

UFRRJ

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

TESE

**Avaliação da Expressão dos Genes *OsNRT1.1* (A, B e C) e
Efeito do Silenciamento das Isoformas *OsA2* e *OsA7* de PM
 H^+ -ATPases na Absorção de Nitrogênio em Arroz**

Marcus Vinícius Loss Sperandio

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

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

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *OSNRT1.1* (A, B E C) E
EFEITO DO SILENCIAMENTO DAS ISOFORMAS *OSA2* E *OSA7* DE
PM H⁺-ATPASES NA ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO EM ARROZ**

MARCUS VINÍCIUS LOSS SPERANDIO

Sob a Orientação da Professora

Sonia Regina de Souza

e Co-orientação dos Professores

Leandro Azevedo Santos e Marcelo de Freitas Lima

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2015

Sperandio, Marcus Vinícius Loss, 1986-
Análise da expressão dos genes OsNRT1.1 (A,
B e C) e efeito do silenciamento das
isoformas OsA2 e OsA7 de PM H⁺-ATPases na
absorção de nitrogênio em arroz

Orientadora: Sonia Regina de Souza.

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

Bibliografia: f. 124-138.

1. Arroz - Teses. 2. Arroz - Nutrição -
Teses. 3. Plantas - Efeito do nitrogênio -
Brasil - Teses. 4. Nitrogênio na
agricultura - Teses. I. Souza, Sonia
Regina, 1962-. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Agronomia. III. Título.

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

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

MARCUS VINÍCIUS LOSS SPERANDIO

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

TESE APROVADA EM 26/02/2015

Sonia Regina de Souza. Dra. UFRRJ
(Orientadora)

Altamiro Souza de Lima Ferraz Junior. Dr. UEMA

Claudete Santa Catarina. Dra. UENF

Gilberto Sachetto Martins. Dr. UFRJ

André Marques dos Santos. Dr. UFRRJ

DEDICATÓRIA

A Deus que sempre me iluminou e deu forças em todos os momentos de minha vida, para que alcançasse os objetivos,

Aos meus queridos pais José Salvador Sperandio e Marilza da Penha Loss Sperandio que sempre estiveram ao meu lado, com apoio incondicional,

dedico.

AGRADECIMENTOS

Antes de todos os outros e acima de tudo, Deus que esteve sempre presente e colocou sua mão no meu ombro em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais José Salvador Sperandio e Marilza da Penha Loss Sperandio e minha irmã Sâmia Marize Loss Sperandio que são meu maior presente nessa terra.

À professora Sonia Regina de Souza pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa e carinho e atenção desde a minha Iniciação Científica.

Ao professor Manlio Silvestre Fernandes por tantos anos de convivência e ensinando o que é fazer pesquisa.

Ao professor Leandro Azevedo Santos pelos ensinamentos de laboratório e ajuda para a realização desse trabalho.

Aos colegas/amigos de laboratório que tornaram mais fácil a caminhada pelo doutorado.

Ao CPGA-CS pela oportunidade de cursar o doutorado com professores competentes e dedicados.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro desde a Iniciação Científica.

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

BIOGRAFIA

Marcus Vinícius Loss Sperandio nasceu em 13 de fevereiro de 1986 na cidade de Aimorés (MG). Fez o ensino fundamental na escola Benevenuto Clementino Gobbo e ensino médio/profissionalizante na Escola Agrotécnica Federal de Colatina (ES). Em 2004 ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde foi bolsista CNPq por três anos trabalhando no Laboratório de Nutrição de Plantas sob a orientação da professora Sonia Regina de Souza. Ganhou prêmios de Iniciação Científica em 2007 e 2008 pelos trabalhos com expressão de genes relacionados à absorção de nitrogênio. Em março de 2009 ingressou no mestrado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo na UFRRJ, desenvolvendo trabalhos relacionados à absorção de nitrato e amônio. Em março de 2011 ingressou no doutorado pelo mesmo curso, continuando seus estudos sob a orientação da professora Sonia Regina de Souza, caracterizando genes chaves para a absorção de nitrato, através de silenciamento por micro RNA artificial, de isoformas de bombas de prótons de membrana plasmática, visando entender melhor a eficiência de absorção de nitrogênio em arroz.

RESUMO GERAL

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

A disponibilidade de nitrogênio (N) nos solos é geralmente baixa, o que leva a necessidade do aporte frequente de fertilizantes e a busca por variedades mais eficientes no uso de N. Dentre os parâmetros favoráveis se inclui a maior expressão das bombas de prótons de membrana plasmática e de transportadores de nitrato de alta afinidade sob cultivos com baixo N. Neste trabalho se identificou o padrão de expressão das isoformas *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C*, prováveis ortólogos do transportador de nitrato de dupla afinidade NRT1.1 de *Arabidopsis* (CHL1; NPF8.9) em resposta ao NO₃⁻ e NH₄⁺, assim como se avaliou a importância dos genes das bombas de prótons *OsA2* e *OsA7* para a absorção de N. Para avaliar a expressão dos genes *OsNRT1.1* (A, B e C) foram conduzidos dois experimentos: um com a variedade de arroz Nipponbare e o outro com as variedades IAC-47 (melhorada) e Piauí (local). O silenciamento dos genes *osa2* e *osa7* foi realizado usando a técnica do microRNA artificial (amiRNA) seguida de transformação genética do arroz. O experimento para avaliar a contribuição das duas isoformas de H⁺-ATPases de membrana plasmática (PM H⁺-ATPase) para a absorção de NO₃⁻ em baixas doses foi com as variedades IAC-47 e Piauí. Nas raízes as isoformas *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* foram as mais expressas, enquanto *OsNRT1.1C* apresentou baixa expressão. *OsNRT1.1B* demonstrou alta repressão com ressurgimento de 2,0 mM de N-NO₃⁻, nas plantas cultivadas com NH₄⁺ e sob deficiência de N, no entanto, *OsNRT1.1B* foi induzido pelo tratamento constante com 2,0 mM de N-NO₃⁻. Após a transformação do arroz com o amiRNA para silenciar *OsA2* e *OsA7*, a análise de expressão por PCR em tempo real mostrou que entre as duas construções, para cada gene, somente uma promoveu o silenciamento do gene, sendo as linhagens com silenciamento multiplicadas em casa de vegetação. As linhagens de arroz mutantes silenciando os genes *OsA2* (*osa2.2*, *osa2.3*, *osa2.4*), *OsA7* (*osa7.1*, *osa7.2*, *osa7.3*) e plantas controle IRS (plantas transformadas com vetor IRS154 vazio) foram cultivadas com quatro tratamentos: sem N por três dias, suprimento constante com 0,2 mM de N-NO₃⁻, ressurgimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ após três dias de privação de N e suprimento constante com 2,0 mM de N-NO₃⁻. Os mutantes *osa7* apresentaram menor crescimento vegetativo, enquanto os mutantes *osa2* cresceram normalmente em comparação com o controle IRS. Ambos os mutantes apresentaram menor influxo de NO₃⁻ quando cultivados com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante comparados com o controle IRS, enquanto nos outros tratamentos não houve diferença no influxo de NO₃⁻. A atividade das PM H⁺-ATPases foi menor nos mutantes *osa7* e *osa2* em relação ao controle IRS em todos os tratamentos usados. A atividade da V-H⁺-ATPase não apresentou mudança em ambos os mutantes (*osa7* e *osa2*), enquanto a atividade da V-H⁺-PPase foi menor somente nos mutantes *osa7* quando comparado ao controle IRS. Os mutantes *osa2* apresentaram menor índice de Eficiência de Absorção de N, com menor acúmulo de N-total com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante. Os resultados obtidos demonstram que há uma contribuição diferenciada de isoformas específicas de PM H⁺-ATPases para o crescimento vegetativo em arroz e para a eficiência de absorção de NO₃⁻.

Palavras-chave: Silenciamento gênico. Eficiência de absorção de N. Nutrição nitrogenada.

GENERAL ABSTRACT

SPERANDIO, Marcus Vinícius Loss. **Gene expression analysis of *OsNRT1.1* (A, B e C) and effects of downregulation of PM H⁺-ATPase isoforms *OsA2* and *OsA7* in the nitrogen uptake in rice.** 2015. 121p. Thesis (Doctor Science in Agromomy - Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2015.

The soil nitrogen (N) availability is generally low, leading to frequently input of fertilizer and the search of varieties with higher nitrogen use efficiency. Among the favorable parameters include higher expression of plasma membrane pumps protons and high-affinity nitrate transporters under low N cultivation. This work aimed to identify the expression pattern of *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* and *OsNRT1.1C*, possible orthologs of the Arabidopsis double affinity nitrate transporter NRT1.1 (CHL1; NPF8.9) in response to NO₃⁻ and NH₄⁺, as well as evaluate the importance of *OsA2* and *OsA7* proton pumps genes to N uptake. To evaluate *OsNRT1.1* (A, B and C) gene expression, two experiments were performed: the first using Nipponbare rice variety and the second using IAC-47 (improved) and Piauí (Landrace) rice varieties. The *OsA2* and *OsA7* gene silencing was made using the artificial micro RNA (amiRNA) followed by rice genetic transformation. The experiment to evaluate the contribution of plasma membrane H⁺-ATPase (PM H⁺-ATPase) to low NO₃⁻ levels was made using IAC-47 and Piauí rice varieties. The *OsNRT1.1* gene expression analysis in the roots showed that *OsNRT1.1A* and *OsNRT1.1B* are highly expressed, while *OsNRT1.1C* showed low expression rate. *OsNRT1.1B* expression was downregulated with resupply of 2.0 mM of NO₃⁻-N, in the plants cultivated using NH₄⁺ and N starving plants, however, *OsNRT1.1B* expression was upregulated with constant supply of 2.0 mM of NO₃⁻-N. After rice genetic transformation, Real Time PCR analysis showed that only one amiRNA successfully downregulated the target, furthermore the lineages silencing the target were multiplied in greenhouse. The rice lineages downregulating *OsA2* (*osa2.2*, *osa2.3*, *osa2.4*), *OsA7* (*osa7.1*, *osa7.2*, *osa7.3*) and control plants (plants transformed with empty IRS) were cultivated using four treatments: three days N starvation, constant with 0.2 mM of NO₃⁻-N, resupply with 0.2 mM of NO₃⁻-N and constant with 2.0 mM of NO₃⁻-N. The *osa7* mutants shown lower growth, meanwhile *osa2* growth normally compared to control plants (IRS). Both mutants shown lower NO₃⁻ uptake when grown with constant 0.2 mM of NO₃⁻-N compared to control IRS plants, meanwhile the other treatments did not show differences of NO₃⁻ uptake. The PM H⁺-ATPase activity was lower in the *osa7* and *osa2* mutants compared to IRS plants in all treatments used. The V-H⁺-ATPase activity did not show difference in the mutants *osa7* and *osa2*, however, V-H⁺-PPase activity was slower only in the *osa7* mutants compared to IRS control plants. The mutant plants *osa2* showed lower N uptake Efficiency index, accumulating lower total-N when fed with 0.2 mM of NO₃⁻-N constant. The results highlight that there is differentiated contribution of specific PM H⁺-ATPase isoforms to rice growth and to NO₃⁻ uptake efficiency.

Keywords: Gene silencing. N efficiency uptake. Nitrogen nutrition.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos iniciadores (forward e reverso) para os genes <i>OsNRT1.1A</i> , <i>OsNRT1.1B</i> e <i>OsNRT1.1C</i> de arroz. O gene da actina (<i>OsAct1</i>), ubiquitina 5 (<i>OsUBQ5</i>) e fator de alongamento (<i>OsEF-1α</i>) foram usados como de referencia.....	28
Tabela 2. Valores de ΔC_T para os genes <i>OsNRT1.1A</i> , <i>OsNRT1.1B</i> e <i>OsNRT1.1C</i> em raízes de arroz sob suprimento constante de 2,0 mM de N-NO ₃ ⁻ ou N-NH ₄ ⁺ , ressuprimento com 2,0 mM de N-NO ₃ ⁻ ou N-NH ₄ ⁺ e deficiência de NO ₃ ⁻ e NH ₄ ⁺ por 72 horas.	34
Tabela 3. Perfil de EST (<u>e</u> xpressed <u>s</u> equen <u>ce</u> <u>t</u> ag) de acordo com o banco de dados “NCBI Unigene” para arroz (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/UGOrg.cgi?TAXID = 4530).....	34
Tabela 4. Influxo líquido de NO ₃ ⁻ e atividade da PM H ⁺ -ATPase após 24 horas da adição dos tratamentos nas variedades de arroz IAC-47 e Piauí.....	37
Tabela 5. Protocolo para mutagênese direta usando o vetor pNW55 (WARTHMAN et al., 2008).....	44
Tabela 6. Iniciadores para as reações de PCR contendo o amiRNA para os genes <i>OsA2</i> e <i>OsA7</i>	44
Tabela 7. Sequências dos iniciadores usados nas reações de PCR em tempo real para os dez genes das isoformas de PM H ⁺ -ATPases (<i>OsA1</i> a <i>Os10</i>), três isoformas de transportadores de nitrato (<i>OsNRT1.1</i> , <i>OsNRT2.1</i> e <i>OsNRT2.2</i>) e amônio (<i>OsAMT1.1</i> , <i>OsAMT1.2</i> e <i>OsAMT1.3</i>), actina (<i>OsAct11</i>) de arroz, eficiência de amplificação e acessos nos bancos de dados TIGR e NCBI.....	47
Tabela 8. Características fenotípicas das linhagens de arroz produzidas pelo processo de transformação para silenciar as isoformas de PM H ⁺ -ATPase <i>OsA2</i> (<i>OsA2</i> mi1 e <i>OsA2</i> mi2) e <i>OsA7</i> mi2 e <i>OsA7</i> mi3).	60
Tabela 9. Massa fresca (MF) de parte aérea (PA) e raiz, assim como relação raiz/parte aérea (R/PA) das linhagens mutantes silenciando <i>OsA7</i> (<i>osa7.1</i> , <i>osa7.2</i> e <i>osa7.3</i>) cultivadas durante três dias sem N (deficiência), 0,2 mM de N-NO ₃ ⁻ constata por 30 dias, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO ₃ ⁻ após três dias de deficiência e 2,0 mM de N-NO ₃ ⁻ constante durante 30 dias. Como controle foram usadas plantas transformadas com o vetor vazio (IRS) sem a inserção de qualquer amiRNA.....	65
Tabela 10. Massa fresca (MF) de parte aérea (PA) e raiz, assim como relação raiz/parte aérea (R/PA) das linhagens mutantes silenciando <i>OsA2</i> (<i>osa2.2</i> , <i>osa2.2</i> e <i>osa2.4</i>) cultivadas durante três dias sem N (deficiência), 0,2 mM de N-NO ₃ ⁻ constata por 30 dias, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO ₃ ⁻ após três dias de deficiência e 2,0 mM de N-NO ₃ ⁻ constante durante 30 dias. Como controle foram usadas plantas transformadas com o vetor vazio (IRS) sem a inserção de qualquer amiRNA.....	66
Tabela 11. Representação do perfil de EST (<u>E</u> xpressed <u>S</u> equen <u>ce</u> <u>T</u> ag) das isoformas PM H ⁺ -ATPase (<i>OsA</i>) de acordo com o banco de dados “NCBI Unigene” para arroz (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/UGOrg.cgi?TAXID = 4530).	75
Tabela anexa 1. Teste de segregação para verificar a segregação das linhagens mutantes IRS, <i>osa2.2</i> , <i>osa2.3</i> , <i>osa2.4</i> , <i>osa7.1</i> , <i>osa7.2</i> , e <i>osa7.3</i>	113

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Expressão relativa de três transportadores de NO_3^- (*OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B*, *OsNRT1.1C*) raízes (a e b) e parte aérea (c e d) de arroz da variedade Nipponbare em experimentos com NO_3^- (a e c) ou NH_4^+ (b e d). Os tratamentos foram suprimento constante de 2,0 mM de N- NO_3^- ou N- NH_4^+ , ressuprimento de 2,0 mM de N- NO_3^- ou N- NH_4^+ após 72 horas de deficiência de N ou deficiência de NO_3^- ou NH_4^+ por 72 horas. O tratamento com 2 mM constante com NO_3^- foi assumido como tratamento de referência (controle). Os tratamentos com ressuprimento e deficiência de N sob asterisco diferem significativamente do tratamento controle com suprimento constante de N- NO_3^- na raiz ($P < 0,05$). As barras representam médias \pm SE (erro padrão) de três repetições. 31
- Figura 2.** Árvore filogenética radiada contendo o alinhamento das sequências de aminoácidos da família NRT1 de *Oryza sativa* e *Arabidopsis thaliana*. Para a construção da árvore foi usado o programa MEGA (Multi Evolutionary Genomic Analysis). Os transportadores OsNPF8.9 e OsNPF2.4 estão marcados com asterisco (*) porque estão com a nomenclatura de LÉRAN et al. (2014). 33
- Figura 3.** Expressão relativa de três transportadores de NO_3^- (*OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B*, *OsNRT1.1C*) nas raízes de arroz IAC-47 e Piauí. Os tratamentos foram suprimento constante de 2,0 mM de N- NO_3^- (a), deficiência de NO_3^- por 72 horas (b), ressuprimento com 0,2 mM de N- NO_3^- (c) e ressuprimento com 5,0 mM de N- NO_3^- (d). O tratamento com 2 mM constante com NO_3^- foi assumido como tratamento de referência (controle, valor 1). 36
- Figura 4.** (A) Esquema da PCR de montagem do amiRNA (adaptado de WARTHMAN et al., 2008). (B) Visualização em gel de agarose das reações de montagem do amiRNA para o gene *OsA2*. 49
- Figura 5.** Reação de PCR de junção do amiRNA para o gene *OsA2* usando as enzimas DNA polimerases Pfx e Taq (A) e Phusion (B). 50
- Figura 6.** (A) Reação de digestão do amiRNA para *OsA2* e o vetor IRS154 com as enzimas BamHI e KpnI. (B) Digestão do plasmídeo IRS154 de cinco colônias de *E. coli* com a enzima EcoRI para confirmar a inserção do amiRNA no vetor. Os géis foram corados durante 30 minutos com Brometo de Etídio 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 50
- Figura 7.** Gel de agarose dos produtos de digestão das construções contendo o amiRNA no vetor IRS154 para silenciar os genes de PM H^+ -ATPase *OsA2* e *OsA7*. Os géis foram corados durante 30 minutos com Brometo de Etídio 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 51
- Figura 8.** Teste para a reação de PCR usando os primers forward e reverso de *OsA2mi1* e Higromicina. p1: primer reverso de *OsA2mi1*, p4: primer forward de *OsA2mi1*. Como controle, foi usado o vetor vazio (IRS154) como controle. O gel foi corado durante 30 minutos com Brometo de Etídio 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 52
- Figura 9.** Reações de PCR de colônia com as construções de amiRNA para *OsA2* (*OsA2mi1* e *OsA2mi2*) e *OsA7* (*OsA7mi2* e *OsA7mi3*) usando os primers para o amiRNA (A) e para a Higromicina (B e C). Os géis foram corados durante 30 minutos com Brometo de Etídio 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 52
- Figura 10.** Reações de PCR usando os primers do amiRNA e Higromicina para *OsA2mi1*, *OsA2mi2*, *OsA7mi2* e *OsA7mi3*. Os géis foram corados durante 30 minutos com Brometo de Etídio 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 53
- Figura 11.** Etapas iniciais de transformação de arroz da variedade Nipponbare com as construções de amiRNA para *OsA2* (*OsA2mi1* e *OsA2mi2*) e *OsA7* (*OsA7mi2* e *OsA7mi3*). Indução de calos com 0,0278 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (A) e com 0,0556 mg

- L⁻¹ FeSO₄.7H₂O (B). Cultivo de *Agrobacterium* em meio AB (C) e calos de arroz em co-cultivo com *Agrobacterium* (D).54
- Figura 12.** Etapas de seleção dos calos e regeneração de plantas de arroz provenientes dos calos transformados com as construções de amiRNA para *Osa2* (*Osa2mi1* e *Osa2mi2*) e *Osa7* (*Osa7mi2* e *Osa7mi3*). (A) calos em meio de seleção com 50 mg L⁻¹ de Higromicina; (B) início do aparecimento de “pontos-verdes” em meio de regeneração de parte aérea e (C) planta desenvolvida no meio de regeneração.....55
- Figura 13.** Etapas finais da transformação de arroz da variedade Nipponbare com as construções de amiRNA para *Osa2* (*Osa2mi1* e *Osa2mi2*) e *Osa7* (*Osa7mi2* e *Osa7mi3*). Tubos contendo meio de regeneração de raiz em diferentes estágios de desenvolvimento (A) e plantas após a regeneração de raízes plantadas em vasos de terra para produção de sementes de arroz transformado (B).56
- Figura 14.** Teste de resistência da folha bandeira de algumas linhagens mutantes e não transformadas (WT) ao antibiótico higromicina no momento em que foram colocadas na placa de petri (dia zero) na solução contendo 50 mg L⁻¹ de higromicina e 1 mg L⁻¹ de BAP (6-benzil amino purina) e sete dias após a aplicação da solução de Higromicina...58
- Figura 15.** Gel de agarose contendo a reação de PCR para amplificar o gene *hpt* (*Hygromycin phosphotransferase*) de algumas linhagens transformadas e da planta não transformada (WT). Controle negativo ocorreu sem a adição de DNA. Gel corado com Gel-Red (Uniscience) de acordo com as recomendações do fabricante.....59
- Figura 16.** Expressão dos genes *Osa2* e *Osa7* nos mutantes *Osa2mi1* e *Osa2mi2*. Como controle, foram usadas três linhagens de arroz da variedade Nipponbare transformadas com o vetor IRS154 vazio (sem amiRNA).....61
- Figura 17.** Expressão dos genes *Osa2* e *Osa7* nos mutantes *Osa7mi2* e *Osa7mi3*. Como controle, foram usadas três linhagens de arroz da variedade Nipponbare transformadas com o vetor IRS154 vazio (sem amiRNA).....61
- Figura 18.** Média da expressão nos mutantes *Osa2mi1*, *Osa2mi2*, *Osa7mi2* e *Osa7mi3*. Plantas transformadas com o vetor vazio IRS154 foram usadas como controle (valor 1). * indica diferença entre as linhagens *osa2* ou *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05).....62
- Figura 19.** Avaliação do crescimento e produção das plantas obtidas no processo de transformação em casa de vegetação em plantas não transformadas (WT), transformadas com vetor IRS vazio e linhagens silenciando os genes *Osa2* e *Osa7*. (A) produção de massa fresca da parte aérea e (B) produção de grãos. * indica que houve diferença entre as plantas não transformadas (WT) e os mutantes (P<0,05).63
- Figura 20.** Altura das plantas obtidas no processo de transformação em casa de vegetação em plantas não transformadas (WT), transformadas com vetor IRS vazio e linhagens silenciando os genes *Osa2* e *Osa7* ao final do ciclo. * indica que houve diferença entre as plantas não transformadas (WT) e os mutantes silenciando os genes *Osa2* e *Osa7* (P<0,05).....64
- Figura 21.** Influxo de N-NO₃⁻ pelas raízes de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*), *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa2* ou *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05). ^{ns} (não significativo) indica que não houve diferença entre as linhagens *osa2* ou *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05).....67
- Figura 22.** Atividade da PM H⁺-ATPase em raízes de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*), *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N por três dias, 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e

- 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa2* ou *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05). A atividade foi relativizada em relação à planta controle IRS em cada tratamento.68
- Figura 23.** Atividade da V-H⁺-ATPase em raízes de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*), *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N por três dias, 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa2* ou *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05). A atividade foi relativizada em relação à planta controle IRS em cada tratamento.70
- Figura 24.** Atividade da V-H⁺-PPase em raízes de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*), *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N por três dias, 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa2* ou *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05). A atividade foi relativizada em relação à planta controle IRS em cada tratamento.71
- Figura 25.** Expressão das isoformas de PM H⁺-ATPase (*OsA*) em raízes de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. Como amostra referência foi usada a planta IRS sem N (valor 1). Os valores de expressão de cada gene foi relativizado usando os genes constitutivos *OsAct*, *OsUBQ5* e *OsEF1-α*. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05).72
- Figura 26.** Expressão das isoformas de PM H⁺-ATPase (*OsA*) em raízes de arroz das linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. Como amostra referência foi usada a planta IRS sem N (valor 1). Os valores de expressão de cada gene foi relativizado usando os genes constitutivos *OsAct*, *OsUBQ5* e *OsEF1-α*. * indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05).73
- Figura 27.** Expressão dos transportadores de NO₃⁻ de alta afinidade (*OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*) e proteína *OsNAR2.1* em raízes de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. Como amostra referência foi usada a planta IRS sem N (valor 1). Os valores de expressão de cada gene foi relativizado usando os genes constitutivos *OsAct*, *OsUBQ5* e *OsEF1-α*. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05).76
- Figura 28.** Expressão dos transportadores de NO₃⁻ de alta afinidade (*OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*) e proteína *OsNAR2.1* em raízes de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. Como amostra referência foi usada a planta IRS sem N (valor 1). Os valores de expressão de cada gene foi relativizado usando os genes constitutivos *OsAct*, *OsUBQ5* e *OsEF1-α*. * indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05).77
- Figura 29.** Conteúdo de N-NO₃⁻ nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05).79

- Figura 30.** Conteúdo de N-NO_3^- nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) IRS(controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$). **80**
- Figura 31.** Conteúdo de N-NH_4^+ nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) IRS(controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$). **82**
- Figura 32.** Conteúdo de N-NH_4^+ nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) IRS(controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$). **83**
- Figura 33.** Conteúdo de N-amino livre nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) IRS(controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$). **84**
- Figura 34.** Conteúdo de N-amino livre nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) IRS(controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. * indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$). **85**
- Figura 35.** Conteúdo de açúcares solúveis nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) IRS(controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$). **87**
- Figura 36.** Conteúdo de açúcares solúveis nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. * indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$). **88**
- Figura 37.** (A) Conteúdo de N-total nas linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) IRS(controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. (B) Índice de Eficiência de Absorção de N (iEAN) entre a planta controle IRS e os mutantes *osa7*, calculado a partir da relação entre o N-total das plantas cultivadas com 0,2 mM (baixa dose) e 2,0 mM de N-NO_3^- (alta dose). * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$). **89**
- Figura 38.** (A) Conteúdo de N-total nas linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) IRS(controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. (B) Índice de Eficiência de Absorção de N (iEAN) entre a planta controle IRS e os mutantes *osa7*, calculado a partir da relação entre o N-total das plantas cultivadas com 0,2 mM (baixa dose) e 2,0 mM de N-NO_3^- (alta dose). * indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$). **91**

- Figura 39.** Expressão das isoformas de PM H⁺-ATPase nas raízes e parte de arroz da variedade Nipponbare crescidas com suprimento constante de 2,0 mM de N-NO₃⁻. * indica diferença entre raiz e parte aérea pelo teste F (P<0,05)..... 92
- Figura anexo 1.** Mapa do vetor pNW55 contendo osaMIR528 usado nas reações de PCR para inserir o amiRNA para silenciar os genes *Osa2* e *Osa7*..... 112
- Figura anexo 2.** Concentração de N-NO₃⁻ nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) IRS(controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05). 114
- Figura anexo 3.** Concentração de N-NO₃⁻ nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) IRS(controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05). 115
- Figura anexo 4.** Concentração de N-NH₄⁺ nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) IRS(controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05). 116
- Figura anexo 5.** Concentração de N-NH₄⁺ nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) IRS(controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05). 117
- Figura anexo 6.** Concentração de N-amino livre nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) IRS(controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05). 118
- Figura anexo 7.** Concentração de N-amino livre nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) IRS(controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05). 119
- Figura anexo 8.** (A) Teor de N-total nas linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) IRS(controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. (B) Índice de Eficiência de Absorção de N entre a planta controle IRS e os mutantes *osa7*, calculado a partir da relação entre o N-total das plantas cultivadas com 0,2 mM (baixa dose) e 2,0 mM de N-NO₃⁻ (alta dose). * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05). 120
- Figura anexo 9.** (A) Teor de N-total nas linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS(controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. (B) Índice de Eficiência de Absorção de N entre a planta controle IRS e os mutantes *osa2*, calculado a partir da relação entre o N-total das plantas cultivadas com 0,2 mM (baixa dose) e 2,0 mM de N-NO₃⁻ (alta dose). * indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05). 121

