

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CIÊNCIA DO SOLO**

**DISSERTAÇÃO**

**Caracterização dos Transportadores Osnr1.1A,  
Osnr1.1B e Osnr1.1C por Meio da Reversão  
Fenotípica do Mutante *Chl1-5* de *Arabidopsis  
thaliana***

**Juan Sebastian Vera Chamba**

**2018**



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

**CARACTERIZAÇÃO DOS TRANSPORTADORES OSNTR1.1A,  
OSNTR1.1B E OSNTR1.1C POR MEIO DA REVERSÃO FENOTÍPICA  
DO MUTANTE CHL1-5 DE *ARABIDOPSIS THALIANA***

**JUAN SEBASTIAN VERA CHAMBA**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Leandro Azevedo dos Santos**

*e Co-orientação do Professor*  
**Marcus Vinícius Loss Sperandio**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ  
Abril de 2018

V473c Vera Chamba, Juan Sebastian, 1991-  
CARACTERIZAÇÃO DOS TRANSPORTADORES  
OSNTR1.1A, OSNTR1.1B E OSNTR1.1C POR MEIO DA  
REVERSÃO FENOTÍPICA DO MUTANTE CHL1-5 DE  
*ARABIDOPSIS THALIANA* / Juan Sebastian Vera Chamba. -  
Seropédica, 2018.  
40 f.  
Orientador: Leandro Azevedo Santos.  
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGRONOMIA CIÊNCIA DO SOLO, 2018.  
1. Transceptor. 2. Nitrogênio. 3. *Oryza sativa*. 4. *Arabidopsis  
thaliana*. I. Azevedo Santos, Leandro , 1981-, orient. II  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA CIÊNCIA DO SOLO  
III. Título.

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

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

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

**JUAN SEBASTIAN VERA CHAMBA**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 04/04/2018.

---

Leandro Azevedo Santos. Dr. UFRRJ  
(Orientador)

---

Marcia Soares Vidal. Dra. Embrapa Agrobiologia

---

Marco André Alves de Souza. Dr. UFRRJ

## DEDICATÓRIA

*Dedico*

*As pessoas a quem amo: minha família e amigos.*

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família que embora longe o nosso carinho ultrapassou qualquer distância, igualmente a minha mãe Susana Vera que me deu esperanças em todo momento.

Ao meu orientador professor Leandro Azevedo Santos, por ter me proporcionado a oportunidade de trabalhar com esta pesquisa, além de me encaminhar em todas as etapas do trabalho e fornecer suporte profissional. Pra mim é exemplo de pesquisador.

Ao meu co-orientador Marcus Vinícius Loss Sperandio, pela valiosa ajuda na elaboração da pesquisa e trabalho, assim como sua confiança e dedicação depositadas, sempre esteve disponível e sua motivação me ajudou a continuar trabalhando.

À professora Sonia Regina de Souza e Manlio Silvestre Fernandes pela formação científica que recebemos nas nossas reuniões do grupo de pesquisa.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Sabrina Dahmer, Rafael Passos, Leandro Martins, Leilson Arruda, Erika Fernandes, Natalia Frasson, Erinaldo Gomes, Renan Braga, Andressa Fabiane, Luizine, Marcela.

Aos estagiários e amigos que dedicaram seu tempo para me ajudar nas coletas e análises: Aline Garcia, Alex Gomes, Thamires Luz, Mayhara da Costa Pereira, Larissa Santos, Thainá Dantas.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), principalmente ao PPGA-CS.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro durante todo este mestrado.

A todos que de alguma forma ajudaram a elaborar este trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Juan Sebastian Vera Chamba nasceu em 25 de novembro de 1991 na cidade de Quito, capital do Equador. Fez o ensino fundamental na escola Teodoro Wolf e ensino médio na unidade educativa San Luis Gonzaga (Quito). Em 2011 ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Minas Gerais, onde trabalhou com Anatomia vegetal. Em 2015 foi aprovado para mestrado nos cursos de Pós-Graduação da UFMG (Produção vegetal), e UFRRJ (Ciência do Solo). Em março de 2016 ingressou no mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo na UFRRJ, onde desenvolveu trabalhos relacionados à absorção de nitrato em plantas de *Arabidopsis thaliana*.

## RESUMO

CHAMBA, Juan Sebastian Vera. **Caracterização dos transportadores OsNTR1.1A, OsNTR1.1B e OsNTR1.1C por meio da reversão fenotípica do mutante *chl1-5* de *Arabidopsis thaliana***. 2018. 40 f. (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2018.

A absorção de Nitrogênio (N) pelas plantas é uma etapa chave para a eficiência de uso de N, afetando a produção de massa fresca e rendimento de grãos. O transceptor NRT1.1 de *Arabidopsis thaliana* foi identificado como sinalizador da absorção de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Em arroz, três prováveis ortólogos do transceptor NRT1.1 foram identificados, nomeados de *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C*. O objetivo deste estudo foi avaliar se a superexpressão dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* em plantas mutantes *chl1-5* de *Arabidopsis thaliana* (sem o gene NRT1.1) restabelecem a capacidade de transporte e sinalização pelo nitrato perdida no mutante nocauteado. O processo de transformação de plantas *chl1-5* de *A. thaliana* foi mediante *floral dip* com as cepas de *Agrobacterium tumefaciens* da linhagem LBA4404 mediante as construções obtidas 35S:OsNRT1.1A:HA, 35S:OsNRT1.1B:HA, 35S:OsNRT1.1C:HA e 35S:OsNRT1.1sa:HA (promotor:gene:tag de HA). Posteriormente foi utilizado o antibiótico canamicina para obter as linhagens segregantes produto da transformação, sendo que apenas as plantas com duas cópias do gene foram selecionadas para testar os diferentes níveis de expressão gênica das plantas obtidas. Para verificar a resistência das plantas mutantes ao clorato ( $\text{NaClO}_3$ ), foi montado o experimento com plantas homocigotas, e suas sementes foram germinadas sobre substrato comercial e vermiculita, aos 23 dias após o plantio foram iniciadas aplicações com 12 mM de  $\text{NaClO}_3$ . Para avaliar a expressão gênica alterada pela introdução de *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* ou *OsNRT1.1C* no mutante *chl1-5*, foram desenhados iniciadores para análise de expressão dos transportadores de  $\text{NO}_3^-$  de alta afinidade e baixa afinidade. Foram usadas duas linhagens de cada transformação nos experimentos, além de plantas tipo silvagem (WT) e plantas mutantes *chl1-5*. O teste com clorato mostrou a capacidade dos transportadores *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* ou *OsNRT1.1C* de absorver nitrato, evidenciado pelo decréscimo da massa fresca provocado pela redução do clorato a clorito pela nitrato redutase, produto tóxico para as células. A inserção do transportador *OsNRT1.1B* causou a maior redução de crescimento no teste do clorato em comparação com *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1C*, chegando aos mesmos níveis de redução do crescimento da planta tipo silvestre (WT). As análises de expressão mostraram que a inserção dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* em *Arabidopsis thaliana chl1-5* foi capaz de induzir a expressão dos genes *OsNRT2.1* e *OsNAR2.1*, sendo que a forma splicing alternativo de OsNRT1.1A (OsNRT1.1Asa) não afetou de maneira significativa a expressão de *OsNRT2.1* e *OsNAR2.1*. Os resultados obtidos mostram a capacidade dos ortólogos de NRT1.1 em arroz (*OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C*) em absorver nitrato e sinalizar para a expressão de outros transportadores de nitrato (transceptor), podendo afetar a eficiência de absorção de nitrogênio.

**Palavras-chave:** Transceptor. Nitrogênio. *Oryza sativa*. *Arabidopsis thaliana*.

## ABSTRACT

CHAMBA, Juan Sebastian Vera. **Characterization of the isoforms OsNTR1.1A, OsNTR1.1B and OsNTR1.1C transporters by phenotypic reversion of the *chl1-5* mutant of *Arabidopsis***. 2018. 40p. Dissertation (Master in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2018.

Nitrogen (N) uptake by plants is a key step for N use efficiency, affecting fresh mass production and yield of grains. The NRT1.1 transceptor of *Arabidopsis thaliana* was identified as a molecular signal of nitrate uptake ( $\text{NO}_3^-$ ). In rice, three orthologs of the NRT1.1 named OsNRT1.1A, OsNRT1.1B and OsNRT1.1C, were identified. The objective of this work was to evaluate the overexpression of the genes OsNRT1.1A, OsNRT1.1B and OsNRT1.1C in *Arabidopsis thaliana chl1-5* mutant plants to restore the transport and signaling capacity of the nitrate lost in the knockout mutant. The transformation process of *A. thaliana* plants was obtained by floral immersion with strains of *Agrobacterium tumefaciens* of lineage LBA4404 by the following constructs 35S: OsNRT1.1A: HA, 35S: OsNRT1.1B: HA, 35S: OsNRT1.1C: HA and 35S: OsNRT1.1sa: HA (promoter: gene: HA tag). Subsequently, the antibiotic kanamycin was used to obtain segregant lineages of the transformation product, being only plants with two copies of the gene was selected for testing the different levels of gene expressing. To verify the resistance of the mutant plants to the chlorate ( $\text{NaClO}_3$ ), the experiment was set up with homozygous plants, and their seeds were germinated on commercial substrate and vermiculite. At 23 days after planting, applications with 12 mM  $\text{NaClO}_3$  were started. To evaluate altered gene expression by introduction of OsNRT1.1A, OsNRT1.1B, OsNRT1.1C, primers were designed for expression analysis of the high and low affinity  $\text{NO}_3^-$  transporters. Two lines of each transformation were used in the experiments, including wild type plants (WT) and *chl1-5* mutant plants. The chlorate test showed the ability of OsNRT1.1A, OsNRT1.1B or OsNRT1.1C to nitrate uptake, evidenced by the decrease in fresh mass caused by the reduction of chlorate to chlorite by nitrate reductase, the chlorite a toxic product to cells. The insertion of transporter OsNRT1.1B caused the largest growth reduction in the chlorate test compared to OsNRT1.1A and OsNRT1.1C, approximating to the same levels of wild-type (WT). Expression analyzes showed that the insertion of OsNRT1.1A, OsNRT1.1B and OsNRT1.1C genes into *Arabidopsis thaliana chl1-5* was able to induce the expression of OsNRT2.1 and OsNAR2.1 genes, and the alternative splicing form of OsNRT1.1A (OsNRT1.1Asa) did not significantly affect the expression of OsNRT2.1 and OsNAR2.1. The results show the ability of orthologs of NRT1.1 in rice (OsNRT1.1A, OsNRT1.1B and OsNRT1.1C) to nitrate uptake and signal to the expression of other nitrate transporters (transceptor), which may affect the nitrogen efficiency and uptake.

**Key-words:** Transceptor. Nitrogen. *Oryza sativa*. *Arabidopsis thaliana*.

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Iniciadores gateway para isolamento das regiões codante (cds) dos transportadores <i>OsNRT1.1A</i> , <i>OsNRT1.1A splicing</i> , <i>OsNRT1.1B</i> e <i>OsNRT1.1C</i> contendo os sítios de recombinação <i>attB</i> Gateway.....	8
<b>Tabela 2.</b> Concentração balanceada de nutrientes para a quantidade de vinte litros, até os vinte e um dias de idade das plantas.....	12
<b>Tabela 3.</b> Concentração balanceada de nutrientes para a quantidade de vinte litros, aos vinte e dois dias de idade das plantas.....	13
<b>Tabela 4.</b> Sequências dos iniciadores usados nas reações de PCR em tempo real.....	16
<b>Tabela 5.</b> Resultado da segregação nas plantas selecionadas ao antibiótico canamicina. ....	19

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Locus do transportador *OsNRT1.1 full* (LOC\_Os08g05910.1) e *OsNRT1.1 splicing* (LOC\_Os08g05910.2) sem o primeiro éxon. **Fonte:** Rice Genome Annotation Project.... 7
- Figura 2.** Expressão dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* nas raízes (A e B) e parte aérea (C e D) de arroz cultivados com  $\text{NO}_3^-$  (A e C) e com  $\text{NH}_4^+$  (B e D). Os tratamentos usados foram suprimento constante com 2 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  ou  $\text{N-NH}_4^+$ , ressuprimento com 2 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  ou  $\text{N-NH}_4^+$  após 72 horas de privação de N e deficiência de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  72 horas. \* representa diferença com *OsNRT1.1A* no tratamento constante com  $\text{NO}_3^-$  na raiz. .... 17
- Figura 3.** Plantas de *Arabidopsis thaliana Wild type (WT)* com clorato de sódio ( $\text{NaClO}_3$ ) e sem clorato de sódio, mutante *chl1-5*, e linhagens transformadas *OsNRT1.1AS* genótipos 2.2 e 1.1, *OsNRT1.1A* genótipos 1.2 e 3.1. .... 21
- Figura 4.** Plantas de *Arabidopsis thaliana Wild type (WT)* com clorato de sódio ( $\text{NaClO}_3$ ) e sem clorato de sódio, mutante *chl1-5*, e linhagens transformadas *OsNRT1.1B* genótipos 1.8 e 2.2, *OsNRT1.1C* genótipos 1.1 e 2.1. .... 22
- Figura 5.** Massa fresca planta<sup>-1</sup> com e sem clorato no mutante *chl1-5*, WT e *chl1-5* transformado com superexpressão dos genes de arroz *OsNRT1.1A splicing (1.1Aspl)*, *OsNRT1.1A (1.1A)*, *OsNRT1.1B (1.1B)* e *OsNRT1.1C (1.1C)*. Foram usadas duas linhagens para cada mutante superexpressando *OsNRT1.1*. .... 23
- Figura 6.** Massa fresca planta sem clorato no mutante *chl1-5*, WT e *chl1-5* transformado com superexpressão dos genes de arroz *OsNRT1.1A splicing (1.1Aspl)*, *OsNRT1.1A (1.1A)*, *OsNRT1.1B (1.1B)* e *OsNRT1.1C (1.1C)*. Foram usadas duas linhagens para cada mutante superexpressando *OsNRT1.1*. \* Representa diferença significativa das linhagens transformadas e WT comparadas com plantas *chl1-5* ( $P < 0,05$ ). .... 24
- Figura 7.** Efeito do clorato (%) no mutante *chl1-5*, WT e *chl1-5* transformado com superexpressão dos genes de arroz *OsNRT1.1A splicing (1.1Aspl)*, *OsNRT1.1A (1.1A)*, *OsNRT1.1B (1.1B)* e *OsNRT1.1C (1.1C)*. Foram usadas duas linhagens para cada mutante superexpressando *OsNRT1.1*. .... 24
- Figura 8.** Teores de  $\text{N-NO}_3^-$  no mutante *chl1-5*, WT e *chl1-5* transformado com superexpressão dos genes de arroz *OsNRT1.1A splicing (1.1Aspl)*, *OsNRT1.1A (1.1A)*, *OsNRT1.1B (1.1B)* e *OsNRT1.1C (1.1C)*. Foram usadas duas linhagens para cada mutante superexpressando *OsNRT1.1*. .... 25
- Figura 9.** Teores de  $\text{N-NH}_4^+$  no mutante *chl1-5*, WT e *chl1-5* transformado com superexpressão dos genes de arroz *OsNRT1.1A splicing (1.1Aspl)*, *OsNRT1.1A (1.1A)*, *OsNRT1.1B (1.1B)* e *OsNRT1.1C (1.1C)*. Foram usadas duas linhagens para cada mutante superexpressando *OsNRT1.1*. .... 26
- Figura 10.** Teores de N-amino no mutante *chl1-5*, WT e *chl1-5* transformado com superexpressão dos genes de arroz *OsNRT1.1A splicing (1.1Aspl)*, *OsNRT1.1A (1.1A)*, *OsNRT1.1B (1.1B)* e *OsNRT1.1C (1.1C)*. Foram usadas duas linhagens para cada mutante superexpressando *OsNRT1.1*. .... 27
- Figura 11.** Expressão do transportador de  $\text{NO}_3^-$  *NRT2.1* no mutante *chl1-5*, WT e *chl1-5* transformado com superexpressão dos genes de arroz *OsNRT1.1A splicing (1.1Aspl)*, *OsNRT1.1A (1.1A)*, *OsNRT1.1B (1.1B)* e *OsNRT1.1C (1.1C)*. Foram usadas duas linhagens para cada mutante superexpressando *OsNRT1.1*. A expressão no mutante *chl1-5* foi colocado valor 1. .... 28

