagens transformadas pode ser em função das alterações ocorridas durante o desenvolvimento das plantas devido as alterações nos níveis de expressão do OsNPF4.11, alterações essa como menor absorção de NO_3^- no estágio de muda, assim como uma provável menor remobilização no estágio de enchimento dos grãos. Também em plantas de arroz a superexpressão do transportador di/tripeptídeo OsPTR6 embora tenha aumentado o crescimento das plantas e a acumulação de N, assim como a expressão dos OsAMT1 em altas concentrações de amônio (5 mM), houve um efeito negativo na NUE nas linhagens transformadas (Fan et al., 2014), indicando que nem sempre a alteração de genes do metabolismo de N pode alterações positivas na NUE.

5 CONCLUSÕES

Tanto o silenciamento quanto a superexpressão do OsNPF4.11 afetaram significativamente a absorção de NO_3^- em baixa e alta disponibilidade acarretando em plantas menores e com uma menor biomassa total.

Principalmente sob baixa disponibilidade de N, as alterações no padrão de expressão do *OsNPF4.11* também afetaram o transporte de NO_3^- da raiz para a parte aérea, isso ocorreu em função de uma menor expressão do OsNRT2.3a.

Além da absorção, alterações na expressão do OsNPF4.11 também afetaram a remobilização do N para os grãos, acarretando um maior número de espiguetas estéreis e uma menor produção, e assim uma menor EUN.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alterações na expressão do *OsNPF4.11* afetou a expressão de outros genes e enzimas do metabolismo de N, de forma que foram levantadas duas prováveis teorias a respeito do mesmo: a primeira seria que a alterações de expressão do *OsNPF4.11* afeta a expressão do *OsNRT1.1* e esse por sua vez afeta a expressão dos transportadores de alta afinidade; e a segunda seria que o *OsNPF4.11*, assim como *OsNRT1.1* também poderia funcionar como um sensor, de modo que as alterações no seu padrão de expressão influencia na expressão dos outros transportadores de NO_3^- .

No presente trabalho o silenciamento gênico, embora funcional, não foi o método mais adequado para estudar o efeito da redução da expressão do *OsNPF4.11* sob o metabolismo de N, principalmente em função de uma variação entre as linhagens que pode ter ocorrido em função de um controle pós-transcricional. Desta forma um método mais adequado seria, por exemplo, o nocaute gênico analisado por meio do uso de plantas mutantes obtidas através de banco de mutantes ou por meio de técnicas como CRISPR-CAS9.

O presente trabalho ofereceu resultados interessantes a respeito do transportador de NO_3^- *OsNPF4.11*, porém para melhores inferências sobre a sua real função no metabolismo de N, seriam ainda necessárias análises como localização celular e subcelular, estudo da seiva do xilema (afim de monitorar o transporte de NO_3^- e aminoácidos da raiz para a parte aérea), análise do perfil completo de aminoácidos e açúcares solúveis, dentre outras.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAKI R., HASEGAWA H. Expression of Rice (*Oryza sativa* L.) Genes Involved in High-Affinity Nitrate Transport during the Period of Nitrate Induction. **Breeding Science**, v. 56, n. 3, p. 295–302, 2006.
- ARRUDA L.N. Metilação Diferencial do DNA e Metabolismo do Nitrogênio em Variedades de Arroz Submetidas a Alto e Baixo Suprimento de Nitrato. 2014. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2014.
- BAUER, D., BIEHLER, K., FOCK, H., CARRAYOL, E., HIREL, B., MIGGE, A., & BECKER, T. W. A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during water stress in tomato. **Physiologia Plantarum**, v. 99, n. 2, p. 241-248, 1997.
- BERNARD, S. M., & HABASH, D. Z. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. **New Phytologist**, v. 182, n. 3, p. 608-620, 2009.
- BORÉM, A.; RANGEL, PHN. Arroz: do plantio a colheita. Viçosa: **Ed. UFV**, 2015
- 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 and Soil Science**, 2014.
- BUZETTI, S., BAZANINI, G. C., FREITAS, J. G. D., ANDREOTTI, M., ARF, O., SÁ, M. E. D., & MEIRA, F. D. A. Resposta de cultivares de arroz a doses de nitrogênio e do regulador de crescimento cloreto de cloromequat. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p. 1731-1737, 2006.
- 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, n. 4, p. 443–51, 2008.
- CASTAINGS, L., MARCHIVE, C., MEYER, C., & KRAPP, A. Nitrogen signalling in Arabidopsis: how to obtain insights into a complex signalling network. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 4, p. 1391-1397, 2011
- CEREZO, M.; TILLARD, P.; FILLEUR, S.; MUNOS, S.; DANIEL - VEDELE, F.; GOJON, A. Major alterations of the regulation of root NO₃⁻ uptake are associated with mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.127, p.262- 271, 2001.
- CHARDON, F., NOËL, V., & MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Exploring NUE in crops and in Arabidopsis ideotypes to improve yield and seed quality. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 9, p. 3401-3412, 2012
- 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**, p. n/a–n/a, 2016.
- CHEN, C. W., YANG, Y. W., LUR, H. S., TSAI, Y. G., & CHANG, M. C. A novel function of abscisic acid in the regulation of rice (*Oryza sativa* L.) root growth and development. **Plant and cell physiology**, v. 47, n. 1, p. 1-13, 2006.