LISTA DE SÍMBOLOS

AHA	Arabidopsis H ⁺ -ATPase
amiRNA	MicroRNA artificial
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina de Soro Bovino (Bovine Serum Albumine)
BTP	1,3-Bis[Tris(hydroxymethyl)methylamino]propane
DAG	Dias Após a Germinação
DCL1	Dicerisoforma 1 (Dicer like 1)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético (Diaminoethanetraacetic acid)
EGTA	Ácido etiloglicol tetracético (Ethylene glycol tetraacetic acid)
HATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidade (High Affinity Transport System)
HEPES	Tampão HEPES ((N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesufonic acid) hemisodium salt))
H ⁺ -ATPase	Bomba de prótons que hidrolisa ATP.
H ⁺ -PPase	Bomba de prótons que hidrolisa PPI.
LATS	Sistema de Transporte de Baixa Afinidade (Low Affinity Transport System)
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
miRNA	MicroRNA
NRT1	Família de genes para os transportadores de NO ₃ ⁻ de baixa afinidade (Nitrate transporter 1)
NRT2	Família de genes para os transportadores de NO ₃ ⁻ de alta afinidade (Nitrate transporter 2)
Osa	<i>Oryza sativa</i> H ⁺ -ATPase
<i>osa2</i>	Mutante de arroz com a isoforma <i>Osa2</i> de PM H ⁺ -ATPase silenciada
<i>osa7</i>	Mutante de arroz com a isoforma <i>Osa7</i> de PM H ⁺ -ATPase silenciada
PM H ⁺ -ATPase	H ⁺ -ATPase de membrana plasmática
PMA	H ⁺ -ATPase de <i>Nicotiana plumbaginifolia</i>
PMSF	Polimetilssulfonil fluoreto
PVP	Polivinilpirrolidona
PPi	Pirofosfato
RNAm	Ácido Ribonucléico mensageiro
TRIS	2-(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol
V-H ⁺ -ATPase	H ⁺ -ATPase de vacúolo (endomembranas)
V-H ⁺ -PPase	H ⁺ -PPase de vacúolo (endomembranas)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. O Nitrogênio no Cultivo de Arroz	3
2.2. A Absorção de NO ₃ ⁻ e o Transportador NRT1.1	6
2.3. Biogênese e Modo de Ação dos Micro RNAs: Silenciamento Gênico Mediado por Micro RNA Artificial (amiRNA)	9
2.4. Bombas de Prótons (H ⁺) em Plantas: Desenvolvimento Vegetal e Nutrição Mineral....	13
2.5. Status de N na Planta e Controle da Absorção	19
3. CAPÍTULO I	22
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES <i>OsNRT1.1A</i>, <i>OsNRT1.1B</i> E <i>OsNRT1.1C</i> EM ARROZ E RELAÇÃO COM A ABSORÇÃO DE NITRATO E ATIVIDADE DAS PM H⁺-ATPASES	22
3.1. RESUMO.....	23
3.2. ABSTRACT	24
3.3. INTRODUÇÃO	25
3.4. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.4.1. Montagem e condução do experimento com a variedade de arroz Nipponbare para identificar os padrões de expressão de <i>OsNRT1.1A</i> , <i>OsNRT1.1B</i> e <i>OsNRT1.1C</i> em resposta ao NO ₃ ⁻ e ao NH ₄ ⁺	26
3.4.2. Montagem e condução de experimento com as variedades de arroz contrastantes IAC-47 e Piauí sob diferentes suprimentos de N para avaliar a resposta dos genes <i>OsNRT1.1A</i> , <i>OsNRT1.1B</i> e <i>OsNRT1.1C</i>	26
3.4.3. Extração e quantificação do RNA total	26
3.4.4. Tratamento do RNA total com DNase e síntese de cDNA.....	27
3.4.5. qPCR em tempo real	27
3.4.6. Árvore filogenética dos transportadores <i>OsNRT1.1A</i> , <i>OsNRT1.1B</i> e <i>OsNRT1.1C</i> ...	28
3.4.7. Extração de vesículas e atividade das PM H ⁺ -ATPases	28
3.4.8. Cálculo do influxo de NO ₃ ⁻	29
3.4.9. Análise estatística	29
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.5.1. Análise de expressão dos genes <i>OsNRT1.1A</i> , <i>OsNRT1.1B</i> e <i>OsNRT1.1C</i> na variedade de arroz Nipponbare	30
3.5.2. Expressão dos genes <i>OsNRT1.1A</i> , <i>OsNRT1.1B</i> e <i>OsNRT1.1C</i> nas variedades de arroz IAC-47 e Piauí, absorção de NO ₃ ⁻ e atividade da PM H ⁺ -ATPase.....	35
3.6. CONCLUSÕES.....	39

4. CAPÍTULO II.....	40
OBTENÇÃO DE MUTANTES COM SILENCIAMENTO DAS ISOFORMAS <i>OsA2</i> E <i>OsA7</i> DE PM H⁺-ATPASE VIA MICRORNA ARTIFICIAL E AVALIAÇÃO DE PLANTAS DE ARROZ COM MENOR EXPRESSÃO DAS PM H⁺-ATPASES QUANTO A ABSORÇÃO DE NITRATO E DESENVOLVIMENTO.....	40
4.1. RESUMO.....	41
4.2. ABSTRACT	42
4.3. INTRODUÇÃO	43
4.4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.4.1. Obtenção de plantas silenciando as isoformas de PM H ⁺ -ATPase <i>OsA2</i> e <i>OsA7</i> por microRNA artificial (amiRNA).....	44
4.4.2. Confirmação das plantas mutantes transformadas com amiRNA para silenciar <i>OsA2</i> e <i>OsA7</i>	45
4.4.3. Experimento em casa de vegetação para avaliar o acúmulo de massa fresca e produção de grãos nos mutantes de arroz silenciando os genes <i>OsA2</i> e <i>OsA7</i>	46
4.4.4. Experimento para caracterizar os efeitos do silenciamento dos genes <i>OsA2</i> e <i>OsA7</i> na massa fresca e absorção de NO ₃ ⁻ em diferentes doses de N.....	46
4.4.5. Análise da expressão das isoformas de PM H ⁺ -ATPase em raiz e parte aérea	48
4.4.6. Análise estatística	48
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.5.1. Construção do vetor contendo o micro RNA artificial (amiRNA) para silenciar os genes <i>OsA2</i> e <i>OsA7</i>	49
4.5.2. Transformação de arroz com as construções contendo o amiRNA para silenciar os genes <i>OsA2</i> e <i>OsA7</i>	53
4.5.3. Confirmação das plantas transformadas.....	56
4.5.4. Avaliação da expressão gênica dos genes <i>OsA2</i> e <i>OsA7</i> nas linhagens de arroz mutantes.....	59
4.5.5. Avaliação do crescimento das plantas mutantes silenciando os genes <i>OsA2</i> e <i>OsA7</i> em casa de vegetação.....	62
4.5.6. Efeitos do silenciamento das isoformas <i>OsA2</i> e <i>OsA7</i> no influxo de NO ₃ ⁻ e crescimento vegetativo em diferentes doses de N-NO ₃ ⁻	64
4.5.7. Análise do N-total e eficiência de absorção de N nas plantas mutantes <i>osa7</i> e <i>osa2</i> ..	89
4.5.8. Expressão das isoformas de PM H ⁺ -ATPases em raiz e parte aérea	92
4.6. CONCLUSÕES.....	94
5. CONCLUSÕES GERAIS	95
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
8. ANEXOS	112
9. APÊNDICE	113

1. INTRODUÇÃO GERAL

O arroz (*Oryza sativa* L.) é cultivado em aproximadamente 157 milhões de ha, com produção de aproximadamente 452 milhões de toneladas na safra de 2011, sendo 57% da área em sistema de inundamento (USDA, 2011). Este cereal é importante para a alimentação de mais de 50% da população mundial (KÖGEL-KNABNER et al. 2010). O Brasil é o maior produtor de arroz fora da Ásia, sendo o Rio Grande do Sul (RS) o maior estado produtor com 8026,2 mil toneladas e produtividade 7525 Kg ha⁻¹ na safra 2012/2013 (CONAB, 2013). O cultivo de arroz no RS é basicamente sob sistema de inundamento, enquanto o Maranhão (MA) é o maior produtor de arroz no sistema de sequeiro com 661,8 mil toneladas e produtividade média de 1590 Kg ha⁻¹ (CONAB, 2013).

O arroz é uma planta modelo para estudos genômicos em outras espécies monocotiledôneas, como milho, trigo, cevada e sorgo. Existe grande semelhança entre os genes das monocotiledôneas, até mesmo a ordem dos genes dentro do genoma. O arroz possui o menor genoma entre as monocotiledôneas (410 Mb), sendo seu genoma diplóide mais fácil para estudos genéticos quando comparada com outras espécies. O arroz também é de fácil transformação genética por meio de cultura de tecidos. Logo, arroz foi a primeira espécie cultivada (a primeira foi a dicotiledônea *Arabidopsis*) a ter o genoma totalmente sequenciado e os genes anotados no banco de dados do “*The Institute Genomic Research*” (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>).

O nitrogênio (N) é o nutriente mineral que mais limita a produção de arroz, é exigido também para o melhoramento da qualidade nutricional do grão de arroz (MINGOTTE et al., 2012). A nutrição nitrogenada tem forte influência nos componentes de produção, como número de panículas, número de espiguetas, peso de 1000 grãos e tamanho da panícula (FAGERIA e BALIGAR, 2001). Desse modo, o entendimento da dinâmica do N no cultivo de arroz é de extrema importância para obter boas produtividades e diminuir as perdas de N. O sistema de produção de arroz, inundado ou sequeiro, possui grande importância na dinâmica de N por interferir nos processos químicos, físicos e biológicos (SCIVITTARO et al., 2010). O arroz aproveita de forma eficiente o NO₃⁻ e NH₄⁺, enquanto outras espécies não suportam o NH₄⁺ como única fonte de N. O N mineral aplicado apresenta utilização de apenas 30%, enquanto o restante é perdido por lixiviação, volatilização e desnitrificação (SCIVITTARO et al., 2010).

Uma alternativa para diminuir a perda de N do solo são plantas que apresentem maior capacidade de absorção. Os componentes-chaves para a maior absorção de N são a H⁺-ATPase de membrana plasmática (PM H⁺-ATPase) e os transportadores de NO₃⁻. Ambos os componentes sofrem indução de acordo com a dose de N aplicada e sofrem regulação por *feedback* provocado pela redução do N. Os dois principais genes de PM H⁺-ATPase envolvidos na absorção de N são *OsA2* e *OsA7* (SPERANDIO et al., 2011), enquanto os transportadores de NO₃⁻ *OsNRT1.1*, *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* são os principais membros (ARAKI e HASEGAWA, 2006). O transportador NRT1.1 foi caracterizado em *Arabidopsis* como responsável pela sinalização do NO₃⁻ disponível no solo (HO et al., 2009), enquanto em arroz ainda não foi caracterizado seus três prováveis ortólogos (*OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C*).

Desse modo, o presente trabalho apresenta duas hipóteses: (i) as isoformas A, B e C do gene *OsNRT1.1* com probabilidade de codificar proteínas de transporte de NO₃⁻ em arroz possuem regulação diferenciada com o fornecimento de NO₃⁻ e NH₄⁺ e são diferencialmente expressos nas variedades de arroz IAC-47 e Piauí; (ii) as isoformas *OsA2* e *OsA7* previamente identificadas em arroz podem exercer papel fundamental na aquisição de NO₃⁻ e desenvolvimento de arroz, especialmente em baixa concentração desse íon.

Este trabalho teve por objetivos: (i) Avaliar a expressão dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* na variedade Nipponbare; (ii) verificar a expressão dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* nas variedades IAC-47 e Piauí; (iii) obter plantas de arroz mutantes contendo microRNA artificial silenciando *OsA2* ou *OsA7*; (iv) avaliar o papel das PM H⁺-ATPase para a absorção de NO₃⁻ a partir do silenciamento das isoformas *OsA2* ou *OsA7*; e (v) verificar a importância das isoformas *OsA2* e *OsA7* no crescimento e desenvolvimento de plantas de arroz.

Com base nos objetivos do presente trabalho, duas abordagens foram realizadas, dividindo em dois capítulos:

- Capítulo I: Avaliação da expressão dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* em arroz e relação com a absorção de nitrato e atividade das PM H⁺-ATPases.
- Capítulo II: Obtenção de mutantes com silenciamento das isoformas *OsA2* e *OsA7* de PM H⁺-ATPase via microRNA artificial e avaliação de plantas de arroz com menor expressão das PM H⁺-ATPases quanto a absorção de Nitrato e desenvolvimento.

Os objetivos do Capítulo I foram: estudar a expressão das isoformas A, B e C do gene *OsNRT1.1* em resposta a diferentes doses e fontes de N e avaliar a relação entre a expressão dessas isoformas, *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C*, e a absorção de NO₃⁻ e atividade das PM H⁺-ATPases visando a eficiência de absorção de N em arroz.

Os objetivos do Capítulo II foram: obter plantas de arroz mutantes por microRNA artificial, com menor expressão de *OsA2* e *OsA7*; verificar o efeito desse silenciamento na atividade das PM H⁺-ATPases; estudar a relação entre as PM H⁺-ATPases e as V-H⁺-ATPase e V-H⁺-PPase; verificar o crescimento e produção desses mutantes em casa de vegetação; avaliar a absorção de NO₃⁻ com diferentes níveis de N e analisar se a alteração das PM H⁺-ATPases afeta a expressão dos transportadores de N de alta afinidade e se essas alterações podem afetar a eficiência de absorção de N.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Nitrogênio no Cultivo de Arroz

As duas principais formas de N mineral presentes no solo são o nitrato (NO_3^-) e o amônio (NH_4^+), sendo o NO_3^- a forma de predominante em solos aerados e o NH_4^+ em solos inundados.

A grande diferença observada na produtividade de arroz entre o sistema inundado e sequeiro pode ser atribuída ao manejo, melhoramento genético e deficiência hídrica no sistema de sequeiro. As variedades usadas no sistema inundado possuem melhoramento genético para obter altas produtividades além de ter melhor manejo, como maiores níveis de adubação. Por outro lado, as variedades usadas no cultivo de sequeiro são geralmente tradicionais com menor capacidade produtiva e manejo menos intensivo, com baixa entrada de insumos. Portanto, o cultivo do arroz que pode acontecer tanto em solos aerados ou inundados, deve apresentar manejo adequado da nutrição nitrogenada para diminuir as perdas de N e aumentar a eficiência de uso de N.

LINQUIST et al. (2011) estudaram o efeito dos ciclos de drenagem e inundamento nos teores de NO_3^- no solo e observaram que a drenagem nos campos de arroz por um período prolongado levou ao aumento do teor de NO_3^- no solo. Após o solo ser inundado novamente, 60% do N foi perdido (principalmente NO_3^-) quando o solo foi reinundado, reduzindo a eficiência de uso e absorção de N e afetando a produção de grãos na colheita do arroz. Quando o solo se torna aerado, o NH_4^+ é oxidado por meio de processos microbianos (nitrificação) à NO_3^- . O NO_3^- é suscetível a perdas nos cultivos inundados de arroz, desaparecendo da zona radicular em uma ou duas semanas após o solo ser reinundado (LINQUIST et al., 2006). Quando a plantação de arroz é reinundado o solo se torna anóxico, microrganismos convertem uma porção do NO_3^- em N gasoso (desnitrificação), que corresponde à perda de N para a atmosfera (BURESH e DE MATTA, 1991).

A mineralização da matéria orgânica do solo ou resíduos culturais é um processo complexo que envolve diversas enzimas e microrganismos do solo. Enzimas extracelulares são necessárias para degradar polímeros orgânicos complexos em subunidades solúveis que podem ser absorvidos por microrganismos. As mais importantes enzimas extracelulares são as proteases, chitinases e hidrolases do peptidoglicano (GEISSELER, 2010). Proteases extracelulares possuem ampla diversidade de substratos e podem degradar a maioria das proteínas não-estruturais. A chitinase hidrolisa a ligação entre moléculas N-acetil-D-glucosamina. Peptidoglicano são compostos de diversos açúcares e aminoácidos. Essas três classes de enzimas são produzidas e secretadas por uma ampla gama de fungos e bactérias do solo e sua produção é induzida pela presença do seu substrato na solução do solo (GEISSELER, 2010). CHAPIN et al. (2002) propõem que as enzimas extracelulares envolvidas na degradação primária dos compostos nitrogenados são o fator crítico para a mineralização e liberação do NH_4^+ para a solução do solo. As moléculas orgânicas liberadas podem ser absorvidas e usadas pelos microrganismos e posteriormente o N presente pode ser liberado para a solução do solo, principalmente na forma de NH_4^+ (NANNIPIERI e ELDOR, 2009).

Os trabalhos de SILVA et al. (2011) e LINQUIST et al. (2011) mostram a dinâmica do NO_3^- no cultivo de arroz inundado, evidenciando que a adubação com fertilizantes e/ou adubação orgânica devem ser criteriosas na sua escolha. Para entender porque os níveis de NO_3^- tendem a permanecer muito baixos com o inundamento na cultura do arroz, três processos chaves estão envolvidos: (i) a mineralização da matéria orgânica, (ii) a nitrificação do N mineral quando o solo está drenado, aumentando os teores de NO_3^- e, (iii) a desnitrificação quando o solo é inundado.

Em solos inundados, o NO_3^- adicionado ao solo ou formado pela nitrificação de NH_4^+ nas zonas aeróbicas perto da raiz ou da superfície do solo tende a ser rapidamente perdido por desnitrificação no solo anóxico, portanto, é geralmente assumido que plantas de solos inundados absorvem muito pouco NO_3^- comparado com NH_4^+ . No entanto, em experimentos em arroz cultivado hidroponicamente, foi encontrado que uma variedade de arroz inundado foi excepcionalmente eficiente em absorver e assimilar NO_3^- comparado com outras espécies (KRONZUCKER et al., 2000). Isso sugere uma particular adaptação do arroz para a absorção de NO_3^- e a possibilidade de absorção de NO_3^- em arroz inundado é mais importante que geralmente pensado (KIRK e KRONZUCKER, 2005).

Em solos inundados também ocorre mineralização da matéria orgânica, no entanto, a decomposição é mais lenta graças à decomposição incompleta e ineficiente da matéria orgânica em condições anaeróbicas (SAHRAWAT et al., 2004). A conversão do N orgânico em NH_4^+ em solos aeróbicos é feito por microrganismos aeróbicos, principalmente bactérias. A falta de O_2 nos cultivos inundados de arroz leva ao acúmulo de NH_4^+ , porque a conversão para NO_2^- necessita de O_2 para sua reação (SAHRAWAT, 2010). A mineralização do N orgânico em NH_4^+ é um processo chave para a nutrição nitrogenada em cultivos de terras inundados, como o arroz. Apesar de grande parte dos cultivos de arroz inundado necessitar da aplicação de N, a mineralização do N orgânico presente no solo ou aplicado via adubação verde é essencial para o crescimento e desenvolvimento da cultura de arroz. Em solos inundados a imobilização de N por microrganismos é mais lenta quando comparada com solos aerados, o que facilita a solos inundados acumularem maiores teores de NH_4^+ (ISHII et al., 2011).

CHEN et al. (2010) avaliaram o efeito da aplicação de adubo e resíduos vegetais marcados com ^{15}N por seis cultivos sequenciais de rotação trigo-arroz, verificando que 85% do adubo verde aplicado permaneceu no solo e somente 15% foi mineralizado e absorvido pela cultura de arroz. Fica evidente a importância da matéria orgânica do solo no fornecimento de N para o cultivo de arroz e que a adição de adubos verdes pode aumentar o estoque de N-orgânico do solo, diminuindo a necessidade da aplicação de grandes quantidades de N-fertilizante no cultivo do arroz. A vantagem do uso de adubos verdes em relação aos adubos minerais ocorre pela liberação lenta de nutrientes para a solução do solo, além de aumentar o teor de matéria orgânica do solo e impedir a degradação do ambiente de produção. Apesar dos resultados de CHEN et al. (2010) demonstrarem que o sistema de cultivo arroz-arroz aumenta os níveis de NH_4^+ no solo e diminui as perdas por desnitrificação, o cultivo prolongado pode provocar decréscimo do teor de N no solo por causa da ligação que o N mineral pode realizar com compostos lignificados que acumulam em solos inundados por causa da decomposição menos eficiente da matéria orgânica (SHIBU et al., 2006).

Em estudo realizado no Brasil pela EMBRAPA Clima Temperado, foi avaliado o potencial de uso de leguminosas durante a inter-safra de arroz para diminuir a necessidade de aplicação de N-fertilizante em arroz inundados. Nesse experimento conduzido por SCIVITTARO et al. (2002) foi avaliado o desempenho produtivo e o potencial de fornecimento de nitrogênio para o arroz irrigado de três leguminosas de inverno [trevo-persa cv. Kyambro (*Trifolium resupinatum* var. *resupinatum*); trevo-branco cv. Estanzuela Zapican (*Trifolium repens*) e cornichão cv. El Rincón (*Lotus subbiflorus*)], associadas ou não a uma fonte nitrogenada mineral, a ureia. O adubo verde e o N-fertilizante foram marcados com ^{15}N para avaliar a eficiência de recuperação e o fornecimento de N proveniente de cada adubo. O cultivo de adubos verdes apresentou grande produção de massa e elevado potencial de fixação de N (98 a 166 kg ha⁻¹), com a vantagem do N fixado não estar em formas prontamente disponíveis e ser liberado gradualmente durante o ciclo de cultivo de arroz.

SCIVITTARO et al. (2002) verificaram ainda que o uso de leguminosas de inverno juntamente com N-uréia (50 kg ha⁻¹) tiveram rendimento de grãos e N acumulado equivalente

ao tratamento com aplicação de somente 100 kg ha⁻¹ de N-uréia, sendo que a aplicação de uréia juntamente com o adubo verde aumentou a utilização do N por estimular a mineralização. O uso de adubo verde não diminuiu a utilização de N-uréia, que teve 23% de aproveitamento pelo arroz irrigado. O aproveitamento do N proveniente pelo adubo verde no cultivo de arroz foi em média 22%, indicando a importância do N proveniente da mineralização da matéria orgânica do solo como fonte de N. O mais importante do uso de adubos verdes na dinâmica de N em solos cultivados com arroz é que parte do N permanece no solo na forma orgânica e diminui as perdas de N do solo, enquanto o N-uréia residual no solo (principalmente NH₄⁺) pode ser facilmente perdido no decorrer do cultivo de arroz ou depois da colheita, por ocasião da nitrificação do N em solos aerados.

A dinâmica do N em cultivos de arroz de sequeiro (terras altas) é diferente da dinâmica abordada no arroz inundado, devido as mudanças que o inundamento induz na dinâmica de N, como abordado anteriormente. As perdas de N em cultivo de arroz por inundamento são grandes desde a aplicação de adubo, provocado por volatilização de NH₃ e desnitrificação do NO₃⁻, sendo a perda de NO₃⁻ por lixiviação muito pequena por causa da sua baixa abundância em solos inundados. No cultivo de arroz de sequeiro, a forma predominante é NO₃⁻ e pouco NH₄⁺ é encontrado no solo, sendo as perdas por volatilização de NH₃ menor nesse sistema de cultivo de arroz (SCIVITTARO et al., 2002).

A principal via de perda de N no arroz de sequeiro é por lixiviação de NO₃⁻, que não fica adsorvido na CTC do solo sendo facilmente perdido pela água de percolação. A concentração de NO₃⁻ no solo dependerá da quantidade de N aplicado, taxa de nitrificação, taxa de desnitrificação e taxa de mineralização da matéria orgânica (LEE et al., 2012). A primeira reação de nitrificação em solos aerados (NH₄⁺ para NO₂⁻) é mediada principalmente por microrganismos do grupo AOB (*Nitrospira* e *Nitrosomonas*), enquanto o grupo AOA parece não ter relação direta com a presença de NO₃⁻ no solo. DI et al. (2010) estudaram as populações AOA e AOB pela abundância do gene *amoA* e verificaram que o grupo AOB possui relação direta com o teor de NO₃⁻ no solo, enquanto AOA não apresentou correlação com o teor de NO₃⁻ do solo, apesar de sua alta abundância.

O NO₃⁻ formado no solo que não for absorvido pelas plantas estará suscetível à perda por lixiviação. Quando o solo está em pousio, sem cobertura vegetal, o risco de perdas significativas de NO₃⁻ é grande caso ocorra chuvas de intensidade moderada e forte. Em regiões onde ocorrem chuvas de entre-safra é recomendado uso de leguminosas para evitar perdas significativas de N do solo e aumentar o aporte de N-orgânico para o próximo cultivo.

A mineralização da matéria orgânica é importante fonte de N para o cultivo de arroz, sendo que em cultivo de sequeiro a nitrificação do NH₄⁺ liberado pela mineralização ocorre rapidamente (NANNIPIERI e ELDOR, 2009). A razão C/N dos materiais orgânicos determina a taxa de mineralização pela atividade microbiana e o “ponto de viragem” entre N-mineralização e N-imobilização é a razão C/N de aproximadamente 20:1 (LEE et al., 2012). LEE et al. (2012) estudaram o efeito da adição de resíduos orgânicos com diferentes relações C/N no cultivo de arroz inundado e de sequeiro. Segundo esses autores, a mineralização do N-orgânico foi maior nos compostos com menor relação C/N, no entanto, a liberação de N foi maior no cultivo de arroz de sequeiro, enquanto no arroz inundado a liberação de N foi menor e parte do N foi rapidamente perdida por volatilização e/ou desnitrificação.

O clima tropical, caracterizado por duas estações climáticas definidas (período chuvoso e seco), pode causar fluxos sazonais de nutrientes. Desse modo, a distribuição de chuvas afeta a dinâmica de N e sua disponibilidade para as plantas. De acordo com NARDOTO e BUSTAMANTE (2003), o início do período chuvoso provoca intensa mineralização da matéria orgânica e liberação de nutrientes para a solução do solo. O N liberado é acumulado no solo na forma de NO₃⁻ e com a ocorrência de fortes chuvas, o NO₃⁻ presente é lixiviado e não permanece disponível para as plantas. As plantas cultivadas nesses

ambientes necessitam de absorver rapidamente o NO_3^- presente na solução do solo antes que seja lixiviado (SANTOS et al., 2007). Essa ocorrência da rápida liberação de NO_3^- no início da estação chuvosa e perda por lixiviação com o seguimento das chuvas é chamado de “flush” de N.

O cultivo de arroz no Maranhão (MA) é predominante de sequeiro onde o “flush” de N é comum no início da estação chuvosa, quando acontece o plantio do arroz (SOUZA et al., 1998). Devido à baixa renda dos produtores de arroz no MA, geralmente não é feita adubação nitrogenada no decorrer do ciclo do arroz. A dinâmica de N nesse ambiente forçou a seleção de variedades que absorvem rapidamente o NO_3^- disponível nos primeiros meses de cultivo e remobilizam posteriormente durante o restante do ciclo da planta (SOUZA et al., 1998).

Outro estudo feito no MA verificou que em regiões produtoras de arroz de sequeiro com predomínio de Plintossolos, ocorrem teores de NH_4^+ maiores que os de NO_3^- (ARAÚJO, 2011). A localização desses solos na baixada maranhense favorece a rápida ascensão do lençol freático, sendo o solo com pouca capacidade de drenagem. A criação de pontos saturados favorece o acúmulo de NH_4^+ e a desnitrificação do NO_3^- presente no solo. Os produtores locais enfrentam baixa produtividade por causa da baixa fertilidade natural do solo e a dinâmica do N nesses solos favorecem as perdas de NO_3^- do sistema.