<b>Figura 12.</b> Expressão da proteína NAR2.1 no mutante <i>chl1-5</i> , WT e <i>chl1-5</i> transformado com superexpressão dos genes de arroz <i>OsNRT1.1A splicing (1.1Aspl)</i> , <i>OsNRT1.1A (1.1A)</i> , <i>OsNRT1.1B (1.1B)</i> e <i>OsNRT1.1C (1.1C)</i> . Foram usadas duas linhagens para cada mutante superexpressando <i>OsNRT1.1</i> . A expressão no mutante <i>chl1-5</i> foi colocado valor 1. ....	28
<b>Figura 13.</b> Expressão do transportador <i>NRT1.2</i> no mutante <i>chl1-5</i> , WT e <i>chl1-5</i> transformado com superexpressão dos genes de arroz <i>OsNRT1.1A splicing (1.1Aspl)</i> , <i>OsNRT1.1A (1.1A)</i> , <i>OsNRT1.1B (1.1B)</i> e <i>OsNRT1.1C (1.1C)</i> . Foram usadas duas linhagens para cada mutante superexpressando <i>OsNRT1.1</i> . A expressão no mutante <i>chl1-5</i> foi colocado valor 1. ....	29
<b>Figura 14.</b> Comparação da expressão do <i>NRT1.1</i> ou isoformas de <i>OsNRT1.1</i> nas linhagens transformadas. Para comparar a expressão entre as linhagens transformadas com o mesmo gene, foi atribuído valor 1 para <i>1.1A spl L1.1</i> , <i>1.1A L1.2</i> , <i>1.1B L1.8</i> e <i>1.1C L1.1</i> . ....	31
<b>Figura 15.</b> Expressão gênica do <i>NRT2.1</i> da planta WT de <i>A. thaliana</i> .....	32
<b>Figura 16.</b> Expressão do transportador <i>NRT2.1</i> nas isoformas de <i>OsNRT1.1 A full</i> e <i>Aspl</i> nas linhagens transformadas. ....	33
<b>Figura 17.</b> Expressão do transportador <i>NRT2.1</i> na isoformas de <i>OsNRT1.1 B</i> .....	34
<b>Figura 18.</b> Expressão do transportador <i>NRT2.1</i> na isoforma de <i>OsNRT1.1 C</i> . ....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
DAP	Dias Após o Plantio
DEPC	Dicarbonato de dietila
HATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidade (High Affinity Transport System)
LATS	Sistema de Transporte de Baixa Afinidade (Low Affinity Transport System)
NRT1	Família de genes para os transportadores de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> de baixa afinidade
NRT2	Família de genes para os transportadores de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> de alta afinidade
RNAm	Ácido Ribonucléico mensageiro
TRIS	2-(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol
WT	Wild type ou linhagem selvagem de <i>Arabidopsis thaliana</i>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Importância da Cultura do Arroz .....	3
2.2 Importância do Nitrogênio.....	3
2.3 Transportadores de Nitrato .....	4
2.4 O Transportador de Nitrato NRT1.1.....	6
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3.1 Construção dos Vetores para Superexpressar <i>OsNRT1.1A</i> , <i>OsNRT1.1A splicing</i> , <i>OsNRT1.1B</i> e <i>OsNRT1.1C</i> .....	7
3.2 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com as Construções de <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> .....	8
3.3 Preparação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Competentes.....	8
3.4 Expressão dos Genes <i>OsNRT1.1A</i> , <i>OsNRT1.1B</i> e <i>OsNRT1.1C</i> em Raiz e Parte Aérea de Arroz Cultivado com $\text{NO}_3^-$ e $\text{NH}_4^+$ .....	9
3.5 Propagação de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	9
3.6 Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i> Mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	10
3.7 Seleção de Plantas da Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	10
3.8 Teste com Clorato.....	11
3.9. Experimento com Plantas Transformadas de <i>Arabidopsis thaliana</i> Superexpresando os Ortólogos de Arroz <i>OsNRT1.1A</i> , <i>B</i> , <i>C</i> em Substrato e Solução Nutritiva.....	11
3.9.1 Análises de frações solúveis e mensuração da massa fresca.....	13
3.9.2 Extração alcoólica .....	14
3.9.3 Determinação das concentrações de $\text{N-NO}_3^-$ , $\text{N-NH}_4^+$ , $\text{N-amino}$ .....	14
3.9.4 Extração de RNA total .....	14
3.9.5 Tratamento com DNase e síntese de cDNA.....	15
3.9.10 PCR em tempo real .....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1 Expressão dos Genes <i>OsNRT1.1A</i> , <i>OsNRT1.1B</i> e <i>OsNRT1.1C</i> em Arroz.....	17
4.2 Análise da superexpressão dos genes <i>OsNRT1.1A</i> , <i>OsNRT1.1B</i> e <i>OsNRT1.1C</i> no mutante <i>chl1-5</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	18
5. CONCLUSÕES .....	35
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36

## 1 INTRODUÇÃO

O arroz é alimento fundamental que possui importância social e econômica para o Brasil, dados destacam que o consumo brasileiro de arroz é de 45 kg/pessoa/ano, média que é superada no continente asiático onde o consumo é de 100 e 150 kg/pessoa/ano (SOSBAI, 2014). Este cereal consumido mundialmente constitui fonte principal para a manutenção da segurança alimentar, por este motivo países como a China tem designado políticas governamentais que envolvam pesquisas sobre a produção deste alimento (JIAO et al., 2016), para atingir tal objetivo os insumos agrícolas tem se mostrado indispensáveis no restabelecimento da fertilidade do solo, sendo necessário o planejamento da adubação em base à análise química do solo e a demanda da planta, no entanto na União Europeia e Estados Unidos, mais da metade do incremento na produção de culturas agrícolas na China tem sido correlacionado ao maior uso de fertilizantes minerais (LUZ et al., 2002; JIAO et al., 2016). Atualmente na agricultura de alto rendimento, as plantas removem o N do solo, e aplicações consideráveis de adubos nitrogenados são necessários para a manutenção da produtividade no ciclo do cultivo (O'BRIEN et al, 2016). Pesquisas científicas revelam que a aplicação de fertilizantes é o segundo maior emissor de gases de efeito estufa na agricultura brasileira (ROQUETTI, 2014).

O nitrogênio é o elemento limitante para o crescimento de vegetais, sendo as formas inorgânicas de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  as formas preferenciais de absorção (GLASS, 2003). O  $\text{NO}_3^-$  é absorvido por transportadores da família gênica NRT (Nitrate Transporter, transportador de nitrato), que são classificados como HATS (High Affinity Transport System, sistema de transporta de alta afinidade) e LATS (Low Affinity Transport System, sistema de transporta de baixa afinidade), permitindo a entrada de íons  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{H}^+$ , via simporte ( $2\text{H}^+/\text{NO}_3^-$ ) (GLASS, et al., 1992; GLASS, 2003). Em *Arabidopsis thaliana* existe a família de genes NRT1 que codificam para transportadores LATS, que operam sobre concentrações de nitrato acima de 1 mM (FERNANDES e SOUZA, 2006). Estudos recentes demonstraram que o membro NRT1.1 além de transportar  $\text{NO}_3^-$  também pode atuar no transporte do fito hormônio auxina. A caracterização de diversos transportadores da família NRT1 mostrou o transporte de diversas moléculas além do  $\text{NO}_3^-$  e auxina, como ABA e peptídeos. Desse modo, LERAN et al. (2004) e von WITTGENSTEIN et al. (2014) realizaram uma nova classificação da família NRT1 e nomearam de família NPF (Nitrate Peptide Transporter Family, família de transportadores de nitrato e peptídeos).

O transportador AtNRT1.1 (AtNPF6.3) é capaz de atuar na absorção de  $\text{NO}_3^-$  na faixa de alta afinidade (<1 mM) e baixa afinidade (>1 mM), ou seja, AtNRT1.1 é um transportador de dupla afinidade. A dupla afinidade do transportador AtNRT1.1 depende da modificação pós-traducional via fosforilação da treonina 101 (T101) que está localizada entre a terceira e quarta hélice transmembrana, sendo necessária a participação da quinase CIPK23 (quando o  $\text{NO}_3^-$  está presente em baixos níveis) (HO et al., 2009; SUN e ZHENG, 2015). Esse mecanismo de regulação descreve como a planta se adapta a concentrações variáveis de nitrogênio no meio ambiente (LIU e TSAY, 2003).

As características relevantes do transportador NRT1.1 (NPF6.3) de *A. thaliana* destacam-se a tolerância ao baixo pH da planta tipo selvagem (WT) quando crescida com pH 5 ou 4,5 em solução nutritiva (FANG et al., 2016). Se o nitrato estiver em baixas concentrações no meio o NRT1.1 tem a capacidade de reduzir o acúmulo de auxina em raízes laterais novas, conseqüentemente, reprimindo sua emergência, mesmo assim o NRT1.1 pode ser estimulado por nitrato e baixos níveis de pH (MOUNIER, et al., 2014). O transportador

também influencia a abertura estomática de células guarda na presença de luz, por meio de mecanismo co-transporte de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{K}^+$  (GUO et al., 2003).

Se conhece que três genes ortólogos em plantas de arroz do NRT1.1 são potenciais para o mesmo papel funcional de AtNRT1.1, sendo eles OsNRT1.1A, OsNRT1.1B e OsNRT1.1C (PLETT et al., 2010). Pesquisas recentes têm estudado o papel das isoformas do NRT1.1 em arroz sendo que das variedades indica e japônica HU et al., (2015) encontraram que o OsNRT1.1B possui atividade de transporte de nitrato sobre alta e baixa disponibilidade, e a variedade IR-24 tem maior atividade que a Nipponbare.

A remoção do gene NRT1.1 originou o mutante chl1-5 de *A. thaliana*, caracterizando tolerância ao cádmio em comparação com plantas WT, e acumulando menor teor de nitrato quando exposto a doses de 1 mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (MUÑOS et al., 2004; MAO et al., 2014), além disso o mutante, apresenta tolerância ao clorato e sinaliza para a expressão de diversos genes responsivos ao  $\text{NO}_3^-$  (HO et al., 2009). No presente estudo, os mutantes de *Arabidopsis thaliana* chl1-5 foram utilizados para caracterizar a função dos transportadores OsNRT1.1A, OsNRT1.1B e OsNRT1.1C de arroz na absorção de  $\text{NO}_3^-$  e na sinalização da expressão (expressão heteróloga).

Desse modo, a hipótese deste trabalho é que a superexpressão dos transportadores OsNRT1.1A, OsNRT1.1B e OsNRT1.1C podem reestabelecer a função de transporte e sinalização do nitrato no mutante chl1-5 de *Arabidopsis*.

Os objetivos foram: (i) avaliar a sobrevivência em clorato de plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* chl1-5 superexpressando os genes OsNRT1.1A, OsNRT1.1B e OsNRT1.1C (chl1-5::35S:OsNRT1.1A-C) e (ii) avaliar se as plantas chl1-5::35S:OsNRT1.1A-C restabelecem a capacidade de transporte e sinalização pelo nitrato perdida no mutante chl1-5.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância da Cultura do Arroz

O arroz é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo que o seu consumo médio mundial é de 60 kg/pessoa/ano, países asiáticos apresentam médias de consumo de 100 e 150 kg/pessoa/ano, na América Latina destaca-se o Brasil como grande consumidor com média de 45 kg/pessoa/ano (SOSBAI, 2014). Na Ásia mais de 2000 milhões de pessoas obtém 60 a 70% de calorias originadas do arroz e seus subprodutos. Este cereal também exerce importância no setor de empregatício, por exemplo, no sistema de produção e operações post-colheita, o arroz ocupa aproximadamente 1000 milhões de pessoas em áreas rurais dos países em desenvolvimento (FAO, 2004).

No Brasil, os principais Estados produtores de arroz são Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Mato Grosso, Maranhão e Pará (EMBRAPA, 2008). Em 2016 a produção de arroz alcançou 10,6 milhões de toneladas, fatores que contribuíram ao índice de produtividade é justificado pela adoção de variedades de arroz resistentes ao estresse hídrico e a pragas, já no ano de 2017 a produção teve valor de 12,5 milhões de toneladas, atribuído a maior frequência de períodos chuvosos que possibilitaram o enchimento de reservatórios destinados à tabuleiros de arroz irrigado (IBGE, 2016; IBGE 2017). Dados recentes da CONAB sobre a safra 2017/2018 relatam que a produção total de grãos está estimada em 225,57 milhões de toneladas, houve redução de 5,1% em relação à safra anterior, sendo que a produção da cultura do arroz estimada em 11,6 milhões de toneladas não sofreu alterações significativas neste levantamento, visto que as condições climáticas permaneceram favoráveis à cultura (CONAB, 2018).

### 2.2 Importância do Nitrogênio

O nitrogênio é o elemento limitante para o crescimento de vegetais, e a forma de nitrato é requerida pela maioria das plantas (ARAKI e HASEGAWA, 2006), além de fazer parte constituinte da molécula de clorofila é fundamental para o processo fotossintético, em cereais como no arroz o N aumenta teor de proteínas nos grãos, porém os solos de terras altas, geralmente não possuem nutrientes necessários para o pleno desenvolvimento das culturas, é vital nessas circunstâncias fazer uso da adubação mineral (EMBRAPA, 2013).

O  $\text{NH}_4^+$  e o  $\text{NO}_3^-$  são fontes de nitrogênio inorgânico. O nitrato pode ser imobilizado por microrganismos, absorvido pelas plantas, fixado em argilominerais 2:1, volatilizado em formas gasosas, reduzido a  $\text{NH}_4^+$  (BRADY e WEIL, 2013). Em solos alagados o  $\text{NO}_3^-$ , formado pela nitrificação de  $\text{NH}_4^+$ , pode ser perdido na zona anóxica, sendo assim as plantas absorvem menores teores de  $\text{NO}_3^-$  ao  $\text{NH}_4^+$ , e vegetais que se desenvolvem nesses solos podem absorver mais  $\text{NO}_3^-$  na zona radicular pela presença do oxigênio (KIRK e KRONZUCKER, 2005). Quando o  $\text{NO}_3^-$  é absorvido pela planta passa a ser reduzido a  $\text{NH}_4^+$ , por meio de enzimas, sendo elas a nitrato redutase e nitrito redutase, posterior ação da via enzimática glutamina sintetase-glutamato sintase (GS-GOGAT) faz possível a integração do  $\text{NH}_4^+$  a esqueletos de carbono na forma de aminoácidos (SOUZA e FERNADEZ, 2006). O pH do meio também influencia na absorção de  $\text{NO}_3^-$ , quando pH é básico há maior absorção de  $\text{NH}_4^+$  (SOUZA e FERNADEZ, 2006).

Entre os efeitos do N sobre as plantas pode-se destacar que fonte localizada de  $\text{NO}_3^-$  possui efeito estimulante em raízes laterais de *A. thaliana*, aumentando a atividade meristemática celular (ZHANG e FORDE, 2000). O teor de nitrato nas raízes é controlado por processos integrados como absorção de nutrientes, assimilação pela enzima nitrato redutase, e translocação raiz parte aérea (MAO et al, 2014). Experimento com plantas de arroz irrigado

revela que, o fornecimento equilibrado de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ , na concentração  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ , favorece o acúmulo de biomassa, já o decréscimo na proporção de  $\text{NO}_3^-$  pode levar à toxidez pelo amônio e afetar a absorção de Ca e Mg (HOLZSCHUH et al., 2011). Dentro das variadas linhas de pesquisa, a otimização na absorção de nutrientes minerais é constante alvo de pesquisas, nesse intuito tem-se tentado aprimorar técnicas relevantes para conseguir esse desafio, a primeira está envolvida na identificação de genes de interesse com usos de marcadores moleculares, a segunda se baseia na construção genética (SANTOS, 2006). Por exemplo, durante a transformação de *Arabidopsis thaliana* mediada por *Agrobacterium*, foi concluído que o uso de marcadores de seleção, tais como resistência a antibiótico canamicina, dose  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , impedem a regeneração de raízes ou explantes não transformados (VALVEKENS et al., 1988).

Uso de estratégias tecnológicas e inovações agropecuárias tem sido importante para países como a China, que tem designado desde o ano 2004 políticas governamentais que priorizem a seguridade alimentar da nação (JIAO et al., 2016), para atingir tal objetivo os insumos agrícolas tem se mostrado indispensáveis no restabelecimento da fertilidade do solo, sendo necessário o planejamento da adubação em base à análise química do solo e a demanda da planta (LUZ et al., 2002), no entanto se comparado com países como a União Europeia e Estados Unidos, mais da metade do incremento na produção de culturas agrícolas na China tem sido correlacionado ao maior uso de fertilizantes minerais (JIAO et al., 2016). Na agricultura de alto rendimento as plantas removem o N do solo, sendo que grandes aplicações posteriores de adubos nitrogenados são necessárias para a manutenção da produtividade no decorrer do cultivo (O'BRIEN et al., 2016), nesse panorama a aplicação de fertilizantes é o segundo maior emissor de gases de efeito estufa na agricultura brasileira, sendo superado pela emissão de gás metano produto da fermentação entérica do rebanho bovino. Considerando a evolução da agricultura sustentável, o balanço entre eficiência produtiva e balanço de carbono deve ser considerado em todos os aspectos (ROQUETTI, 2014).

### 2.3 Transportadores de Nitrato

O  $\text{NO}_3^-$  é absorvido por transportadores da família gênica NRT (Nitrate Transporter, transportador de nitrato), já no  $\text{NH}_4^+$  atua a família gênica AMT (Ammonium Transporter, transportador de amônio) (MAATHUIS, 2009). Os transportadores de  $\text{NO}_3^-$  são classificados como HATS (High Affinity Transport System) e LATS (Low Affinity Transport System) permitindo a entrada de íons  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{H}^+$  via simporte ( $2\text{H}^+/\text{NO}_3^-$ ) (GLASS, et al., 1992). A concentração de  $\text{NO}_3^-$  influencia na reação entre os transportadores de alta e baixa afinidade (FERNANDES e SOUZA, 2006). Por exemplo, o influxo de nitrato em raízes de cevada possui comportamento bifásico, tanto pelo sistema de baixa concentração (HATS) que é saturável, ou pelo sistema de alta concentração (LATS) não saturável e constitutivo (SIDDIQI et al., 1990; ASLAM et al., 1992; ASLAM et al., 1993). Estudos aprofundados nos processos fisiológicos de transportadores HATS e LATS revelam que as diferentes proteínas regulatórias encarregadas pelo efluxo e influxo de nitrato possuem diferentes funções, entre elas a direção, Km e Vmax, e são reguladas especificamente pelo nitrato, repressão feedback pelo N, e estímulo pelos produtos da fotossíntese (O'BRIEN et al., 2016).

Em *Arabidopsis thaliana* existe a família de genes NRT1 que codificam para transportadores LATS, que operam sobre concentrações de nitrato acima de  $1 \text{ mM}$  (FERNANDES e SOUZA, 2006). Dentro desse grupo a denominação de transceptor é dada para proteínas de membrana que atuam como transportadores e sinalizadores do nutriente (GOJON, et al. 2011), cabe destaque aqui a proteína NRT1.1 transceptor, pois possui função sinalizadora de  $\text{NO}_3^-$  no meio independente da atividade de absorção (HO et al., 2009). A família de transportadores NRT1 possui ampla variedade de substratos, no entanto com o

intuito de promover bases moleculares para a compreensão específica de cada transportador foi proposta nova terminologia para o transportador NRT1.1, que além de transportar nitrato também transporta auxina, passando a ser nomeado AtNPF6.3. (LÉRAN et al., 2014).

A proteína NRT1.1 (NPF6.3) possui 12 segmentos que estão contidos na membrana plasmática, entre as características importantes para esta proteína se relata a fosforilação da treonina 101 (T101) para a funcionalidade entre alta e baixa afinidade de transporte (HO et al., 2009), sendo relevante mencionar que a T101 está localizada intracelularmente entre a terceira e quarta hélice transmembrana (TM) do NRT1.1 (SUN e ZHENG., 2015). NRT1.1 e o resíduo T101 fosforilado interagem com a proteína quinase CIPK23 (CBL-Interacting Protein Kinase 23) e induzem a expressão de genes associados ao metabolismo de nitrato, quando o íon está presente em baixos níveis (HO et al., 2009). A proteína que apresentava conformação dupla se separa ganhando flexibilidade estrutural funcionando como transportador de alta afinidade com Km aproximado de 50  $\mu$ M, sendo o contrário acontece quando o nitrato é abundante e o NRT1.1 é desfosforilado funcionando como transportador de baixa afinidade com Km de 4 mM (SUN e ZHENG, 2015). Mutações da T101, inibindo ou possibilitando a fosforilação, podem alterar a conversão do transportador de dupla afinidade (SUN e ZHENG, 2015). LIU e TSAY (2003) expressando a fosforilação no sítio T101A em *Xenopus oocytes*, demonstraram que há 9 e 70% da atividade total do NRT1.1 nas concentrações de 150  $\mu$ M e 10 mM nitrato respectivamente, sendo que a atividade de absorção de alta afinidade foi fortemente reduzida, sugerindo que a fosforilação da T101A converte o NRT1.1 exclusivamente em transportador de baixa afinidade, este mecanismo de regulação descreve como a planta confronta as condições limitadas de nitrogênio no meio ambiente (LIU e TSAY, 2003).