- CHICHKOVA S., VANCE C. P., HERNA G. Transgenic tobacco plants that overexpress alfalfa NADH-glutamate synthase have higher carbon and nitrogen content **Journal of experimental botany**. v. 52, n. 364, p. 2079–2087, 2001.
- CHIU, C. C., LIN, C. S., HSIA, A. P., SU, R. C., LIN, H. L., & TSAY, Y. F. Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1: 4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 9, p. 1139-1148, 2004.
- CONAB. Perspectivas para a agropecuária: Safra 2017/18. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Brasília, v.5, p. 1-111, ago. 2017
- CRÉTÉ P., CABOCHE M., MEYER C. Nitrite reductase expression is regulated at the post-transcriptional level by the nitrogen source in *Nicotiana plumbaginifolia* and *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**.11, 625–634, 1997
- DECHORGNAT, J., NGUYEN, C. T., ARMENGAUD, P., JOSSIER, M., DIATLOFF, E., FILLEUR, S., & DANIEL-VEDELE, F. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 4, p. 1349-1359, 2011.
- FAN X., TANG Z., TAN Y., ZHANG Y., LUO B., YANG M., LIAN X., SHEN Q., MILLER A., XU G. Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201525184, 2016.
- FAN X., XIE D., CHEN J., LU H., XU Y., MA C., XU G. Overexpression of OsPTR6 in rice increased plant growth at different nitrogen supplies but decreased nitrogen use efficiency at high ammonium supply. **Plant Science**, v. 227, p. 1–11, 2014.
- FEIL B., THIRAPORN R, STAMP P. In vitro nitrate reductase activity of laboratory-grown seedlings as an indirect selection criterion for maize. **Crop science**, v. 33, n. 6, p. 1280-1286, 1993.
- FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts with the salicylate-dichloroisocyanurate color reaction. **Analytical Chemistry**, v.49, p. 1080-1080, 1977
- FENG H.M., YAN M., FAN X.R., LI B.Z., SHEN Q.R., MILLER A.J. & XU G.H.. Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status. **Journal of Experimental Botany**. 62,2319–2332, 2011
- FERNANDES, M. S. N carriers, light and temperature influences on the free amino acid pool composition of rice plants. **Turrialba**, v.33, n.3, p.297-301, 1984.
- FILLEUR, S., DORBE, M. F., CERESO, M., ORSEL, M., GRANIER, F., GOJON, A., & DANIEL-VEDELE, F. An Arabidopsis T-DNA mutant affected in Nrt2 genes is impaired in nitrate uptake. **FEBS letters**, v. 489, n. 2-3, p. 220-224, 2001.
- FREITAS, J. G., CANTARELLA, H., SALOMON, M. V., MALAVOLTA, V. M. A., CASTRO, L. H. S. M., GALLO, P. B., & AZZINI, L. E. Produtividade de cultivares de arroz irrigado resultante da aplicação de doses de nitrogênio. **Bragantia**, v. 66, n. 2, 2007.
- GAO, J.; LIU, J.; LI, B.; LI, Z. Isolation and purification of functional total RNA from blue-grained wheat endosperm tissues containing high levels of starches and flavonoids, **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.185a-185i, 2001.
- GUIMARAES, C. M., & PRABHU, A. S. Adubação orgânica no arroz de terras altas: relacionamentos entre brusone, esterilidade de espiguetas e produtividade. **Embrapa Arroz e Feijão-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2002.