2.2. A Absorção de NO_3^- e o Transportador NRT1.1

O arroz é uma planta estratégica para estudos de absorção de N, tanto pela sua relevância sócio-econômica, com destaque para a alimentação humana, como por ter seu genoma totalmente seqüenciado, o que a torna uma planta modelo entre as monocotiledôneas para estudos moleculares (ARAKI e HASEGAWA, 2006; DUAN et al., 2007). O nitrogênio (N) é um dos nutrientes requeridos em maiores quantidades pelas plantas, no entanto, sua disponibilidade no solo é reduzida por ser facilmente sujeito a perda (ZHAN e FORDE, 2000). Desta maneira o N no solo esta em baixas concentrações, tornando necessárias aplicações sucessivas de fertilizante nitrogenado (GLASS, 2003).

Diversos estudos têm abordado características fisiológicas e moleculares relevantes para a eficiência de absorção de N. Os transportadores de NO_3^- e de NH_4^+ de alta afinidade são relatados como uns dos principais fatores envolvidos na eficiência de absorção de N da solução do solo (ARAKI & HASEGAWA, 2006; SONODA et al., 2003). Sem deixar de destacar a importância das bombas de prótons (H^+ -ATPases) da plasmalema (PM) que são elementos chave na absorção de N, além de outros nutrientes, por gerar um gradiente de potencial eletroquímico entre o apoplasto e o citossol que permite a absorção de íons e moléculas (GLASS et al., 2003; SONDERGAARD et al., 2004).

O NO_3^- absorvido pode ser reduzido sequencialmente a NO_2^- pela enzima nitrato redutase (citossólica) e depois a NH_4^+ pela enzima plastidial nitrito redutase. A seguir, o NH_4^+ é assimilado em moléculas orgânicas, formando glutamina e glutamato pela via Glutamina sintetase-Glutamato sintase (GS-GOGAT) (FERNANDES e SOUZA, 2006). O NO_3^- absorvido também pode ser exportado para outras células ou tecidos, e/ou pode ser acumulado nos vacúolos para posterior reutilização. Para o NO_3^- retornar ao citossol, e ser reduzido a NH_4^+ , é necessário a presença de transportadores de NO_3^- do tipo simporte e das bombas de prótons presentes nos vacúolos: a V- H^+ -ATPase e a Pirofosfatase (H^+ -PPase) (FERNANDES e SOUZA, 2006).

Estudos com NO_3^- têm demonstrado que esse íon além de nutriente, também é um sinal para o metabolismo vegetal (SANTI et al., 2003). Pesquisas atuais avaliando a capacidade das plantas absorverem o NO_3^- do solo estão focadas nos elementos chaves para esse processo: os transportadores de NO_3^- e as PM H^+ -ATPases (SANTI et al., 2003; QUAGGIOTTI et al., 2004; ARAKI e HASEGAWA 2006; ORSEL et al., 2006), ambos presentes na membrana plasmática.

Os transportadores de NO_3^- são classificados de acordo com sua afinidade pelo nutriente. Existem transportadores de alta afinidade (HATS - “High Affinity Transport System”) que operam preferencialmente sob baixas concentrações de NO_3^- (<1mM), enquanto os transportadores de baixa afinidade (LATS - “Low Affinity Transport System”) operam preferencialmente em concentrações acima de 1 mM (SIDDIQI et al., 1990; ASLAM et al., 1992; ASLAM et al., 1993).

Entre os transportadores de alta afinidade em arroz, *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* são os mais importantes e são induzidos pelo fornecimento de NO_3^- e reprimidos pelos produtos de assimilação do NO_3^- (ARAKI e HASEGAWA, 2006). A expressão dos transportadores *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* ocorrem principalmente epiderme da raiz, região em maior contato com a solução do solo (FENG et al., 2011). Em Arabidopsis foi descoberto que para a atividade dos transportadores NRT2.1 e NRT2.2 é necessário a proteína acessória NAR2.1 (ORSEL et al., 2006). Esses autores ainda verificaram que em plantas de Arabidopsis mutantes sem NAR2.1 (*nar2.1*) ocorria menor expressão, endereçamento e atividade de transporte de NRT2.1 e NRT2.2. KOTUR et al. (2012) verificaram que os transportadores da família NRT2 interagem com NAR2.1, com exceção do NRT2.7. Em arroz, OsNAR2.1 interage com os transportadores OsNRT2.1, OsNRT2.2 e OsNRT2.3a, sendo essencial para a absorção de NO_3^- pela família OsNRT2.

Foi caracterizado em Arabidopsis que o transportador *NRT2.4* é expresso na deficiência de NO_3^- e possui alta afinidade pelo NO_3^- (maior que NRT2.1 e NRT2.2) (KIBA et al., 2012). Desse modo, a função do NRT2.4 é absorver NO_3^- da solução do solo em condições de suprimento muito baixo desse composto, onde NRT2.1 e NRT2.2 não são mais ativos.

Enquanto a família NRT2 transporta exclusivamente NO_3^- , a família NRT1 está agrupada com transportadores de peptídeos (NRT1/PTR). Adicionalmente, foi verificado que alguns membros da família NRT1/PTR também transportam auxina (KROUK et al., 2010) e ácido abscísico (KANNO et al., 2012). Essa gama de substratos transportados pela família NRT1/PTR causou novas discussões para a nomenclatura dessa família.

LÉRAN et al. (2014) usaram 2398 sequências de aminoácidos de 33 genomas para realizar um novo agrupamento da família NRT1/PTR. Esses autores renomearam a família NRT1 como NPF (NRT1 PTR FAMILY) dividindo em oito subfamílias (NPF1-NPF8). No entanto, essa nomenclatura mudou a ordem lógica de nomenclatura dos transportadores já caracterizados em diversas plantas. Por exemplo, em Arabidopsis o transportador NRT1.1 (CHL1) foi nomeado como AtNPF6.3, NRT1.2 como AtNPF4.8, NRT1.3 como AtNPF6.4 (LÉRAN et al., 2014).

Concomitante com a nova nomenclatura de LÉRAN et al. (2014), von WITTGENSTEIN et al. (2014) realizaram alinhamentos das famílias NRT1/PTR, NRT2, AMT1 (*ammonium transporter 1*) e AMT2 (*ammonium transporter 2*). Enquanto LÉRAN et al. (2014) dividiram NRT1/PTR em oito subfamílias, von WITTGENSTEIN et al. (2014) dividiram em dez supergrupos e não alteraram a nomenclatura dos membros da família NRT1/PTR. Desse modo, na primeira citação de cada transportador da família NRT1/PTR será adicionado entre parênteses a nomenclatura de acordo com LÉRAN et al. (2014) e no decorrer do texto será adotada a nomenclatura usual.

Em Arabidopsis, o primeiro transportador caracterizado foi NRT1.1 (AtNPF6.3), atuando como um transportador de dupla afinidade (opera tanto em altas quanto em baixas concentrações de NO_3^-) (HO et al., 2009). O NRT1.1 opera em alta afinidade quando o resíduo de aminoácido treonina na posição 101 da cadeia polipeptídica (T101) está fosforilado e em baixa afinidade quando o T101 está desfosforilado (LIU e TSAY, 2003).

Além de atuar como transportador de NO_3^- , em Arabidopsis NRT1.1 possui uma importante função como sensor da concentração de NO_3^- no solo. De acordo com HO et al.

(2009), em baixas doses de NO_3^- o NRT1.1 está com o resíduo de aminoácido T101 fosforilado que interage com a proteína quinase CIPK23 (CBL-Interacting Protein Kinase 23) e induz a expressão de genes associados ao metabolismo de NO_3^- . Quando a concentração de NO_3^- no solo é alta ($>1\text{mM}$), o resíduo T101 do transportador NRT1.1 está desfosforilado e interage com a proteína quinase CIPK8 e induz a expressão dos genes associados ao metabolismo de NO_3^- em altos níveis (HU et al., 2009).

O transportador NRT1.1 de *Arabidopsis* atua também na fluxo de auxina e regula o crescimento radicular de acordo com a concentração de NO_3^- no meio externo (KROUK et al., 2010). Em plantas de *Arabidopsis* cultivadas com baixas doses de NO_3^- ($<0,2\text{mM}$) ocorre o crescimento axial da raiz (profundidade), sendo que NRT1.1 transporta auxina no sentido axial e facilita o crescimento em profundidade. Em altas doses de NO_3^- ($>1\text{mM}$) ocorre crescimento de raízes laterais, sendo que NRT1.1 não transporta auxina e esse hormônio acumula nos pontos de emissão de raízes laterais.

Além de NRT1.1 ser responsável pela absorção de NO_3^- pelas raízes em *Arabidopsis*, NRT1.2 (AtNPF4.8) também é responsável pela absorção de NO_3^- (HUANG et al., 1999). Os outros membros da família NRT1 caracterizados em *Arabidopsis* foram identificados como envolvidos na translocação de NO_3^- dentro da planta. NRT1.5 (NPF7.3) é expresso nas células do periciclo e está envolvido no carregamento do xilema (LIN et al., 2008). NRT1.8 (NPF7.2) e NRT1.9 (NPF2.9) estão envolvidos no descarregamento no xilema, afetando o transporta de NO_3^- da raiz para o parte aérea (LI et al., 2010; WANG e TSAY, 2011). NRT1.7 (NPF2.13) está envolvido na remobilização de NO_3^- das folhas velhas para as folhas novas (FAN et al., 2009). NRT1.4 (AtNPF6.2) é expresso no pecíolo foliar (CHIU et al., 2004) e NRT1.6 (NPF2.12) está envolvido no transporte de NO_3^- para o embrião em desenvolvimento (ALMAGRO et al., 2008). LÉRAN et al. (2013) verificaram que NRT1.5 é bidirecional e especula-se que pode ser uma característica geral dos transportadores de NO_3^- de baixa afinidade.

Recentemente, XIA et al. (2015) caracterizaram um novo transportador de NO_3^- de baixa afinidade OsNPF2.4 (esse transportador não possui a nomenclatura usual porque os autores optaram pela nomenclatura de LÉRAN et al. (2014) e não possui homologia com os transportadores de NO_3^- já caracterizados). OsNPF2.4 esta presente na membrana plasmática, sendo expresso na epiderme e cilindro central da raiz, folhas e grãos (XIA et al., 2015). Plantas de arroz mutantes silenciando *osnnpf2.4* apresentam menor absorção de NO_3^- em alta concentração e menor translocação de NO_3^- para a parte aérea.

LIN et al. (2000) caracterizaram em arroz um transportador de baixa afinidade de NO_3^- fortemente expresso na epiderme e pêlos radiculares. Posteriormente, TSAY et al. (2007) nomeou o transportador caracterizado por LIN et al. (2000) como OsNRT1.1. A nomenclatura do transportador caracterizado por LIN et al. (2000) como OsNRT1.1 (OsNPF8.9) ainda permeceu nos novos estudos de divisões dos transportadores da família NRT1/PTR feitas por LÉRAN et al. (2014) e von WITTGENSTEIN et al. (2014). No entanto, o estudo realizado por PLETT et al. (2010) constatou que o OsNRT1.1 mostrado no trabalho da TSAY et al. (2007) não possui nenhuma relação com NRT1.1 de *Arabidopsis*. PLETT et al. (2010) encontraram no genoma de gramíneas três prováveis ortólogos do gene de *Arabidopsis* NRT1.1. Em arroz, PLETT et al. (2010) nomearam os ortólogos do gene NRT1.1 como OsNRT1.1A (OsNPF6.3), OsNRT1.1B (OsNPF6.5) e OsNRT1.1C (OsNPF6.4). Os ortólogos para NRT1.1 sugeridos por PLETT et al. (2010) estão na mesma superfamília da nomenclatura feita por LÉRAN et al. (2014), estando na superfamília NPF6, enquanto o OsNRT1.1 nomeado por TSAY et al. (2007) está na superfamília NPF8.

2.3. Biogênese e Modo de Ação dos Micro RNAs: Silenciamento Gênico Mediado por Micro RNA Artificial (amiRNA)

A expressão do pri-miRNA (miRNA primário) ocorre de maneira idêntica aos genes codificantes de proteína, contendo sítio de início de transcrição, TATA-box e CAAT-box. As regiões promotoras da maioria dos miRNAs de plantas possuem TATA box e ao menos 21 motivos *cis* regulatórios (ZHAO et al., 2013), podendo gerar respostas de expressão em diferentes etapas do desenvolvimento vegetal, ataque de patógenos ou até mesmo tecido específico. Diversos fatores de transcrição envolvidos em diferentes tipos de respostas à vários tipos de estresse possuem regulação na expressão do pri-miRNA. Um exemplo é o fator de transcrição PHR1 (*PHOSPHATE STARVATION RESPONSE*) envolvido na homeostase de fósforo (P) em *Arabidopsis* (BARI et al., 2006). Muitos promotores de genes pri-miRNA apresentam sítios de ligação para diversos fatores de transcrição na sua região promotora envolvidos em respostas hormonais, como ARF (induz repressão de genes na ausência de auxina), LFY (ativa genes chave homeóticos florais em sua indução, notavelmente por gibberelina) e MYC2 (aumenta a resposta à seca pelo aumento da sensibilidade ao ABA) (MEGRAW et al., 2006; VOINNET, 2009).

Do mesmo modo que a maioria dos genes transcritos pela RNA pol II, os pri-miRNAs possuem a típica estrutura éxon-intron de genes codificantes de proteínas. A maioria dos pri-miRNAs vegetais contém ao menos um íntron do lado 3' do loop contendo o miRNA, sendo que durante muito tempo foi pensando que os introns não possuíam função na biogênese dos miRNAs. Recentemente, foi demonstrado que o íntron no pri-miRNA desempenha papel fundamental na formação do miRNA (DHIR e PROUDFOOT, 2013).

Duas proteínas que estão envolvidas no processamento do miRNA são CBP20 e CBP80 (Cap Binding Proteins). As proteínas CBP foram primeiramente caracterizadas por atuar no splicing de mRNA em plantas (RACZYNSKA et al., 2010), no entanto, também foi verificado que CBP20 e CBP80 são fundamentais na biogênese de miRNAs. Plantas mutantes *cbp20* e *cbp80* apresentaram pri-miRNA com defeitos no splicing, assim como alteração na eficiência de processamento do pri-miRNA (LAUBINGER et al., 2010). A alteração do processamento de pri-miRNA sem íntron nos mutantes *cbp20* e *cbp80* indicam que a função dessas proteínas no processamento do miRNA independente da necessidade de splicing do miRNA (ROGERS e CHEN, 2013).

Após a expressão e maturação do pri-miRNA, ocorre o processamento do miRNA por clivagens sucessivas no pri-miRNA. Em animais, a primeira etapa de clivagem ocorre no núcleo pela enzima Droscha e posteriormente no citossol pela enzima Dicer (BOLOGNA et al., 2012).

Em plantas, toda a clivagem e maturação do miRNA ocorre no núcleo e a enzima DCL1 (Dicer-Like 1), uma enzima tipo RNase III, que realiza todas as clivagens necessárias para a liberação do complexo miRNA-miRNA*. DCL1 é auxiliada pela proteína de ligação do dsRNA HYPOPLASTIC LEAVES HYL1 e a proteína dedo de zinco SERRATE (SE), aumentando a eficiência de corte da DCL1 (DONG et al., 2008; BOLOGNA et al., 2012). Mutantes *dcl1* (sem DCL1) são letais, enquanto mutantes com menores níveis de HYL1 e SE possuem menor processamento do miRNA e acúmulo de pri-miRNA (LAUBINGER et al., 2008). HYL1 e SE juntas são responsáveis pela precisão do corte realizada pela DCL1 (MANAVELLA et al., 2012). Outra proteína envolvida na estabilização do miRNA é TOUGH (TGH), que se liga ao pri-miRNA ainda na forma de fita-simples e apesar de não estar envolvida na precisão de corte da DCL1, aumenta a atividade de processamento do pri-miRNA por aumentar a afinidade da proteína HYL ao pri-miRNA (REN et al., 2012). CPL1 (C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE1) está envolvida no controle de HYL através da fosforilação, mantendo HYL hipofosforilada (MANAVELLA et al., 2012). Existem duas isoformas de CPL1, sendo letal somente quando há mutação das duas isoformas

cpl1 (ROGERS e CHEN, 2013). A proteína DAWDLE (DDL) interage com as isoformas DCL2 e 4 estabilizando o pri-miRNA e aumentando a taxa de processamento de miRNA, entretanto não é conhecido se DDL também interage com outras isoformas de DCL (ENGELSBERGER e SCHULZE, 2012).

Após a expressão do pri-miRNA, é formada uma estrutura secundária conhecida como *stem-loop*, possuindo grande importância no processamento mediado pela DCL. Os pri-miRNA formam uma estrutura secundária (*stem-loop*) contendo *loop* terminal (região central do miRNA que não possui auto-anelamento), haste superior (região entre o *loop* terminal e o miRNA/miRNA*), a região contendo o miRNA/miRNA* e a haste inferior contendo aproximadamente 15 nt abaixo do miRNA/miRNA* e um *loop* interno (BOLOGNA et al., 2012).

Existem quatro DCLs no genoma de *Arabidopsis* (DCL1-4) e seis DCL em arroz, sendo que no genoma de arroz é encontrada uma cópia extra da DCL2 e DCL3 (MARGIS et al., 2006; PATTANAYAK et al., 2013). DCL1 é responsável pela clivagem do pri-miRNA e liberação do miRNA/miRNA* (GARCIA-RUIZ et al. 2010), DCL3 está envolvido na produção de 24-nt si-RNA que regula a metilação de elementos móveis como transposons (LU et al., 2005), DCL4 é principalmente responsável pelo processamento endógeno de 21-nt siRNAs (ta siRNA) e siRNAs derivados de vírus, enquanto DCL2 pode funcionalmente compensar a atividade da DCL4 na defesa viral (PATTANAYAK et al., 2013). A isoforma de DCL mais importante para o processamento do miRNA em plantas é DCL1, embora DCL3 possa clivar miRNAs em órgãos específicos e bloquear a ação dos miRNAs em um determinado órgão (VOINNET, 2009). A regulação da expressão da enzima DCL1 é feita pelo miR162 que silencia o mRNA de DCL1 (MENG et al., 2009).

O processamento do pri-miRNA ocorre dentro do núcleo em estruturas chamadas de “Dicing Bodies” (D-Body) (LIU et al., 2012). Complexos de proteína contendo DCL1, HYL1, SE, TGH e CPL1 foram encontradas em um local subnuclear por complementação de fluorescência bimolecular (FANG e SPECTOR, 2007). A presença da DCL1 e do pri-miRNA nesses sítios sugerem que “D-Bodies” possuem um papel fundamental na maturação do miRNA (ROGERS e CHEN, 2013).

WANG et al. (2013) identificaram outra proteína envolvida na expressão e processamento de miRNAs. Primeiramente identificada em levedura, NOT2 é uma proteína conservada em eucariotos que possui papel fundamental na expressão gênica em levedura (KRUK et al., 2011), no entanto, sua função no controle da expressão gênica não era totalmente caracterizada em plantas. Plantas de arroz transformadas com RNAi para silenciar *OsNOT2* não regeneraram plantas, indicando que o silenciamento de *OsNOT2* é letal nessa espécie. Para caracterizar a função de NOT2 em *Arabidopsis*, WANG et al. (2013) usaram plantas mutantes com duplo nocaute nas duas isoformas de NOT2 (NOT2a e NOT2b) denominada *not2a-1 2b-1*, assim como duas linhagens de plantas mutantes com RNAi para silenciar NOT2b no mutante *not2a-2*, denominadas *RNAi-1* e *RNAi-2*. Todas as plantas mutantes *not2* apresentaram menor crescimento quando comparado com *Arabidopsis* tipo-selvagem. As plantas mutantes *not2a-1 2b-1*, *RNAi-1* e *RNAi-2* apresentaram menor biogênese de miRNAs, no entanto, foi observado que o pri-miRNA não acumulou nas plantas mutantes indicando que NOT2 pode ter influência na expressão de genes MIR.

Após o processamento do pri-miRNA pela DCL e proteínas acessórias, é liberado o complexo miRNA/miRNA*. O duplex miRNA/miRNA* é metilado pela enzima HUA ENHANCER 1 (HEN1) em *Arabidopsis* e WAFY LEAVE 1 (WAF1) em arroz, sendo metil transferases encontrados em plantas (ARIKIT et al., 2013). A adição do grupo metil no resíduo de açúcar 2'-OH do nucleotídeo 3' pela HEN1 protege o miRNA da degradação da 3'-exonuclease e 3'-uridilização (adição de pequenas caudas de poli-U nos miRNAs não metilados que diminui sua estabilidade facilitando a degradação do miRNA) (GULERIA et

al., 2011). HEN1 possui preferência pelo complexo miRNA/miRNA* sugerindo que a metilação ocorre antes da dissociação das fitas de miRNA/miRNA* (ROGERS e CHEN, 2013). Plantas mutantes de arroz *waf1* (ortólogo da Arabidopsis HEN1) apresentam desenvolvimento anormal e menor crescimento de raiz e parte aérea (ABE et al., 2010). Usando Arabidopsis mutante *hen1*, YU et al. (2005) verificaram que a deleção de HEN1 causa degradação do miRNA e uridilização do miRNA, evidente pela formação de bandas com tamanho maior que 21-nt pela adição de U na extremidade 3' do miRNA. Também foi avaliado o efeito da deleção de WAF1 em arroz usando o mutante *waf1* e foi verificado forte degradação dos miRNAs avaliados, sendo que foi verificado menor uridilização do miRNA nos mutantes de arroz quando comparado com os mutantes *hen1* de Arabidopsis (ABE et al., 2010).

A metilação dos miRNAs vegetais aumentam sua resistência à degradação, podendo até ter influência na expressão de genes em animais caso ingerido na alimentação. Em um detalhado estudo da influência de um miRNA vegetal no silenciamento gênico em animais, ZHANG et al. (2012) verificaram que o miR168a de arroz pode atuar no silenciamento gênico pós-transcricional em um gene específico (*LDLRAP1*) de animais.

Após o duplex miRNA/miRNA* ser liberado na maquinaria de processamento e metilado pela HEN no núcleo, a saída para o citoplasma é feita pela HASTY, um homólogo em plantas da exportina-5 de animais (PARK et al., 2005). No entanto, em animais exportina-5 transporta pre-miRNAs para o citoplasma onde a enzima Dicer realiza o processamento. Plantas mutantes *hasty* apresentaram queda de transporte do miRNA/miRNA* do núcleo para o citoplasma somente de alguns miRNAs, sugerindo que existem outras formas de transporte de miRNAs para o citossol em plantas ainda não identificados (ROGERS e CHEN, 2013).

O miRNA no citossol é integrado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, *RNA induced silencing complex*). A fita guia do miRNA é liberada da fita passageira (*miRNA) e carregada na enzima Argonauta (AGO), a unidade catalítica do complexo RISC. O silenciamento do mRNA é mediado pelo pareamento com o miRNA e clivagem promovida pela AGO. A seleção da fita de miRNA correta proveniente do duplex miRNA/miRNA* é baseada em parte pelas características do miRNA. A fita guia (miRNA) contém baixa estabilidade termodinâmica na porção 5' (região da semente, com maior conteúdo de A e U) relativa ao miRNA*, além de possuir poucos mismatches (bases não pareadas dentro do duplex miRNA/mRNA) na região da semente (OSSOWSKI et al., 2008). A porção 3' do miRNA é chamada de região compensatória e pode ter entre 2 e 4 mismatches, além de possuir maior quantidade de citosina (C) e guanina (G). O sítio de clivagem é conservado entre os miRNAs, sendo o nucleotídeo na posição 10 uma adenosina (A) na maioria dos miRNAs, por causa da clivagem mediada pela AGO ocorrer entre os nucleotídeos 10 e 11 (WARTHMAN et al., 2008). O primeiro nucleotídeo na posição 5' é predominantemente uracila (U), sendo de grande importância no carregamento do miRNA na isoforma de AGO1, responsável pela clivagem do mRNAs mediada por miRNA em plantas (OSSOWSKI et al., 2008). A seleção da fita guia é também aumentada pelas proteínas HYL1 e CPL, indicando que o miRNA é selecionado desde o processamento no núcleo (MANAVELLA et al., 2012).

O conhecimento da biogênese e processamento dos miRNAs gerou a possibilidade de criar métodos de silenciamento gênico sem a necessidade de usar bancos de mutantes. A primeira geração de silenciamento usando pequenos RNAi artificiais foi com o método de hairpin RNAi (hpRNAi) (WATSON et al., 2005). A construção de hpRNAi consiste de uma porção de um gene alvo clonado na direção senso e antisenso separados por um íntron. Esse método produz diversos siRNA, possuindo alto silenciamento do gene alvo. No entanto, esses diversos siRNA após entrar no complexo RISC podem resultar no silenciamento de genes não alvos (*off-targets*). O número alto de genes não alvos sendo silenciados pelo método hpRNAi

fazem desse método instável para usos futuros para estudar o efeito de silenciamento nos genes de interesse (TIWARI et al., 2014).

O uso de sRNAi baseado em amiRNA tem crescido a partir do desenvolvimento de vetores para uso em Arabidopsis e arroz, sendo chamado de segunda geração de RNAi. A tecnologia de amiRNA é baseada na manipulação de precursores de miRNA endógenos para silenciamento de mRNA específico (SCHWAB et al., 2006). Análises de expressão mostram que amiRNA possuem similaridade e alta especificidade como miRNA endógenos (SCHWAB et al., 2006), sendo que suas sequências podem ser facilmente otimizadas para silenciamento de um ou diversos genes sem afetar a expressão de outros genes. No entanto, alguns fatores podem afetar a eficiência de silenciamento: (i) produção insuficiente de siRNA com propriedades favoráveis, (ii) inacessibilidade do sítio de clivagem no mRNA alvo, (iii) dificuldades em diminuir os níveis do mRNA alvo por causa de feedback negativos (OSSOWSKI et al., 2008). Analisando as características intrínsecas do amiRNA que possuem alta especificidade no silenciamento gênico apresentam instabilidade (alto teor de AU) na porção 5' (SCHWARZ et al., 2006).

A tecnologia envolvendo amiRNA pode ser facilmente manipulada usando miRNAs endógenos. Sabendo a região que é processada na sequência do miRNA imaturo, essa pode ser manipulada por PCR e inserir um miRNA específico para o mRNA alvo. No entanto, é necessário encontrar as melhores regiões dentro do mRNA alvo para um silenciamento eficiente. Baseado nisso, foi desenvolvido no 'Instituto Max Planck para Fisiologia Vegetal' pelo pesquisador Deflet Weigel uma plataforma que permite a automação do desenho de regiões para amiRNA, chamada WMD (Web MicroRNA Designer). A plataforma WMD foi desenvolvida inicialmente para Arabidopsis e agora conta com banco de dados para mais de 30 espécies (WARTMANN et al., 2008). Para Arabidopsis e arroz basta entrar com o nome do loco (por exemplo, At1g23450 ou Os01g24680), enquanto para outras espécies necessita entrar com a sequência no formato FASTA pois é baseada em bancos de EST (Expressed Sequence Tags).

O princípio da plataforma WMD consiste em encontrar sequências que poderão ser usadas como amiRNAs específicos para determinada espécie baseada no seu banco de dados (OSSOWSKI et al., 2008). Inicialmente, sequências de 21 nucleotídeos são escolhidas do reverso complementar do transcrito alvo, como aquelas que possuem A na posição 10 e possuem alto conteúdo de AU na extremidade 5' e alto conteúdo de CG 3'. Na posição 1, uma U é introduzida em todos os casos, mesmo que exista outro nucleotídeo nessa posição. Próximo, todos os candidatos são testados com mutações nas posições 13-15 e 17-21. Os candidatos de amiRNA mutados deverão hibridizar com o gene candidato com não mais que dois não-anelamentos nas posições 13-21 e a instabilidade da extremidade 5' é obrigatório. É permitido somente um não-anelamento na região entre as posições 2 e 12, nenhuma na região 10 e 11 (sítio de clivagem) e até quatro entre as regiões 13-21, sem mais que dois não-anelamentos consecutivos. O duplex amiRNA-amiRNA* deverá ter pelo menos 70% da energia livre de hibridização calculado de um perfeito anelamento amiRNA-amiRNA*, com pelo menos $-30 \text{ Kcal mol}^{-1}$. Um ou dois não-anelamentos entre as bases 17 e 21 são desejáveis, que deverão reduzir a possibilidade de extensão pela RNA-pol dependente de RNA que poderá atingir outros genes. Finalmente, é evitado amiRNA com perfeita complementaridade com seus alvos por causa dos efeitos que podem ser causados em outros genes, como mencionado anteriormente. Embora a maioria dos sítios alvos dos miRNA endógenos sejam encontrados na extremidade 3' da região codante, os amiRNAs podem ser usados em qualquer região (OSSOWSKI et al., 2008).