A Universidade de Ohio (EUA) possui centro de sementes mutantes (ABRC, *Arabidopsis thaliana* Biological Resource Center) que é disponível para compra por centros de pesquisa ao redor do mundo. Entre os mutantes disponíveis, diversos possuem o silenciamento do gene NRT1.1, sendo o mutante chl1-5 o mais usado. A mutação do mutante chl1-5 foi realizada por raios gama, sendo que uma região genômica de aproximadamente 18340 pares de bases foi deletada, contendo o gene NRT1.1, todos estes eventos acontecem no Cromossomo 1, segundo análises por PCR e busca de dados no GenBank (MUÑOS et al., 2004), todavia, o mutante do gene NRT1.1 proporciona resistência ao clorato e decréscimo na absorção de nitrato, o mRNA deste gene se encontra predominantemente em raízes onde mostra regulação dependente de pH e nitrato (TSAY et al., 1993). O mutante chl1 mostra clorose após tratamento com clorato, sintoma que é facilmente detectado a diferença de outros mutantes chl (TSAY et al., 1993).

Na melhor compreensão da dinâmica e status nutricional na planta é relevante a realização de pesquisas envolvendo plantas mutantes de *Arabidopsis*. A diferença entre o genótipo de *Arabidopsis* tipo silvestre ecotipo Col e o mutante chl1-5 são os genes suprimidos, tais como canais e transportadores de aquaporinas, transportadores de metais, sulfato, potássio, e o NRT1.1, no entanto o mutante possui superexpressão do gene NRT2.1, segundo trabalho confirmado por análises de gel de RNA (MUÑOS et al., 2004).

Entre os transportadores da família NRT2, se destacam na absorção de  $\text{NO}_3^-$  NRT2.1 e NRT2.2. Mutantes de *A. thaliana* sem a expressão de NRT2.1 apresentaram menor absorção de  $\text{NO}_3^-$  comparados a plantas tipo silvestre (REMANS et al., 2006). Em arroz, os transportadores OsNRT2.1 e OsNRT2.2 são expressos nas raízes e são essenciais para a absorção de  $\text{NO}_3^-$ , possuindo regulação feedback negativo dos produtos de assimilação do N (ARAKI e HASEGAWA, 2006; FENG et al., 2010). OsNRT2.4 é expresso na deficiência de N, possuindo alta afinidade pelo  $\text{NO}_3^-$  (baixo KM) (KIBA et al., 2012). A superexpressão do transportador OsNRT2.3a em arroz causa maior acúmulo de fósforo, causado pelo aumento de expressão de transportadores de Pi (FENG et al., 2017). A absorção de  $\text{NO}_3^-$  pelos

transportadores da família NRT2 dependem da proteína auxiliar NAR2.1, que interagem com os transportadores e permitem a entrada de  $\text{NO}_3^-$  na célula (ORSEL et al., 2006; YAN et al., 2011). A expressão da proteína OsNAR2.1 possui alta correlação com a expressão de outros genes envolvidos na absorção de  $\text{NO}_3^-$ , como OsNRT2.1, OsNRT2.2 e as isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPase OsA2 e OsA7 (SPERANDIO et al., 2014).

#### 2.4 O Transportador de Nitrato NRT1.1

Quando se trata da associação entre o NRT1.1 e a tolerância ao cádmio em plantas de *A. thaliana*, após 7 dias de exposição a 10  $\mu\text{M}$  de cádmio, as folhas do ecótipo Col-0 desenvolveram clorose, este efeito foi menos pronunciado no chl1-5 e mutantes nrt1.1, já a biomassa da raiz e parte aérea do ecótipo Col-0 foram reduzidos a aproximadamente 40 e 30% respectivamente (MAO et al., 2014). A perda do NRT1.1 no mutante chl1-5 diminui o teor de nitrato em concentrações de 1 mM de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  o mutante chl1-5 acumula menor teor de nitrato em comparação ao genótipo WT Col-0 (MUÑOS et al., 2004).

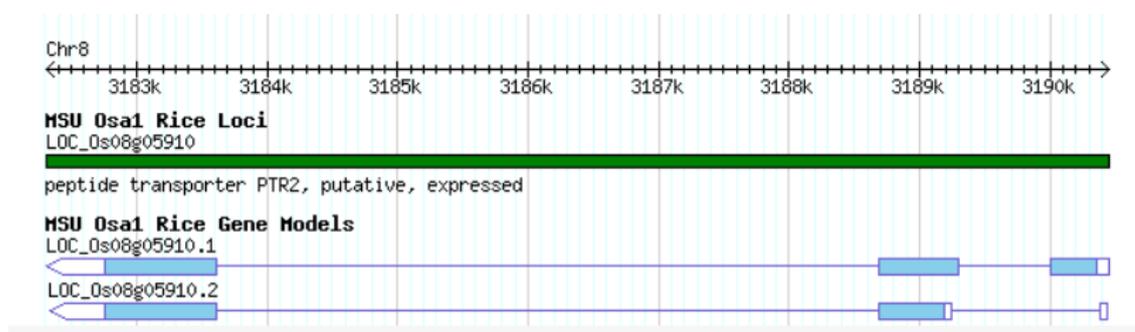
Avaliando o desempenho do NRT1.1 na tolerância a baixo pH foram utilizados os mutantes chl1-5 e nrt1-1, plântulas de *A. thaliana* foram crescidas com diferentes níveis de pH contendo 6 mM de  $\text{NO}_3^-$ , sendo que sobre baixo pH (5 ou 4,5) o crescimento de todas as três linhagens foi reduzido, no entanto a redução foi menor no ecótipo Col-0 indicando importância que o NRT1.1 apresenta para a baixos níveis de pH (FANG et al., 2016). Quando a concentração de nitrato é baixa próximo a 0,5 mM o NRT1.1 reduz o acúmulo de auxina em raízes laterais novas o que causa repressão e emergência de raízes assim como seu crescimento, no entanto o decréscimo no pH do meio associado a altas concentrações de nitrato promove a atividade do NRT1.1 que aumenta o crescimento de raízes laterais (MOUNIER et al., 2014). O influxo de nitrato em células guarda é dependente do CHL1 na presença de luz, sendo que o  $\text{NO}_3^-$  serve de íon co-transporte do  $\text{K}^+$  durante a abertura dos estômatos, no entanto quando o cloreto é absorvido a proteína não aporta na sua função de transporte (GUO et al., 2003).

Pelo menos dois genes do NRT1.1 são potenciais para o mesmo papel funcional de AtNRT1.1 em gramíneas, sendo assim o OsNRT1.1A e OsNRT1.1B expressos no arroz (PLETT et al., 2010). Estudando variedades de arroz indica e japônica Hu et al., (2015) encontraram que o NRT1.1B possui atividade de transporte de nitrato sobre altas e baixas disponibilidade de nutriente, e a variedade IR-24 tem maior atividade que a Nipponbare. Em pesquisas recentes sobre plantas mutantes sem o gene OsNRT1.1A, os resultados mostraram retardo no crescimento significativo quando comparado com plantas WT de arroz, além disso a expressão de genes envolvidos com o transporte de absorção de nitrato como o OsNRT1.1B, OsNRT2.1 e OsNRT2.3A, assim como os genes envolvidos com a assimilação de amônio são pouco expressos no mutante OsNRT1.1A (WANG et al., 2018).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Construção dos Vetores para Superexpressar *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1A splicing*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C*

Os genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* possuem introns, sendo necessário o uso de cDNA feito a partir do mRNA processado (sem íntrons). Foram obtidos iniciadores híbridos, ou seja, contendo uma parte que se anela no gene alvo e outra parte contendo os sítios de recombinação Gateway *attB* (Tabela 1). Como o sítio *attB* é longo, uma parte do sítio *attB* foi colocado no iniciador contendo o sítio de anelamento no gene alvo na primeira reação de PCR, sendo o restante do sítio *attB* colocado em uma segunda reação de PCR. As reações de PCR foram feitas usando o kit Phusion (Finnzymes) de acordo com as instruções do fabricante. O gene *OsNRT1.1A* apresenta dois sítios para splicing alternativos, sendo um chamado de *OsNRT1.1A full* (ou somente *OsNRT1.1A*) contendo todos os éxons, enquanto *OsNRT1.1A spl* não contém o primeiro éxon (splicing alternativo) (Figura 1).



**Figura 1.** Locus do transportador *OsNRT1.1 full* (LOC\_Os08g05910.1) e *OsNRT1.1 splicing* (LOC\_Os08g05910.2) sem o primeiro éxon. **Fonte:** Rice Genome Annotation Project.

Após o isolamento dos genes com os sítios *attB*, foi feita a clonagem dos genes no vetor pDON221 usando o kit “Gateway BP Clonase™ II Enzyme mix” (Thermo Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante. O produto da reação foi eletroporado em *Escherichia coli* estirpe *DH5α*, plaqueado em meio LB sólido contendo os antibióticos Sp/Sm. A extração do vetor foi feita usando o Kit “PureYield™ Plasmid Miniprep system” (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. Os vetores contendo o promotor do vírus do Mosaico da Couve Flor (35S), terminador Tag de HA e o gene *OsNRT1.1* foi feito usando o kit “Gateway™ LR Clonase™ Enzyme mix” (Thermo Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante. O produto da reação foi novamente eletroporado em *E. coli* estirpe *DH5α*, plaqueado em meio LB sólido contendo os antibióticos Sp/Sm. O vetor foi isolado Kit “PureYield™ Plasmid Miniprep system” (Promega). Os vetores foram usados para transformar *Agrobacterium tumefaciens* estirpe LBA4404 por choque térmico para posterior transformação de *Arabidopsis thaliana*.

**Tabela 1.** Iniciadores gateway para isolamento das regiões codante (cds) dos transportadores *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1A splicing*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* contendo os sítios de recombinação *attB* Gateway.

Gene	Iniciadores Forward/Reverse
<i>OsNRT1.1Afull</i>	5'-AAAAAGCAGGCTTAATGGTGGGGATGTTGCC-3' 5' - AGAAAGCTGGGTAGTGGAGGCATGGCTCG -3'
<i>OsNRT1.1Aspl</i>	5'-AAAAAGCAGGCTTAATGGGGGTGCTGTACCTG-3' 5' - AGAAAGCTGGGTAGTGGAGGCATGGCTCG -3'
<i>OsNRT1.1B</i>	5'-AAAAAGCAGGCTTAATGGCGATGGTGTTC -3' 5' - AGAAAGCTGGGTAGTGGCCGACGGCG -3'
<i>OsNRT1.1C</i>	5'-AAAAAGCAGGCTTAATGGCGGTGGCGG -3' 5' - AGAAAGCTGGGTATATATGTATTATTCCGGCGTTCG -3'
<i>Adpt-B1F*</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'
<i>Adpt-B2R*</i>	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'

\* sequência do iniciador contendo todo sítio de recombinação *attB*.

### 3.2 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com as Construções de *Arabidopsis thaliana*

Após a caracterização das construções gênicas, as mesmas foram inseridas em *Agrobacterium tumefaciens* estirpe LBA4404 com o seguinte protocolo: Foi adicionado 1 µg de plasmídeo a 100 µL de *Agrobacterium tumefaciens* competente, a mistura foi homogeneizada e incubada no gelo por 30 minutos. As células com o plasmídeo foram congeladas em nitrogênio líquido por cinco minutos e em seguida incubada a 37° C em banho-Maria por cinco minutos. A continuação, foi adicionado 1 mL de meio YEB, e as células foram mantidas a 28°C, sob agitação a 150 rpm durante duas horas. 1 ml da transformação foi plaqueada em meio YEB sólido com os antibióticos correspondentes a construção Espectinomomicina/Estreptomicina (Sp/Sm) mais Rifamicina (Rf) 100 µg/mL, e Gentamicina (Gm) 40 µg/mL. As placas foram incubadas a 28°C até o aparecimento de colônias (dois a três dias). A transformação foi confirmada por PCR de colônia.

### 3.3 Preparação de *Agrobacterium tumefaciens* Competentes

O estoque de *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) foi riscado em meio YEB sólido contendo rifamicina (100 µg/mL) e gentamicina (40 µg/mL), e incubado a 28° C por 24 horas. Com ajuda de alça flambada foi transferida a colônia isolada para tubo falcon de 50 mL, contendo 3 mL de meio YEB, adicionando previamente Rf/Gm, que foi incubado a 28° C sob agitação (150 rpm) por 48 horas. Pela manhã, 2 mL da cultura fresca foi inoculada em 50 mL de meio YEB contendo Rf e Gm em erlemayer de 250 mL. A inoculação foi realizada a 28°C sob agitação de 150 rpm, até atingir uma DO<sub>600</sub> de aproximadamente 0,6. A cultura foi dividida em dois tubos falcon de 50 mL e incubada no gelo por 20 min. Em seguida, as células foram precipitadas a 1.000 g por 5 min a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o pellet resuspendido em 500 µL de uma solução contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM e glicerol 10%. As células foram divididas em alíquotas de 100 µL acondicionadas em microtubos estéreis de 1,5 mL e mantidas em freezer -80° C por até seis meses.

Para o cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*, foi utilizado o meio YEB contendo 5 g/L de extrato de carne, 1 g/L de extrato de levedura, 1 g/L de peptona, 5 g/L de sacarose, 0,002 g/L de MgSO<sub>4</sub>, sobre pH 7,4. Para meios sólidos, foi adicionado 1,5% de ágar ao meio de cultura, segundo a recomendação do *Cold Spring Harbor Protocols*.

### **3.4 Expressão dos Genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* em Raiz e Parte Aérea de Arroz Cultivado com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>**

Para conhecer o padrão de expressão do *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* em arroz, cultivar Nipponbare, foi realizada análise de expressão por PCR em tempo real usando cDNA do banco de RNA total e cDNA do Laboratório de Nutrição de Plantas. As plantas de arroz foram cultivadas por 21 dias em câmara de crescimento e os tratamentos foram: (i) suprimento constante com 2,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; (ii) ressuprimento com 2,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> após 72 horas sem NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; (iii) deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por 72 horas; (iv) suprimento constante com 2,0 mM de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; (v) ressuprimento com 2,0 mM de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> após 72 horas sem NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; (vi) deficiência de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por 72 horas. Os iniciadores para *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* usados foram os mesmos usados por SPERANDIO et al. (2015).

### **3.5 Propagação de *Arabidopsis thaliana***

Foi conduzido o experimento com sementes de *A. thaliana* Ecotipo Columbia (Col1-tipo selvagem), e o mutante *chl1-5*. Informações necessárias às condições de crescimento para *Arabidopsis thaliana* estão contidas no *Arabidopsis thaliana "Protocols-third edition"*. As sementes foram desinfestadas por imersão em álcool 75%, e numa solução de hipoclorito de sódio 2,5%, o excesso foi retirado posteriormente com três lavagens de água destilada, as sementes imediatamente foram semeadas em recipientes plásticos com capacidade de 150 ml contendo substrato comercial e vermiculita, na proporção 2:1, previamente autoclavados, durante 1 hora a 120° C. Foram utilizados quinze recipientes, dos quais cinco são para o Ecotipo Columbia 1, e dez para o mutante *chl1-5*, todos posicionados sobre uma bandeja plástica contendo água destilada, necessária para humedecer por capilaridade o substrato misturado. Sobre a bandeja foi colocado filme plástico para manter úmido o substrato. Aos três dias após o semeio o plástico foi furado, data que coincide com a germinação das sementes. Aos treze dias após o semeio as plantas completarão o segundo par de folhas verdadeiras, assim os recipientes foram retirados da bandeja contendo água, sendo que cada ciclo de irrigação foi feito visando o umedecimento do substrato. Aos quatorze dias foi realizado o desbaste das plantas, deixando três mudas por recipiente. Posteriormente, foi realizado o teste de resistência ao clorato do mutante *chl1-5*.

No caso da transformação do mutante *chl1-5* via *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404, foi utilizado o método floral dip. E os passos para o cultivo de *A. thaliana* foram semelhantes ao anterior.

### 3.6 Transformação de *Arabidopsis thaliana* Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação de *Arabidopsis thaliana* foi realizada com o método floral-dip (CLOUGHT e BENT, 1998; MARA et al., 2010) *Agrobacterium tumefaciens* da linhagem LBA4404 foram transformados com as construções obtidas 35S:OsNRT1.1A:HA, 35S:OsNRT1.1B:HA, 35S:OsNRT1.1C:HA e 35S:OsNRT1.1SA:HA. Após a transformação e confirmação da mesma por PCR de colônia foi feito, pré-inóculo em 1 mL de meio YEB com os antibióticos Sm/Sp, posteriormente o volume foi elevado para 10 mL com meio YEB sem antibiótico, este cultivo foi *per-noite*, e na manhã do dia seguinte foi quantificada a DO que deveria estar por volta de 2. Aos 10 mL de cultura foram adicionados 40 mL de uma solução contendo sacarose 10% e silwet 0,05%, e usado imediatamente. A inflorescência das plantas mutantes de *Arabidopsis*, na fase fenológica de prefloração foi mergulhada nesta solução por 2 a 3 segundos e levemente agitadas. Oito plantas foram utilizadas para cada construção. Um dia prévio à transformação as plantas foram irrigadas abundantemente para ficarem com os estômatos bem abertos, e após a transformação as mesmas foram mantidas deitadas em bandejas cobertas com filme plástico por 24 horas, sendo que depois da transformação as plantas não foram irrigadas nos dois dias seguintes, após esse período inicia-se a irrigação novamente. As sementes obtidas foram depositadas em microtubos, secas em estufa a 30°C durante dois dias e depois armazenadas em geladeira a aproximadamente 10°C para uso posterior.