- GUO, C., CHANG, W., GU, J., LI, X., LU, W., & XIAO, K. Molecular characterization, transcriptional regulation and function analysis of nitrate transporters in plants. **Frontiers of Agriculture in China**, v. 5, n. 3, p. 291-298, 2011.
- HARRIS, M. Abscisic Acid: Hidden Architect of Root System Structure. **Plants**, v. 4, n. 3, p. 548-572, 2015.
- HO, C. H., LIN, S. H., HU, H. C., & TSAY, Y. F. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. **Cell**, v. 138, n. 6, p. 1184-1194, 2009.
- HOAGLAND, D. R., ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. **California Agricultural Experiment Station**, v. 347, n. 2nd edit, 1950..
- HU, B., WANG, W., OU, S., TANG, J., LI, H., CHE, R., ... & LIANG, C. Variation in NRT1.1B contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies. **Nature Genetics**, v. 47, n. 7, p. 834, 2015.
- HU, R., QIU, D., CHEN, Y., MILLER, A. J., FAN, X., PAN, X., & ZHANG, M. Knock-down of a tonoplast localized low-affinity nitrate transporter OsNPF7.2 affects rice growth under high nitrate supply. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1529, 2016.
- HUANG, N. C., LIU, K. H., LO, H. J., & TSAY, Y. F. Cloning and functional characterization of an Arabidopsis nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. **The Plant Cell Online**, v. 11, n. 8, p. 1381-1392, 1999.
- HUANG, S., ZHAO, C., ZHANG, Y., & WANG, C. Nitrogen Use Efficiency in Rice. In: **Nitrogen in Agriculture-Updates**. InTech, 2018.
- ISHIYAMA, K., INOUE, E., TABUCHI, M., YAMAYA, T., & TAKAHASHI, H. Biochemical background and compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots. **Plant and cell physiology**, v. 45, n. 11, p. 1640-1647, 2004.
- KANNO, Y., HANADA, A., CHIBA, Y., ICHIKAWA, T., NAKAZAWA, M., MATSUI, M., KOSHIBA, T., KAMIYA, Y., & SEO, M. Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 24, p. 9653-9658, 2012.
- KANNO, Y., KAMIYA, Y., & SEO, M. Nitrate does not compete with abscisic acid as a substrate of AtNPF4.6/NRT1.2/AIT1 in Arabidopsis. **Plant signaling & behavior**, v. 8, n. 12, p. e26624, 2013.
- KANT, S., BI, Y. M., & ROTHSTEIN, S. J. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 4, p. 1499-1509, 2010.
- KIBA T., KRAPP A. Plant nitrogen acquisition under low availability: regulation of uptake and root architecture. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, n. March, p. 707–714, 2016.
- KIBA, T., FERIA-BOURRELLIER, A. B., LAFOUGE, F., LEZHNEVA, L., BOUTET-MERCEY, S., ORSEL, M., ... & KRAPP, A. The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. **The Plant Cell Online**, v. 24, n. 1, p. 245-258, 2012.
- KIRK, G. J. D.; KRONZUCKER, H. J. The potential for nitrification and nitrate uptake in the rhizosphere of wetland plants: Modeling study. **Annals of Botany**, v.96, p.639-646, 2005.