Foram identificados miRNA que podem ser usados com alta eficácia para construção de amiRNA em Arabidopsis, como o *MIR164b*, *MIR159a*, *MIR171* e *MIR172a* (SCHWAB et al., 2006). Para estudos de silenciamento em arroz, WARTHMAN et al. (2008) isolou do

pre-miRNA *osa-MIR528* a região que sofre processamento para gerar o miRNA, adicionou sítios de restrição e construiu o vetor pNW55. Através de reações de PCR utilizando o vetor pNW55 e primers contendo o miRNA específico para o gene de interesse, pode-se obter construções gênicas para silenciar qualquer gene de interesse em arroz.

A eficácia de processamento do amiRNA é semelhante aos miRNAs endógenos (SCHWAB et al. 2006). O uso de amiRNAs possuindo especificidade, efetividade e precisão, é indicado para estudos de genes via silenciamento altamente específico (TIWARI et al., 2014). WARTMANN et al. (2008) testando seu sistema de amiRNA conseguiu mais de 70% de silenciamento do gene alvo com grande especificidade. CHEN et al. (2012) usando o sistema de amiRNA para arroz obtve entre 60 e 80% de silenciamento do gene alvo. BUTARDO et al. (2011) usaram a tecnologia hpRNAi e amiRNA em arroz para silenciar o gene *SBEIIb* (*starch branching IIb*) e verificaram que amiRNA possui maior efeito de silenciamento quando comparado ao hpRNAi. KHANDAY et al. (2013) também usaram a tecnologia do amiRNA em arroz, obtendo oito linhagens com alto silenciamento do gene alvo de maneira específica. WENG et al. (2014) produziram 20 linhagens de arroz com o amiRNA para silenciar o gene *Ghd7* (*Grain number, plant height, and heading date7*), obtendo nas linhagens alto nível de silenciamento do gene alvo e expressão da característica fenotípica esperada.

2.4. Bombas de Prótons (H⁺) em Plantas: Desenvolvimento Vegetal e Nutrição Mineral

As bombas de H⁺ são divididas em três grupos: H⁺-ATPase de membrana plasmática (PM H⁺-ATPase), H⁺-ATPase vacuolar (V-H⁺-ATPase) e H⁺-PPase vacuolar (V-H⁺-PPase). A PM H⁺-ATPase é uma P₃-ATPase que utiliza a energia da hidrólise do ATP para bombear H⁺ do citossol para o apoplasto, criando um gradiente de potencial eletroquímico, ou seja, um gradiente elétrico (citosol eletrogênico) e um gradiente de prótons $\Delta\mu_{H^+}$ que gera a força próton-motriz (Δp), ambos necessários para energizar os sistemas de transporte de nutrientes (SONDERGAARD et al., 2004; DUBY e BOUTRY, 2009).

A PM H⁺-ATPase é composta de uma única cadeia peptídica contendo em média 950 aminoácidos e 10 hélices transmembrana, possuindo uma região regulatória na extremidade C-terminal chamada domínio R. Quando o penúltimo resíduo de treonina (Thr) está fosforilado, a proteína 14-3-3 se liga na extremidade C-terminal e abre ou libera o sítio catalítico da PM H⁺-ATPase onde o ATP se liga no momento da hidrólise (ATP → ADP + Pi) (GAXIOLA et al., 2007). A superexpressão da PM H⁺-ATPase sem o domínio regulatório C-terminal (Δ PMA4, sem os últimos 103 resíduos de aminoácidos da porção C-terminal) em tabaco (*Nicotiana tabacum*), resultou em uma PM H⁺-ATPase ativa sem regulação, o que causou efeitos deletérios na planta por causa do alto consumo de ATP (GÉVAUDANT et al., 2007). Esses autores também fizeram a superexpressão da PM H⁺ATPase sem nenhuma alteração na sequência de aminoácidos, não observando mudanças na planta mutante por causa da forte regulação pós-traducional sofrida pelas PM H⁺ATPases.

A regulação pós-transcricional da PM H⁺-ATPase é importante para o controle da atividade de bombeamento de H⁺. Em tabaco, as duas principais isoformas de PM H⁺-ATPase são PMA2 e PMA4, sendo que somente 44% de PMA2 e 32% de PMA4 estão ativas (fosforiladas) em condições normais de crescimento (BOBIK et al., 2010). Esses resultados mostram que a regulação pós-transcricional é diferente entre as isoformas de PM H⁺-ATPases. De acordo com GAXIOLA et al. (2007), a existência de diversas isoformas de PM H⁺-ATPase possibilita um efeito compensatório nos mutantes superexpressando ou silenciando uma isoforma específica. No entanto, BAXTER et al. (2003) sugere que diversas isoformas de PM H⁺-ATPase pode também ser resultado de expressão tecido específica ou expressão em determinados estágios de desenvolvimento ou em resposta a diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos.

A caracterização das isoformas de PM H⁺-ATPase teve grande avanço usando mutantes de *Arabidopsis*, que possui 11 isoformas (ARANGO et al., 2003). Por exemplo, *AHA10* é principalmente expressa no desenvolvimento das sementes (HARPER et al., 1994), *AHA4* é expressa na endoderme da raiz, flores e silículas (VITART et al., 2001), enquanto *AHA6*, *AHA8* e *AHA9* no pólen (BOCK et al., 2006). Em pepino, a isoforma *CsHA1* é mais expressa na parte aérea, enquanto *CsHA3* é mais expresso nas raízes (MŁODZINSKA et al., 2010).

Em uma revisão sobre bombas de H⁺ em plantas, GAXIOLA et al. (2007) afirmaram que ao contrário dos transportadores envolvidos na absorção de nutrientes induzidos com suprimento ou deficiência de nutrientes, as isoformas de PM H⁺-ATPase mostram pequena regulação transcricional em resposta a nutrientes minerais. No entanto, diversos resultados da literatura mostram que essa opinião está equivocada. A indução da atividade da PM H⁺-ATPase pela exposição ao NO₃⁻ em milho foi verificado por SANTI et al. (1995). A exposição de plantas de milho ao NO₃⁻ induzem a expressão das isoformas de PM H⁺-ATPase *MHA3* e *MHA4* (SANTI et al., 2003). A importância da indução da expressão de isoformas de PM H⁺-ATPase fica evidente no aumento da quantidade da PM H⁺-ATPase na membrana plasmática, concomitante à maior atividade da PM H⁺-ATPase (SANTI et al., 2003). Esses autores ainda verificaram que a máxima expressão da PM H⁺-ATPase foi duas horas após o suprimento de NO₃⁻, enquanto a maior quantidade da PM H⁺-ATPase e atividade desse enzima foi 4-6 horas após o suprimento de NO₃⁻. O aumento de atividade da PM H⁺-ATPase se deu concomitante com a maior expressão dos transportadores de NO₃⁻ em milho (*ZmNRT2.1* e *ZmNRT2.2*), gerando maior influxo de NO₃⁻.

Em *Arabidopsis*, *AHA2* e *AHA7* estão relacionadas com absorção de Fe (SANTI et al., 2009), da mesma forma que *CsHA1* em pepino (*Cucumis sativus*) (SANTI et al., 2005). Em arroz, *OsA8* está relacionada com a absorção de P do solo e também translocação de P para parte aérea (CHANG et al., 2009). Em arroz, a expressão das isoformas de PM H⁺-ATPase é diferenciada em relação a fonte de N: o ressurgimento de NO₃⁻ induz fortemente as isoformas *OsA2* e *OsA7*, enquanto *OsA5* e *OsA8* sofrem indução moderada; o ressurgimento com NH₄⁺ induz a expressão das isoformas *OsA1*, *OsA3* e *OsA7* (SPERANDIO et al., 2011). A expressão das isoformas de PM H⁺-ATPase pode ser diferenciada de acordo com a capacidade de absorção de NO₃⁻ pela planta. A isoforma *MHA1* de milho possui maior expressão no genótipo com maior eficiência de uso de N (QUAGGIOTTI et al., 2004).

Desse modo, fica evidente que diversas formas de regulação da PM H⁺-ATPase são importantes para o desenvolvimento vegetal e absorção de nutrientes. Uma forma mais aceitável de analisar a PM H⁺-ATPase é através da expressão das isoformas (regulação transcricional) e atividade dessa enzima a partir do bombeamento de H⁺ e/ou hidrólise de ATP (regulação pós-transcricional). A quantificação da quantidade da PM H⁺-ATPase presente na membrana plasmática (*protein blot*) pode revelar a correlação da atividade dessa enzima com a quantidade presente na membrana plasmática. Adicionalmente, as isoformas de PM H⁺-ATPase possuem diferentes parâmetros cinéticos (K_M, V_{max}), sendo que a indução específica de uma isoforma de PM H⁺-ATPase pode alterar os parâmetros cinéticos da atividade total da PM H⁺-ATPase (PALMGREN e CHRISTENSEN, 1994; BAXTER et al., 2003; DUBY e BOUTRY, 2009). Ainda podem ocorrer diferenças na taxa de acoplamento da PM H⁺-ATPase (1H⁺/1ATP até 3H⁺/1ATP) em resposta a diferentes tipos de estresse que reduzam o fornecimento de ATP (FULSANG et al., 2011). O estudo de expressão e atividade da PM H⁺-ATPase em pepino mostrou que estresse salino provoca aumento de expressão das isoformas *CsHA1* e *CsHA10*, além da mudança da taxa de acoplamento da PM H⁺-ATPase (H⁺ bombeado/ATP hidrolisado) de 1,45 para 2,95 (JANICKA-RUSSAK et al. (2013). Esse estudo mostra que diversas formas de regulação da PM H⁺-ATPase são relevantes para a fisiologia da planta, principalmente em condições de estresse.

Uma importante ferramenta para estudar a contribuição de isoformas específicas de PM H⁺-ATPase é o uso de plantas com menores níveis de expressão de uma isoforma específica (silenciamento). Até o momento, a melhor caracterização de isoformas específicas de PM H⁺-ATPase foi feita por HARUTA et al. (2010) em *Arabidopsis*. Esses autores verificaram em *Arabidopsis* as isoformas *AHA1* e *AHA2* são as mais expressas. Mutantes *aha1* ou *aha2* não apresentavam mudança de crescimento e produção de sementes em condições ideais de crescimento, no entanto, o mutante duplo *aha1-aha2* foi letal (HARUTA et al., 2010). Esses resultados mostram que o silenciamento de uma isoforma de PM H⁺-ATPase em *Arabidopsis* não é letal por causa da compensação de outras isoformas. Esses mesmos autores ainda verificaram que nos mutantes *aha1* e *aha2* não ocorreu aumento de expressão de outra isoforma de PM H⁺-ATPase. A análise de fosforilação da extremidade regulatória C-terminal da PM H⁺-ATPase indicou que nos mutantes *aha1* e *aha2* ocorria pouco aumento de fosforilação, mostrando que o silenciamento de uma isoforma de PM H⁺-ATPase de alta expressão não é compensada. Os mutantes *aha1* e *aha2* apresentaram menor atividade de bombeamento de H⁺ e quando cultivadas com alta dose de KCl (100 mM) e alto pH (8,0) apresentaram menor crescimento. Alta concentração de KCl e alto pH são conhecidos por alterar o potencial eletroquímico, sendo que o menor bombeamento de H⁺ nos mutantes *aha1* e *aha2* gerou menor crescimento. Os resultados de HARUTA et al. (2010) indicam claramente que o silenciamento de uma isoforma de alta expressão em *Arabidopsis* possui efeitos no bombeamento de H⁺ mas o efeito do silenciamento no crescimento só é detectado em condições de estresse onde a manutenção da força próton motriz exige maior bombeamento de H⁺.

A alteração do bombeamento de H⁺ tem efeito direto no crescimento das plantas. A aplicação de ácidos húmicos de baixo peso molecular gerou maior expressão das isoformas *MHA1* e *MHA2* em milho e provocou maior crescimento e maior absorção de NO₃⁻ quando comparado com plantas não tratadas (QUAGGIOTTI et al., 2003). A maior atividade da PM H⁺-ATPase é essencial para maior absorção de NO₃⁻ (SANTI et al., 2003; SPERANDIO et al., 2011; SANTOS et al., 2012) e para o crescimento de acordo com a teoria do crescimento ácido (HAGER, 2003). A aplicação de auxina exógena e ácidos húmicos aumentam a atividade da PM H⁺-ATPase e geram maior crescimento radicular (ZANDONADI et al., 2010; GARCIA et al., 2012).

Outro trabalho que usou plantas mutantes com menor expressão de uma isoforma específica de PM H⁺-ATPase foi ZHAO et al. (2000). Esses autores geraram plantas de tabaco com menor nível da isoforma *PMA4*. Os resultados foram similares ao de HARUTA et al. (2010), não ocorrendo compensação de outras isoformas de PM H⁺-ATPase, confirmado por *western blot* e expressão gênica. As plantas mutantes *pma4* obtidas por ZHAO et al. (2000) apresentaram menor produção de açúcares nas folhas como consequência da alteração da abertura dos estômatos (dependente da ação da PM H⁺-ATPase para entrada e saída de íons que garantem a abertura e fechamento dos estômatos) e menores translocação de açúcares e atividade da PM H⁺-ATPase (redução de 40-50%). ZHAO et al. (2000) verificaram que não houve alteração no N-total da planta mutante *pma4*, no entanto, relatam que a dose de N usada foi alta e com baixa dose de N o resultado poderia ser diferente.

A PM H⁺-ATPase também está relacionado com o transporte de solutos na simbiose micorrízica. O bombeamento de H⁺ no espaço periarbuscular resulta na força motriz que promove a absorção do fosfato nas células corticais da raiz e absorção de açúcares nas células do fungo micorrízico (SONDERGAARD et al., 2004). Estudando a interação entre raízes de arroz e *Rhizophagus irregularis*, WANG et al. (2014) identificaram a isoforma de PM H⁺-ATPase OsA8 como altamente responsiva a inoculação com *R. irregularis*, enquanto as outras isoformas de PM H⁺-ATPase não foram induzidas. Esses autores usaram plantas de arroz mutantes silenciando a isoforma *OsA8* e observaram a colonização entre *R. irregulares* e

raízes de arroz reduzida em 70%, enquanto a superexpressão de *OsA8* aumentou a colonização micorrízica das raízes de arroz. Os mutantes silenciando *OsA8* ainda possuem reduzido potencial de membrana no espaço periarbuscular, mostrando a importância de uma isoforma de PM H⁺-ATPase específica no estabelecimento da simbiose entre fungos micorrízicos e raízes de arroz (WANG et al., 2014).

O transportador de P (PHT) necessita do gradiente de H⁺ entre o citossol e o apoplasto para o simporte H⁺/H₂PO₄. Usando um amiRNA para silenciar a isoforma de PM H⁺-ATPase *MtHA1* em *Medicago truncatula* (luzerna-cortada), KRAJINSKI et al. (2014) também demonstraram que *MtHA1* é essencial para o estabelecimento micorrízico em *M. truncatula*. De acordo com esses autores, a menor expressão de *MtHA1* no espaço periarbuscular diminui a absorção de P pelas raízes de *M. truncatula* e consequentemente a simbiose é afetada, diminuindo a absorção de P e o crescimento de *M. truncatula*. A atividade da PM H⁺-ATPase também é importante para a absorção de P do solo, sendo que maior força próton motriz resulta em maior absorção de P em plantas de arroz (ZHANG et al., 2011).

A isoforma *AHA2* de *Arabidopsis* é a isoforma de PM H⁺-ATPase mais expressa nas raízes (HARUTA et al., 2010). *AHA2* é induzida com o fornecimento de NO₃⁻, principalmente com baixa dose de NO₃⁻ (0,3 mM) (MŁODZIŃSKA et al., 2015). Plantas mutantes silenciando o gene *AHA2* mostram que essa isoforma de PM H⁺-ATPase está envolvida no desenvolvimento radicular, sendo principalmente expressa nos tecidos vasculares e células da epiderme, assim como em pêlos radiculares (MŁODZIŃSKA et al., 2015). Esses mesmos autores verificaram a importância da mudança do sistema radicular em resposta ao NO₃⁻, no entanto, ainda se sabe a rota de ativação da PM H⁺-ATPase pelo NO₃⁻ porque a modulação da atividade da PM H⁺-ATPase é a etapa final da transdução de sinais provocado pelo NO₃⁻. Vale ressaltar que MŁODZIŃSKA et al. (2015) não avaliaram a atividade da PM H⁺-ATPase no mutante *aha2*, o que poderia mostrar a contribuição dessa isoforma na atividade da PM H⁺-ATPase em resposta a diferentes níveis de NO₃⁻.

A H⁺-ATPase vacuolar (V-H⁺-ATPase) é a bomba de H⁺ mais antiga e complexa em plantas, possuindo ancestral comum com as F-ATPases e A-ATPase de arqueobactéria, com distribuição em todos os reinos da vida (GAXIOLA et al., 2007). Ao contrário da PM H⁺-ATPase, a V-H⁺-ATPase é composta de várias cadeias peptídicas, contendo o domínio periférico V₁ com oito subunidades (A, B, C, D, E, F e H) responsável pela hidrólise do ATP e o domínio integral de membrana V_o com até seis unidades (a, c, c', c'', d, e) responsável pela translocação do H⁺ para o interior do vacúolo (GAXIOLA et al., 2007). A dificuldade em estudar a V-H⁺-ATPase com o uso de mutantes é a presença de várias subunidades com diferentes regulações transcricionais e mutantes na maioria das subunidades é letal. KREBS et al. (2010) conseguiram com sucesso um mutante de *Arabidopsis* com mutação na subunidade a (*VHA-a*). Os mutantes *vha-a* apresentavam redução de até 25% da atividade da V-H⁺-ATPase, maior pH vacuolar e a atividade da H⁺-PPase vacuolar (V-H⁺-PPase) não sofreu alteração. Com reduzida atividade da V-H⁺-ATPase no mutante *vha-a* ocorreu menor acúmulo de NO₃⁻ nos vacúolos, maior atividade da Nitrato Redutase e maior teor de glutamina (KREBS et al. 2010). Esses resultados mostram que a V-H⁺-ATPase é essencial para o acúmulo de NO₃⁻, não ocorrendo compensação da outra bomba de H⁺ vacuolar (V-H⁺-PPase).

ZHANG et al. (2013) produziram um mutante de arroz com silenciamento da subunidade *OsVHA-a* mediado por RNA interferente (RNAi). O silenciamento da subunidade *OsVHA-a* foi de aproximadamente 80%, com redução da atividade da V-H⁺-ATPase de 50% e não houve alteração da atividade da V-H⁺-PPase. Nas folhas, a menor atividade da V-H⁺-ATPase causou maior expressão da isoforma de PM H⁺-ATPase *OsA3* por causa do aumento da concentração de H⁺ no citossol, ocasionando maior efluxo de H⁺ do citossol e maior influxo de K⁺ (ZHANG et al., 2013).

A outra bomba de H^+ vacuolar é a H^+ -PPase, composta de somente uma cadeia peptídica de aproximadamente 80 KDa, que usa a energia da hidrólise do PPi para bombear H^+ do citossol no vacúolo (GAXIOLA et al., 2007). Existem as H^+ -PPases tipo I que são dependentes de K^+ para sua atividade, enquanto as H^+ -PPase tipo II não dependem de K^+ (MAESHIMA, 2001). Em Arabidopsis, H^+ -PPase tipo I (AVP1) são bombas de H^+ localizadas no tonoplasto (membrana do vacúolo), enquanto a H^+ -PPase tipo II (AVP2) foram localizadas exclusivamente no complexo de golgi (MITSUDA et al., 2001).

Além do bombeamento de H^+ promovido pela V- H^+ -PPase facilitar a entrada de solutos no vacúolo, esse bomba de H^+ também é vital para o desenvolvimento vegetal. LI et al. (2005) promoveram a superexpressão e silenciamento de AVP1 em Arabidopsis, verificando que plantas superexpressando AVP1 possuíam maior crescimento vegetativo enquanto as plantas silenciando AVP1 apresentaram forte redução do crescimento. Esses autores verificaram que AVP1 está associada com maior tráfico da PM H^+ -ATPase para a membrana plasmática, assim como maior atividade da PM H^+ -ATPase, além da maior produção das proteína PIN associadas com o transporte polar de auxina. As plantas superexpressando AVP1 apresentaram menor pH apoplástico, o que está associado com maior atividade da PM H^+ -ATPase.

O maior desenvolvimento vegetativo (raiz e parte aérea) em plantas superexpressando a V- H^+ -PPase tem despertado interesse biotecnológico para uso em plantas de interesse agrônomico. A superexpressão de AVP1 em tomate gerou maior crescimento radicular com maior resistência à seca devido ao maior volume de solo explorado (PARK et al. 2005). A deficiência de P aumenta a expressão e quantidade da V- H^+ -PPase no tonoplasto (YANG et al., 2007). Plantas superexpressando a V- H^+ -PPase apresentaram maior absorção de P e maior resistência a limitação de P no solo (GAXIOLA et al., 2012).

Estudos com a técnica *western blot* em frações purificadas de plasmalema e tonoplasto mostraram que a H^+ -PPase também pode ser encontrada na plasmalema em algumas células (FUGLSANG et al., 2011). De acordo com LANGHANS et al. (2001), H^+ -PPase e PM H^+ -ATPase estão próximas em células companheiras do floema. No entanto, é fisiologicamente improvável que a H^+ -PPase esteja bombeando H^+ do citossol para o apoplasto, sendo mais provável que a H^+ -PPase localizada na plasmalema funcione no sentido contrário com entrada de H^+ para o citossol e formação de PPi ($Pi + Pi \rightarrow PPi$) (DAVIES et al., 1997). FAÇANHA e DE MEIS (1998) demonstraram *in vitro* que as H^+ -PPases podem também atuar no sentido inverso, ou seja, produzindo PPi a partir de Pi.

A expressão da H^+ -PPase também é regulada por açúcares. Foi demonstrado em Arabidopsis que os fatores de transcrição *AtVOZ1* e *AtVOZ2* (que induzem genes relacionados com o transporte de açúcares) são expressos somente no floema e se ligam na região promotora do gene AVP1 (MITSUDA et al., 2004). GAXIOLA et al. (2012) propuseram um modelo que explica o funcionamento da H^+ -PPase no transporte de açúcares na planta. De acordo com esses autores, a H^+ -PPase presente na membrana plasmática da célula companheira do floema produz PPi a partir da entrada de H^+ (do apoplasto, pH ~5,5, para o citossol, pH ~7,2) seguindo o seu gradiente de potencial eletroquímico. O PPi é co-fator de várias enzimas da glicólise, como a UDP-glicose pirofosforilase e frutose-6-P-1-fosfotransferase, sendo que o aumento de PPi aumenta a atividade dessas enzimas e aumenta a produção de ATP na célula companheira do floema. A maior produção de ATP aumenta a atividade da PM H^+ -ATPase que gera maior força próton-motriz para a entrada da sacarose na célula companheira do floema mediada pelo transportador de sacarose, visto que a entrada deste composto ocorre em co-transporte com $2H^+$ (GAXIOLA et al., 2012). A maior eficiência de carregamento do floema com sacarose permite o maior crescimento da planta, principalmente as raízes que são forte dreno da sacarose produzida nas folhas. Dessa forma, a

superexpressão de *AVPI* favorece maior transporte de sacarose pela planta e permite maior crescimento.

A maior expressão do gene *AVPI* além de aumentar a absorção de P e resistência a seca, pode também aumentar a eficiência de uso de N. PAEZ-VALENCIA et al. (2013) produziram plantas de alface superexpressando a H^+ -PPase de *Arabidopsis* (*AVPI*). As plantas de alface (*Lactuca sativa*) superexpressando *AVPI* apresentaram maior atividade da H^+ -PPase, assim como maior atividade da PM H^+ -ATPase. A superexpressão de *AVPI* em alface também causou maior expressão do transportador de alta afinidade *LsNRT2.1* e maior eficiência do uso de N (PAEZ-VALENCIA et al., 2013). O aumento de expressão de *LsNRT2.1* nos mutantes superexpressando *AVPI* também foi observado em plantas supridas com glicose ou frutose (PAEZ-VALENCIA et al., 2013). Foi demonstrado que o transportador *AtNRT2.1* em *Arabidopsis* (GIRIM et al. 2007) e *OsNRT2.1* em arroz (FENG et al., 2011) possuem elementos cis-regulatórios nas suas regiões promotoras que são responsivos a açúcares. O aumento da atividade da PM H^+ -ATPase nas plantas superexpressando *AVPI* também pode ter contribuído para a maior eficiência de uso de N, visto que a absorção de NO_3^- envolve a ação concomitante dos transportadores de NO_3^- e PM H^+ -ATPase (SPERANDIO et al., 2011).

Recentemente, LI et al. (2014) observaram em trigo que o gene que codifica para o V- H^+ -PPase (*TaVP*) é altamente induzido na raiz e parte aérea por diversos tipos de estresse, como deficiência de P, deficiência de N, salinidade e seca. A superexpressão do gene *TaVP* de trigo (*Triticum spp.*) em tabaco provocou maior atividade da V- H^+ -PPase, com aumento da eficiência de uso N e P, maior resistência à seca e salinidade, além do sistema radicular mais desenvolvido (LI et al., 2014). Os autores ainda verificaram que o maior crescimento nos mutantes superexpressando *TaVP* está relacionado com maior expressão das proteínas de transporte de auxina. Os mutantes de tabaco superexpressando *TaVP* ainda apresentaram maior teor de açúcares solúveis e maior atividade fotossintética, no entanto, não houve alteração da expressão dos transportadores de NO_3^- e P (LI et al., 2014). Desse modo, a superexpressão de *TaVP* afeta a eficiência de uso de nutrientes baseado no aumento da área radicular e sem aumento da expressão dos transportadores de N e P, enquanto PAEZ-VALENCIA et al. (2013) verificaram aumento de expressão do transportador *LsNRT2.1* em resposta à superexpressão de *AVPI* em alface.

YANG et al. (2014) também realizaram a superexpressão do gene *AVPI* de *Arabidopsis* em tomate (*Solanum lycopersicum*). Esses autores verificaram nas plantas de tomate transformadas maior transporte polar de auxina com aumento da extrusão de prótons na raiz, maior crescimento radicular e melhor qualidade dos frutos. UNDURRAGA et al. (2012) usaram plantas de *Arabidopsis* superexpressando *AVPI* e silenciando o gene *SOS1* (transportador antiporte de H^+/Na). Curiosamente, as plantas produzidas por UNDURRAGA et al. (2012) apresentaram as respostas fisiológicas de maior crescimento, maior atividade da PM H^+ -ATPase e V- H^+ -PPase promovidas pela superexpressão da *AVPI* abolidas quando o gene *SOS1* foi silenciado. A regulação promovida pelo *SOS1* associadas com a atividade da V- H^+ -PPase necessita ser esclarecida.

Os diversos trabalhos superexpressando genes que codificam para a V- H^+ -PPase mostram claramente alteração do transporte de açúcares e auxina, melhorando o crescimento vegetativo, maior resistência a seca e salinidade, além de maior eficiência no uso de nutrientes. A relação entre a PM H^+ -ATPase e a V- H^+ -PPase é característica de interesse agrônomico, pois a ação em conjunto dessas bombas de prótons podem conferir maior adaptação a diversos tipos de estresse facilmente encontrados em solos de baixa fertilidade. A aplicação de ácido húmico promove maior crescimento radicular em plantas de milho (*Zea mays*) com a ação conjunta das bombas de H^+ (ZANDONADI et al., 2007).