### 3.7 Seleção de Plantas da Transformação de *Arabidopsis thaliana*

As sementes de *Arabidopsis thaliana* submetidas ao processo de transformação floral-dip foram lavadas em 1 mL de etanol 70% durante 30 segundos, seguido de lavagem com hipoclorito de sódio 2,5%, o hipoclorito foi imediatamente retirado e as sementes lavadas por mais seis vezes consecutivas com água destilada autoclavada. O meio de cultivo das plantas de *A. thaliana* em placa foi o MS (Murashige & Skoog, 1962) a ½ da força iônica com 1% de sacarose, 0,5 gL<sup>-1</sup> de MÊS, e solidificado com 0,7% de bacto agar, o pH da solução foi calibrado para 5,7. Dentro de fluxo laminar, as sementes limpas foram colocadas sobre papel de filtro estéril dentro de placas de Petri e transferidas para a superfície do meio de cultivo com palitos de dente autoclavados, aproximadamente 100 plantas por placa de 12 mm de diâmetro. As placas foram fechadas e a seguir vedadas com fita microporosa e deixadas invertidas em geladeira a 4°C por dois dias para homogeneizar a germinação. As placas foram então transferidas para câmara de crescimento a 25°C com aproximadamente 200 μmol de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 14 horas.

As plantas que sofreram o procedimento de transformação via floral dip, são chamadas de T0, suas sementes plantadas sobre as placas de Petri contendo canamicina deram origem a plantas resistentes ao antibiótico, sendo selecionadas às diferentes linhagens chamadas de T1, esses genótipos resistentes foram plantados no substrato comercial com vermiculita (2:1), enquanto que as sementes das linhagens T1 deram origem à geração T2 onde foi possível observar a segregação 3:1 (Tabela 3), para confirmar este parâmetro estatístico foi realizado o teste de qui-quadrado, sendo que foram selecionadas dez plantas por cada linhagem obtendo-se o total de duas linhagens por cada construção. As plantas selecionadas ou genótipos foram

plantados no substrato para obter as sementes T3 as quais seriam plantadas em Placas de Petri adicionado do antibiótico canamicina para visualizar a homozigose, na geração T3 foi possível identificar qual genótipo é homozigoto ou heterozigoto. Para posteriores etapas analíticas foram escolhidas apenas os genótipos com uma cópia do gene ou plantas homozigotas, porém com diferentes níveis de expressão dos genes em estudo.

### 3.8 Teste com Clorato

Sementes de linhagens WT, *chl1-5* e plantas transformadas sobre a expressão dos genes *OsNRT1.1 A, B, C*, em homozigose foram semeadas sobre substrato comercial (Substrato Mudas e Plantio Orgânico BIOMIX®) misturado com vermiculita, proporção 2:1, em recipientes plásticos de 150 mL, que foram colocados em bandejas plásticas cobertas com papel filme de PVC, as bandejas foram colocadas em câmara de crescimento de plantas com fluxo luminoso médio de  $137 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura média de  $23^\circ\text{C}$  e percentagem de umidade 65% de. Aos 23 dias após o plantio foram iniciadas 8 aplicações, passando um dia, de clorato de sódio na concentração de 12 mM (WANG et al., 1998) no volume de 15 mL por cada recipiente plástico, aos 39 dias após o plantio foram fotografadas e coletadas as plantas para se obter parâmetros comparativos do efeito do clorato no seu metabolismo.

### 3.9. Experimento com Plantas Transformadas de *Arabidopsis thaliana* Superexpressando os Ortólogos de Arroz *OsNRT1.1A, B, C* em Substrato e Solução Nutritiva

Sementes de linhagens WT, *chl1-5* e plantas transformadas foram cultivadas conforme o item anterior (3.8) e adubadas com uma solução contendo 8,25 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  e 3,75 mM de  $\text{N-NH}_4^+$  com os mesmos tempos do item anterior (WANG et al., 1998). Aos 39 dias após o plantio, as plantas foram pesadas, das quais 1,0 gr foi acondicionado em etanol 80% e 1,0 gr foi congelada em nitrogênio líquido estocado em freezer  $-80^\circ\text{C}$  para posterior extração de RNA total.

Para conhecer o padrão de expressão de *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* experimento hidropônico foi montado. Para a germinação individual de sementes de *A. thaliana*, foram utilizadas sementes de cada linhagem transformadas, semeadas sobre tampas separadas de tubos Eppendorf®, com um pequeno orifício no meio, as mesmas foram colocadas sobre estantes de tubos contendo ágar na concentração de 10%, solidificado posteriormente. As estantes foram depositadas sobre bandejas plásticas com uma leve lâmina de água destilada para evitar o ressecamento excessivo do ágar, finalmente foram cobertas com filme plástico e colocadas em câmara de crescimento de plantas a  $25^\circ\text{C}$  com aproximadamente  $200 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 14 horas, nesse berçário hidropônico as mudas germinadas com nove dias de idade foram imediatamente transferidas para o sistema hidropônico, composto de recipientes com capacidade de cinco litros, contendo solução nutritiva com 1/4, 1/2 e 1 força iônica (Tabela 2), com quatro dias de intervalo de troca na primeira e três na segunda, e 6 dias na última. Logo após, as plantas foram transferidas para os tratamentos sem N, 50  $\mu\text{M}$  de, 1 mM e 10 mM de  $\text{NO}_3^-$ , as quantidades de nutrientes estão listadas na Tabela 3, a coleta foi realizada após 12 dias. O delineamento

experimental foi composto de quatro doses, seis plantas de cada linhagem por dose, com quatro repetições por linhagem, distribuídas em vinte recipientes, sendo assim cada recipiente foi dividido em duas partes, traçando-se uma divisória imaginária entre a superfície do sistema hidropônico de tal forma que cada planta de linhagem transformada tenha a metade do espaço, para o caso de plantas *wild type* e *chl1-5* as plantas de cada uma foram colocadas no mesmo recipiente separadas entre si.

**Tabela 2.** Concentração balanceada de nutrientes para a quantidade de vinte litros, até os vinte e um dias de idade das plantas.

<b>Solução 1/4 FI</b>	<b>Quantidade (gr)</b>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,44
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	4,72
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,66
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,34
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,44
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,92
Fe-EDDHMA	1,66
Estoque de micronutrientes	20 mL
<b>Solução 1/2 FI</b>	<b>Quantidade (gr)</b>
KNO <sub>3</sub>	4,04
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,86
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	4,72
<b>Solução 1/2 FI</b>	<b>Quantidade (gr)</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,66
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,62
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,96
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,32
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,0
Fe-EDDHMA	1,66
Estoque micronutrientes	20 mL
<b>Solução 1 FI</b>	<b>Quantidade (gr)</b>
KNO <sub>3</sub>	4,04
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	9,74
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	4,72
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,66
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,14
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,02
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,06
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	3,34
Fe-EDDHMA	1,66
Estoque de micronutrientes	20 mL

**Tabela 3.** Concentração balanceada de nutrientes para a quantidade de vinte litros, aos vinte e dois dias de idade das plantas.

<b>Solução em nitrato</b>	<b>Quantidade (gr)</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,066
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	9,74
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,14
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,02
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7,54
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	13,34
Fe-EDDHMA	1,66
Estoque de micronutrientes	20 mL
<b>Solução 50 uM</b>	<b>Quantidade (gr)</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,066
KNO <sub>3</sub>	0,108
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	<b>9,74</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,14
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,02
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7,54
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	13,34
Fe-EDDHMA	1,66
Estoque de micronutrientes	20 mL
<b>Solução 1 mM</b>	<b>Quantidade (gr)</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,066
KNO <sub>3</sub>	2,02
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	9,74
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,14
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,02
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,8
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	13,34
Estoque de micronutrientes	20 mL
<b>Solução 10 mM</b>	<b>Quantidade (gr)</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,066
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5,14
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,8
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	18,88
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,14
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,02
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7,14
Fe-EDDHMA	1,66
Estoque de micronutrientes	20 mL

### 3.9.1 Análises de frações solúveis e mensuração da massa fresca

Uma grama de material coletado foi estocado em etanol 80%, para depois realizar as análises de fração solúvel (FERNANDES, 1984) compostas de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (CATALDO et al.,

1975), N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (FELKER, 1977), N-amino livre (YEMM e WILLIS, 1957). Para análises de massa fresca uma alíquota do material vegetal foi coletada e imediatamente mensurada.

### **3.9.2 Extração alcoólica**

Esta etapa foi realizada segundo a metodologia proposta por Fernandes, (1984). Uma grama de material fresco foi depositada em 20 ml de etanol (80%) para seu posterior armazenamento dentro de frascos plásticos mantidos em geladeira. Para a extração cada amostra foi triturada e filtrada sobre camadas de gazes e papel filtro, consecutivamente as amostras foram transferidas para funil de separação no qual se adicionará igual volume de clorofórmio. Após suave agitação, foi deixado em repouso por 40 minutos, assim foi descartada a fração apolar. A fração polar (sobrenadante) foi recolhida e avolumada a 25 mL com etanol (80%), o líquido resultante foi armazenado em frascos que foram colocados na geladeira.

### **3.9.3 Determinação das concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-amino**

Para a determinação de N-NO<sub>3</sub>, uma alíquota de 0,1 mL do extrato alcoólico foi depositada em tubo de ensaio, foi adicionada vagarosamente 0,4 mL de solução de ácido salicílico (5%) em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. A mistura foi deixada em repouso durante 20 minutos sobre temperatura ambiente, durante esta etapa foi acrescentado lentamente 9,5 mL de NaOH 2N. Após o resfriamento da amostra foi realizada a leitura em espectrofotômetro de chama a 410 nm, sendo utilizado o KNO<sub>3</sub> como padrão.

Para determinação do N da forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a solução de hipoclorito de sódio proposta por Mitchell (1972) foi substituída por dicloroisocianurato de sódio (FELKER, 1977), pelo motivo de que o hipoclorito perde sua atividade oxidante sobre influência de climas tropicais. Assim foram usadas duas soluções, a primeira composta de 5 g de fenol e 0,025 g de nitroprussiato de sódio em 500 mL de água deionizada, e a segunda solução composta de 15 g de NaOH e 0,31 g de dicloroisocianurato de sódio em 500 mL de água deionizada. Uma alíquota de 0,5 mL da solução obtida de extrato foi acrescentada a 2,5 mL de cada solução, após a homogeneização e descanso por 30 minutos, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 630 nm, o NH<sub>4</sub>Cl (5 mM) foi utilizado como padrão.

A determinação do N-amino foi realizada em tubo pyrex com 0,5 mL de tampão citrato (0,2 M; pH 5), 1 mL da solução obtida anteriormente do extrato alcoólico (diluída quando necessário), 1,2 mL do reagente metil celessolve (100%) + KCN (0,01 M) + ninidrina (5%). A mistura foi agitada e todos os tubos foram fechados com papel alumínio para serem aquecidos em banho-maria a 100°C durante 15 minutos, após esse tempo os tubos foram resfriados em água por 5 minutos, durante esse tempo etanol (60%) foi acrescentado. A mistura foi homogeneizada e levada para a leitura em espectrofotômetro a 570 nm, a leitura de leucina foi utilizada para elaborar a curva padrão.

### **3.9.4 Extração de RNA total**

O procedimento para extração do RNA total foi realizado segundo GAO et al., (2001) com modificações. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, e aproximadamente

100 mg de tecido transferidos para microtubos contendo 500  $\mu$ L de tampão de extração, composto de 200 mM de Tris-HCl pH 7,5, 100 mM de LiCl, 5 mM de EDTA e 1% de SDS. Após as misturas das amostras e o tampão de extração, foram adicionados 250  $\mu$ L de fenol e 250  $\mu$ L de clorofórmio, este conjunto foi então agitada em vórtex durante um minuto e em seguida centrifugado por 10 min a 20.000 x g. A fase aquosa foi depositada para novos tubos já contendo 250  $\mu$ L de fenol e 250  $\mu$ L de clorofórmio. Esta mistura foi novamente agitada em vórtex por um minuto, centrifugada por 10 min a 20.000 x g, e a fase aquosa transferida para novo tubo. Sendo assim o RNA foi precipitado com um volume de LiCl 6 M durante 16 horas a 4°C.

A continuação as amostras foram centrifugadas por 10 min a 20.000 x g, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspense com 1mL de LiCl 3 M para uma segunda precipitação por 10 min a 20.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense com 250  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O ultrapura tratada com dietil pirocarbonato (milli-Q-DEPC). Após completa dissolução do precipitado foram adicionados 0,1 volume de acetato de sódio a 3M (25  $\mu$ L) e 2 volumes de etanol absoluto (550  $\mu$ L). Esta mistura foi mantida no freezer -80° C por 2h, e posteriormente centrifugada por 15 min a 20.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 300  $\mu$ L de etanol 70%. Após a secagem do precipitado o RNA foi ressuspense em 50  $\mu$ L de água milliQ-DEPC e armazenado em freezer -80° C.

### 3.9.5 Tratamento com DNase e síntese de cDNA

Após quantificação do RNA total usando Nanodrop 2000C (*Thermo Scientific*), foi usado 500 ng de RNA total para tratamento com DNase I usando kit Thermo Scientific de acordo com as instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi feita usando o kit *GoScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription System* (*Thermo Scientific*).

### 3.9.6 PCR em tempo real

Para as reações de PCR foram feitas no aparelho Step One Plus (Applied Biosystems) usando cDNA, iniciadores (Tabela 4) e EvaGreen (Solis Biodyne) de acordo com as especificações do fabricante. As sequências dos genes estudados foram obtidos no sítio TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) e os iniciadores feitos usando a ferramenta *primer-BLAST* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A especificidade das reações foi feita após a reação de PCR na curva de dissociação. Todos os iniciadores usados apresentaram alta especificidade para o gene alvo. O cálculo de expressão foi feito de acordo com LIVAK e SCHMITTGEN (2001) usando plantas *chl1-5* como controle (valor 1), a partir dos valores de Ct (*Cycle Threshold*, ciclo limite) obtidas após as reações de PCR em tempo real. Foi usado o gene da Ubiquitina 14 (*Ubi14*) como gene normalizador (Santos, 2009; Santos et al., 2012).

**Tabela 4.** Sequências dos iniciadores usados nas reações de PCR em tempo real.

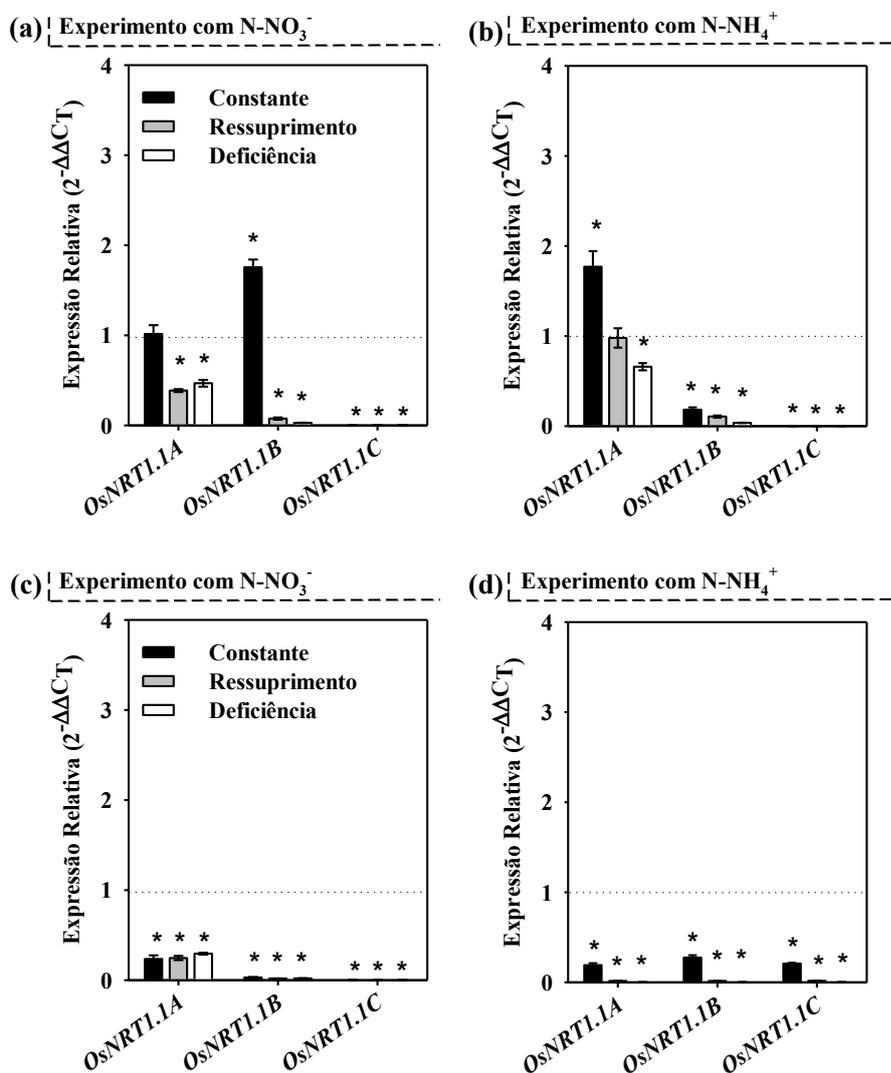
Gene	Iniciadores Forward/Reverse
<i>UBI14</i>	5' -TCACTGGAAAGACCATTACTCTTGAA-3' 5' -AGCTGTTTTCCAGCGAAGATG -3'
<i>NRT1.1*</i>	5' - CGTCCACGCTCAATTAACGA -3' 5' - CGATGGAACGGTCCAATGTC -3'
<i>NRT2.1</i>	5' - CTTGCGGAGCCACCTTTG -3' 5' - TTAAACCCGAGATGATGCCTAGA -3'
<i>NRT2.2</i>	5' - CTTGCGGAGCCACCTTTG -3' 5' - GTTGCGTTCCTTTGTGGAC -3'
<i>NAR2.1</i>	5' - CTTGCGGAGCCACCTTTG -3' 5' - AGAAGACGACAAGAGCCACG -3'
<i>NRT1.2</i>	5' - TTCCTAGGGTCAGCCGATCT -3' 5' - ACCCCATAGCCAAAGAAGCC -3'
<i>OsNRT1.1Afull*</i>	5' - CTGATCCCGCAGTTCCTGTT -3' 5' - ACCCCATAGCCAAAGAAGCC -3'
<i>OsNRT1.1Aspl*</i>	5' - AACTTCATGGGCACCTCCTT -3' 5' - AGATGGCGATGGTGAGGTAG -3'
<i>OsNRT1.1B*</i>	5' - TACTTCTACTGGCTGCTCGC -3' 5' - CGAGGCGCTTCTCCTTGTTAG -3'
<i>OsNRT1.1C*</i>	5' - GACAACCTGGACGAGGGAAG -3' 5' - GAACACCGCTAGGTTACCA -3'

\* somente analisados nas plantas transformadas contendo o respectivo gene. Para as plantas transformadas, a expressão do gene de arroz foi feito para comparar as duas linhagens de cada gene usadas no estudo.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Expressão dos Genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* em Arroz

Para verificar o padrão de expressão dos três prováveis ortólogos do *NRT1.1* de *Arabidopsis thaliana* em arroz, foi avaliada a expressão do *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* em raízes e parte aérea da variedade de arroz Nipponbare cultivada com  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ . A análise de expressão por RTqPCR dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* mostrou variação entre os genes, fonte de N e parte da planta (Figura 2).