- KLEIN, D., MORCUENDE, R., STITT, M., & KRAPP, A. Regulation of nitrate reductase expression in leaves by nitrate and nitrogen metabolism is completely overridden when sugars fall below a critical level. **Plant, Cell & Environment**, v. 23, n. 8, p. 863-871, 2000.
- KONG, L., WANG, F., LÓPEZ-BELLIDO, L., GARCIA-MINA, J. M., & SI, J. Agronomic improvements through the genetic and physiological regulation of nitrogen uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Biotechnology Reports**, p. 1-11, 2013.
- KRAISER, T., GRAS, D. E., GUTIÉRREZ, A. G., GONZÁLEZ, B., & GUTIÉRREZ, R. A. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 4, p. 1455-1466, 2011.
- LÉRAN, S., VARALA, K., BOYER, J. C., CHIURAZZI, M., CRAWFORD, N., DANIEL-VEDELE, F., ... & LACOMBE, B. A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. **Trends in plant science**, v. 19, n. 1, p. 5-9, 2014.
- LI, S., QIAN, Q., FU, Z., ZENG, D., MENG, X., KYOZUKA, J., ... & WANG, Y. Short panicle1 encodes a putative PTR family transporter and determines rice panicle size. **The Plant Journal**, v. 58, n. 4, p. 592-605, 2009.
- LI, W., WANG, Y., OKAMOTO, M., CRAWFORD, N. M., SIDDIQI, M. Y., & GLASS, A. D. Dissection of the AtNRT2. 1: AtNRT2. 2 inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. **Plant physiology**, v. 143, n. 1, p. 425-433, 2007.
- LI, Y., OUYANG, J., WANG, Y. Y., HU, R., XIA, K., DUAN, J., ... & ZHANG, M. Disruption of the rice nitrate transporter OsNPF2. 2 hinders root-to-shoot nitrate transport and vascular development. **Scientific reports**, v. 5, p. 9635, 2015.
- LIN, S. H., KUO, H. F., CANIVENC, G., LIN, C. S., LEPETIT, M., HSU, P. K., ... & GOJON, A. Mutation of the Arabidopsis NRT1. 5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. **The Plant Cell**, v. 20, n. 9, p. 2514-2528, 2008.
- LITTLE, D. Y., RAO, H., OLIVA, S., DANIEL-VEDELE, F., KRAPP, A., & MALAMY, J. E. The putative high-affinity nitrate transporter NRT2. 1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 38, p. 13693-13698, 2005.
- LIU, X., FENG, H., HUANG, D., SONG, M., FAN, X., & XU, G. Two short sequences in *OsNAR2. 1* promoter are necessary for fully activating the nitrate induced gene expression in rice roots. **Scientific reports**, v. 5, 2015.
- 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**. 2001, 25, 402.
- LOPES, M. B. S., RAUBER, W. A., MARQUES, K. R., SERAGLIO, N. A., & FIDELIS, R. R. Adubação nitrogenada em arroz cultivado em solos arenosos de várzea tropical. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science/Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 10, n. 1, 2017.
- MAATHUIS, F. J. M. Physiological functions of mineral macronutrients. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p.250-258, 2009.
- 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, n. 7, p. 1141-1157, 2010.

- MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide** 2001, 5, 62-71.
- MOLL R.H., KAMPRATH E.J., JACKSON W.A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. **Agronomy Journal**, v.74, n.3, p.562-564, 1982.
- QUILLERÉ I., DUFOSSÉ C., ROUX Y., FOYER C. H. F., CABOCHE M., MOROT-GAUDRY J. F. The Effects of Deregulation of Nr Gene-Expression on Growth and Nitrogen-Metabolism of *Nicotiana Plumbaginifolia* Plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, n. 278, p. 1205–1211, 1994.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, 2011.
- RAI, V. K. Role of amino acids in plant responses to stresses. **Biologia Plantarum**, v. 45, n. 4, p. 481-487, 2002.
- SANTOS L. A., SANTOS W. A., SPERANDIO M. V. L., BUCHER C. A., DE SOUZA S. R., FERNANDES M. S. Nitrate Uptake Kinetics and Metabolic Parameters in Two Rice Varieties Grown in High and Low Nitrate. **Journal of Plant Nutrition**, v. 34, n. 7, p. 988–1002, 2011.
- SHI, W. M., XU, W. F., LI, S. M., ZHAO, X. Q., & DONG, G. Q. Responses of two rice cultivars differing in seedling-stage nitrogen use efficiency to growth under low-nitrogen conditions. **Plant and soil**, v. 326, n. 1-2, p. 291-302, 2010.
- SKOPELITIS, D. S., PARANYCHIANAKIS, N. V., PASCHALIDIS, K. A., PLIAKONIS, E. D., DELIS, I. D., YAKOUMAKIS, D. I., ... & ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. **The Plant Cell**, v. 18, n. 10, p. 2767-2781, 2006.
- SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In **Nutrição Mineral de Plantas**. Ed. Fernandes, pag. 15-18, 22-26. Local: Viçosa – MG, Brasil, 2006.
- SPERANDIO, M. V. L., SANTOS, L. A., BUCHER, C. A., FERNANDES, M. S., & DE SOUZA, S. R. Isoforms of plasma membrane H⁺-ATPase in rice root and shoot are differentially induced by starvation and resupply of NO₃⁻ or NH₄⁺. **Plant Science**, v. 180, n. 2, p. 251-258, 2011.
- TAKAYANAGI, S., TAKAGI, Y., ARAKI, R., & HASEGAWA, H. High-affinity nitrate uptake by rice (*Oryza sativa*) coleoptiles. **Journal of plant research**, v. 124, n. 2, p. 305-309, 2011.
- TAMURA W., HIDAKA Y., TABUCHI M., KOJIMA S., HAYAKAWA T., SATO T., OBARA M., KOJIMA M., SAKAKIBARA H., YAMAYA T. Reverse genetics approach to characterize a function of NADH-glutamate synthase1 in rice plants. **Amino Acids**, v. 39, n. 4, p. 1003–1012, 2010.
- TAMURA W., KOJIMA S., TOYOKAWA A., WATANABE H., TABUCHI-KOBAYASHI M., HAYAKAWA T., YAMAYA T. Disruption of a novel NADH-glutamate synthase2 gene caused marked reduction in spikelet number of rice. **Frontiers in plant science**, v. 2, p. 57, 2011.