2.5. Status de N na Planta e Controle da Absorção

A absorção de NO_3^- é um processo altamente integrado, sendo não só influenciado pela disponibilidade de N na rizosfera, mas também pela demanda de N por toda a planta. A presença do NO_3^- na região da rizosfera induz a sua absorção e um sistema de *feedback* negativo causado pelos produtos da assimilação do NO_3^- (catalizado pelas enzimas Nitrato Redutase, Nitrito Redutase e GS/GOGAT) inibem a absorção de NO_3^- do meio externo (GIRIM et al., 2007). O estímulo para a absorção ocorre muito rapidamente, sendo de aproximadamente 30 minutos após a exposição ao íon e, requer síntese *de novo* dos transportadores, evidenciando que a absorção de NO_3^- é influenciada pelo seu próprio substrato (GIRIM et al., 2007).

A absorção de N pela raiz é um processo altamente regulado pelas mudanças na disponibilidade de N do meio externo. Existem dois mecanismos principais que agem de forma coordenada para modular a absorção de N em função do suprimento externo de N e a demanda interna de N (GOJON et al., 2011). O primeiro efeito direto das próprias fontes de N é percebido pelos sistemas sensores da planta (ex: o transceptor NRT1.1 de Arabidopsis). O segundo mecanismo é a repressão por *feedback* exercida pelo alto status de N da planta, que reprime a expressão e atividade dos transportadores de alta-afinidade. Esta repressão diminui quando a planta passa por período de limitação de N que resulta no forte aumento da capacidade do sistema HATS que aumentam a eficiência de absorção de N (NACRY et al., 2013).

O status de N na planta (raiz e parte aérea) envolve mais que os teores de aminoácidos, sendo o N-total e a proteína solúvel usados como marcadores (JEUFFROY et al., 2002). O conteúdo de aminoácidos e NH_4^+ representam bons indicadores da transição entre assimilação para remobilização de N (MASCLAUX et al., 2000). HIREL et al. (2005) mostraram que existe uma forte correlação entre N-total, clorofila, proteína solúvel e conteúdo de aminoácidos livres. O teor de aminoácidos livres correlaciona também com o envelhecimento do órgão e nível de adubação, sugerindo que o decréscimo do teor de aminoácidos pode ser um bom indicativo do status de N do órgão. Adicionalmente, o conteúdo de aminoácido é influenciado pelo nível de aplicação de N-fertilizante e pelo estágio de desenvolvimento da planta, fazendo que o pool de aminoácidos livres seja um bom indicador do status de N (HIREL et al., 2005). Aminoácidos são os principais metabólitos presentes nos vasos do xilema e floema e foi sugerido que sua concentração e composição entre raiz e parte aérea podem integrar o status de N em todos os órgãos (COOPER e CLARKSON, 1989; MILLER et al., 2007). Essa informação foi confirmada com o uso de plantas mutantes sem a Nitrato Redutase (NR-null) (LEJAY et al., 1999).

A aplicação de aminoácidos, principalmente glutamina (principal forma de acúmulo de N em condições de altas doses de N) reprime a absorção de NO_3^- e a expressão dos genes chaves envolvidos na absorção de N (NAZOA et al., 2003). Glutamato também foi sugerido como sinal do status de N por ser um composto de alta translocação na planta (LIU et al., 2009). Apesar do mecanismo de *feedback* estar envolvido no controle da absorção de NO_3^- e NH_4^+ por regular os transportadores de N, diversos estudos indicam que os mecanismos de repressão por *feedback* são diferentes (GANSEL et al., 2001; KROUK et al., 2006; WIDIEZ et al., 2011).

A absorção de NH_4^+ é influenciada predominantemente pelo status local de N da raiz, enquanto a absorção de NO_3^- é controlada pelo status de N da planta inteira (GANSEL et al., 2001). O fato do NH_4^+ não ser translocado para a parte aérea pode ter gerado a especialização do controle pelo status de N da raiz, enquanto o NO_3^- pode ser translocado para a parte aérea e ser então assimilado com aumento dos teores de aminoácidos na parte aérea. Adicionalmente, em experimentos modelo “*split-root*” (uma parte da raiz com N e outra parte sem N) mostra que o suprimento com NH_4^+ em uma parte da raiz não exerce controle na raiz sem N

(GANSEL et al., 2001). De acordo com MERIGOUT et al. (2008), o transcriptoma da resposta à deficiência de N ou tratamento com N é específico para forma de N suprida à planta.

O status de N também pode representar a demanda que a planta apresenta por N para suportar seu crescimento. GARNETT et al. (2013) realizaram um detalhado estudo abordando a expressão dos transportadores de NO_3^- , absorção de NO_3^- e acúmulo de aminoácidos em milho durante todo o ciclo com duas doses de NO_3^- (0,5 mM e 2,5 mM). O perfil dos transcritos de NRTs sugere que as mudanças na capacidade de absorção, em resposta ao suprimento de NO_3^- e demanda de N, estão ligadas às mudanças de expressão dos transportadores de alta-afinidade *ZmNRT2.1* e *ZmNRT2.2* em milho. Curiosamente, o nível dos transcritos *ZmNRT2* atingiram seu nível máximo aos 18 dias após o germinação (DAG) e diminuíram fortemente aos 22 DAG, concomitante com o aumento dos níveis de aminoácidos livres que alcança seu nível máximo aos 22 DAG. Enquanto a demanda de N é alta para manter o crescimento vegetativo, grande parte dos aminoácidos são usados para síntese proteica e estrutural, mantendo alta capacidade de absorção de N pelas raízes. Quando a demanda de N diminui (menor crescimento vegetativo) e o status de N na planta aumenta por causa dos aminoácidos livres que começam a acumular, ocorre rápido decréscimo da absorção de NO_3^- mediado pelo controle negativo dos transcritos de *ZmNRT2* nas raízes (GARNETT et al., 2013). Esses autores ainda sugerem que o aumento dos níveis de aminoácidos na parte aérea possa também sinalizar para o controle pós-traducional dos transportadores *ZmNRT2* nas raízes. Nesse estudo, foi observado que a resposta de expressão de *ZmNRT2.1* e *ZmNRT2.2* foram altas em ambas as doses de N usadas (0,5 mM e 2,5 mM), enquanto o nível de transcritos dos genes de baixa afinidade (*ZmNRT1.1A*, *ZmNRT1.1B*, *ZmNRT1.2* e *ZmNRT1.5A*) foram baixos. Diversos estudos demonstraram que a expressão dos transportadores de alta-afinidade é reprimida com alta dose de NO_3^- (OKAMOTO et al., 2003; LIU et al., 2009). Possivelmente, a alta demanda de N pela planta durante o crescimento vegetativo manteve alta expressão dos transportadores de alta-afinidade independente da dose para manter o crescimento (menor nível de aminoácidos livres), visto que os transportadores de baixa afinidade apresentaram menor expressão quando comparado com os transportadores de alta-afinidade.

Permanece obscura a exata natureza dos sinais sistêmicos envolvidos no status de N na planta. Aminoácidos são o principal constituinte do floema e foi sugerido que seu tamanho e composição podem integrar o status de N entre os órgãos (MILLER et al., 2006; NACRY et al., 2013). Essa hipótese é confirmada pelo uso de plantas mutantes sem a Nitrato Redutase, indicando que os produtos da assimilação do N estão envolvidos na repressão da absorção de NO_3^- por feedback negativo (LEJAY et al., 1999). Apesar da provável regulação na absorção de NO_3^- e NH_4^+ mediado pelo pool de aminoácidos, essa hipótese necessita confirmação final porque os mecanismos moleculares ainda não estão esclarecidos. O trabalho de TILLARD et al. (1998) encontrou correlação negativa entre transporte de aminoácidos para a raiz pelo floema e inibição do transporte de N.

Uma hipótese alternativa em relação à sinalização sistêmica do status de N pode ser os miRNAs. A sinalização da homeostase de P e S da parte aérea para a raiz é mediado por miRNAs (PANT et al., 2008; KAWASHIMA et al., 2009). Por exemplo, PANT et al. (2008) detectaram que em condições limitantes de P na parte aérea ocorre a expressão do pri-miR399 e o miR399 processado é enviado pelo floema para as raízes, onde ocorre a clivagem do seu alvo PHO2 que regula a homeostase de P entre a raiz e parte aérea. Condições limitantes de N na planta altera a expressão de diversos miRNA, ocorrendo aumento ou decréscimo da expressão de diversos miRNAs nas raízes e parte aérea (FISCHER et al., 2013). O miR167a é reprimido pelos produtos de assimilação do NO_3^- e seu alvo, *ARF8* (*AUXIN RESPONSE FACTOR8*) envolvido na resposta transcricional promovida pela auxina), aumenta os nível de

mRNA e ativa o crescimento de raízes laterais (GIFFORD et al., 2008). O miR393 é induzido pelo fornecimento de NO_3^- e diminui os níveis de AFB3 (proteína de sinalização da auxina, promovendo a degradação de repressores transcricionais induzidos por Aux/AIA) que reprime o crescimento da raiz principal (VIDAL et al., 2010). Desse modo, dois miRNAs que possuem regulação diferencial pelo NO_3^- agem no controle da auxina e crescimento radicular. O miRNA169 é reprimido pela deficiência de NO_3^- e o seu gene alvo *NFYA5* (fator de transcrição) aumenta, possuindo efeito positivo na expressão dos transportadores de NO_3^- em condições limitantes de N (ZHAO et al., 2011). Os resultados mostram relação direta entre NO_3^- e seus produtos de assimilação com o controle da expressão de diversos miRNAs, podendo algum miRNA estar envolvido no controle sistêmico da absorção de N por afetar a expressão de diversos fatores de transcrição (FISCHER et al., 2013).

3. CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* E *OsNRT1.1C* EM ARROZ E RELAÇÃO COM A ABSORÇÃO DE NITRATO E ATIVIDADE DAS PM H⁺-ATPASES

3.1. RESUMO

O transportador NRT1.1 em *Arabidopsis* atua na absorção de NO_3^- na faixa de alta e baixa afinidade, sendo ainda um sinalizador da concentração de NO_3^- na solução do solo. Em arroz, os prováveis ortólogos do gene *NRT1.1* foram denominados *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* e ainda não foram caracterizados. Como o transportador NRT1.1 de *Arabidopsis* trabalha em alta e baixa afinidade, algum transportador *OsNRT1.1* pode ser induzido por baixas concentrações de NO_3^- no meio externo. Desse modo, o objetivo deste estudo foi identificar o padrão de expressão dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* na variedade de arroz modelo Nipponbare e depois estudá-los nas variedades brasileiras de arroz IAC-47 (melhorada) e Piauí (tradicional), bem como verificara relação entre expressão desses transportadores, absorção de NO_3^- e atividade da PM H^+ -ATPase. O experimento com a variedade Nipponbare foi feito em câmara de crescimento usando solução de Hoagland modificada a $\frac{1}{2}$ força iônica até os 21 dias após a germinação. Os tratamentos usados foram suprimento constante com 2 mM de N- NO_3^- ou N- NH_4^+ , ressuprimento com 2,0 mM de N- NO_3^- ou N- NH_4^+ após três dias de deficiência de N e deficiência de N por três dias sem N- NO_3^- ou N- NH_4^+ . Na coleta as plantas foram divididas em raiz e parte aérea e a expressão dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* foram estudados por PCR em tempo real. Na raiz, a expressão do gene *OsNRT1.1A* foi reprimida nos tratamentos com ressuprimento e deficiência de N- NO_3^- , enquanto na parte aérea não houve diferença. No experimento com N- NH_4^+ , *OsNRT1.1A* foi induzido pelo suprimento constante. Na raiz, *OsNRT1.1B* foi reprimido com ressuprimento e deficiência de NO_3^- e reprimido em todos os tratamentos com NH_4^+ . Na parte aérea, *OsNRT1.1B* não alterou a expressão nas plantas cultivadas com N- NO_3^- e foi reprimido nas plantas cultivadas com N- NH_4^+ . *OsNRT1.1C* foi induzido pelo ressuprimento e deficiência de NO_3^- e NH_4^+ na raiz e parte aérea. A análise de ΔCt mostra que *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* são mais expressos, enquanto *OsNRT1.1C* é pouco expresso. No experimento com as variedades IAC-47 e Piauí usando N- NO_3^- com tratamentos de 2,0 mM de N- NO_3^- constante, deficiência de NO_3^- por três dias, ressuprimento com 0,2 mM de N- NO_3^- após três dias sem N e ressuprimento com 5,0 mM de N- NO_3^- após três dias sem N, as coletas foram feitas 3, 9 e 24 horas após a aplicação dos tratamentos. Houve pouca diferença entre a expressão dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* entre as variedades, mas *OsNRT1.1A* foi induzido após 9 horas de ressuprimento com 0,2 mM de N- NO_3^- em ambas as variedades. A variedade Piauí apresentou maior influxo de NO_3^- com 0,2 mM de N- NO_3^- em comparação com a IAC-47. Nesse mesmo tratamento, a variedade Piauí apresentou maior atividade da PM H^+ -ATPase. Os genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* são expressos na raiz e parte aérea, sendo *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* os mais expressos. Houve indução do gene *OsNRT1.1B* nas raízes quando as plantas foram cultivadas com NO_3^- e repressão com deficiência e fornecimento de NH_4^+ . Isso indica que esses genes respondem de maneira distinta à fonte de N. O estudo de expressão gênica mostra que *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* podem ter atuação limitada na absorção de NO_3^- em baixas doses, tendo possível participação no transporte de NO_3^- na faixa de baixa afinidade.

Palavras-chave: PCR em tempo real. Nitrogênio. Absorção de nitrato.

3.2. ABSTRACT

The Arabidopsis transporter NRT1.1 is involved in the NO_3^- uptake in low and high affinity range, signaling for soil solution NO_3^- concentration. In rice, the most likely ortholog of Arabidopsis *NRT1.1* were named *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* and *OsNRT1.1C*, and still have not been characterized. Likewise the Arabidopsis transporter NRT1.1 functions in low and high affinity, some *OsNRT1.1* transporter may be upregulated by external low NO_3^- concentration. Thereby, the objective of this work was identify the pattern of expression of *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* and *OsNRT1.1C* in the Nipponbare rice model variety, and then study their expression in the brazilian rice IAC-47 (improved) and Piauí (Landrace) varieties, as well as their relation with NO_3^- uptake and PM H^+ -ATPase activity. The experiment using Nipponbare was made in growth chamber using modified Hoagland solution $\frac{1}{2}$ ionic strength until 21 days after germination. The treatments used were constant supply of 2 mM of NO_3^- -N or NH_4^+ -N, resupply with 2 mM of NO_3^- -N or NH_4^+ -N after three days of N starvation and N starvation for three days. In the harvest, the plants were divided in root and shoot and the expression of *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* and *OsNRT1.1C* were evaluated by real time PCR. In the roots, *OsNRT1.1A* was downregulated with resupply and NO_3^- starvation, whilst in the shoot there was no expression difference. In the experiment using NH_4^+ , *OsNRT1.1A* was upregulated by constant supply of NH_4^+ . In the root, *OsNRT1.1B* was downregulated with resupply and NO_3^- starvation, as well as in all treatments using NH_4^+ . In the shoot, *OsNRT1.1B* did not change its patten of expression in the NO_3^- experiment, and it was downregulated in the NH_4^+ experiment. *OsNRT1.1C* was upregulated by resupply and starvation of NO_3^- and NH_4^+ in the root and shoot. The ΔCt analysis show that *OsNRT1.1A* and *OsNRT1.1B* are more expressed, whilst *OsNRT1.1C* is low expressed. The other experiment using IAC-47 and Piauí varieties using NO_3^- -N with the treatments constant supply of 2 mM of NO_3^- -N, NO_3^- starvation of three days, resupply with 0.2 mM of NO_3^- -N and resupply with 5.0 mM of NO_3^- -N after three days without N. The harvests were made 3, 9 and 24 hours after treatment application. The rice varieties showed little difference in the expression of *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* and *OsNRT1.1C*. *OsNRT1.1A* was upregulated after 9 hours with 0,2 mM of NO_3^- -N in both varieties. The Piauí variety showed higher NO_3^- uptake with 0.2 mM of NO_3^- -N compared to IAC-47 variety. In the same treatment, Piauí variety showed higher PM H^+ -ATPase activity compared to IAC-47 variety. The *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* and *OsNRT1.1C* are expressed in root and shoot, and *OsNRT1.1A* and *OsNRT1.1B* the highly expressed. *OsNRT1.1B* is upregulated when growth with NO_3^- and downregulated by N starvation and NH_4^+ supply. It indicates that these genes are regulated in different forms with N supply. The gene expression analysis show that *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* and *OsNRT1.1C* may represent limited N uptake under low levels, with possible participation NO_3^- uptake in the low affinity range.

Keywords: Real time PCR. Nitrogen. Nitrate uptake.

3.3. INTRODUÇÃO

O nitrato (NO_3^-) é uma importante fonte de N para o arroz de sequeiro, estando também presente em cultivos inundados através da nitrificação, que ocorre na região da rizosfera. O estudo de caracterização dos transportadores de NO_3^- de alta afinidade em arroz é proeminente, já tendo sido identificado que *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* juntamente com a proteína *OsNAR2.1* estão diretamente envolvidos na absorção de NO_3^- em baixas concentrações (ARAKI e HASEGAWA, 2006; FENG et al., 2011). Por outro lado, os transportadores de baixa afinidade foram pouco caracterizados em arroz, sendo *OsNRT1* (LIN et al., 2000) e *OsNPF2.4* (XIA et al., 2015) os únicos caracterizados em arroz. No entanto, existem 80 sequências anotadas pertencentes à família NRT1/PTR em arroz e 53 em Arabidopsis. Vários transportadores da família foram caracterizados em Arabidopsis, sendo principalmente expressos no transporte interno de NO_3^- dentro da planta (KRAPP et al., 2014). Na absorção de NO_3^- , o transportador NRT1.1 desperta interesse porque atua na faixa de alta e baixa afinidade e ainda está envolvido na sinalização da concentração de NO_3^- no solo (HO et al., 2009). O transportador NRT1.1 ainda está envolvido na regulação da arquitetura radicular (KROUK et al., 2010).

Apesar dos avanços na planta modelo Arabidopsis, pouco progresso foi feito em plantas de interesse agrônomico. Em gramíneas, o transportador NRT1.1 possui pelo menos três ortólogos que podem estar envolvidos na absorção de NO_3^- em dupla afinidade. Em arroz, *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* podem desenvolver funções importantes para a absorção de NO_3^- que ainda não foram descobertas. A primeira etapa na caracterização de transportadores de NO_3^- é o estudo da expressão gênica em resposta a diferentes suprimentos e fontes de N (ARAKI e HASEGAWA, 2006; PELLIZZARO et al., 2015).

Os transportadores de alta e baixa afinidade dependem do gradiente de H^+ para absorverem o NO_3^- via simporte com dois H^+ . Desse modo, nesse capítulo será avaliado a expressão dos transportadores *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* em diferentes doses de NO_3^- e sua relação com a absorção de NO_3^- e atividade da PM H^+ -ATPase. Primeiramente será feita a análise de expressão dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* na variedade Nipponbare e depois será avaliado em duas variedades de arroz contrastantes na eficiência de uso de N. Os resultados poderão trazer informações de transportadores de NO_3^- ainda não caracterizados e potencialmente envolvidos na absorção deste composto.

Desse modo os objetivos desse capítulo foram: estudar a expressão das isoformas A, B e C do gene *OsNRT1.1* em resposta a diferentes doses e fontes de N e avaliar a relação entre a expressão dessas isoformas, *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C*, e a absorção de NO_3^- e atividade das PM H^+ -ATPases visando a eficiência de absorção de N em arroz.

3.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1. Montagem e condução do experimento com a variedade de arroz Nipponbare para identificar os padrões de expressão de *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* em resposta ao NO_3^- e ao NH_4^+ .

Foi conduzido um experimento em câmara de crescimento usando plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) cv Nipponbare para identificar os padrões de expressão de *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* em resposta ao NO_3^- e ao NH_4^+ . As sementes de arroz foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2% por 10 minutos e depois lavadas várias vezes com água destilada. Em seguida foram transferidas para potes contendo somente água destilada. Seis dias após a germinação, as plântulas foram transferidas para vasos com volume de 700 ml de solução nutritiva, com quatro plantas por vaso, usando solução de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950) modificada com $\frac{1}{4}$ da força iônica total, onde um grupo recebeu 2 mM de N-NO_3^- como fonte de N e outro 2 mM de N-NH_4^+ . O pH da solução no experimento com N-NO_3^- foi ajustado para 5,5 e no experimento com N-NH_4^+ 6,0 usando H_2SO_4 diluído. Após três dias, as plantas receberam solução de Hoagland modificada com $\frac{1}{2}$ força iônica, continuando um grupo com 2 mM de NO_3^- como fonte de N e outro com 2 mM de NH_4^+ . A partir de então, esta mesma solução foi reposta a cada três dias. Quinze dias após a germinação, uma parte dos vasos de cada grupo receberam solução de Hoagland modificada sem nitrogênio, enquanto o restante continuou recebendo a solução de Hoagland com 2 mM de N-NO_3^- ou N-NH_4^+ .

Dezoito dias após a germinação, a metade dos vasos com solução sem nitrogênio voltou a receber solução com N-NO_3^- ou N-NH_4^+ (ressuprimento), enquanto a outra metade permaneceu sem N-NO_3^- ou N-NH_4^+ por três dias (deficiência). Assim, houve três tratamentos: um grupo constantemente com N-NO_3^- (controle), outro submetido a um período de deficiência de N-NO_3^- ou N-NH_4^+ por 75 horas e o último que foi submetido ao ressuprimento com 2 mM de N-NO_3^- ou com N-NH_4^+ após 72 horas de deficiência. Três horas após o início dos tratamentos, as plantas foram separadas em parte aérea e raiz e amostras coletadas para extração do RNA total.

3.4.2. Montagem e condução de experimento com as variedades de arroz contrastantes IAC-47 e Piauí sob diferentes suprimentos de N para avaliar a resposta dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C*

Para avaliar a resposta dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* na absorção de NO_3^- foi conduzido um experimento com as variedades de arroz contrastantes IAC-47 (melhorada) e Piauí (local) empregando o mesmo modelo do experimento anterior com a variedade Nipponbare (item 3.2.1) usando NO_3^- como única fonte de N. Os tratamentos foram: *i*) suprimento constante com 2,0 mM de N-NO_3^- , *ii*) deficiência de N por 72 horas, *iii*) ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- , *iv*) ressuprimento com 5,0 mM de N-NO_3^- . Foram feitas coletas 3, 9 e 24 horas após a aplicação dos tratamentos para coleta de material vegetal usados nas análises de expressão gênica. Foram coletadas alíquotas de 2,0 ml de solução nutritiva no tempo 24 horas para calcular o influxo de NO_3^- pelo método da depleção. Também foi coletado material para extração da fração microsomal e atividade da PM H^+ -ATPase.

3.4.3. Extração e quantificação do RNA total

O RNA total foi extraído segundo GAO et al. (2001) com modificações. As raízes de arroz foram maceradas com nitrogênio líquido e homogeneizadas por 10 minutos com 1000 μL de tampão NTES (0,2 M Tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0; 0,3 M NaCl; 2% SDS) e 800 μL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Os tubos foram centrifugados a 18000 x g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para um tubo

novo. Foi adicionado às amostras 1 volume de isopropanol e 0,1 volume de NaOAc 2M pH 4,8 e incubados a -80°C por 30 minutos. O material foi centrifugado à 18000 x g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 500µl de etanol 70% para então centrifugar novamente a 18000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi ressuspensão com 500µl de H₂O_{DEPC} e então adicionado 500µl de LiCl 4M. Os tubos foram acondicionados em gelo e colocados dentro de geladeira por uma noite (aproximadamente 16 horas). Na manhã seguinte, os tubos foram centrifugados a 18000 x g por 20 minutos a 4°C para recuperar o pellet de RNA total, ressuspensão com 450µl de H₂O_{DEPC} e 50µl de NaOAc 2M pH 4,8. Foi adicionado 1000µL de etanol absoluto gelado, homogeneizado e incubado a -80°C por 30 minutos. O material foi centrifugado a 18000 x g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 500µl de etanol 70% para então centrifugar novamente a 18000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi gentilmente retirado do tubo e o pellet ressuspensão com 30µl de TE 1X (Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 1mM pH 8,0). O RNA foi estocado em freezer -80°C para posterior análise. A quantificação do RNA total foi feito em Nanodrop (Thermo Scientific) e a qualidade determinado eletroforeticamente em gel de agarose 1,5% corado com Gel-Red.

3.4.4. Tratamento do RNA total com DNase e síntese de cDNA

Para tratamento das amostras com DNase foi utilizado o Kit “Amplification Grade DNase I” da Sigma. Para cada 1µg de RNA total tratado, foi utilizado 1µl de tampão de reação (10x), 1µl da enzima *DNase I* (1U/ µL) e água para volume total de 10µl de reação. As amostras foram incubadas em termociclador por 25°C por 15 minutos. Foi adicionado 1µl da solução de parada para cada 1µg de RNA tratado e incubado em termociclador a 70°C por 10 minutos para inativação da enzima DNase.

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

3.4.5. qPCR em tempo real

As reações de qPCR em tempo real foram realizadas em duplicata, utilizando o kit “SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. Cada reação foi realizada da seguinte maneira: dez minutos a 95°C, quarenta ciclos de amplificação com 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto e finalmente a curva de dissociação com aumento de temperatura de 0,3°C de 60°C até 95°C para verificar a especificidade da reação. Como genes de referência foram usados actina (*OsAct1*), ubiquitina 5 (*OsUBQ5*) e fator de alongamento 1-alfa (*OsEF-1α*) (JAIN et al., 2006). Os primers foram desenhados com o auxílio do programa Primer Express (Tabela 1).

A especificidade dos iniciadores foi analisada por alinhamento das seqüências nos bancos de dados (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> e TIGR, <http://rice.plantbiology.msu.edu>) e experimentalmente ao fim da reação de PCR durante a curva de dissociação. Todos os iniciadores apresentaram alta eficiência de amplificação e os cálculos de expressão foram feitos de acordo com LIVAK e SCHMITTGEN (2001) usando o tratamento com suprimento constante como controle, a partir dos valores de C_T (*Cycle Threshold*, ciclo limite) obtidos na reação de PCR em tempo real.

Tabela 1. Sequência dos iniciadores (forward e reverso) para os genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* de arroz. O gene da actina (*OsAct1*), ubiquitina 5 (*OsUBQ5*) e fator de alongamento (*OsEF-1 α*) foram usados como referencia.

Gene	Sequência	Eficiência (%)	Acesso TIGR	Acesso NCBI
<i>OsNRT1.1A</i>	5'-CGAGGTTGGTGCAATTTGTG-3' 5'-GCCGTGGTGTCTCTTTTTTTT-3'	99,88	LOC_Os08g05910.1	NM_001067555.1
<i>OsNRT1.1B</i>	5'-CGCCGTCGGCCACTAATA-3' 5'-ACGCGTGCGAGCTAACTGGTA-3'	100,10	LOC_Os10g40600.1	NM_001071873.1
<i>OsNRT1.1C</i>	5'-GCTTACAAAAAGTGAGGAAACCAATA-3' 5'-ACCTGGATGCGTGCATATAGT-3'	99,47	LOC_Os03g01290.1	NM_001186298.1
<i>OsAct1</i>	5'-CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA-3' 5'-CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA-3'	99,83	LOC_Os03g50885.1	NM_001057621.1
<i>OsUBQ5</i>	5'-ACCACTTCGACCGCCACTACT-3' 5'-ACGCCTAAGCCTGCTGGTT-3'	99,95	LOC_Os01g22490.1	NM_001049450.1
<i>OsEF-1α</i>	5'-TTTCACTCTGGTGTGAAGCAGAT-3' 5'-GACTTCCTTCACGATTCATCGTAA-3'	100,05	LOC_Os03g08020.1	NM_001055681.1

3.4.6. Árvore filogenética dos transportadores *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C*

Para a construção da árvore filogenética da família NRT1 de Arabidopsis e arroz as sequências de NRT1 foram obtidas no banco de dados de Arabidopsis (www.tair.org) e arroz (<http://rice.plantbiology.msu.edu>). Os códigos de acesso das sequências de aminoácidos dos transportadores de NO₃⁻ de Arabidopsis e arroz usados foram de PLETT et al. (2010). A análise e árvore filogenética foi feita pelo alinhamento múltiplo das proteínas usando o programa MEGA 6 (Multi Evolutionary Genomic Analysis) pelo método “neighbour-joining” (SAITOU e NEI, 1987). Os valores de “Bootstrap” foram calculados com a porcentagem de 2000 repetições.