**Figura 2.** Expressão dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* nas raízes (A e B) e parte aérea (C e D) de arroz cultivados com  $\text{NO}_3^-$  (A e C) e com  $\text{NH}_4^+$  (B e D). Os tratamentos usados foram suprimento constante com 2 mM de N- $\text{NO}_3^-$  ou N- $\text{NH}_4^+$ , ressuprimento com 2 mM de N- $\text{NO}_3^-$  ou N- $\text{NH}_4^+$  após 72 horas de privação de N e deficiência de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  72 horas. \* representa diferença com *OsNRT1.1A* no tratamento constante com  $\text{NO}_3^-$  na raiz.

A expressão de *OsNRT1.1A* ocorreu principalmente nas raízes, com maior expressão no suprimento constante com  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , enquanto na parte aérea *OsNRT1.1A* foi mais expresso nas plantas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ . A expressão de *OsNRT1.1B* ocorreu

principalmente nas raízes das plantas cultivadas com suprimento constante de  $\text{NO}_3^-$ , enquanto na parte aérea e no cultivo com  $\text{NH}_4^+$  apresentou baixa expressão. A expressão de *OsNRT1.1C* foi muito baixo em todos os tratamentos e doses usadas.

Os resultados de expressão mostram a complexa regulação dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* em arroz. Enquanto *OsNRT1.1A* apresentou expressão menos variável e foi mais constitutivo, *OsNRT1.1B* parece ser expresso principalmente nas raízes e com suprimento constante com  $\text{NO}_3^-$  e *OsNRT1.1C* com menor relevância entre as ortólogos de *OsNRT1.1*. PLETT et al. (2010) também verificaram menor expressão do *OsNRT1.1C* em arroz. Os resultados de expressão sugerem a maior participação das ortólogos *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* em arroz, sendo que *OsNRT1.1A* pode atuar no fluxo de  $\text{NO}_3^-$  na parte aérea. O  $\text{NH}_4^+$  e seus produtos de assimilação, principalmente glutamina, é forte inibidor de vários transportadores de  $\text{NO}_3^-$  (GLASS et al., 2003) e foi usado como fonte de N na solução nutritiva para verificar a expressão de *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* em condições repressivas (SPERANDIO, 2015). A expressão de *OsNRT1.1A* apresentou pouco efeito inibitório nas raízes das plantas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , mostrando ser pouco sensível as variações do *status* de N na planta. Por outro lado, a expressão de *OsNRT1.1B* foi induzida somente por  $\text{NO}_3^-$  nas raízes de arroz, sugerindo que pode atuar na absorção de  $\text{NO}_3^-$  nas raízes e com menor participação no fluxo de  $\text{NO}_3^-$  na parte aérea.

Experimento hidropônico com plantas de arroz superexpressando o *OsNRT1.1A* revela forte indução pelo amônio, sugerindo que esse ortólogo possui importância em áreas de produção de arroz alagado (WANG et al., 2018). Esses dados mostram similaridade com nossos resultados obtidos na Figura 2, em raiz onde o  $\text{NH}_4^+$  é responsável por induzir a expressão de *OsNRT1.1A*. WANG et al., (2018) demonstraram que em condições de campo o mutante *OsNRT1.1A* mostra decréscimo no tamanho da planta, tamanho de panícula, e massa de 1000 sementes, em contrapartida a superexpressão de *OsNRT1.1A* em *Arabidopsis thaliana* resultou em incremento do tamanho da planta e menor tempo de florescimento com redução de 6 a 15 dias (WANG et al., 2018).

#### **4.2 Análise da superexpressão dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* no mutante *chl1-5* de *Arabidopsis thaliana***

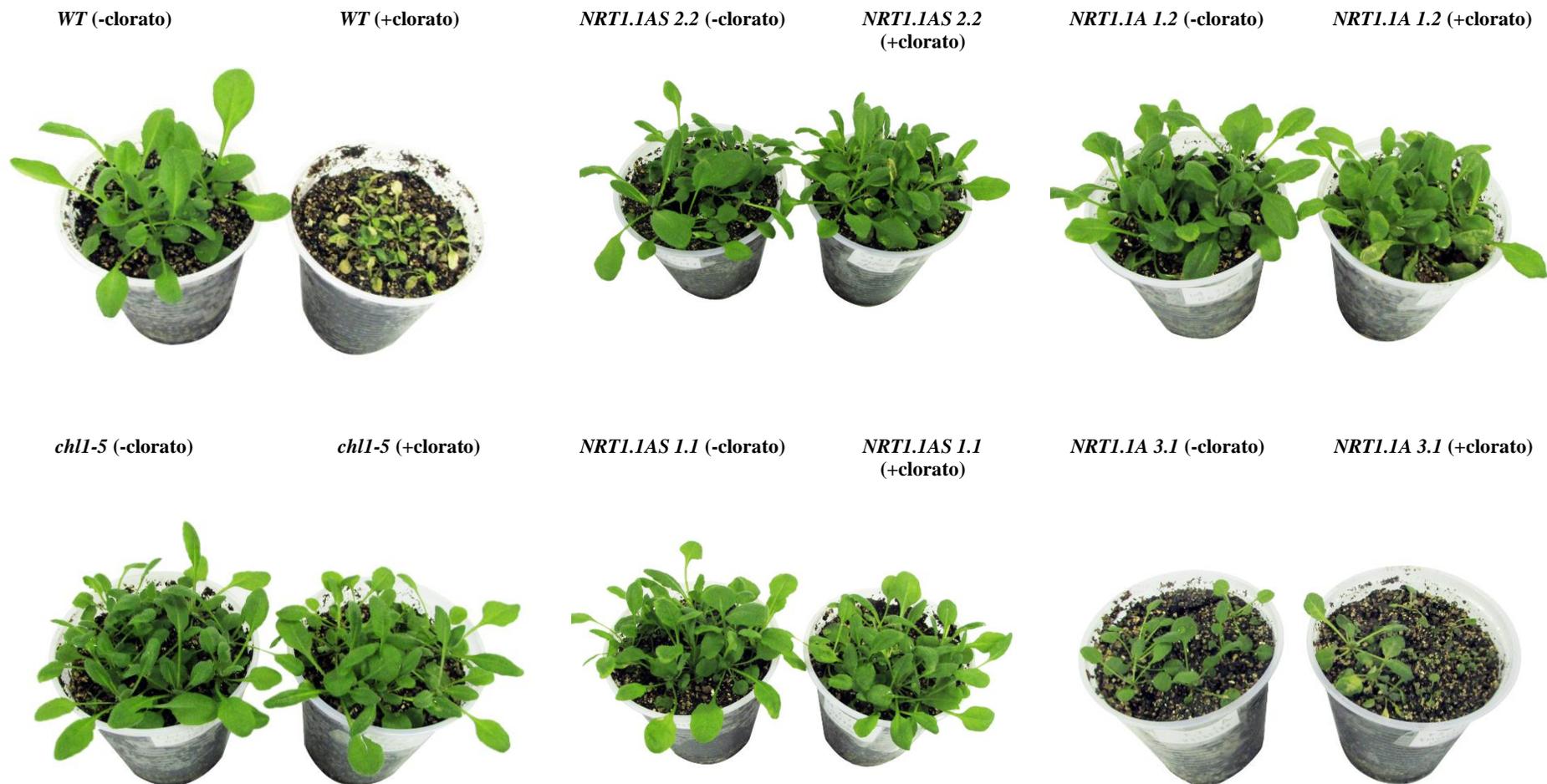
Com relação ao cultivo da *Arabidopsis thaliana* RIVERO et al., (2014) relatam que, para o bom crescimento das plantas de *Arabidopsis thaliana* a irradiância deve estar da faixa de 120 a 150  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-2}$ , além de temperaturas entre 22 e 23 ° C. Na câmara de crescimento o valor mensurado pelo radiômetro foi de 79  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , não sendo observado nenhum sintoma típico de estresse luminoso para todas as plantas, resultado contrastante com a literatura. Fotoperíodo longo, acima de 12 horas pode diminuir o ciclo vegetativo de *Arabidopsis*, neste caso plantas *WT* apresentaram estágio reprodutivo a partir das 3 semanas, já as plantas *chl1-5* a partir de 4 semanas. O ciclo reprodutivo de plantas *WT* foi reduzido em 2 semanas, para *chl1-5* o ciclo se manteve conforme relatado pela literatura. Conforme a metodologia do item 3.7, o resultado da segregação 3:1 é apresentado na Tabela 5. Se verifica que todas as linhagens utilizadas para as análises posteriores podem ser utilizadas.

**Tabela 5.** Resultado da segregação nas plantas selecionadas ao antibiótico canamicina.

<b>Linhagem</b>	<b>Número de plantas</b>	<b>Plantas Vivas</b>	<b>Plantas Mortas</b>	<b>Qui quadrado calculado</b>	<b>Qui quadrado tabelado (0,05%)</b>	<b>Segregação 3:1</b>	<b>Porcentagem plantas mortas</b>
OsNRT1.1Aspl L1	742	324	418	6,42	16,91	Sim	56,33%
OsNRT1.1Aspl L2	845	654	191	3,43	16,91	Sim	22,60%
OsNRT1.1Aspl L3	408	317	91	2,13	9,49	Sim	22,30%
OsNRT1.1A L1	715	537	178	10,06	18,31	Sim	24,89%
OsNRT1.1A L2	313	243	70	4,63	9,49	Sim	22,36%
OsNRT1.1A L3	290	223	67	3,73	7,81	Sim	23,10%
OsNRT1.1B L1	661	487	174	1,85	16,91	Sim	26,32%
OsNRT1.1B L2	552	480	72	11,64	16,91	Sim	13,04%
OsNRT1.1C L1	828	675	153	9,67	16,91	Sim	18,48%
OsNRT1.1C L2	856	682	174	7,76	14,06	Sim	20,33%
OsNRT1.1C L3	335	251	84	2,91	7,81	Sim	25,07%

Nos relatos de artigos científicos o protocolo de resistência ao clorato é avaliado no substrato, como no caso de WANG et al. (1998) que aplicaram em plantas de *A. thaliana* com doze dias de idade a concentração de 12 mM de clorato de sódio, 3,75 mM de sulfato de amônio e 8,25 mM de nitrato de potássio. Sendo assim este experimento foi realizado conforme WANG et al. (1998), no entanto, com plantas homozigotas de 21 dias após germinação que receberam sete aplicações de clorato de sódio na concentração de 12 mM, o tratamento controle recebeu a mesma concentração de nutrientes sem clorato.

O resultado de resposta de absorção ao clorato nas plantas WT é visível (Figura 3), mostrando também o fenótipo das linhagens transformadas. O mutante *chl1-5* não mostra alteração nenhuma à aplicação com clorato conforme dados de literatura de LIU et al. (1999). Para o ortólogo *OsNRT1.1As 2.2 e 1.1* (Figura 3) não há variação de fenótipo. Já para o ortólogo *A1.2* e *A3.1* existe variação, no entanto, para linhagem *A3.1* o efeito tóxico do clorato é mais evidente, mas não tão evidente como na planta WT. Na Figura 4 o fenótipo de sensibilidade ao clorato pela superexpressão do transportador *OsNRT1.1B* foi mais característico e aproximou-se da planta WT, indicando que possivelmente este seja o ortólogo predominante na absorção de nitrato em arroz. A superexpressão do *OsNRT1.1C 1.1 e 2.1* não mostrou evidências de danos críticos para o tratamento com clorato (Figura 4).

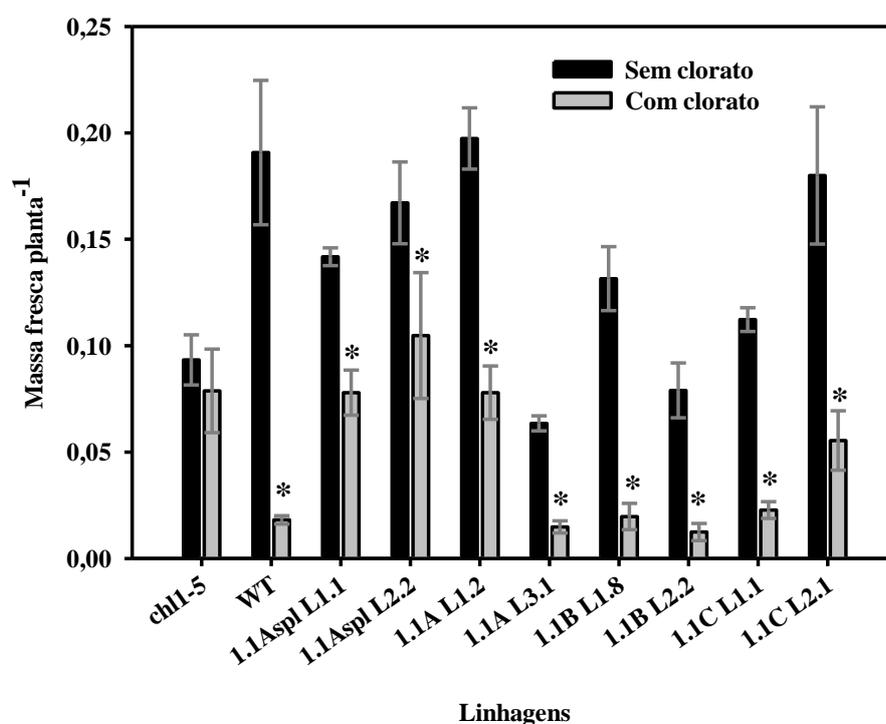


**Figura 3.** Plantas de *Arabidopsis thaliana* Wild type (WT) com clorato de sódio ( $\text{NaClO}_3$ ) e sem clorato de sódio, mutante *chl1-5*, e linhagens transformadas *OsNRT1.IAS* genótipos 2.2 e 1.1, *OsNRT1.IA* genótipos 1.2 e 3.1.



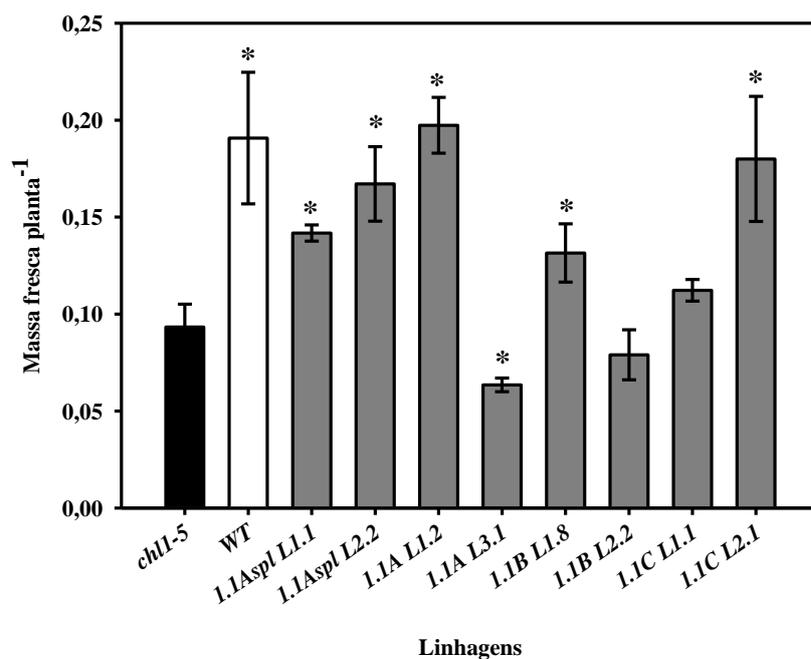
**Figura 4.** Plantas de *Arabidopsis thaliana* Wild type (*WT*) com clorato de sódio ( $\text{NaClO}_3$ ) e sem clorato de sódio, mutante *chl1-5*, e linhagens transformadas *OsNRT1.1B* genótipos 1.8 e 2.2, *OsNRT1.1C* genótipos 1.1 e 2.1.

É possível observar na Figura 5 que quando foi aplicado 12 mM de clorato não houve redução de massa fresca no mutante *chl1-5*, o mesmo acontece no tratamento controle, demonstrando que a ausência do gene NRT1.1, também impede a absorção de clorato. No caso da planta WT observa-se diferença significativa de redução de massa fresca com o clorato, resultados semelhantes são visíveis para todas as linhagens transformadas. O clorato é molécula análoga ao nitrato, sendo que depois de ser absorvido o clorato é reduzido no interior das células a clorito, pela atividade da enzima nitrato redutase, assim, o clorito é tóxico para a planta resultando na diminuição de massa fresca para as todas as isoformas transformadas.

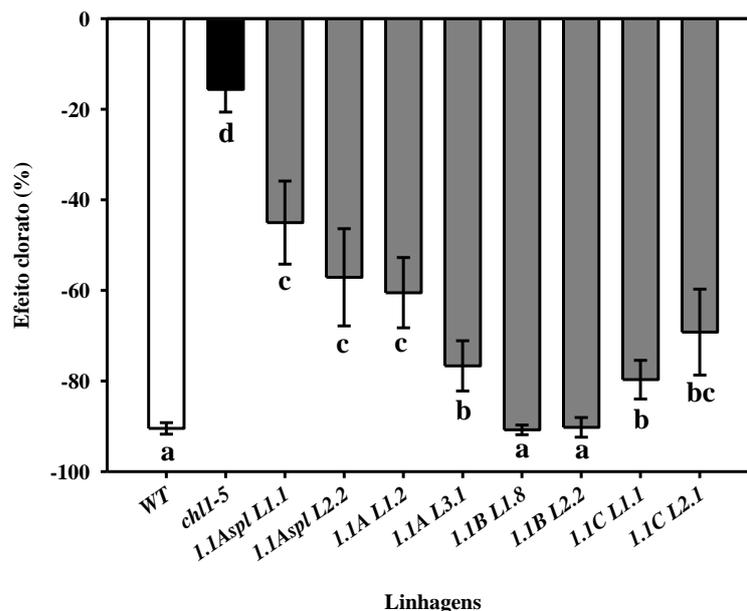


**Figura 5.** Massa fresca planta<sup>-1</sup> com e sem clorato no mutante *chl1-5*, WT e *chl1-5* transformado com superexpressão dos genes de arroz *OsNRT1.1A splicing* (1.1Aspl), *OsNRT1.1A* (1.1A), *OsNRT1.1B* (1.1B) e *OsNRT1.1C* (1.1C). Foram usadas duas linhagens para cada mutante superexpressando *OsNRT1.1*.