- TANG Z., FAN X., LI Q., FENG H., MILLER A. J., SHEN Q., XU G. Knockdown of a rice stelar nitrate transporter alters long-distance translocation but not root influx. **Plant Physiology**, v. 160, n. 4, p. 2052–2063, 2012.
- TEDESCO, M. J. Extração Simultânea de N, P, K, Ca e Mg em tecidos de plantas por digestão com H₂O₂.H₂SO₄. **UFRGS**. 1983.23p
- 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.
- UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic acids research**, v. 45, n. D1, p. D158-D169, 2016.
- VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A., & SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. research0034. 1, 2002.
- VON WITTGENSTEIN, N. J., LE, C. H., HAWKINS, B. J., & EHLTING, J. Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. **BMC evolutionary biology**, v. 14, n. 1, p. 11, 2014.
- WANG, H., AHAN, J., WU, Z., SHI, D., LIU, B., & YANG, C. Alteration of nitrogen metabolism in rice variety 'Nipponbare' induced by alkali stress. **Plant and soil**, v. 355, n. 1-2, p. 131-147, 2012a.
- WANG, H., WU, Z., HAN, J., ZHENG, W., & YANG, C. Comparison of ion balance and nitrogen metabolism in old and young leaves of alkali-stressed rice plants. **PLoS one**, v. 7, n. 5, p. e37817, 2012b
- WANG, Y. Y., HSU, P. K., & TSAY, Y. F. Uptake, allocation and signaling of nitrate. **Trends in plant science**, v. 17, n. 8, p. 458-467, 2012c.
- XIA, X., FAN, X., WEI, J., FENG, H., QU, H., XIE, D., ... & XU, G. Rice nitrate transporter OsNPF2. 4 functions in low-affinity acquisition and long-distance transport. **Journal of experimental botany**, v. 66, n. 1, p. 317-331, 2014.
- XU, G., FAN, X., & MILLER, A. J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. **Annual review of plant biology**, v. 63, p. 153-182, 2012
- YAMAYA, T., & KUSANO, M. Evidence supporting distinct functions of three cytosolic glutamine synthetases and two NADH-glutamate synthases in rice. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 19, p. 5519-5525, 2014.
- 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 & Environment**, v. 34, n. 8, p. 1360-1372, 2011.
- YANG W., YOON J., CHOI H., FAN Y., CHEN R., AN G. Transcriptome analysis of nitrogen-starvation-responsive genes in rice. **BMC plant biology**, v. 15, n. 1, p. 31, 2015.
- YEMM, E. W. & COCKING, E. C. The determination of amino-acid with ninhydrin. **Analytical Biochemistry**., 80:209-213, 1955.
- YEMM, E. W. & WILLIS, A. I. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical journal**, v. 57, n. 3, p. 508, 1954..