3.4.7. Extração de vesículas e atividade das PM H⁺-ATPases

A extração das vesículas de plasmalema e atividade das PM H⁺-ATPases foi realizadas de acordo com FAÇANHA e DE MEIS (1995) e SANTOS et al (2009). A maceração das raízes de arroz foi feita usando tampão de extração (Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), sacarose 250 mM, glicerol 100 mL L⁻¹, KI 150 mM, cloreto de colina 100 mM, EGTA 2 mM, EDTA 2 mM, polivinilpirrolidona (PVP) 10 gL⁻¹, fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) 1 mM, ditioneitol (DTT) 5 mM, 2-mercaptoetanol 5 mmoles L⁻¹ e 5 g L⁻¹ de albumina) a 4°C. O homogenato foi filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado a 3.600 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e novamente centrifugado a 8000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e centrifugado a 100000 x g por 1 hora a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a fração microssomal foi ressubilizada usando tampão de ressuspensão (Tris-HCl 30 mM (pH 7,5), glicerol 150 mL L⁻¹, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 2 mM, DTT 2 mM e PMSF 1 mM).

As frações microssomais foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C para posteriores análises. O conteúdo de proteína foi determinado de acordo com BRADFORD (1976). A atividade da PM H⁺-ATPase foi realizada de acordo com SANTOS et al. (2009) com modificações. O meio de reação foi composto de MES-BTP 30 mM (pH 6,5), MgSO₄ 5 mM, KCl 50 mM, Na₂MoO₄ 1 mM, 0,2 mL L⁻¹ de Triton X-100, KNO₃ 50 mM, NaN₃ 1 mM e ATP 5 mM. Para cada amostra foi feito um branco usando vanadato 0,2 mM (inibidor específico da atividade da PM H⁺-ATPase). A reação foi iniciada com a adição de 5 µg de proteína no meio de reação, com incubação a temperatura constante de 30 °C. Após 20 minutos de incubação foi adicionado a cada tubo 1 ml do meio de parada (2% v/v de H₂SO₄, 5% p/v de SDS, 0,7% p/v de (NH₄)₂MoO₄) e 50 µL de ácido Ascórbico 10% p/v. Após 10 minutos foi adicionado 1,45 mL do meio contendo citrato (4% de citrato de sódio e 2% ácido acético glacial) para evitar desenvolvimento adicional da coloração. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 820 nm. A reação quantifica a quantidade de

Pi, sendo a atividade da PM H^+ -ATPase a diferença entre a reação sem vanadato e com vanadato (SANTOS et al., 2009).

3.4.8. Cálculo do influxo de NO_3^-

A quantidade de NO_3^- absorvida da solução nutritiva foi avaliada baseada no índice de NO_3^- absorvido da solução (dosado por MIRANDA et al., 2001) por massa fresca de raiz de quatro potes independentes, com quatro plantas cada. O influxo líquido de NO_3^- foi calculado baseado na depleção de NO_3^- 24 horas após a aplicação dos tratamentos.

3.4.9. Análise estatística

O experimento foi conduzido com delineamento inteiramente casualizado em um fatorial com as doses e fonte de N com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando o programa “Statistica 7” e “Sisvar”. As comparações das médias foram feitas pelo teste F ($P < 0,05$).

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1. Análise de expressão dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* na variedade de arroz Nipponbare

Foi avaliado o efeito da nutrição nítrica ou amoniacal na expressão dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* por PCR em tempo real. Foi possível detectar a expressão das isoformas *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* em todos os tratamentos, no entanto, com distintos níveis de expressão (Figura 1). Nas raízes das plantas cultivadas com NO_3^- , *OsNRT1.1A* apresentou repressão de aproximadamente 50% nos tratamentos com ressuprimento de 2,0 mM de N-NO_3^- e deficiência de NO_3^- , quando comparado com o tratamento constante com 2,0 mM de N-NO_3^- . *OsNRT1.1B* somente foi induzido nas plantas cultivadas com 2,0 mM de N-NO_3^- constate, enquanto *OsNRT1.1C* apresentou padrão de expressão contrário, com indução nos tratamentos de ressuprimento e deficiência de NO_3^- e NH_4^+ . Na parte aérea, somente *OsNRT1.1C* apresentou diferença de expressão entre os tratamentos, com indução nos tratamento com ressuprimento e deficiência.

O perfil de expressão das isoformas *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* foi distinta entre os tratamentos com NO_3^- e NH_4^+ . A isoforma *OsNRT1.1A* não apresentou diferença significativa de expressão entre os tratamentos com NO_3^- (Figura 1a), no entanto, essa isoforma foi induzida no ressuprimento com 2mM de NH_4^+ (Figura 1b). A expressão de *OsNRT1.1B* é induzida somente nas raízes com suprimento constante de 2,0 mM de N-NO_3^- , enquanto nos tratamentos com NH_4^+ houve repressão da expressão de *OsNRT1.1B* (Figuras 1a e 1b).

Os genes *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* apresentam padrão de expressão diferente entre raiz e parte aérea. *OsNRT1.1A* foi reprimido aproximadamente 50% na parte aérea com os tratamentos de NO_3^- e NH_4^+ , enquanto *OsNRT1.1B* foi reprimido aproximadamente 95% na parte aérea com os tratamentos de NO_3^- e NH_4^+ (Figura 1c e d). *OsNRT1.1C* apresentou na parte aérea o mesmo padrão de expressão encontrado na raiz, com indução nos tratamentos com deficiência de NO_3^- e NH_4^+ (Figura 1c e d).

A alteração do status de N na planta, resultante da absorção e assimilação de NO_3^- e NH_4^+ com produção de de aminoácidos livres, reprime a expressão dos transportadores de alta afinidade (GLASS et al., 2003; ORSEL et al., 2006). Esse experimento revelou que a isoforma *OsNRT1.1B* se comporta de maneira semelhante, portanto, a repressão do *OsNRT1.1B* pode ser consequência de produtos do metabolismo de N que acarretam em um efeito feedback.

Analisando somente os tratamentos com suprimento constante de 2,0 mM de N-NO_3^- e deficiência de NO_3^- , o perfil de expressão de *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* assemelha-se com o perfil de expressão de *AtNRT1.1* (WANG et al., 2003; HO et al., 2009). Possivelmente *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* podem estar atuando na absorção de NO_3^- com suprimento constante de NO_3^- . Deve-se ressaltar que os tratamentos com suprimento constante de NO_3^- e deficiência de N são os tratamentos amplamente usados para avaliar a expressão de genes relacionados à absorção de NO_3^- (HO et al., 2009; PAVEN et al., 2011).

A baixa expressão de *OsNRT1.1B* nas plantas cultivadas com NH_4^+ (Figura 1b) mostra que entre as isoformas de *OsNRT1.1* em arroz, *OsNRT1.1B* apresenta a maior sensibilidade aos produtos da assimilação de N, visto que o ressuprimento de NH_4^+ aumenta os níveis de aminoácidos na planta (SPERANDIO et al., 2011). Nas raízes, *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1C* apresentaram a mesma expressão com suprimento constante de NO_3^- e NH_4^+ , enquanto *OsNRT1.1B* foi reprimido em todos os tratamentos com NH_4^+ apresentando expressão semelhante à deficiência de NO_3^- (Figura 1a e 1b).

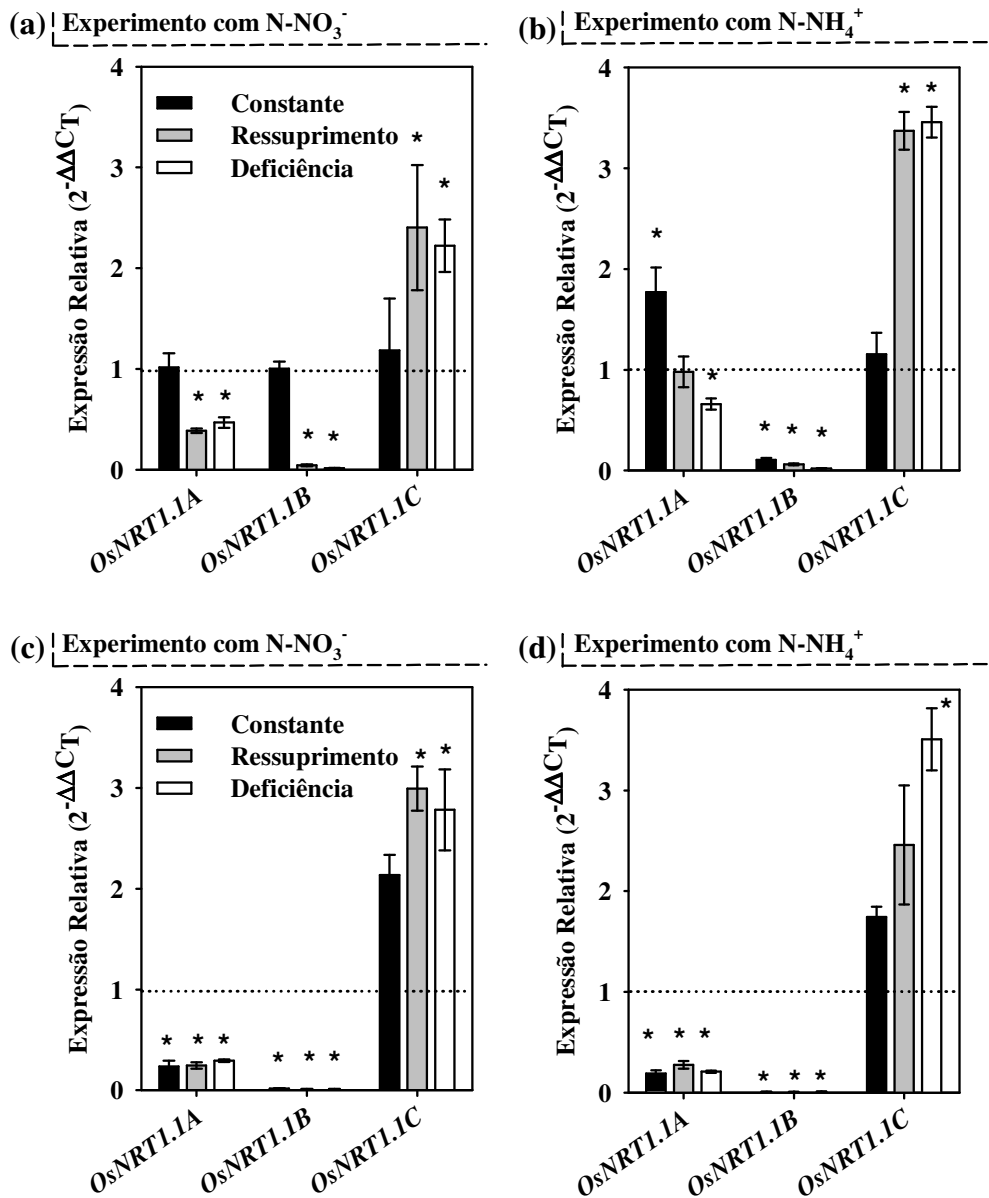


Figura 1. Expressão relativa de três transportadores de NO₃⁻ (*OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B*, *OsNRT1.1C*) raízes (a e b) e parte aérea (c e d) de arroz da variedade Nipponbare em experimentos com NO₃⁻ (a e c) ou NH₄⁺ (b e d). Os tratamentos foram suprimento constante de 2,0 mM de N-NO₃⁻ ou N-NH₄⁺, ressuprimento de 2,0 mM de N-NO₃⁻ ou N-NH₄⁺ após 72 horas de deficiência de N ou deficiência de NO₃⁻ ou NH₄⁺ por 72 horas. O tratamento com 2 mM constante com NO₃⁻ foi assumido como tratamento de referência (controle). Os tratamentos com ressuprimento e deficiência de N sob asterisco diferem significativamente do tratamento controle com suprimento constante de N-NO₃⁻ na raiz (P < 0,05). As barras representam médias ± SE (erro padrão) de três repetições.

Deve ser ressaltado que a expressão de *OsNRT1.1B* foi específica nas raízes com suprimento constante de 2,0 mM de N-NO₃⁻ (Figura 1). Os resultados obtidos sugerem que a expressão de *OsNRT1.1B* nas raízes é dependente da presença de NO₃⁻, sendo ainda a única isoforma de *OsNRT1.1* em arroz com esse padrão de expressão. O padrão de expressão de *OsNRT1.1B* é semelhante ao *AtNRT1.1* (WANG et al., 2003), indicando a possível função do *OsNRT1.1B* na absorção de NO₃⁻ em arroz, visto que não é expresso na parte aérea e

provavelmente desempenha função reduzida no fluxo interno de NO_3^- . Entre os ortólogos de *AtNRT1.1* em arroz, *OsNRT1.1B* possui a maior homologia com *AtNRT1.1* (PLETT et al., 2010).

Em contraste, PAVEN et al. (2011) analisou o perfil de expressão de *MtNRT1.3* em *Medicago trunculata*, um transportador de NO_3^- filogeneticamente relacionado ao *AtNRT1.1*, *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B*, e verificou-se que a ausência de NO_3^- no meio estimulou expressão de *MtNRT1.3*, contudo esse resultado não foi desencadeado por sinais provenientes da planta sob limitação de N. Observa-se então, que mesmo estando próximos geneticamente, as isoformas de *OsNRT1.1* e *MtNRT1.3* apresentam padrão de expressão e regulação distintos.

Diversos transportadores da família NRT1, no qual as isoformas *OsNRT1.1* pertencem, foram caracterizados como essenciais para o fluxo de NO_3^- dentro da planta. *AtNRT1.8* foi caracterizado e sua função principal está no descarregamento do xilema na parte aérea e raiz, sendo que mutantes para esse gene apresentam alto teor de NO_3^- acumulado no xilema e baixo teor em outras células da parte aérea (LI et al., 2010). *AtNRT1.7* é expresso em células do floema e está envolvido na remobilização de NO_3^- sendo que plantas mutantes para esse gene apresentam menor desenvolvimento quando o NO_3^- está em depleção no meio (FAN et al., 2009). Grande parte dos transportadores de baixa afinidade para NO_3^- descrito em *Arabidopsis* é responsável pelo fluxo de NO_3^- dentro da planta (KRAPP et al., 2014). Desse modo, *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1C* são expressos na parte aérea e podem também estar atuando no fluxo interno de NO_3^- em arroz.

A expressão do gene *OsNRT1.1C* apresentou padrão de expressão distinto em relação ao *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B*, apresentando indução com ressuprimento e deficiência de NO_3^- e NH_4^+ nas raízes e parte aérea (Figura 1). O comportamento de expressão de *OsNRT1.1C* é também distinto com outros transportadores de NO_3^- da família NRT1, que apresentam padrão de expressão estável, ou seja, não mudam seu padrão de expressão (FAN et al., 2009).

Na família NRT1, somente *AtNRT1.1* e *AtNRT1.2* foram caracterizados como envolvidos na absorção de NO_3^- em *Arabidopsis*. PLETT et al. (2010) realizaram o alinhamento das sequências de nucleotídeos para verificar homologia entre os transportadores NRT1. O alinhamento das sequências de aminoácidos dos membros da família NRT1 em arroz e *Arabidopsis* mostra a proximidade entre essas duas espécies apesar de *Arabidopsis* ser dicotiledônea e arroz monocotiledônea (Figura 2). De acordo com PLETT et al. (2010), a família NRT1 está mais conservada entre monocotiledôneas e dicotiledôneas quando comparado com a família NRT2.

Para verificar a homologia dos genes *OsNPF8.9* (*OsNRT1.1* proposto por TSAY et al., 2007) e *OsNPF2.4* (XIA et al., 2015) envolvido na absorção de NO_3^- em alta dose e fluxo interno de NO_3^- em arroz, ambos foram incluídos na análise de filogenia para verificar sua posição entre os transportadores de NO_3^- caracterizados em *Arabidopsis*. O transportador *OsNPF8.9* não possui filogenia com *AtNRT1.1*, sendo *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* mais próximos do transportador *AtNRT1.1* (Figura 2). O transportador *OsNPF2.4* apresenta maior homologia com os transportadores *OsNRT1.7*, *AtNRT1.11* e *AtNRT1.12*. O alinhamento baseado na sequência de aminoácidos dos transportadores da família NRT1 é mais um indício que *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* atuem na absorção de NO_3^- em raízes de arroz.

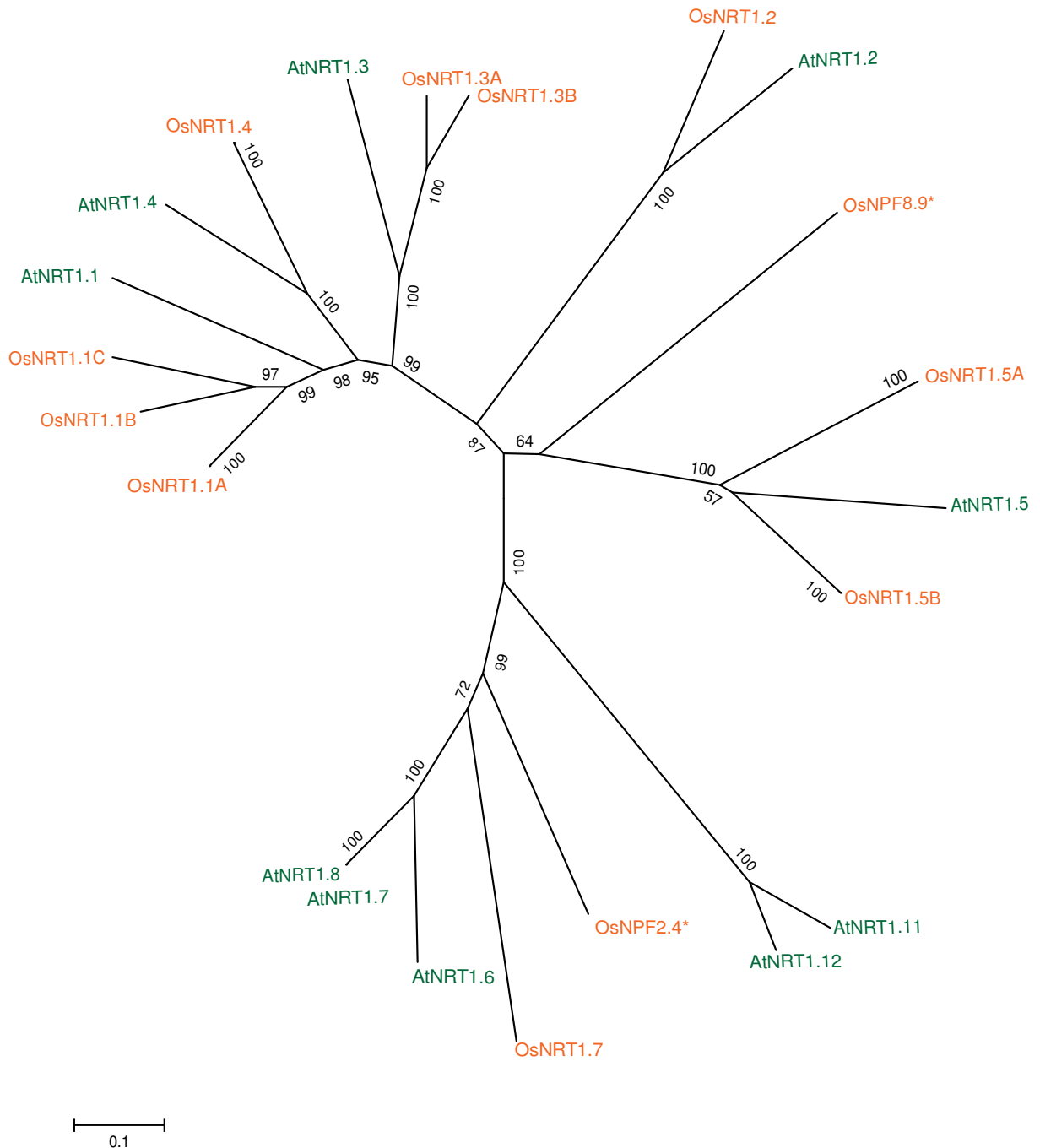


Figura 2. Árvore filogenética radiada contendo o alinhamento das sequências de aminoácidos da família NRT1 de *Oryza sativa* e *Arabidopsis thaliana*. Para a construção da árvore foi usado o programa MEGA (Multi Evolutionary Genomic Analysis). Os transportadores OsNPF8.9 e OsNPF2.4 estão marcados com asterisco (*) porque estão com a nomenclatura de LÉRAN et al. (2014).

Analisado o alinhamento das sequências da família NRT1/PTR de *Arabidopsis*, arroz e trigo, BUCHNER e HAWKESFORD (2014) também encontraram que *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* são os membros da família NRT1/PTR mais próximos de AtNRT1.1. Esses autores ainda verificaram quatro prováveis ortólogos do gene AtNRT1.1 em trigo (*TaNPF6.1*, *TaNPF6.2*, *TaNPF6.3* e *TaNPF6.4*). A análise de expressão mostrou *TaNPF6.1* e *TaNPF6.2* mais expressos nas raízes, sendo *TaNPF6.2* e *TaNPF6.3* expresso com suprimento de NO_3^- , enquanto *TaNPF6.1* e *TaNPF6.4* apresentaram expressão estável com ou sem NO_3^- (BUCHNER e HAWKESFORD, 2014). Os resultados encontrados em trigo

(monocotiledônea) por BUCHNER e HAWKESFORD (2014) corroboram com os resultados encontrados em arroz, mostrando a complexidade e variação de expressão da família NRT1/PTR em resposta ao fornecimento de NO_3^- em espécies agrícolas em comparação com a planta modelo *Arabidopsis* (BUCHNER e HAWKESFORD, 2014). Do mesmo modo que a análise de expressão sugere a participação de *OsNRT1.1B* na absorção de NO_3^- nas raízes de arroz, TaNPF6.1 e TaNPF6.2 podem atuar na absorção de NO_3^- em raízes de trigo (BUCHNER e HAWKESFORD, 2014).

Analisando os valores de ΔC_T (C_T do gene – C_T da actina) dos genes analisados por PCR em tempo real, a expressão dos genes *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* é maior que a expressão do gene *OsNRT1.1C* (Tabela 2). Como o valor de ΔC_T é a diferença entre o C_T do gene analisado e o gene controle, quanto maior o valor de ΔC_T , menor é a expressão do gene e cada unidade de ΔC_T representa duas vezes de diferença na expressão gênica (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). O valor de ΔC_T do gene *OsNRT1.1C* é aproximadamente oito unidades maior que *OsNRT1.1A* e cinco unidades maior que *OsNRT1.1B* (Tabela 2), indicando que a expressão do *OsNRT1.1C* é aproximadamente 256 vezes e 32 vezes menor que *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B*, respectivamente. Possivelmente o envolvimento de *OsNRT1.1C* na absorção de NO_3^- é muito pequena, sendo que os membros *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* provavelmente são mais importantes para a absorção de NO_3^- pois possuem expressão elevada em arroz.

Tabela 2. Valores de ΔC_T para os genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* em raízes de arroz sob suprimento constante de 2,0 mM de N- NO_3^- ou N- NH_4^+ , ressuprimento com 2,0 mM de N- NO_3^- ou N- NH_4^+ e deficiência de NO_3^- e NH_4^+ por 72 horas.

Genes	NO_3^-			NH_4^+		
	Const 2,0mM	Ressup 2,0mM	Defic sem N	Const 2,0mM	Ressup 2,0mM	Defic sem N
<i>OsNRT1.1A</i>	-5,60	-4,23	-4,49	-6,41	-5,55	-5,00
<i>OsNRT1.1B</i>	-6,41	-1,79	-0,40	-3,11	-2,34	-0,80
<i>OsNRT1.1C</i>	6,02	4,83	4,88	5,62	4,04	4,00

A análise do banco de dados “NCBI Unigene” para arroz também aponta que *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* são mais expressos quando comparado com *OsNRT1.1C* (Tabela 3). Esse banco de dados mostra que *OsNRT1.1A* é expresso em toda a planta, enquanto *OsNRT1.1B* não foi encontrado em calos, flor e semente de arroz. *OsNRT1.1C* somente foi encontrado em calos de arroz, confirmando a baixa expressão encontrada na análise por PCR em tempo real (Figura 1). Apesar dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* serem prováveis ortólogos no mesmo gene de *Arabidopsis* (PLETT et al., 2010; Figura 2), o padrão de expressão é diferente e possivelmente possuem diferentes funções na fisiologia da planta por serem expressos em partes e condições diferentes.

Tabela 3. Perfil de EST de acordo com o banco de dados “NCBI Unigene” para arroz (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/UGOrg.cgi?TAXID = 4530>)

	Total	Calos	Flor	Folha	Panicula	Raiz	Semente	Colmo
<i>OsNRT1.1A</i>	216	18	29	5	44	74	30	16
<i>OsNRT1.1B</i>	59	0	0	22	7	14	0	16
<i>OsNRT1.1C</i>	7	7	0	0	0	0	0	0
Total	282	25	29	27	51	88	30	32

* EST (expressed sequence tag, fragmentos de sequencias expressas) expressos em transcritos por milhão (TPM)

3.5.2. Expressão dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* nas variedades de arroz IAC-47 e Piauí, absorção de NO_3^- e atividade da PM H^+ -ATPase

Outro experimento foi realizado para verificar o influxo de NO_3^- e o padrão de expressão das isoformas *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* ao longo do tempo nas variedades de arroz Piauí e IAC-47. Para isso, foram utilizadas plantas de arroz contrastantes quanto à eficiência de uso de N, a variedade de arroz Piauí adaptada a condições de baixa disponibilidade de nutrientes e ao fluxo sazonal de NO_3^- e a variedade de arroz IAC-47 desenvolvida para cultivos com aporte de nutrientes via fertilização (SOUZA et al., 1998). A resposta transcricional das plantas à disponibilidade diferencial de NO_3^- pode ser um mecanismo chave para a sobrevivência em ambientes pobres em nutrientes, através da regulação de genes específicos (KANT et al., 2011).

A resposta transcricional dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* nas variedades IAC-47 e Piauí (Figura 3) assumiram padrões de expressão semelhantes aos observados na variedade Nipponbare (Figura 1). As coletas no curso do tempo (3, 9 e 24 horas após o início dos tratamentos) revelaram indução dos genes *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* após 24 horas no tratamento com suprimento constante com 2,0 mM de N- NO_3^- (Figura 3a). Com deficiência de NO_3^- , *OsNRT1.1A* teve expressão reduzida no tempo 24 horas enquanto *OsNRT1.1B* apresentou baixa expressão em todos os tempos e *OsNRT1.1C* apresentou aumento de expressão no tempo 24 horas (Figura 3b).

Com ressuprimento de 0,2 mM de N- NO_3^- , *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1C* apresentaram aumento de expressão nos tempos 9 e 24 horas, enquanto *OsNRT1.1B* mostrou pequeno aumento de expressão no tempo 9 horas (Figura 1c). Quando as plantas foram submetidas ao ressuprimento com 5,0 mM de N- NO_3^- , *OsNRT1.1A* apresentou aumento de expressão em relação ao suprimento constante com 2,0 mM de N- NO_3^- , enquanto *OsNRT1.1B* apresentou indução no tempo 3 horas seguido de repressão nos tempos 9 e 24 horas (Figura 3d).