Na massa fresca (Figura 6) de plantas que receberam dosagens de amônio e nitrato na concentração de 3,75 mM e 8,25 mM respectivamente, há diferença significativa entre WT e linhagens homocigotas transformadas comparadas ao mutante *chl1-5*, no entanto as linhagens B2.2 e C1.1 não mostram diferença em relação ao mutante, valores que não são conclusivos em relação a absorção de nitrato pela planta. Para caracterizar a importância do teste com clorato e a função do NRT1.1, a Figura 7 mostra a diminuição do efeito do clorato em porcentagem, sendo assim as linhagens transformadas e WT mostram efeitos de diminuição acima de 40%, sendo que a linhagem WT e isoformas NRT1.1 B1.8 e NRT1.1 B2.1 tem redução significativa acima de 80%, argumentando a função transportadora de nitrato dessas linhagens transformadas e sua proximidade com a planta WT, pode-se concluir que as linhagens transformadas dessa isoforma possuem a função de transporte de nitrato semelhante a planta WT.

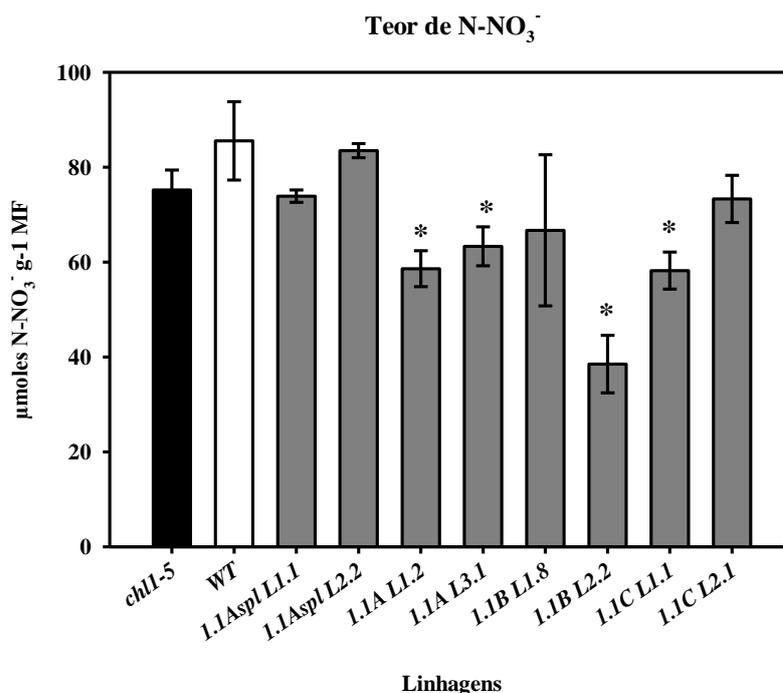


**Figura 6.** Massa fresca planta sem clorato no mutante *chl1-5*, WT e *chl1-5* transformado com superexpressão dos genes de arroz *OsNRT1.1A* splicing (*1.1Aspl*), *OsNRT1.1A* (*1.1A*), *OsNRT1.1B* (*1.1B*) e *OsNRT1.1C* (*1.1C*). Foram usadas duas linhagens para cada mutante superexpressando *OsNRT1.1*. \* Representa diferença significativa das linhagens transformadas e WT comparadas com plantas *chl1-5* ( $P < 0,05$ ).



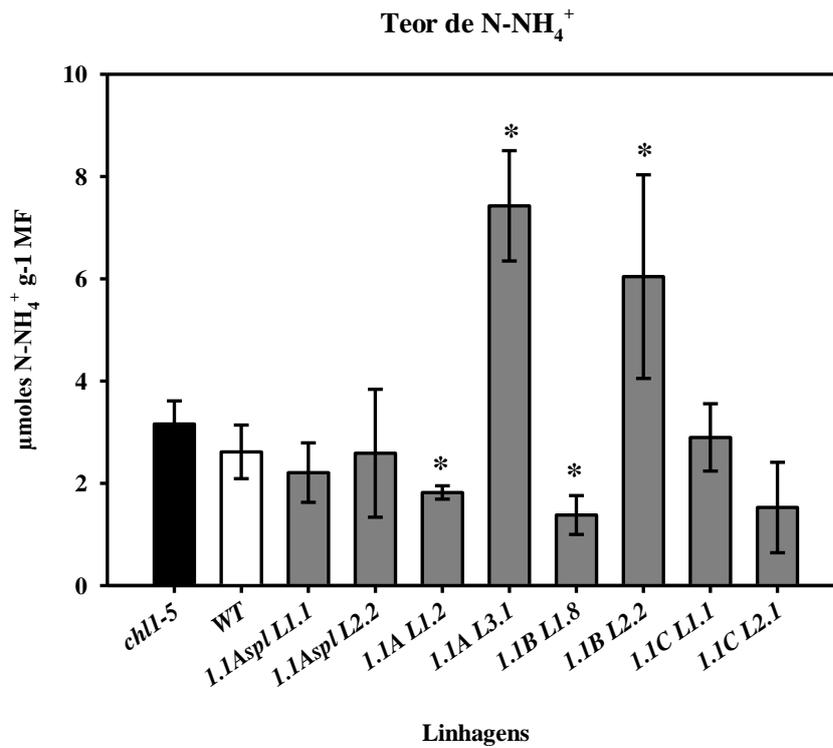
**Figura 7.** Efeito do clorato (%) no mutante *chl1-5*, WT e *chl1-5* transformado com superexpressão dos genes de arroz *OsNRT1.1A* splicing (*1.1Aspl*), *OsNRT1.1A* (*1.1A*), *OsNRT1.1B* (*1.1B*) e *OsNRT1.1C* (*1.1C*). Foram usadas duas linhagens para cada mutante superexpressando *OsNRT1.1*.

O teor de nitrato (Figura 8) teve diferença significativa entre as linhagens transformadas e o mutante *chl1-5*, a exceção da planta *WT*, as duas isoformas de *Aspl*, *1.1B L1.8*, além do mutante *1.1C L2.1*. LIU et al., (1999) conferiram que há redução no teor de nitrato do mutante *chl1-5* quando comparado a *WT* sobre doses de 250  $\mu\text{M}$   $\text{KNO}_3$ , sendo que o mutante *chl1-5* tem falha na absorção de nitrato do sistema de alta e baixa afinidade. No nosso experimento a concentração de nitrato foi 8.25 mM sobre a forma de  $\text{KNO}_3$ , mesmo assim não houve redução no teor de nitrato com entre a planta *WT* e *chl1-5*, possivelmente as doses aplicadas de nutrientes que receberam todas as plantas permitiu menor diferença entre as linhagens. LIU et al., (1999) demonstraram que embora possam existir diferenças entre o pH citoplasmático de *WT* e *chl1-5*, a redução na absorção de nitrato é devida principalmente a ausência do *NRT1.1*.



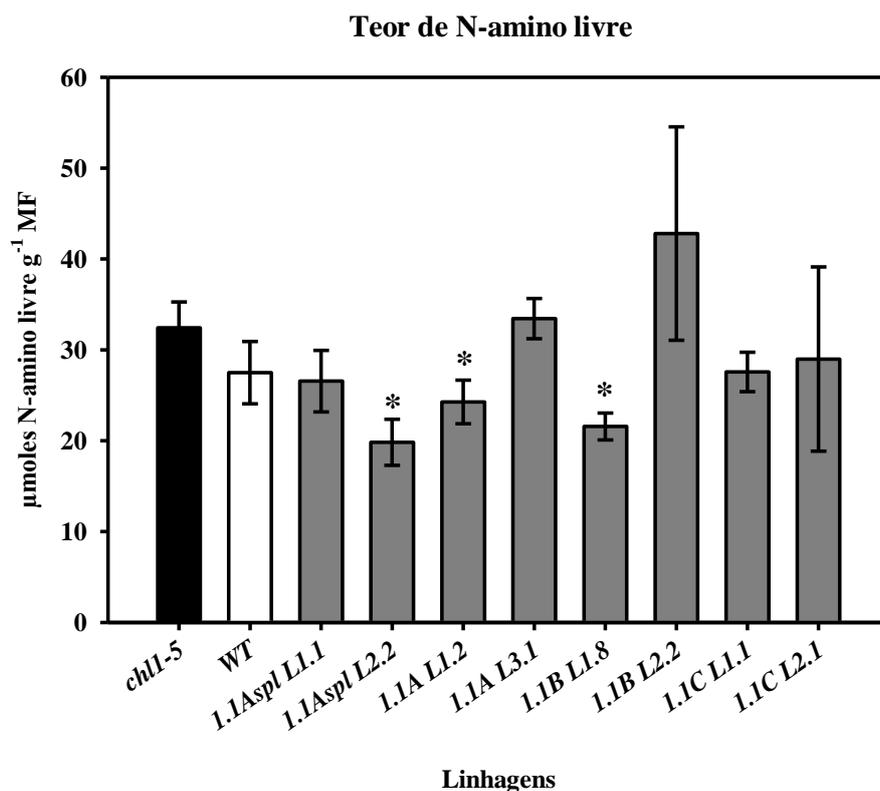
**Figura 8.** Teores de  $\text{N-NO}_3^-$  no mutante *chl1-5*, *WT* e *chl1-5* transformado com superexpressão dos genes de arroz *OsNRT1.1A splicing* (*1.1Aspl*), *OsNRT1.1A* (*1.1A*), *OsNRT1.1B* (*1.1B*) e *OsNRT1.1C* (*1.1C*). Foram usadas duas linhagens para cada mutante superexpressando *OsNRT1.1*.

Para o teor de  $\text{N-NH}_4^+$  (Figura 9) as linhagens que se diferenciam do mutante *chl1-5* são *1.1A L1.2* e *1.1B L1.8* tendo os menores teores de  $\text{N-NH}_4^+$ , as mesmas linhagens também apresentam maior massa fresca com relação ao *chl1-5* (Figura 5), já as linhagens que apresentam maior teor de amônio são *1.1A L3.1*, *1.1B L2.2* apresentaram menor massa fresca (Figura 6), possivelmente devido ao efeito tóxico do amônio nas plantas.



**Figura 9.** Teores de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no mutante *chl1-5*, WT e *chl1-5* transformado com superexpressão dos genes de arroz *OsNRT1.1A* splicing (*1.1Aspl*), *OsNRT1.1A* (*1.1A*), *OsNRT1.1B* (*1.1B*) e *OsNRT1.1C* (*1.1C*). Foram usadas duas linhagens para cada mutante superexpressando *OsNRT1.1*.

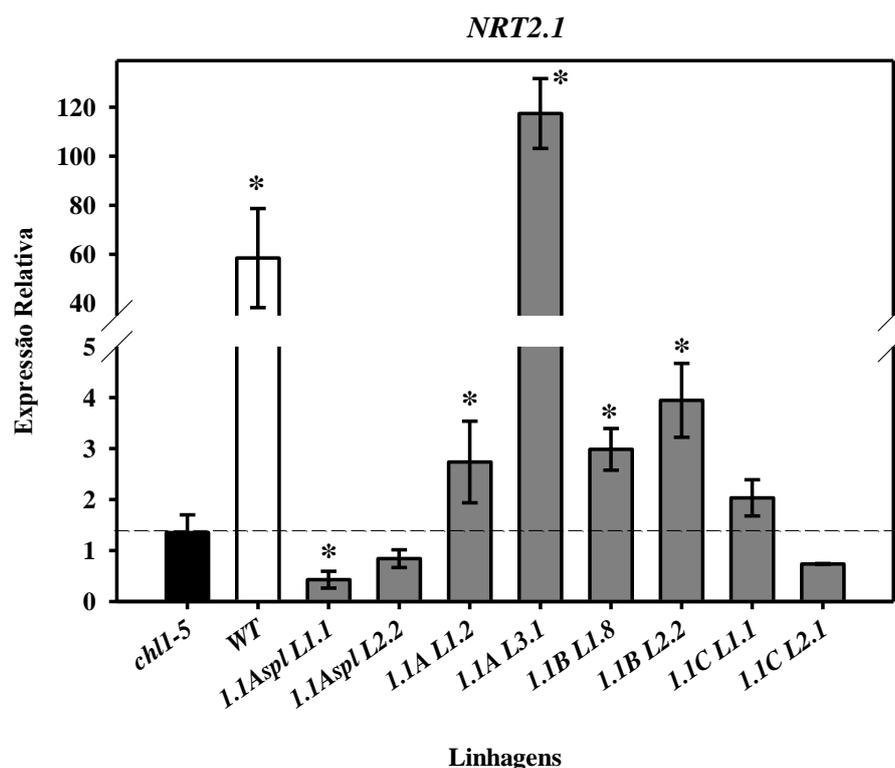
Não houve variação nos teores de N-amino livre entre as linhagens analisadas, com exceção de *1.1A spl L1.2*, *1.1A L1.2* e *1.1B L1.8*, que apresentaram menor teor de N-amino quando comparado com *chl1-5*. O teor de aminoácidos livres (principalmente glutamina) pode regular a expressão de diversos genes, como *NRT2.1*. No entanto, a variação nos teores de N-amino livre não é suficiente para explicar as diferenças na expressão de *NRT2.1* e *NAR2.1* entre as linhagens superexpressando isoformas de *OsNRT1.1* (Figura 10).



**Figura 10.** Teores de N-amino no mutante *chl-5*, WT e *chl-5* transformado com superexpressão dos genes de arroz *OsNRT1.1A* splicing (*1.1Aspl*), *OsNRT1.1A* (*1.1A*), *OsNRT1.1B* (*1.1B*) e *OsNRT1.1C* (*1.1C*). Foram usadas duas linhagens para cada mutante superexpressando *OsNRT1.1*.

A superexpressão de *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* apresentaram efeito de indução no *NRT2.1*. Os resultados com clorato mostraram a capacidade de transporte de  $\text{NO}_3^-$  desses transportadores, principalmente *OsNRT1.1B* que apresentou níveis de redução de crescimento semelhantes ao WT com aproximadamente 90% de redução pelo efeito do clorato (Figura 7). A linhagem *OsNRT1.1A* L3.1 mostrou indução de *NRT2.1* 120 vezes maior quando comparado com WT (Figura 11).

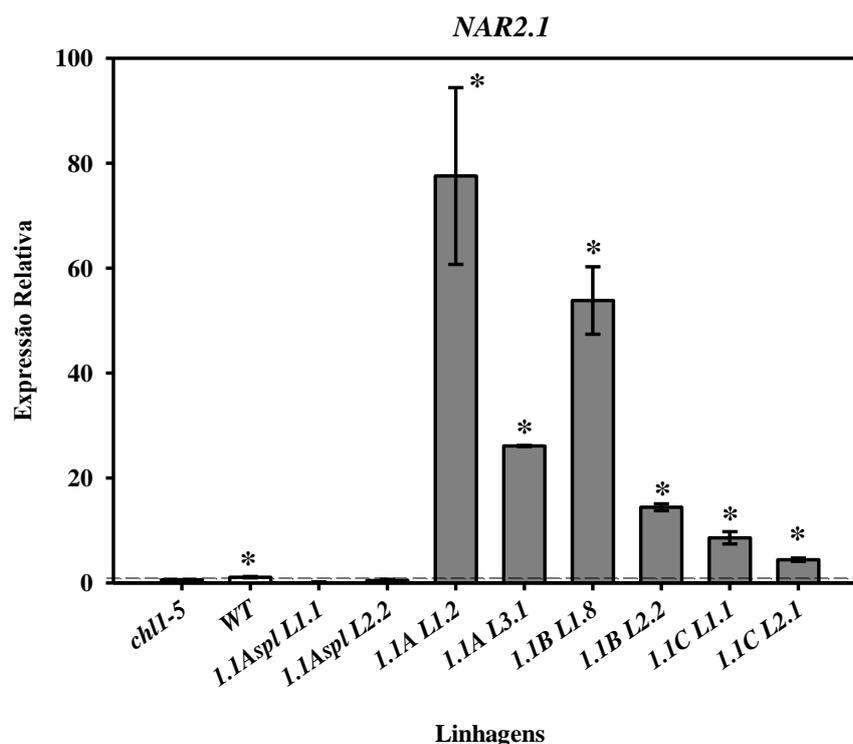
A superexpressão de *OsNRT1.1C* não afetou a expressão de *NRT2.1*. Curiosamente, a expressão de *OsNRT1.1C* em arroz é muito baixa quando comparada com *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B*. O teste com clorato mostrou sua capacidade de transportar  $\text{NO}_3^-$ , no entanto, sua baixa expressão em arroz indica que *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* sejam os ortólogos de *NRT1.1* mais importantes em arroz (Figura 11).



**Figura 11.** Expressão do transportador de  $\text{NO}_3^-$  *NRT2.1* no mutante *chl1-5*, WT e *chl1-5* transformado com superexpressão dos genes de arroz *OsNRT1.1A splicing* (1.1Aspl), *OsNRT1.1A* (1.1A), *OsNRT1.1B* (1.1B) e *OsNRT1.1C* (1.1C). Foram usadas duas linhagens para cada mutante superexpressando *OsNRT1.1*. A expressão no mutante *chl1-5* foi colocado valor 1.