YONG Z., KOTUR Z. & GLASS A.D.M. Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from Arabidopsis roots. **The Plant Journal**. 63,739–748, 2010.

ZHAO, D., REDDY, K. R., KAKANI, V. G., & REDDY, V. R. Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyperspectral reflectance properties of sorghum. **European journal of agronomy**, v. 22, n. 4, p. 391-403, 2005.

7 ANEXO

Meios de cultivo utilizados para transformação de arroz de acordo com o protocolo de Toki et al. (2006).

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 mg mL⁻¹ (conc. final de 28,8 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 poderão 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 MRA para Ressuspensão da *Agrobacterium* – 200 mL

- 0,86g Sais MS
- 13,6g Sacarose
- 7,2 g Glicose
- 0,60g KCl
- 0,80g MgCl₂
- 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 0,4 mL de acetoseringona a 19,2 mg mL⁻¹ (conc. final de 38,4 mg L⁻¹).

6-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.

7-Meio de Seleção dos Calos - MSM- 500 mL

- 2,15g Sais MS
- 15g Maltose
- 0,15 g Casaminoácidos
- 0,3 g Prolina
- 0,125 mL BAP
- 7,5 mL de 2,4D a 100 mg L⁻¹
- 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.

8-Meio de Regeneração de parte aérea I – 500 mL

- 25 mL de N6 Macro (10X) – ½ FI
- 5 mL Fe-EDTA (100X)
- 5 mL B5-Micro (1000X)
- 5 mL de N6 vitaminas (100X)
- 0,5 g Casaminoácidos
- 15g Maltose
- 0,3g de Prolina (concentração final de 0,6g. L⁻¹)
- 50mL de AA aminoácidos (10x)
- Ajustar pH para 5,8 com KOH
- Avolumar para 500 mL com H₂O destilada
- 5 g Agarose (concentração final de 1%)
- Autoclavar 121 °C por 15 mim
- Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar 0,75 mL de cinetina 1000X (conc. final de 3 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 µg L⁻¹), 100mg de timentim (conc. final 200 mg L⁻¹) e 0,5 mL de BAP 1mg.mL⁻¹ (conc. final de 1mg.L⁻¹).

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

9-Meio de Regeneração de parte aérea II – 500 mL

- 25 mL de N6 Macro (10X) – ½ FI
- 5 mL Fe-EDTA (100X)
- 5 mL B5-Micro (1000X)
- 5 mL de N6 vitaminas (100X)
- 0,5 g Casaminoácidos
- 15g Maltose
- 0,3g de Prolina (concentração final de 0,6g. L⁻¹)
- 50mL de AA aminoácidos (10x)
- Ajustar pH para 5,8 com KOH
- Avolumar para 500 mL com H₂O destilada
- 4 g Agarose (concentração final de 0,8%)
- Autoclavar 121 °C por 15 mim

- Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar 0,75 mL de cinetina 1000X (conc. final de 3 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 µg L⁻¹), 100mg de timentim (conc. final 200 mg L⁻¹) e 0,5 mL de BAP 1mg.mL⁻¹ (conc. final de 1mg.L⁻¹).

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

10-Meio de Regeneração de parte aérea III – 500 mL

- 50 mL de N6 Macro (10X) – ½ FI
- 5 mL Fe-EDTA (100X)
- 5 mL B5-Micro (1000X)
- 5 mL de N6 vitaminas (100X)
- 0,5 g Casaminoácidos
- 5 g Sorbitol
- 10g Maltose
- 0,15g de Prolina (concentração final de 0,6g. L⁻¹)
- 50mL de AA aminoácidos (10x)
- Ajustar pH para 5,8 com KOH
- Avolumar para 500 mL com H₂O destilada
- 5 g Agarose (concentração final de 1%)
- Autoclavar 121 °C por 15 mim
- Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar 1 mL de cinetina 1mg.mL⁻¹ (conc. final de 2 mg L⁻¹), 0,27 mL de ANA 1mg.mL⁻¹ (conc. final de 0,54 mg L⁻¹), 0,5 mL de Higromicina 1000X (conc. final de 50 µg L⁻¹), 100mg de timentim (conc. final 200 mg L⁻¹) e 1 mL de BAP 1 mg.mL⁻¹ (conc. final de 2 mg.L⁻¹).