A expressão do *OsNRT1.1B* parece responder à presença de NO_3^- no meio. A maior expressão verificada foi sob o tratamento constante de 2,0 mM de NO_3^- , enquanto sob deficiência e ressuprimento com 0,2 mM de N- NO_3^- (baixa dose), praticamente não foi detectada expressão de *OsNRT1.1B*. Sendo assim, a expressão de *OsNRT1.1B* apresentou um perfil de expressão semelhante ao do gene *AtNRT1.1* (WANG et al. 2003, HO et al. 2009), resultado que indica a atuação do *OsNRT1.1B* na absorção como transportador de baixa afinidade (LATS - “Low Affinity Transport System”), operando em concentrações acima de 1 mM de NO_3^- (SIDDIQI et al., 1990; ASLAM et al., 1992; ASLAM et al., 1993).

Estudos com NO_3^- demonstram que esse íon além de nutriente, também é um sinal para o metabolismo vegetal (WANG et al., 2003). A indução da expressão de *OsNRT1.1A* sob ressuprimento com 0,2 mM de NO_3^- indica que esse transportador pode contribuir com a absorção de NO_3^- na faixa de alta afinidade.

YANG et al. (2012) caracterizaram funcionalmente o gene *BcNRT1* em repolho (*Brassica campestris*) verificando pico de expressão desse gene 1 hora após o suprimento de NO_3^- e não apresentou diferenças de expressão entre as doses de 0,125, 0,5 e 25 mM de NO_3^- . Desse modo, *BcNRT1* é um candidato a atuar na faixa de baixa afinidade de absorção de NO_3^- . Nossos resultados em arroz sugerem que a expressão dos genes *OsNRT1.1* depende da concentração de NO_3^- aplicada, mostrando maior complexidade de *OsNRT1.1* em arroz do que em repolho. O gene *OsNRT1.1B* apresentou indução nos tratamentos com dose de NO_3^- maior que 1,0 mM (Figura 3), indicando ser um transportador de NO_3^- de baixa afinidade induzível por altas concentrações de NO_3^- . Por outro lado, *OsNRT1.1A* também foi induzido pelo ressuprimento com 0,2 mM de N- NO_3^- e pode atuar em altas e baixas concentrações de NO_3^- .

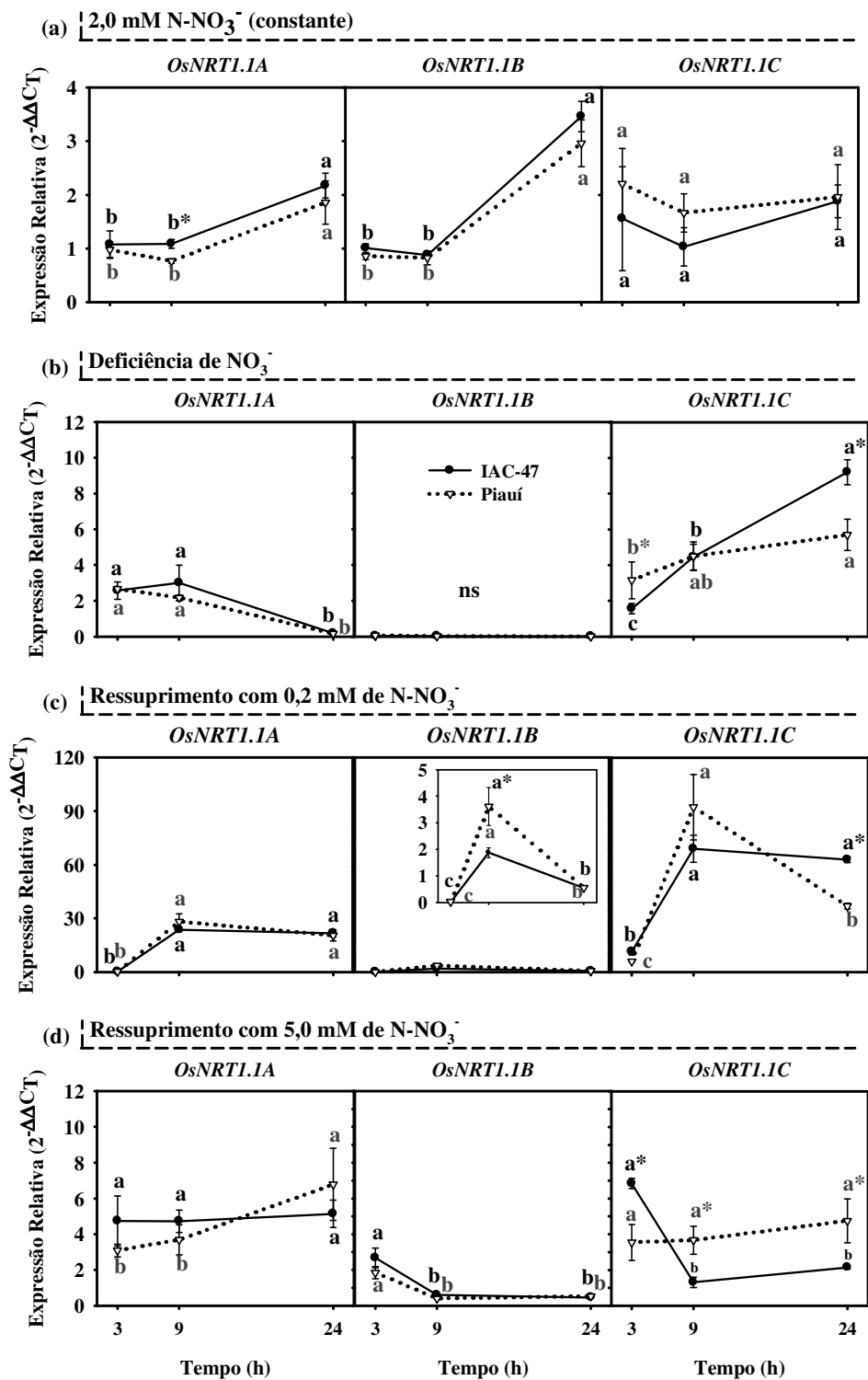


Figura 3. Expressão relativa de três transportadores de NO₃⁻ (*OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B*, *OsNRT1.1C*) nas raízes de arroz IAC-47 e Piauí. Os tratamentos foram suprimento constante de 2,0 mM de N-NO₃⁻ (a), deficiência de NO₃⁻ por 72 horas (b), ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ (c) e ressuprimento com 5,0 mM de N-NO₃⁻ (d). O tratamento com 2 mM constante com NO₃⁻ foi assumido como tratamento de referência (controle, valor 1). Linhas pontilhadas representam a variedade Piauí e linhas contínuas representam a variedade IAC-47.

O padrão de expressão de *OsNRT1.1A* indica que esse gene pode ter função semelhante ao *AtNRT1.1* em *Arabidopsis*, que atua na faixa de alta e baixa afinidade dependendo da concentração de NO_3^- , sendo regulado por fosforilação de resíduo T101 (HO et al., 2009). Apesar do gene *OsNRT1.1C* apresentar indução nos tratamentos usados, deve ser ressaltado que *OsNRT1.1C* apresenta baixa expressão em relação aos genes *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* (Tabela 2).

A expressão dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C* não diferiram entre as variedades IAC-47 e Piauí na maioria dos tratamentos e tempos analisados (Figura 3). A absorção de NO_3^- em baixa dose é mediada principalmente pelos transportadores *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* (ARAKI e HASEGAWA, 2006) juntamente com a proteína *OsNAR2.1* (YAN et al., 2011). Desse modo, a variedade Piauí apresenta maior absorção de NO_3^- (Figura 4) e maior expressão dos genes *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* (SPERANDIO, 2011). No entanto, não deve ser descartada a hipótese de *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* afetarem a absorção de NO_3^- em outras variedades.

A variedade Piauí apresentou maior influxo de NO_3^- nos tratamentos com ressurgimento de 0,2 e 5,0 mM de N- NO_3^- (Tabela 4). O influxo na variedade Piauí foi 71,87% maior quando comparado com a variedade IAC-47 no tratamento com 0,2 mM de N- NO_3^- , enquanto com 5,0 mM de N- NO_3^- o influxo foi 18,15% maior na variedade Piauí. A atividade da PM H^+ -ATPase diferiu significativamente entre as variedades IAC-47 e Piauí no tratamento com 0,2 mM de N- NO_3^- , sendo 47,76% maior na variedade Piauí.

Tabela 4. Influxo líquido de NO_3^- e atividade da PM H^+ -ATPase após 24 horas da adição dos tratamentos nas variedades de arroz IAC-47 e Piauí.

	Influxo líquido de NO_3^- ($\mu\text{mol N-NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ MF raiz h}^{-1}$)		Atividade da PM H^+ -ATPase ($\mu\text{mol Pi mg}^{-1} \text{ ptn h}^{-1}$)	
	IAC-47	Piauí	IAC-47	Piauí
Constante	15,57 Ba*	15,99 Ba (+2,70%)	13,70 Ca	16,11 Ca (+8,59%)
Deficiência	nd	nd	23,66 Aa	22,25 Ba (-5,95%)
R0,2	1,60 Cb	2,75 Ca (+71,87%)	17,69 Bb	26,14 Aa (+47,76%)
R5,0	23,14 Ab	27,34 Aa (+18,15%)	21,28 Aa	20,72 Ba (-2,63%)

* médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas não diferem significativamente ($P < 0,05$), e médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente ($P < 0,05$).

nd = não disponível.

R0,2 = ressurgimento com 0,2 mM de N- NO_3^- e R5,0 ressurgimento com 5,0 mM de N- NO_3^-

Os resultados indicam que em baixa dose de NO_3^- (0,2 mM) a atividade da PM H^+ -ATPase pode ser mais importante para a absorção de NO_3^- quando comparado com doses maiores de NO_3^- . Desse modo, a variedade Piauí apresenta maior influxo de NO_3^- no ressurgimento com 0,2 mM de N- NO_3^- quando comparada com a variedade IAC-47 em parte por causa da maior atividade da PM H^+ -ATPase que pode gerar maior gradiente de H^+ e favorece a absorção de NO_3^- . QUAGGIOTTI et al. (2003) verificaram que a aplicação de ácidos húmicos de baixo peso molecular à plantas de milho resultavam em estímulo das PM H^+ -ATPases e aumentava o influxo de NO_3^- por unidade de massa radicular.

As isoformas *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* são as mais expressas em arroz de acordo com a tabela de ΔCt e EST (Tabela 2 e Tabela 3), sendo que somente *OsNRT1.1A* possui aumento de expressão no ressurgimento com 0,2 mM de N- NO_3^- (Figura 3). O influxo mostra que somente com ressurgimento de 0,2 e 5,0 mM de N- NO_3^- houve diferença no influxo de NO_3^- entre IAC-47 e Piauí, no entanto, não houve diferença da expressão do gene *OsNRT1.1A* entre as variedades (Figura 3). Desse modo, *OsNRT1.1A* pode ter pouca participação na absorção de NO_3^- em baixa dose (alta afinidade). Em alta concentração de N- NO_3^- (5,0 mM) não foi observada diferença de expressão dos transportadores *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* nas variedades IAC-47 e Piauí (Figura 3), no entanto, houve diferença de absorção entre as

variedades (Tabela 4). Possivelmente outros transportadores estão atuando na absorção de NO_3^- , como OsNPF8.9 (LIN et al., 2000) e OsNPF2.4 (XIA et al., 2015).

Deve ser destacado que os transportadores de alta afinidade *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* também são induzidos pelo ressuprimento com 5,0 mM de N- NO_3^- (SPERANDIO, 2011; FENG et al., 2011), sendo parte das diferenças do influxo de NO_3^- entre as variedades IAC-47 e Piauí podem ser provenientes da expressão de transportadores de alta afinidade. SPERANDIO (2011) não observou aumento de expressão dos genes *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* nas plantas com suprimento constante de 2,0 mM de N- NO_3^- , sendo que não foi observado diferença de influxo entre as variedades nesse mesmo tratamento (Tabela 4). Como o influxo de NO_3^- é resultado da atuação de diversos transportadores com diferentes propriedades cinéticas (GLASS, 2003), somente plantas mutantes superexpressando ou silenciando *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* irão indicar a real importância desses transportadores na absorção de NO_3^- .

3.6. CONCLUSÕES

As isoformas A, B e C de *OsNRT1.1* mostraram regulação diferenciada em resposta a diferentes fontes de N, no entanto, não apresentaram diferença de expressão nas variedades de arroz IAC-47 e Piauí.

Houve expressão constitutiva de *OsNRT1.1A*, independente da fonte de N, enquanto *OsNRT1.1B* responde positivamente à presença de NO_3^- no meio de cultivo.

4. CAPÍTULO II

OBTENÇÃO DE MUTANTES COM SILENCIAMENTO DAS ISOFORMAS *OsA2* E *OsA7* DE PM H⁺-ATPASE VIA MICRORNA ARTIFICIAL E AVALIAÇÃO DE PLANTAS DE ARROZ COM MENOR EXPRESSÃO DAS PM H⁺-ATPASES QUANTO A ABSORÇÃO DE NITRATO E DESENVOLVIMENTO.

4.1. RESUMO

A PM H⁺-ATPase é um componente chave na absorção de nutrientes. Existem dez isoformas de PM H⁺-ATPases no genoma de arroz (*OsA1-OsA10*), sendo *OsA2* e *OsA7* induzidas pelo suprimento com NO₃⁻. O objetivo desse trabalho foi produzir plantas de arroz mutantes silenciando as isoformas *OsA2* e *OsA7* e avaliar a função dessas isoformas na absorção de NO₃⁻ e desenvolvimento vegetal. O silenciamento das isoformas *OsA2* e *OsA7* foi feito via micro RNA artificial (amiRNA). Inicialmente, foram escolhidos dois amiRNA para silenciar cada isoforma. Após a inserção do amiRNA no pre-miRNA *osaMIR-528* por PCR usando o vetor pNW55, foi feita a montagem do amiRNA e inserção no vetor de expressão IRS154. Após a transformação de *Agrobacterium tumefaciens* estirpe LBA4404 com o vetor IRS154, foi efetuada a transformação genética de arroz por cultura de calos. Após modificações na transformação de arroz, foram obtidas diversas linhagens para cada construção. Também foi feita a transformação de arroz com o vetor IRS154 vazio (sem amiRNA), chamado de IRS. A primeira avaliação das plantas mutantes foi a expressão dos genes *OsA2* e *OsA7* para avaliar o silenciamento dos genes alvos. As linhagens *OsA2mi1* apresentaram pequeno silenciamento (~15%), enquanto *OsA2mi2* gerou silenciamento de aproximadamente 70%. As linhagens *OsA7mi2* não apresentaram silenciamento, enquanto a linhagem *OsA7mi3* gerou silenciamento de aproximadamente 70%. O amiRNA para silenciamento de *OsA2* não afetou a expressão de *OsA7*, e vice-versa. Para o experimento na casa de vegetação, foram usados plantas *OsA2mi2*, *OsA7mi3*, IRS e tipo-selvagem (WT). Não houve alteração do ciclo das plantas mutantes. As plantas IRS e WT não apresentaram diferenças de massa fresca, altura e produção de grãos, mostrando que a transformação de arroz com IRS154 vetor vazio não afetou a planta. Os mutantes *OsA2mi2* e *OsA7mi3* apresentaram menor massa fresca e produções de grãos, quando comparado com as plantas IRS. A análise dos genes *OsA* (*Oryza sativa*H⁺-ATPase) no “NCBI Unigene” mostrou que *OsA2* e *OsA7* são as isoformas mais expressas em arroz, sendo também altamente expressas na panícula e flor. A menor produção de grãos e massa fresca de grãos nos mutantes silenciando *OsA2* e *OsA7* mostra a importância dessas isoformas de PM H⁺-ATPase para o desenvolvimento e reprodução de arroz. Outro experimento com as linhagens mutantes *osa2* e *osa7* foi feito para avaliar o influxo de NO₃⁻, atividade das bombas de H⁺, expressão gênica e metabólitos solúveis. Os tratamentos usados foram: suprimento constante com 0,2 mM de N-NO₃⁻, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ após três dias sem N, suprimento constante com 2,0 mM de N-NO₃⁻ e deficiência de NO₃⁻ por três dias. Foram usados plantas IRS, linhagens de *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*). As plantas foram coletadas 30 dias após a germinação. Os mutantes *osa7* apresentaram menor acúmulo de massa fresca em comparação com IRS, enquanto *osa2* não apresentou mudanças. O influxo de NO₃⁻ foi menor nos mutantes *osa2* e *osa7* somente no tratamento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, comparado com plantas IRS. A atividade da PM H⁺-ATPase foi menor nos mutantes *osa2* e *osa7* em comparação com IRS em todos os tratamentos. A V-H⁺-ATPase não apresentou variação da atividade nos mutantes *osa2* e *osa7*. Os mutantes *osa7* apresentaram menor atividade da V-H⁺-ATPase, enquanto os mutantes *osa2* não apresentaram mudança na atividade da V-H⁺-ATPase. A análise de expressão das isoformas de PM H⁺-ATPase mostrou que não houve alteração das outras isoformas de *OsA* com o silenciamento de *OsA2* e *OsA7*, indicando que o silenciamento foi específico e não houve regulação transcricional de outras isoformas de PM H⁺-ATPase. O menor influxo de NO₃⁻ no tratamento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante nos mutantes *osa2* e *osa7* resultou em menor conteúdo de N-NO₃⁻, N-NH₄⁺, N-amino livre e N-total. Os resultados obtidos demonstram a importância de *OsA2* e *OsA7* para a absorção de NO₃⁻ em baixa dose de N-NO₃⁻, contribuindo para a eficiência de uso de N.

Palavras-chave: Silenciamento gênico. Bombas de prótons de membrana plasmática. Eficiência de absorção de nitrogênio.

4.2. ABSTRACT

The PM H⁺-ATPase is key component in nutrient uptake. There are ten PM H⁺-ATPases isoforms in the rice genome (*OsA1-OsA10*), and *OsA2* e *OsA7* are induced by NO₃⁻ supply. The goal of this work was to obtain rice mutants silencing *OsA2* and *OsA7* genes and evaluate their functions in the NO₃⁻ uptake and plant development. The silencing of *OsA2* and *OsA7* isoforms was made by artificial micro RNA (amiRNA). Initially, two amiRNA was chosen to downregulate each isoform. After the insertion of the amiRNA in the *osaMIR-528* pre-miRNA by PCR using pNW55 vector as template, it was made the assembly of amiRNA in the expression vector IRS154. After the *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 transformation with IRS154 vector, it was performed the rice genetic transformation by callus culture. After modifications in the rice transformation, several lineages were obtained for each vector construction. It was also made the rice transformation with the empty IRS154 vector (without amiRNA), named IRS. The first evaluation of the mutant plants was the *OsA2* and *OsA7* expression to address the silencing of the gene targets. The *OsA2mi1* lineages showed small silencing of the target (~15%), while *OsA2mi2* had silencing about 70%. The *OsA7mi2* lineages did not show silencing of the target, while *OsA7mi3* lineages showed silencing about 70%. The amiRNA for silencing of *OsA2* did not affect *OsA7* expression, and vice-versa. In the greenhouse experiment, it was used *OsA2mi2* and *OsA7mi3* plants, IRS, and wild-type (WT). There was no change in the cycle of mutant plants. The IRS and WT plants did not show difference in the fresh weight, showing that rice transformation with IRS154 empty vector did not affect the plant. The *OsA2mi2* and *OsA7mi3* mutants showed low fresh weight and grain production, compared to IRS plants. The *OsA* (*Oryza sativa*H⁺-ATPase) gene analysis in the “NCBI Unigene” show that *OsA2* and *OsA7* are the more expressed isoforms in rice, also highly expressed in panicle and flower. The lower grain production and fresh weight in the mutants silencing *OsA2* and *OsA7* show the importance of these PM H⁺-ATPase isoforms to rice development and reproduction. Another experiment with the *osa2* and *osa7* lineages was made to evaluate NO₃⁻ uptake, proton pumps activity, gene expression and soluble fractions. The treatments used were constant supply with 0.2 mM of NO₃⁻-N, resupply with 0.2 mM of NO₃⁻-N after three days without N, constant supply with 2.0 mM of NO₃⁻-N, and NO₃⁻ starvation for three days. It was used IRS plants, *osa2* lineages (*osa2.2*, *osa2.3* and *osa2.4*), and *osa7* lineages (*osa7.1*, *osa7.2* and *osa7.3*). The plants were harvested 30 days after germination. The *osa7* mutants showed lower fresh weight compared to IRS, while *osa2* did not show fresh weight difference. The NO₃⁻ uptake was lower in the *osa2* and *osa7* mutants only when cultivated with constant supply with 0.2 mM of NO₃⁻-N, compared to IRS plants. The PM H⁺-ATPase activity was lower in the *osa2* and *osa7* mutants compared to IRS in all treatments. The V-H⁺-ATPase activity did not show any alteration in the *osa2* and *osa7* mutants. The *osa7* mutants showed lower V-H⁺-ATPase activity, while *osa2* mutants did not change V-H⁺-ATPase activity. The PM H⁺-ATPase gene expression showed that did not have changes of other *OsA* isoforms with *OsA2* and *OsA7* silencing, indicating that the silencing was specific and it did not affect the transcriptional regulation of other PM H⁺-ATPase isoforms. The lower *osa2* and *osa7* NO₃⁻ uptake in the constant supply with 0,2 mM of NO₃⁻-N resulted lower NO₃⁻-N, NH₄⁺-N, free amino-N and total-N. The results obtained highlight the importance *OsA2* and *OsA7* to NO₃⁻ uptake in low NO₃⁻ levels, contributing to Nitrogen use efficiency.

Key words: Gene silencing. Plasma membrane proton pumps. Nitrogen uptake efficiency.

4.3. INTRODUÇÃO

A eficiência de uso de N pode ser dividida em diversos fatores como: eficiência de absorção, eficiência de assimilação e eficiência de remobilização. Em solos de baixa fertilidade, a eficiência de absorção é fator chave para a eficiência de uso. Plantas mais eficientes na absorção de N apresentam maior expressão dos transportadores de NO_3^- e NH_4^+ de alta afinidade (KANT et al., 2011). A absorção de nutrientes depende do gradiente eletroquímico entre o apoplasma e o citossol. A enzima responsável pela criação desse gradiente é a H^+ -ATPase localizada na membrana plasmática (PM H^+ -ATPase). Usando a energia da hidrólise do ATP, as PM H^+ -ATPases bombeiam H^+ para o citossol contra seu gradiente eletroquímico (transporte ativo primário). O gradiente de H^+ ($\Delta\mu\text{H}^+$) gera a força próton motriz (Δp) que energiza o transporte de íons e moléculas pela membrana, como por exemplo a absorção do ânion NO_3^- (SOUZA e FERNANDES, 2006).

A PM H^+ -ATPase é regulada transcricional e pós-traducionalmente GAXIOLA et al. (2007). GAXIOLA et al. (2014) afirmam que o controle pós-traducional é o mecanismo mais importante na regulação dessa enzima. No entanto, estudos com aplicação de nutrientes minerais mostram que ocorre forte regulação transcricional da PM H^+ -ATPase e consequente aumento da atividade de bombeamento de H^+ (SANTI et al., 2003; SPERANDIO et al., 2011; KANT et al., 2011). Como o gradiente de H^+ entre o citossol e o apoplasto permite a absorção de nutrientes, é de interesse agrícola a melhor caracterização do controle transcricional das PM H^+ -ATPases.

A PM H^+ -ATPase apresenta dez isoformas em arroz (*Osa1-Osa10*), sendo *Osa2* e *Osa7* as isoformas mais expressas e também induzidas pelo fornecimento com NO_3^- (SPERANDIO et al., 2011). Desse modo, é necessário maior entendimento da função de isoformas específicas de PM H^+ -ATPase na nutrição nítrica. Além da absorção de nutrientes, as PM H^+ -ATPases estão envolvidas em diversos processos biológicos na planta, sendo responsáveis pelo crescimento celular, fluxo de hormônios, fluxo de açúcares, translocação de nutrientes no interior da planta, enchimento de grãos, etc (FULGSANG et al., 2011). Por sua função de extrema importância em toda a planta, a PM H^+ -ATPase é chamada de enzima mestre do metabolismo vegetal.

Foi demonstrado que existe relação entre a PM H^+ -ATPase e as bombas de H^+ do vacúolo ou endomembranas (V- H^+ -ATPase e V- H^+ -PPase). A alteração da expressão da V- H^+ -PPase exerce grande efeito na expressão e atividade da PM H^+ -ATPase, alterando crescimento, absorção de nutrientes e fluxo de hormônios. Até o momento ainda não se sabe se a alteração da expressão da PM H^+ -ATPase pode afetar as bombas de H^+ do vacúolo.

A estratégia aplicada nesse estudo para avaliar a função das isoformas de PM H^+ -ATPase *Osa2* e *Osa7* foi o silenciamento mediado por micro RNA artificial (amiRNA), visando elucidar a função das isoformas *Osa2* e *Osa7* em arroz.

Esse estudo teve por objetivos: obter plantas de arroz mutantes por microRNA artificial, com menor expressão de *Osa2* e *Osa7*; verificar o efeito desse silenciamento na atividade das PM H^+ -ATPases; estudar a relação entre as PM H^+ -ATPases e as V- H^+ -ATPase e V- H^+ -PPase; verificar o crescimento e produção desses mutantes em casa de vegetação; avaliar a absorção de NO_3^- com diferentes níveis de N e analisar se a alteração das PM H^+ -ATPases afeta a expressão dos transportadores de N de alta afinidade e se essas alterações podem afetar a eficiência de absorção de N.

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1. Obtenção de plantas silenciando as isoformas de PM H⁺-ATPase *OsA2* e *OsA7* por microRNA artificial (amiRNA)

a) Construções dos vetores contendo amiRNA

Os amiRNAs foram construídos no website projetado pelo Dr. Weigel (Max Planck Institute for Developmental Plant Biology: <http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>). Para cada gene foram usados dois amiRNA, que a partir de reações de PCR (Tabela 5) o amiRNA foi inserido na sequência do pre-miRNA *osa-MIR528* usando o vetor pNW55.

Tabela 5. Protocolo para mutagênese direta usando o vetor pNW55 (WARTHMAN et al., 2008).

Primer	Tamanho	Protocolo da PCR
G-4368 + primer II	256 bp	95°C 2 min;
Primer I + primer IV	87 bp	34 ciclos de 95°C 30s, 55°C 30s, 72°C 30s;
Primer III + G-4369	259 bp	72°C 7 min
Reação de PCR para fusão dos fragmentos do amiRNA:		
Primer	Tamanho	Protocolo da PCR
G-4368 + G-4369	554 bp	95°C 2 min; 34 ciclos de 95°C 30s, 55°C 30s, 72°C 1min; 72°C 7 min

Para o silenciamento de cada gene dois amiRNAs foram projetados, sendo chamados de *Os2mi1* e *OsA2mi2* para a isoforma *OsA2* e *OsA7mi2* e *OsA7mi3* para a isoforma *OsA7* (o amiRNA *OsA7mi1* inicialmente projetado foi descartado porque não abrangia os três prováveis splicing alternativos de *OsA7*). Inicialmente, para cada amiRNA foram feitas três PCRs com os iniciadores da Tabela 6. Em seguida, o produto foi submetido à eletroforese e purificado com o kit “*Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*” (Promega). A montagem do amiRNA foi feita usando o produto das primeiras PCRs e os primers G-4368 + G-4369. Nessa etapa foram necessários ajustes que foram detalhados no item 4.3.1.

Tabela 6. Iniciadores para as reações de PCR contendo o amiRNA para os genes *OsA2* e *OsA7*.