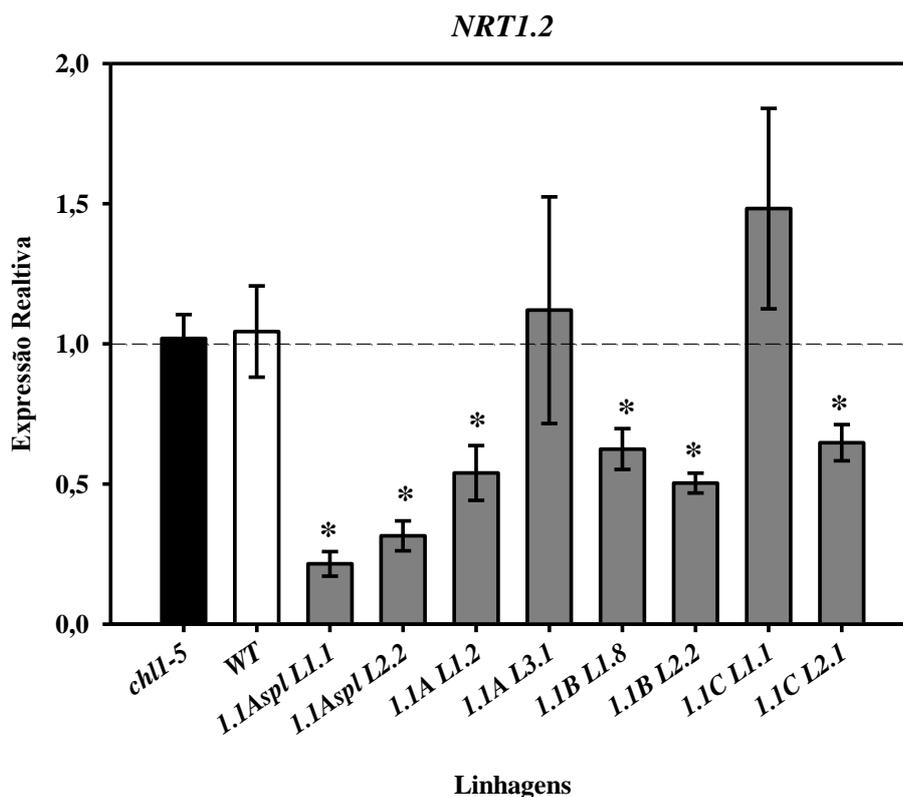
Tanto o sistema de transporte de alta afinidade induzido pelo nitrato ou não induzido (constitutivo) requerem da proteína NAR2 para sua funcionalidade (Okamoto et al., 2006), apesar da proteína NAR2.1 não transportar  $\text{NO}_3^-$ . A proteína NAR2.1 é essencial para o endereçamento de *NRT2.1* para a membrana plasmática e também forma complexos com *NRT2.1* na membrana plasmática (2 *NRT2.1*/2 *NAR2.1*) (Orsel et al., 2006). Sem a proteína NAR2.1, o transportador *NRT2.1* perde sua função de transportar  $\text{NO}_3^-$ .

Plantas WT apresentaram maior expressão de *NAR2.1* comparado com *chl1-5* (Figura 12), apesar de pequena indução de expressão. A superexpressão de *OsNRT1.1A splicing* não afetou a expressão de *NAR2.1*. No entanto, a superexpressão de *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* mostrou forte aumento da expressão de *NAR2.1* em *Arabidopsis*, principalmente 1.1A L1.2 e 1.1B L1.8. É conhecido a participação de *NRT1.1* na expressão de *NRT2.1*, no entanto, nossos resultados mostram claramente que os transportadores de arroz ortólogos ao *NRT1.1* de *Arabidopsis thaliana* *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* induzem a expressão de *NAR2.1* em *Arabidopsis thaliana*. Em arroz, os transportadores *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* são os mais expressos e podem atuar na sinalização para expressão de *OsNAR2.1*, visto que *OsNRT2.1* depende também de *OsNAR2.1* para transportar  $\text{NO}_3^-$  (Yan et al., 2011). A falha da superexpressão do *OsNRT1.1A splicing* em induzir a expressão de *NAR2.1*, assim como *NRT2.1*, mostra a importância do primeiro éxon para a sinalização mediada pelo *OsNRT1.1A*.



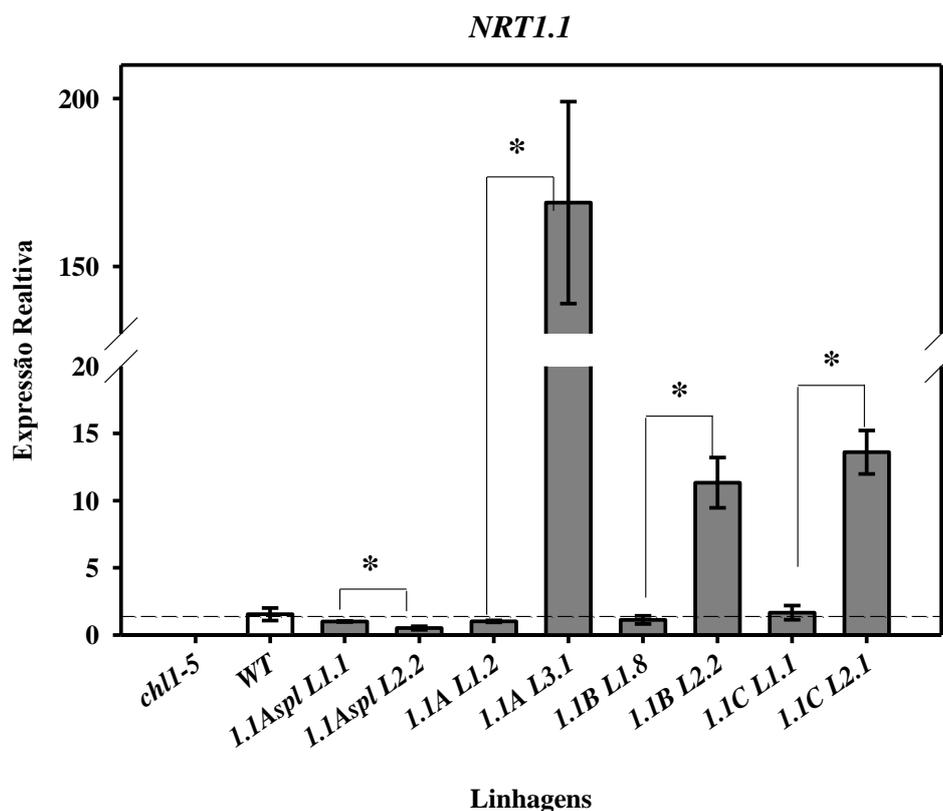
**Figura 12.** Expressão da proteína NAR2.1 no mutante *chl1-5*, WT e *chl1-5* transformado com superexpressão dos genes de arroz *OsNRT1.1A splicing* (*1.1Aspl*), *OsNRT1.1A* (*1.1A*), *OsNRT1.1B* (*1.1B*) e *OsNRT1.1C* (*1.1C*). Foram usadas duas linhagens para cada mutante superexpressando *OsNRT1.1*. A expressão no mutante *chl1-5* foi colocado valor 1.

O transportador NRT1.2 pertence a família dos transportadores de  $\text{NO}_3^-$  de baixa afinidade (NRT1), sendo expresso na raiz e atuando na absorção de  $\text{NO}_3^-$  principalmente com altas doses de  $\text{NO}_3^-$ . As plantas WT não apresentaram diferença de expressão de *NRT1.2* em comparação a *chl1-5* (Figura 13), no entanto, com exceção de duas linhagens (*1.1A L3.1* e *1.1C L1.1*) a superexpressão de *OsNRT1.1* reduziu a expressão de *NRT1.2* em *Arabidopsis*. Curiosamente, a superexpressão de *OsNRT1.1A splicing* também mostrou redução de *NRT1.2* (baixa afinidade), enquanto não afetou o sistema de alta afinidade (NRT2.1/NAR2.1). Podem existir outras regiões em *OsNRT1.1* que são importantes na sinalização além do primeiro éxon, podendo atuar na regulação de outros componentes envolvidos na absorção e metabolismo de nitrogênio em *Arabidopsis*. A superexpressão de *OsNRT1.1* sugere que esses transportadores também podem regular o sistema de baixa afinidade, modulando a expressão dos sistemas de baixa e alta afinidade da absorção de  $\text{NO}_3^-$ .



**Figura 13.** Expressão do transportador *NRT1.2* no mutante *chll-5*, WT e *chll-5* transformado com superexpressão dos genes de arroz *OsNRT1.1A splicing* (*1.1Aspl*), *OsNRT1.1A* (*1.1A*), *OsNRT1.1B* (*1.1B*) e *OsNRT1.1C* (*1.1C*). Foram usadas duas linhagens para cada mutante superexpressando *OsNRT1.1*. A expressão no mutante *chll-5* foi colocado valor 1.

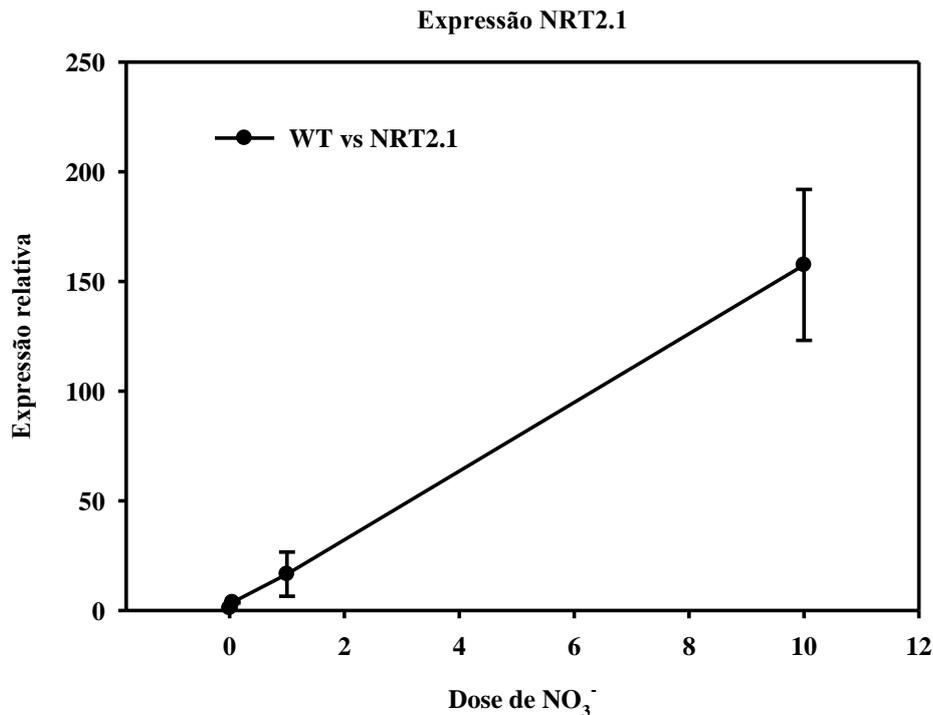
A análise de expressão de *OsNRT1.1* mostra diferenças de expressão entre as linhagens de *chll-5* transformadas com as isoformas de *OsNRT1.1* (Figura 14). As linhagens *1.1A splicing L1.1* e *L2.2* apresentaram expressão de *OsNRT1.1A splicing* similar, enquanto *1.1A L3.1* apresentou expressão de *OsNRT1.1A* 168 vezes maior quando comparada com *1.1A L1.2*, a linhagem *1.1A L3.1* também apresenta maior teor de  $\text{N-NO}_3^-$  (Figura 8). A linhagem *1.1B L2.2* apresentou expressão de *OsNRT1.1B* 11 vezes maior que a linhagem *1.1B L1.8*, enquanto *1.1C L2.1* apresentou expressão de *OsNRT1.1C* 13 vezes maior expressão quando comparada com *1.1C L1.1*. As diferenças de expressão entre as linhagens podem explicar algumas diferenças analisadas, como a linhagem *1.1A L3.1* apresentar indução de *NRT2.1* 120 vezes maior que *chll-5*, enquanto *1.1A L1.2* somente 3 vezes, visto que *1.1A L3.1* expressou *OsNRT1.1A* 168 vezes mais que *1.1A L1.2* (Figura 14).



**Figura 14.** Comparação da expressão do *NRT1.1* ou isoformas de *OsNRT1.1* nas linhagens transformadas. Para comparar a expressão entre as linhagens transformadas com o mesmo gene, foi atribuído valor 1 para *1.1A spl L1.1*, *1.1A L1.2*, *1.1B L1.8* e *1.1C L1.1*.

Os resultados apresentados desde a Figura 3 até a 14 foram feitos a partir do item 3.9, com a coleta de plantas cultivadas a partir de substrato. No entanto com o intuito de conhecer padrões de expressão gênica mais apurados, os resultados das Figuras 15 a 18 são apresentados a continuação, os mesmos foram obtidos a partir de plantas cultivadas em solução nutritiva com quatro doses, conforme a metodologia descrita no item 3.9.

O gene *NRT2.1* é utilizado para estudar sua influência na resposta primária ao nitrato dependente do *NRT1.1* (NPF6.3), em plantas *WT* a expressão gênica do *NRT2.1* mostra padrão bifásico sobre exposição ao nitrato em alta e baixa afinidade, já a expressão de mesmo gene no mutante *chl1-5* mostra curva basal, demonstrando que o sistema tranceptor do *NRT1.1* além da presença ou ausência do nitrato no meio pode mostrar a concentração do nitrato (Ho et al., 2009). Na Figura 15 observa-se o aumento de expressão do *NRT2.1* na dose de 10 mM de  $KNO_3$  e sua diferença significativa com à dose 50  $\mu M$  e sem N. Não foi possível observar a variação bifásica para este gene devido a quantidade de doses usadas para este experimento, sendo que Ho et al. (2009), usaram dez doses de  $KNO_3$  fazendo mais evidente sua resposta bifásica.

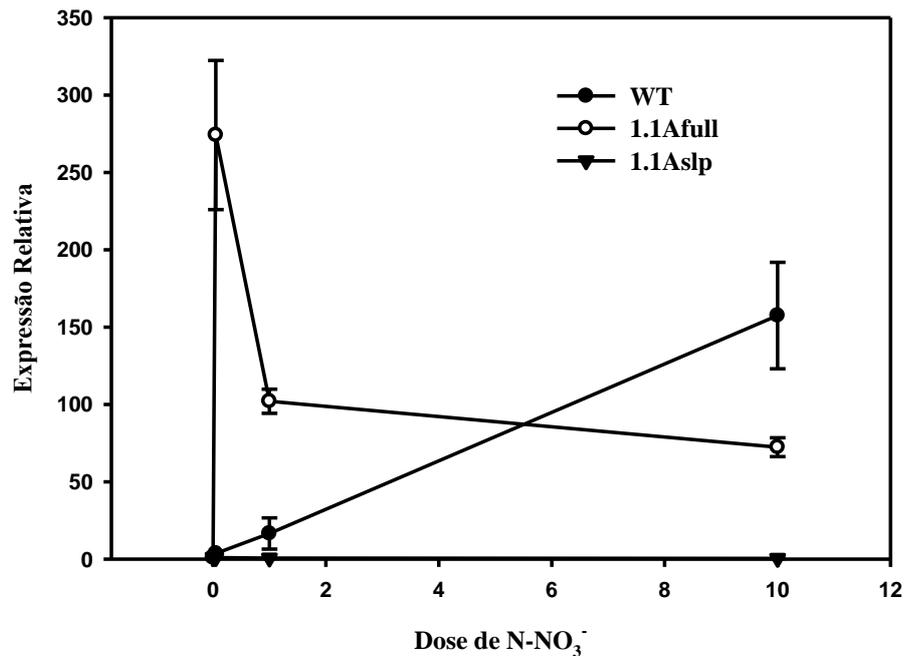


**Figura 15.** Expressão gênica do *NRT2.1* da planta WT de *A. thaliana*.

A transformação de *Arabidopsis thaliana* com *OsNRT1.1A* splicing não mostrou efeito na sinalização de *NRT2.1*. *OsNRT1.1A* splicing não possui o primeiro éxon do *OsNRT1.1A*, possivelmente afetando sua capacidade de interagir com a maquinaria celular envolvida na sinalização pelo NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, como a quinase CIPK23. A treonina 101 (T101) que supostamente seria responsável pela interação com CIPK23 não está presente nessa forma do splicing alternativo, evidenciando que o primeiro éxon é importante para a sinalização pelo NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Os dados do tratamento com clorato mostram que esses mutantes tiveram redução de crescimento, sendo que esse gene ainda pode atuar no transporte de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, mesmo que com menor eficiência quando comparado aos outros *OsNRT1.1* (Figura 16).

A superexpressão de *OsNRT1.1A* mostrou diferenças significativas para o gene *NRT2.1*, na dose de 50 µM há expressão acima de 250 vezes, no entanto na dose de 1 mM e 10 mM há redução da expressão. Neste caso aqui se verifica comportamento bifásico contrário ao que acontece com a planta WT (Figura 16), mostrando redução da expressão relativa conforme aumenta a doses de KNO<sub>3</sub>, sendo que existe similaridade com plantas mutantes onde se verifica o comportamento similar entre o mecanismo de ação de fosforilação e defosforilação da treonina no sitio ativo. O aumento da expressão do *NRT2.1* para o gene ortólogo *OsNRT1.1A* full na dose de 50 µM pode estar relacionada ao sistema de indução primária ao nitrato, relatado no trabalho de Ho et al., (2009).

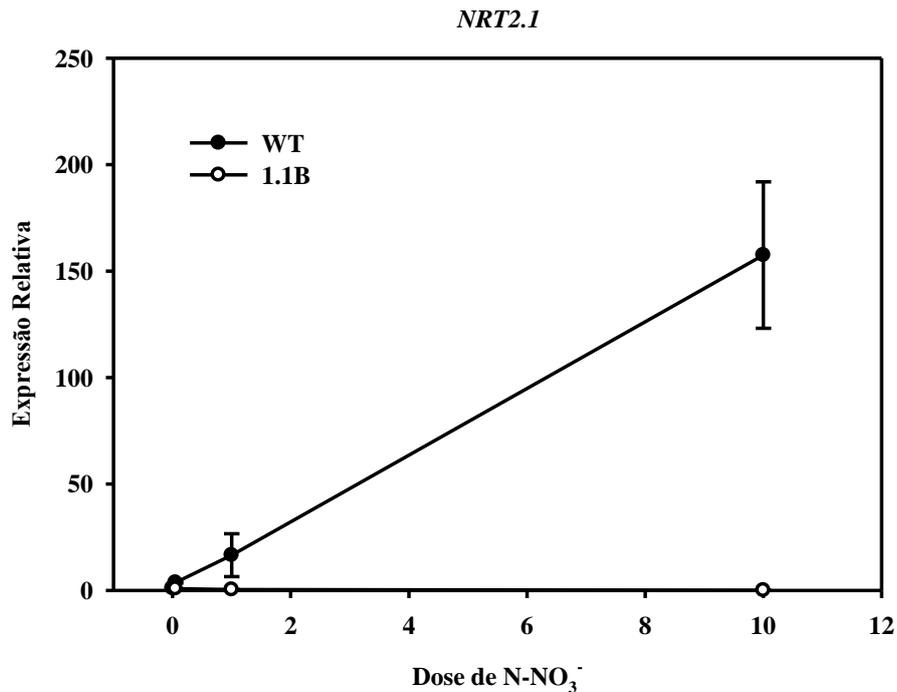
### *NRT2.1*



**Figura 16.** Expressão do transportador *NRT2.1* nas isoformas de *OsNRT1.1 A full* e *Aslp* nas linhagens transformadas.