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

11-Meio de Regeneração de parte aérea IV – 500 mL

- 50 mL de N6 Macro (10X) – ½ FI
- 5 mL Fe-EDTA (100X)
- 5 mL B5-Micro (1000X)
- 5 mL de N6 vitaminas (100X)
- 0,5 g Casaminoácidos
- 5 g Sorbitol
- 10g Maltose
- 0,15g de Prolina (concentração final de 0,6g. L⁻¹)
- 50mL de AA aminoácidos (10x)
- Ajustar pH para 5,8 com KOH
- Avolumar para 500 mL com H₂O destilada
- 4 g Agarose (concentração final de 0,8%)
- Autoclavar 121 °C por 15 mim
- Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar 1 mL de cinetina 1mg.mL⁻¹ (conc. final de 2 mg L⁻¹), 0,27 mL de ANA 1mg.mL⁻¹ (conc. final de 0,54 mg L⁻¹), 0,5 mL de Higromicina 1000X (conc. final de 50 µg L⁻¹), 100mg de timentim (conc. final 200 mg L⁻¹) e 1 mL de BAP 1 mg.mL⁻¹ (conc. final de 2 mg.L⁻¹).

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

12-Meio de Regeneração de parte aérea V – 500 mL

- 25 mL de N6 Macro (10X) – ½ FI
- 5 mL Fe-EDTA (100X)
- 5 mL B5-Micro (1000X)
- 5 mL de N6 vitaminas (100X)
- 0,5 g Casaminoácidos
- 7,5 g Sorbitol
- 10 g Maltose
- 0,3 g de Prolina (concentração final de 0,6g. L⁻¹)
- 50mL de AA aminoácidos (10x)
- Ajustar pH para 5,8 com KOH
- Avolumar para 500 mL com H₂O destilada
- 5 g Agarose (concentração final de 1%)
- Autoclavar 121 °C por 15 mim
- Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar 0,5 mL de cinetina 1000X (conc. final de 2 mg L⁻¹), 1,25 mL de ANA 1000X (conc. final de 0,05 mg L⁻¹), 0,5 mL de Higromicina 1000X (conc. final de 50 µg L⁻¹), 100mg de timentim (conc. final 200 mg L⁻¹) e 0,5 mL de BAP 1 mg.mL⁻¹ (conc. final de 1 mg.L⁻¹).

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

13-Meio de Regeneração de parte aérea VI – 500 mL

- 25 mL de N6 Macro (10X) – ½ FI
- 5 mL Fe-EDTA (100X)
- 5 mL B5-Micro (1000X)
- 5 mL de N6 vitaminas (100X)
- 0,5 g Casaminoácidos
- 7,5 g Sorbitol
- 10 g Maltose
- 0,3 g de Prolina (concentração final de 0,6g. L⁻¹)
- 50mL de AA aminoácidos (10x)
- Ajustar pH para 5,8 com KOH
- Avolumar para 500 mL com H₂O destilada
- 4 g Agarose (concentração final de 0,8%)
- Autoclavar 121 °C por 15 mim
- Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar 0,5 mL de cinetina 1000X (conc. final de 2 mg L⁻¹), 1,25 mL de ANA 1000X (conc. final de 0,05 mg L⁻¹), 0,5 mL de Higromicina 1000X (conc. final de 50 µg L⁻¹), 100mg de timentim (conc. final 200 mg L⁻¹) e 0,5 mL de BAP 1 mg.mL⁻¹ (conc. final de 1 mg.L⁻¹).

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

13-Meio de Regeneração de parte aérea VII – 500 mL

- 25 mL de N6 Macro (10X) – ½ FI
- 5 mL Fe-EDTA (100X)
- 5 mL B5-Micro (1000X)
- 5 mL de N6 vitaminas (100X)

- 0,5 g Casaminoácidos
- 15 g Sorbitol
- 50mL de AA aminoácidos (10x)
- Ajustar pH para 5,8 com KOH
- Avolumar para 500 mL com H₂O destilada
- 2 g gelrite
- Autoclavar 121 °C por 15 mim
- 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 0,020 mg L⁻¹), 0,5 mL de Higromicina 1000X (conc. final de 50 µg L⁻¹) e 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.

14-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 mim
- 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.

15-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.