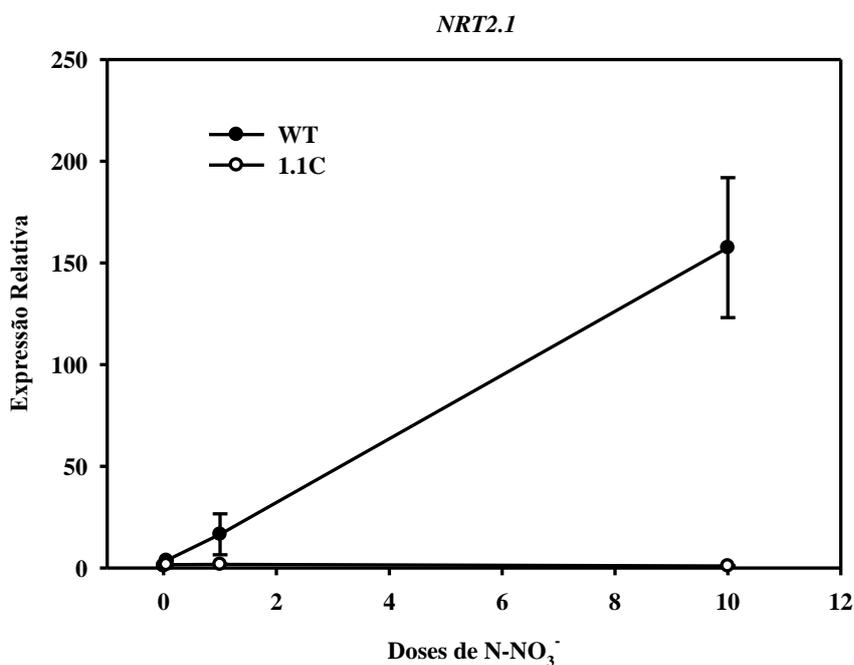
Os resultados do gráfico mostram que o *OsNRT1.1B* não é regulado pelo gene *NRT2.1* sobre altas e baixas concentrações de nitrato no meio. Hu et al., (2015) demonstraram que *OsNRT1.1B* é responsável pela absorção de nitrato em arroz, também estudou a variação de aminoácidos entre as variedades Japônica e Indica, sendo que Treonina é substituída pela Metionina, respectivamente. O gene *OsNRT1.1B* da cultivar indica mostra interessante desempenho quanto a conteúdo de clorofila, taxa fotossintética, produção de biomassa, se comparado a alelo *OsNRT1.1B* da cultivar japônica, especialmente sobre baixos níveis de nitrogênio (Duan e Zhang, 2015).

A superexpressão de *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* apresentaram efeito de indução no *NRT2.1*. Os resultados com clorato mostraram a capacidade de transporte de  $\text{NO}_3^-$  desses transportadores, principalmente *OsNRT1.1B* que apresentou níveis de redução de crescimento semelhantes ao WT com aproximadamente 90% de redução pelo efeito do clorato (Figura7). A diferença da resposta a cada gene Devido a sítios de inserção gênica alternativos.



**Figura 17.** Expressão do transportador *NRT2.1* na isoformas de *OsNRT1.1 B*.

A superexpressão de *OsNRT1.1C* não afetou a expressão de *NRT2.1*. Curiosamente, a expressão de *OsNRT1.1C* em arroz é muito baixa quando comparada com *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* (Figura 18). O teste com clorato mostrou sua capacidade de transportar NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, no entanto, sua baixa expressão em arroz indica que *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* sejam os ortólogos de *NRT1.1* mais importantes em arroz.



**Figura 18.** Expressão do transportador *NRT2.1* na isoforma de *OsNRT1.1 C*.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados de superexpressão dos genes *OsNRT1.1* e *OsNRT1.1B* no mutante de *Arabidopsis thaliana chl1-5* mostraram a função de transporte e sinalização desses transportadores no sistema de expressão heteróloga.

As análises com splicing alternativo do gene *OsNRT1.1A* mostraram a importância do primeiro éxon na estrutura do transportador para absorção e sinalização.

O transportador OsNRT1.1A apresentou forte efeito de sinalização e OsNRT1.1B apresentou forte efeito do clorato, mostrando sua provável função na absorção de  $\text{NO}_3^-$ .

O gene *OsNRT1.1C* apresentou baixa expressão nos estudos de expressão em arroz e os resultados da superexpressão no mutante *chl1-5* mostraram sua menor participação na absorção e sinalização promovido pelo  $\text{NO}_3^-$ .

## 6 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, p. 295-302, 2006.
- ASLAM, M.; TRAVIS, R. L. & HUFFAKER, R. C. Comparative induction of nitrate and nitrite uptake and reduction systems by ambient nitrate and nitrite in intact roots of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiology*, v. 102, p. 811-819, 1993.
- ASLAM, M.; TRAVIS, R. L.; HUFFAKER, R. C. Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiology*, v. 99, n. 3, p. 1124-1133, 1992.
- BRADY, N. C.; WEIL, R. R. Elementos da natureza e propriedades do solo. 3ª edição. Bookman. 2013. 685 p.
- CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, New York, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.
- CLOUGH, S. J. AND BENT, A. F. (1998), Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16: 735–743. doi:10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x
- CONAB Acompanhamento safra brasileira grãos, v. 5 Safra 2017/18 – Quinto levantamento, Brasília, p. 1-140. Fevereiro 2018.
- DUAN DongDong & ZHANG HanMa. A single SNP in NRT1.1B has a major impact on nitrogen use efficiency in rice. *Sci China Life Sci*.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Arroz: o produtor pergunta, a Embrapa responde. 2ª ed. rev. ampl. Brasília, DF. Embrapa, 2013. 245 p.
- FANG, X.Z.; TIAN, W.H.; LIU, X.X.; LIN, X.Y.; JIN, C.W.; ZHENG, S. J. Alleviation of proton toxicity by nitrate uptake specifically depends on nitrate transporter 1.1 in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 211: 149-158. 2016.
- FARN DEN, K. J. S.; ROBERTSON, J. G. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogen. In: BERGSEN, F. J. ed. *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*, Chichester: John Wiley, 1980. p. 265-314.
- FENG, H.; LI, B.; ZHI, Y.; CHEN, J.; LI, R.; XIA, X.; XU, G.; FAN, X. Overexpression of the nitrate transporter, OsNRT2.3b, improves rice phosphorus uptake and translocation. *Plant Cell Rep* (2017) 36: 1287
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. International year of rice. 2004.
- FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extrats. *Analytical Chemistry*, Washington, v.49, n. 7, p.1080, 1977.
- FERNANDES, M. S. N-carriers, light and temperature influences on uptake and assimilation of nitrogen by rice. *Turrialba*, San Jose, CR, v.34, p. 9-18, 1984.

FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Absorção de Nutrientes. In: Fernandes M. S.. (Org.). *Nutrição Mineral de Plantas*. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006, v. 1, p. 115-152.

FORDE, B.G. Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annual Review of Plant Biology*, v 53, p. 203-224.

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.

GLASS, A. D. M.; SHAFF, J. E.; KOCHIAN, L. V. Studies of nitrate uptake in barley. IV Electrophysiology. *Plant Cell*, 99: 456-463, 1992.

GLASS A.D.M. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. *Crit. Rev.Plant Sci*. 22: 453–470. 2003.

GIBEAUT D. M.; HULETT J.; CRAMER G. R.; SEEMANN J. R. Maximal Biomass of *Arabidopsis thaliana* Using a Simple, Low-Maintenance Hydroponic Method and Favorable Environmental Conditions. Department of Biochemistry, University of Nevada, Reno, Nevada 89557. *Plant Physiol*. Vol. 115, 1997.

GOJON A, KROUK G, PERRINE-WALKER F, LAUGIER E. Nitrate transporter(s) in plants. *J Exp Bot* 62: 2299–2308, 2011.

GUO F-Q.; YOUNG J.; CRAWFORD NM. The Nitrate Transporter AtNRT1.1 (CHL1) Functions in Stomatal Opening and Contributes to Drought Susceptibility in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 2003;15(1):107-117.

HO, C. H., LIN, S. H., HU, H. C., TSAY, Y. F. CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants. *Cell*, v.138, p. 1184-1194. 2009.

HOLZSCHUH M.J, BOHNEN H., ANGHINONI I., PIZZOLATO T.M., CARMONA F.C.; CARLOS F.S. (2011) Absorção de nutrientes e crescimento do arroz com suprimento combinado de amônio e nitrato. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 35:1357-1366.

HU, B.; WANG, W.; OU, S.; TANG, J.; LI, H.; CHE, R.; ZHANG, Z.; CHAI, X.; WANG, H.; WANG, Y.; LIANG, C.; LIU, L.; PIAO, Z.; DENG, Q.; DENG, K.; XU, C.; LIANG, Y.; ZHANG, L.; LI, L.; CHU, C. Variation in NRT1.1B contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies. *Nature Genetics* 47, 834-838. 2015.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Levantamento sistemático da produção agrícola pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro v. 29 n. 12. 2016.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Levantamento sistemático da produção agrícola pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro v.29 n.12. 2017.

JIAO X.; LYU, Y.; WU, X.; LI, H.; CHENG, L.; ZHANG, C.; YUAN, L.; JIANG, R.; JIANG, B.; RENGEL, Z.; ZHANG, F.; DAVIES, J. W.; SHEN, J. Grain production versus

resources and environmental costs: towards increasing sustainability of nutrient use in China. *Journal of Experimental Botany*. 2016.

KIBA, T.; FERIA-BOURRELLIER, A-B.; LAFOUGE, F.; LEZNHEVA, L.; MERCEY, B-T.; ORSEL, M.; BREHAUT, V.; MILLER, A.; DANIEL-VEDELE, F.; SAKAKIBARA, H.; KRAPP, A. The *Arabidopsis thaliana* Nitrate Transporter NRT2.4 Plays a Double Role in Roots and Shoots of Nitrogen-Starved Plants. *The Plant Cell*. 2012;24 (1):245-258.

KIRK, G.J.D. & KRONZUCKER, H.J. The potential for nitrification and nitrate uptake in the rhizosphere of wetland plants: A modeling study. *Ann. Bot.*, 96:639-646, 2005.

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

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

LIU, K. H. & TSAY, Y-F. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J*. 22, 1005-1013 (2003).

LIU, K. H., HUANG, C. Y., & TSAY, Y. F. CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis thaliana* involved in multiple phases of nitrate uptake. *The Plant Cell*, 11(5), 865–874. (1999).

LUZ, M. J. S.; FERREIRA, G. V.; BEZERRA, J. R. C. Adubação e Correção do Solo: Procedimentos a Serem Adotados em Função dos Resultados da Análise do Solo. Circular técnica 63. Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2002.

MAATHUIS, F. J. M. Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 12, p.250-258, 2009.

MAO, Q. Q.; GUAN, M, Y.; LU, K, X.; DU, S. T.; FAN, S. K.; YE, Y, Q.; LIN, X. Y.; JIN, C. W. Inhibition of nitrate transporter 1.1-controlled nitrate uptake reduces cadmium uptake in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2014 Oct; 166(2): 934-944.

MARA, C., GRIGOROVA, B., & LIU, Z. Floral-dip Transformation of *Arabidopsis thaliana* to Examine pT<sub>SO2</sub>:: $\beta$ -glucuronidase Reporter Gene Expression. *Journal of Visualized Experiments* : JoVE, (40), 1952, 2010.

MEINKE, D. W., CHERRY, J. M., DEAN, C., ROUNSLEY, S. D. & KOORNNEEF, M. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282, 662±665 (1998).

MOUNIER, E., PERVENT, M., LJUNG, K., GOJON, A. and NACRY, P. (2014), Auxin-mediated nitrate signalling by NRT1.1 participates in the adaptive response of *Arabidopsis thaliana* root architecture to the spatial heterogeneity of nitrate availability. *Plant Cell Environ*, 37: 162-174.

MUÑOS S, CAZETTES C, FIZAMES C, GAYMARD F, TILLARD P, LEPETIT M, LEJAY L, GOJON A (2004) Transcript profiling in the *chl1-5* mutant of *Arabidopsis thaliana* reveals a role of the nitrate transporter NRT1.1 in the regulation of another nitrate transporter, NRT2.1. *Plant Cell* 16: 2433-2

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–497. (1962)

O'BRIEN J.A., VEGA A., BOUGUYON E., KROUK G., GOJON A., CORUZZI G., AND GUTIÉRREZ R.A. (2016). Nitrate transport, sensing and responses in plants. *Mol. Plant*.

OKAMOTO M.; KUMAR A.; LI W.; WANG Y.; SIDDIQI MY.; CRAWFORD NM.; GLASS AD. (2006) High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis thaliana* depends on expression of the NAR2-like gene AtNRT3.1. *Plant Physiol* 140: 1036–1046

ORSEL, M.; EULENBURG, K.; KRAPP, A.; DANIEL-VEDELE, F. Disruption of the nitrate transporter genes AtNRT2.1 and AtNRT2.2 restricts growth at low external nitrate concentration. *PLANTA*, v. 219, p. 714-721, 2004.

PLETT, D.; TOUBIA, J.; GARNETT, T.; TESTER, M.; KAISER, BN.; BAUMANN, U. Dichotomy in the NRT Gene Families of Dicots and Grass Species. Schönbach C, ed. *PLoS ONE*. 2010.

REMANS T, NACRY P, PERVENT M, ET AL. A Central Role for the Nitrate Transporter NRT2.1 in the Integrated Morphological and Physiological Responses of the Root System to Nitrogen Limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2006;140(3):909-921.

RIVERAS, E.; ALVAREZ, J. M.; VIDAL, E. A.; OSES, C.; VEGA, A.; GUTIERREZ, E. A. The calcium ion is a second Messenger in the nitrate signaling pathway of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2015 Oct; 169(2): 1397–1404.

RIVERO, L.; SCHOLL, R.; HOLOMUZKI, N.; CRIST, D.; GROTEWOLD, E.; BRKLJACIC J. Handling *Arabidopsis thaliana* Plants: Growth, Preservation of Seeds, Transformation, and Genetic Crosses. In: Sanchez-Serrano, J. J.; Salinas, J. (eds) *Arabidopsis thaliana* protocols. Third edition. 2014. p 3-27.

ROQUETTI, F. D. Potencial de produção de grãos brasileiros via fertilização e impactos nas emissões de CO<sub>2</sub>eq. Dissertação de Mestrado - 2014.

SANTOS, L. A. Efeito da superexpressão dos fatores de transcrição ZmDof1 e OsDof25 sobre a eficiência de uso de Nitrogênio em *Arabidopsis thaliana* L. Dissertação mestrado. 2009.

SIDDIQI, M.Y., GLASS, A.D.M., RUTH, T.J., et al. Studies of the uptake of nitrate in barley. I. Kinetics of <sup>13</sup>NO<sub>3</sub> - influx. *Plant Physiology*, Lancaster, v.93, p.1426-1432, 1990.

SOSBAI (Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado) Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil / XXX Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado. RS, Santa Maria, Brasil, 2014.

SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In: Fernandes, M.S. (Org.). Nutrição Mineral de Plantas. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 2006a, v. 1, p. 215-252.

SPERANDIO, M. V. L. Análise de expressão dos genes OsNRT1.1 (A, B e C) e efeito do silenciamento das isoformas OsA2 e OsA7 de PM H<sup>+</sup>-ATPases na absorção de nitrogênio em arroz. UFRRJ Tese doutorado. 2015.

SUN, J.; ZHENG, N. Molecular Mechanism Underlying the Plant NRT1.1 Dual-Affinity Nitrate Transporter. *Frontiers in Physiology*, 6, 386. 2015.

TEDESCO, M. J. Extração simultânea de N, P, K, Ca e Mg em tecido de plantas por digestão com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. UFRGS. 1982, 23 p.

TURANO, F. J.; DASHNER, R.; UPADHYAYA, A.; CALDWELL, C. R. Purification of mitochondrial glutamate dehydrogenase from dark-grown soybean seedlings. *Plant Physiology*, v.112, p.1357-1364, 1996.

TSAY, Y. F.; SCHROEDER, J. I.; FELDMANN, K. A.; CRAWFORD, N. M. The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis thaliana* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* 72: 705-713. 1993.

VALVEKENS, D.; VAN MONTAGU, M. and VAN LIJSE BETTENS, M. A. tumefaciens mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, May 1988, vol. 85, no. 10, p. 5536-5546.

WANG, X., FELDMANN, K. A. AND SCHOLL, R. L. (1988), A chlorate-hypersensitive, high nitrate/chlorate uptake mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 73: 305–310.

WANG, W.; HU, B.; YUAN, D.; LIU, Y.; CHE, R.; HU, Y.; OU, S.; ZHANG, Z.; WANG, H.; LI, H.; JIANG, Z.; ZHANG, Z.; GAO, Z.; QIU, Y.; MENG, X.; LIU, Y.; BAI, Y.; LIANG, Y.; WANG, Y-Q.; ZHANG, L.; LI, L.; SODMERGEN, S.; JING, H-C.; LI, J.; CHU, C. Expression of the Nitrate Transporter Gene OsNRT1.1A/OsNPF6.3 Confers High Yield and Early Maturation in Rice. *Plant Cell Advance Publication*. 2018.

YAN, M.; FAN, X.; FENG, H.; MILLER, A. J.; SHEN, Q.; XU, G. Rice OsNAR2.1 interacts with OsNRT2.1, OsNRT2.2 and OsNRT2.3a nitrate transporters to provide uptake over high and low concentration ranges. *Plant, Cell and Environment*, v. 34, p. 1360-1372, 2011.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino acids with Ninhydrin. *Analyst*, London, v.80, n. 948, p.209-213, 1955.

ZHANG, H. & FORDE, B. G. Regulation of *Arabidopsis thaliana* root development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany*, v.51, n.342, p.51-59, 2000.