Gene	miRNA	Primers*	
<i>OsA2</i>	<i>OsA2mi1</i> TCAATCTTTAACGGGTACCT	Primer I agTCAATCTTTAACGGGTACCTcaggagattcagttga Primer II tgAGGTGACCCGTTAAAGATTGActgctgctgctacagcc Primer III ctAGGTGTCCCCTTAAAGATTGAttcctgctgctaggtg Primer IV aaTCAATCTTTAAGGGGACACCTagagaggcaaaagtga	
	<i>OsA2mi2</i> TATCTTTAACGGATCACCTG	Primer I agTATCTTTAACGGATCACCTGcaggagattcagttga Primer II tgCAGGGTGATCCGTTAAAGATActgctgctgctacagcc Primer III ctCAGGGAGATGCGTTAAAGATActgctgctgctaggtg Primer IV aaTATCTTTAACGCATCTCCCTGagagaggcaaaagtga	
	<i>OsA7</i>	<i>OsA7mi2</i> TAATCTTAAGGGGATCGCCT	Primer I agTAATCTTAAGGGGATCGCCTcaggagattcagttga Primer II tgAAGGCGATCCCTTAAAGATTActgctgctgctacagcc Primer III ctAAGGCCATCGCCTTAAAGATTAttcctgctgctaggtg Primer IV aaTAATCTTAAGGCGATGGCCTTagagaggcaaaagtga
		<i>OsA7mi3</i> TAATAACGGTCATTAGGGCAA	Primer I agTAATAACGGTCATTAGGGCAAacaggagattcagttga Primer II tgTTGCCCTAATGACCGTTATTActgctgctgctacagcc Primer III ctTTGCCGTTAAAGACCGTTATTAttcctgctgctaggtg Primer IV aaTAATAACGGTCTTTACGGCAAagagaggcaaaagtga

* Letras minúsculas nas sequências dos iniciadores representam o local de anelamento no vetor pNW55 e letras maiúsculas a sequência que irá dar origem ao amiRNA.

b) Ligação do amiRNA ao vetor IRS154, transformação de *Escherichia coli* estirpe DH5 α e confirmação das construções

Após purificação, 1 μg do amiRNA e também 1 μg do vetor IRS154 foram digeridos com as enzimas de restrição BanHI e KpNI por três horas e novamente purificados em gel usando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. Para ligação do amiRNA no vetor IRS154 foi usado o kit T4 DNA ligase (Promega) adotando a razão molar amiRNA:vetor de 3:1. A reação de ligação foi mantida em geladeira por uma noite.

O procedimento para transformação das bactérias e confirmação seguiu o protocolo de SAMBROOK e RUSSEL (2001). Para transformação de *E. coli*, uma alíquota de 50 μl de DH5 α foi gentilmente misturada com 2 μl do produto de ligação e eletroporadas com 1,7 kV. Logo após o choque, foi adicionado 700 μl de meio SOC (Triptona 2%, extrato de fungo 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM e glicose 20 mM) e as bactérias foram agitadas por 1 hora em agitador orbital a 37 °C. As bactérias foram então plaqueadas em placa de Petri contendo meio LB sólido e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ do antibiótico canamicina (o vetor IRS154 contém o gene de resistência a canamicina para seleção em bactéria). As placas foram mantidas no escuro a 37 °C e as colônias cresceram por uma noite.

As colônias de forma arredondada e coloração amarelo-claro foram incubadas em meio LB líquido contendo 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de canamicina por uma noite a 37 °C em agitador orbital. O plasmídio foi extraído com o kit PureYield™ Plasmid Miniprep system (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. Para confirmação das construções foi feita análise de restrição com as enzimas EcoRI, BanHI e KpNI usando 1 μg de plasmídio extraído. Após visualização em gel de agarose e confirmação da inserção do amiRNA, a construção foi guardada em freezer para posterior transformação de *Agrobacterium tumefaciens*.

c) Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* estirpe LBA4404

Para transformação de *Agrobacterium*, 1 μg da construção foi gentilmente misturado com 100 μl de *Agrobacterium* e incubadas no gelo por 30 minutos. As bactérias foram então congeladas em nitrogênio líquido por 5 minutos e em seguida incubadas a 37 °C em banho-maria por mais cinco minutos. Após esse tempo, foi adicionado 1 mL de meio YEB líquido (extrato de carne 5 g L⁻¹, extrato de 1 g L⁻¹, peptona 5 g L⁻¹, sacarose 5 g L⁻¹, MgCl₂ 0,5 g L⁻¹) e *Agrobacterium* foi incubada em agitador orbital por duas horas a 28 °C. A *Agrobacterium* foi então plaqueada em meio YEB sólido contendo os antibióticos Rifamicina/Gentamicina (seleção de *Agrobacterium*) e canamicina (seleção da construção) e incubadas por dois dias a 28 °C. As colônias crescidas foram confirmadas por PCR de colônia e estocadas em freezer -80 °C em glicerol 15%.

d) Transformação genética de calos de arroz variedade Nipponbare

A transformação de arroz foi feita de acordo com TOKI et al. (2006) com ajustes em algumas etapas. O detalhamento da transformação de arroz com os ajustes são apresentados nos item 4.3.2.

4.4.2. Confirmação das plantas mutantes transformadas com amiRNA para silenciar *OsA2* e *OsA7*

a) Teste da folha bandeira com Higromicina

Três pedaços da folha bandeira das plantas transformadas foram acondicionadas em placas de Petri contendo solução 1 mg L⁻¹ de BAP (benzil-amino purina) e 50 mg L⁻¹ do antibiótico Higromicina. Como controle, foram usadas amostras da folha bandeira de plantas da variedade Nipponbare não transformada. As plantas foram fotografadas no dia 1 e

novamente sete dias após o início do teste. A análise é feita de modo visual comparando com o controle (Nipponbare não transformada). As folhas das plantas não transformadas apresentarem necrose típica após o período do teste.

b) Expressão dos genes *OsA2* e *OsA7* e PCR do gene da Higromicina

A análise de expressão nas linhagens foi realizada usando a folha 2 (folha imediatamente inferior à folha bandeira). A extração do RNA total foi realizada de acordo com GAO et al. (2001) e o DNA foi extraído usando o sobrenadante da etapa de precipitação com isopropanol da extração de RNA total. A expressão dos genes *OsA2* e *OsA7* foi realizada por PCR em tempo real como especificado no item 3.2.5 (Capítulo I) usando os primers *OsA2F5'*-GCAGAAGAGGCCCGTAGGA-3', *OsA2R* 5'-CAGGGTGGTCAGCTCTCTCAA-3', *OsA7F* 5'-TCGACACGATCCAGCAGAAC-3' e *OsA7R* 5'-GCTGATGACGATCTCTCGTTGA-3'. A PCR do gene da Higromicina (*Hyg*) foi feita usando o DNA e os primers *HygF* 5'-TTGGCGACCTCGTATTGGGA-3' e *HygR* 5'-CAAGACCTGCCTGAAACCGAA-3'.

4.4.3. Experimento em casa de vegetação para avaliar o acúmulo de massa fresca e produção de grãos nos mutantes de arroz silenciando os genes *OsA2* e *OsA7*

O cultivo das plantas foi feito em casa de vegetação usando vasos com 8 Kg de terra proveniente do horizonte A de um Chernossolo. Cada vaso continha uma planta proveniente das linhagens do mutante *OsA2mi2* (L2, L3, L4, L6, L7, L8) e *OsA7mi3* (L1, L2, L3, L5, L6, L7). O plantio foi feito dia 13/11/2013, emissão de panícula 08/01/2014 e colheita 15/12/2014. A massa fresca e os grãos foram pesados e a altura das plantas medida. Foram usadas quatro vasos contendo 2 plantas para cada linhagem.

4.4.4. Experimento para caracterizar os efeitos do silenciamento dos genes *OsA2* e *OsA7* na massa fresca e absorção de NO_3^- em diferentes doses de N

a) Condução do experimento e tratamentos

Foram selecionadas as linhagens de arroz *osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3* para o experimento avaliando o efeito do silenciamento de *OsA7* e *osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4* para o experimento avaliando o efeitos do silenciamento de *OsA2*. Essas linhagens apresentaram maior silenciamento do gene alvo e foram as linhagens que permaneceram menos tempo no meio de cultivo de calos, diminuindo a interferência de retrotransposons que são ativos durante o cultivo de calos (HIROCHIKA, 1997; MIYAO et al., 2003). O teste de segregação mostrou que *IRS*, *osa2.2*, *osa2.4*, *osa7.2* e *osa7.3* apresentaram segregação 3:1, enquanto as linhagens *osa2.3* e *osa7.1* apresentaram segregação diferentes de 3:1 (Tabela anexo 1).

As sementes foram desinfestadas em Hipoclorito de sódio e germinadas em potes com gaze contendo água. Seis dias após a germinação (DAG) as plântulas foram selecionadas quanto a uniformidade e transferidas para potes contendo 0,7 L (quatro plantas por pote) de solução de Hoagland (HOAGLAND e ARNON, 1950) a $\frac{1}{4}$ da força iônica com 0,2 mM de N-NO_3^- ou 2,0 mM de N-NO_3^- com pH 5,6. Aos nove DAG foi aplicada solução iônica a $\frac{1}{2}$ força iônica com um grupo novamente recebendo 0,2 mM de N-NO_3^- e o restante com 2,0 mM de N-NO_3^- com pH 5,6. As soluções foram trocadas a cada três dias, até os 27 DAG. As plantas que estavam sendo cultivadas com 2,0 mM de N-NO_3^- foram divididas em dois grupos contendo plantas com 2,0 mM de N-NO_3^- e sem N, enquanto as plantas que estavam com 0,2 mM de N-NO_3^- continuaram com a mesma dose de N. Aos 30 DAG, as plantas que estavam sem N foram divididas em dois grupos, sendo um grupo recebendo 0,2 mM de N-NO_3^- e outro grupo permaneceu sem N. As plantas que estavam com 2,0 mM de N-NO_3^- e 0,2 mM de N-NO_3^- continuaram receberem nova solução contendo a mesma formulação. Desse modo, quatro tratamentos foram aplicados: (i) sem N, (ii) 0,2 mM de N-NO_3^- constante, (iii)

ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e (iv) 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. Três horas após a aplicação das soluções as plantas foram separadas em raiz, bainha e folha e pesadas. Uma amostra de 0,5 grama de material de cada parte foi acondicionada em frascos com etanol 80% para posterior extração das frações solúveis e análise de N-NO₃⁻, N-NH₄⁺, N-amino livre e açúcares solúveis. Também foi separado 0,5 grama da raiz que foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer -80 °C para posterior extração de RNA total e análise da expressão gênica. O restante do material de raiz foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer -80 °C para posterior extração das vesículas para atividade da PM H⁺-ATPase.

b) Análise do influxo de N

Idem item 3.2.8 (Capítulo I).

c) Análise de expressão gênica das isoformas de PM H⁺-ATPase e transportadores de NO₃⁻

A extração do RNA total, tratamento com DNase, síntese de cDNA e reação de PCR em tempo real foram feitas de acordo com os itens 3.2.4 (Capítulo I) e 3.2.5 (Capítulo I). Os primers estão listados na Tabela 7.

Tabela 7. Sequências dos iniciadores usados nas reações de PCR em tempo real para os dez genes das isoformas de PM H⁺-ATPases (*OsA1* a *OsA10*), três isoformas de transportadores de nitrato (*OsNRT1.1*, *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*) e amônio (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*), actina (*OsAct1*) de arroz, eficiência de amplificação e acessos nos bancos de dados TIGR e NCBI.

Gene	Primers Forward/ Reverse	Eficiência (%)	Acesso TIGR	Acesso NCBI
<i>OsA1</i>	5'-TGGGCACATGCACATAGGA-3' 5'-GCTCACTGTAGCCGGTCTTCTC-3'	99,64	LOC_Os03g48310	NM_001057482.1
<i>OsA2</i>	5'-GCAGAAGAGGCCCGTAGGA-3' 5'-CAGGGTGGTCAGCTCTCTCAA-3'	99,24	LOC_Os07g09340	NM_001065628.1
<i>OsA3</i>	5'-AATCTGCAATCACCTACGTGTACTT-3' 5'-GCTGGAGCAGGAGGGACAA-3'	99,70	LOC_Os12g44150	NM_001073914.1
<i>OsA4</i>	5'-CGTCGAGTCGGTGGTCAAG-3' 5'-CGGTGTAGTGGTCTGGATGGT-3'	*	LOC_Os05g25550	NM_001061721.1
<i>OsA5</i>	5'-CGGCGTCATCTGGCTCTAC-3' 5'-GACGGCGAACTTGAAGATGTC-3'	99,44	LOC_Os08g14360	NM_001067873.1
<i>OsA6</i>	5'-AGAGTCGGTGGTGAAGCTCAA-3' 5'-CGATGGCATGCTGTATGTTACA-3'	*	LOC_Os02g55400	NM_001054930.1
<i>OsA7</i>	5'-TCGACACGATCCAGCAGAAC-3' 5'-GCTGATGACGATCTCTCGTTGA-3'	100,90	LOC_Os04g56160	NM_001060653.1
<i>OsA8</i>	5'-TGTTTAACTACAACACGACAATGC-3' 5'-AATGGGATGGGAAAGGAAAATAC-3'	99,74	LOC_Os03g01120	NM_001055182.1
<i>OsA9</i>	5'-GTTCTACGCCCCCTCGAT-3' 5'-CTTCCTGTCGAACAGCAGGTT-3'	*	LOC_Os03g08560	NM_001055720.1
<i>OsA10</i>	5'-CGCCGAGGTCGCAAGAT-3' 5'-CGCTCAAACCACGCAAAC-3'	*	LOC_Os06g08310	NM_001063515.1
<i>OsNRT2.1</i>	5'-GCGACCGAGACCAGCAATAC-3' 5'-TTCATCACCGTTTGCAACAAG-3'	99,54	LOC_Os02g02170.1	NM_001052193.1
<i>OsNRT2.2</i>	5'-GCCGGAGCACGCCTAAT-3' 5'-AAACGGTAACAAAACGTTCACAG-3'	100,64	LOC_Os02g02190.1	NM_001052194.1
<i>OsNAR2.1</i>	5'-AAGACGCAGGTGTTCTCTCC-3' 5'-ACTTCACCGTGCTTGGGC-3'	99,88	LOC_Os02g38230	NM_001053852.1
<i>OsUBQ5</i>	5'-ACCACCTCGACCGCCACTACT-3' 5'-ACGCCTAAGCCTGTGGTT-3'	99,95	LOC_Os01g22490.1	NM_001049450.1
<i>OsEF-1a</i>	5'-TTTCACTTTGGTGTGAAGCAGAT-3' 5'-GACTTCTTCACGATTCATCGTAA-3'	100,05	LOC_Os03g08020.1	NM_001055681.1
<i>OsAct1</i>	5'-CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGTA-3' 5'-CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA-3'	99,83	LOC_Os03g50885.1	NM_001057621.1

* não ocorreu amplificação

d) Extração da fração microsomal e atividade da PM H⁺-ATPase, V-H⁺-ATPase e V-H⁺-PPase

A extração da fração microsomal e a reação da PM H⁺-ATPase foi feita de acordo com o item 3.2.7 (Capítulo I). O meio de reação da V-H⁺-ATPase foi composto de HEPES-BTP 30

mM (pH 7,5), MgSO₄ 5 mM, KCl 50 mM, Na₂MoO₄ 1 mM, 0,2 mL⁻¹ de Triton X-100, NaN₃ 1 mM, ATP 5 mM e 0,2 mM de vanadato. Para cada amostra foi feito um branco usando KNO₃ 50 mM (inibidor específico da atividade da V-H⁺-ATPase). O meio de reação para V-H⁺-PPase foi composto de MES-Imidazol 30 mM (pH 7,2), MgSO₄ 5 mM, 0,2 mL⁻¹ de Triton X-100, NaN₃ 1 mM e PPi 1 mM. Para cada amostra foi feita uma reação sem e com KCl 100 mM (K é ativador da V-H⁺-PPase). A reação foi iniciada com a adição de 5 µg de proteína no meio de reação, com incubação a temperatura constante de 30 °C. Após 20 minutos de incubação foi adicionado a cada tubo 1 ml do meio de parada (2% v/v de H₂SO₄, 5% p/v de SDS, 0,7% p/v de (NH₄)₂MoO₄) e 50 µL de ácido Ascórbico 10% p/v. Após 10 minutos foi adicionado 1,45 mL do meio que inibe a reação de desenvolvimento da coloração (4% de citrato de sódio e 2% ácido acético glacial). A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 820 nm.

e) Análises de N-NH₄⁺, N-NO₃⁻, N-amino livre e açúcares solúveis em tecido vegetal e N-total

Amostras de 0,5 grama de material coletado da parte aérea ou raízes foram homogeneizadas em etanol 80%, e após partição com clorofórmio (FERNANDES, 1984) a fração solúvel obtida foi utilizada para a determinação dos teores de N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955), N-NH₄⁺ (FELKER, 1977), N-NO₃⁻ (MIRANDA et al., 2001) e açúcares solúveis (YEMM & WILLIS, 1954). O material vegetal foi seco em estufa e depois moído para análise do N-total (TEDESCO et al., 1982).

4.4.5. Análise da expressão das isoformas de PM H⁺-ATPase em raiz e parte aérea

Nesse estudo, foi usado o RNA total do banco de RNA do Laboratório de Nutrição de Plantas (UFRRJ) estocado no freezer -80 °C do experimento usando a variedade de arroz Nipponbare cultivada com suprimento constante de 2,0 mM de N-NO₃⁻ (SPERANDIO, 2011). A análise de expressão foi feita usando primers específicos para cada isoforma de PM H⁺-ATPase desenhados por SPERANDIO et al. (2011). A reação de PCR em tempo real foi feita de acordo com o item 3.2.5 (Capítulo I).

4.4.6. Análise estatística

O experimento foi montado com delineamento inteiramente casualizado em um fatorial contendo as doses de N com quatro repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância, com o programa “Statistica 7” e “Sisvar”. As comparações das médias foram feitas entre as linhagens do mutante *osa2* e *osa7* com as plantas IRS (transformadas com vetor vazio) usando o teste F ($P < 0,05$).

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1. Construção do vetor contendo o micro RNA artificial (amiRNA) para silenciar os genes *OsA2* e *OsA7*

Inicialmente foi adquirido o vetor pNW55 no banco de vetores Addgene (www.addgene.org) contendo a sequência do miRNA *osa-MIR528*. Através de reações de PCR com os primers listados na Tabela 6, a região contendo o miRNA *osa-MIR528* foi substituída pelo amiRNA do gene de interesse. Primeiramente, foram feitos ajustes das reações para a obtenção do amiRNA de *OsA2*. Após as reações estarem ajustadas foram feitos o amiRNA de *OsA7*. A Figura 4 mostra o esquema das três primeiras PCR para obtenção dos três segmentos que darão origem ao amiRNA.

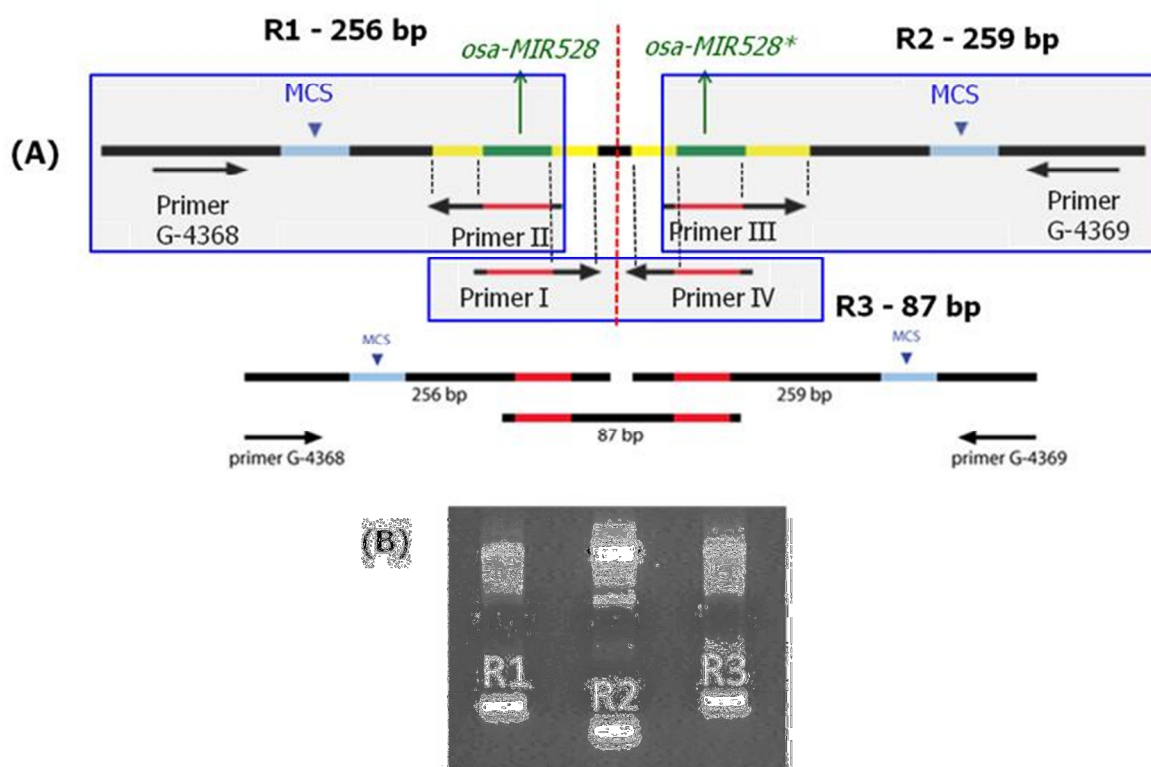


Figura 4. (A) Esquema da PCR de montagem do amiRNA (adaptado de WARTHMAN et al., 2008). (B) Visualização em gel de agarose das reações de montagem do amiRNA para o gene *OsA2*.

As três primeiras reações de PCR usando a enzima de alta fidelidade Pfx (Invitrogen) foi satisfatória, amplificando os três fragmentos que darão origem ao amiRNA. Nesta etapa, foi importante usar uma DNA polimerase de alta fidelidade, no entanto, na próxima etapa de fusão dos três fragmentos a Pfx não gerou o fragmento esperado (Figura 5a). Para verificar se a atividade exonucleática da enzima Pfx que confere a alta fidelidade do produto de PCR, foi feito um teste usando a enzima Taq que não possui atividade exonucleática.

A enzima Taq amplificou o produto correspondente de 557 bp (Figura 5a), no entanto, a enzima Taq não possui alta fidelidade e não pode ser usada para reações de PCR usadas em clonagens. Foi adquirida a enzima Phusion (Finnzymes, Finlândia) de alta fidelidade para solucionar o problema de amplificação e fidelidade da PCR. Usando a enzima Phusion o produto de 557 bp correspondente a junção dos três fragmentos anteriores foi obtido com sucesso (Figura 5b). Foram ainda testadas duas temperaturas de anelamento, 55 °C e 60 °C,

sendo que ambas as temperaturas amplificaram o produto de PCR correspondente ao amiRNA de *OsA2*.

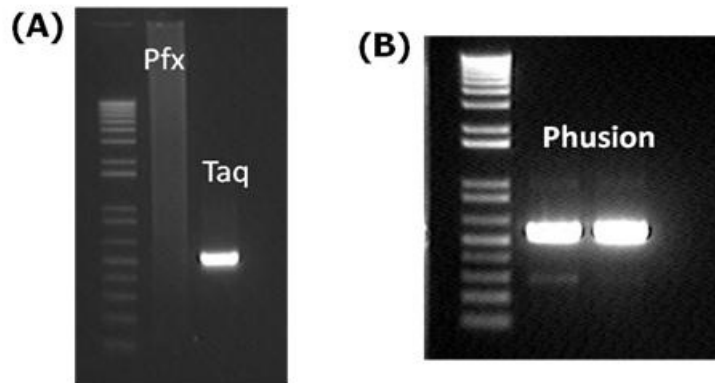


Figura 5. Reação de PCR de junção do amiRNA para o gene *OsA2* usando as enzimas DNA polimerases Pfx e Taq (A) e Phusion (B).

Após a obtenção do amiRNA para *OsA2*, o produto foi digerido com as enzimas de restrição de BamHI e KpnI, obtendo as extremidades coesivas para a inserção no vetor de clonagem (Figura 6a). O vetor de clonagem indicado para essa metodologia é o IRS154, que possui o promotor da ubiquitina de milho que induz alta expressão em arroz (WARTHMAN et al., 2008). O vetor de clonagem IRS154 foi gentilmente cedido pelo pesquisador Emmanuel Guiderdoni (CIRAD, França). O vetor IRS154 também foi digerido com as enzimas BamHI e KpnI para a reação de ligação com o amiRNA usando a enzima T4 DNA ligase (Figura 6a).

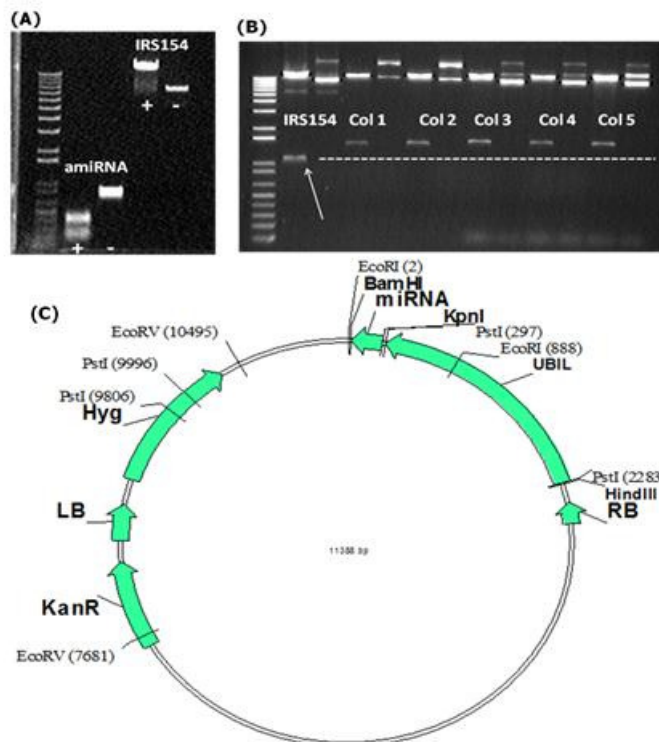


Figura 6. (A) Reação de digestão do amiRNA para *OsA2* e o vetor IRS154 com as enzimas BamHI e KpnI. (B) Digestão do plasmídeo IRS154 de cinco colônias de *E. coli* com a enzima EcoRI para confirmar a inserção do amiRNA no vetor. Os géis foram corados durante 30 minutos com Brometo de Etídio $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Após a reação de ligação do amiRNA ao IRS154, a construção foi inserida na bactéria *E. coli* competente linhagem *DH5α*. As colônias geradas tiveram o plasmídeo extraído e analisado por digestão com a enzima EcoRI para verificar a inserção do amiRNA no vetor IRS154. As cinco colônias analisadas apresentaram o fragmento de amiRNA de *OsA2*, o que fica evidente pelo aumento de 254 bp da banda assinalada no gel em relação ao vetor IRS154 vazio (Figura 7b). O vetor com a inserção do amiRNA está representado na Figura 6C com os sítios de restrição, mostrando a inserção do amiRNA na frente do promotor da ubiquitina de milho (UBIL) que induz alta expressão em plantas de arroz (CORNEJO et al., 1993).

Após o ajuste do procedimento de ligação do amiRNA ao vetor IRS154 e transformação de *E. coli* adaptado de SAMBROOK e RUSSEL (2001), foram feitas as construções para o silenciamento dos genes *OsA2* e *OsA7*. Para cada gene alvo foram feitos dois amiRNA, como recomendado por WARTHMAN et al. (2008) e OSSOWSKI et al. (2008), e duas colônias de *E. coli* para cada construção foram isoladas e caracterizadas por restrição com EcoRI. A Figura 7 mostra as confirmações por restrição das construções inseridas em *E. coli*. Desse modo, as construções foram isoladas por mini-prep de kit (Promega) e usadas para transformar *A. tumefaciens* estirpe LBA4404. Como controle da reação de restrição, foi usado o vetor IRS154 vazio (sem amiRNA), sendo que a inserção do amiRNA deve resultar em um fragmento 254 bp maior (correspondente à inserção do amiRNA no vetor IRS154).

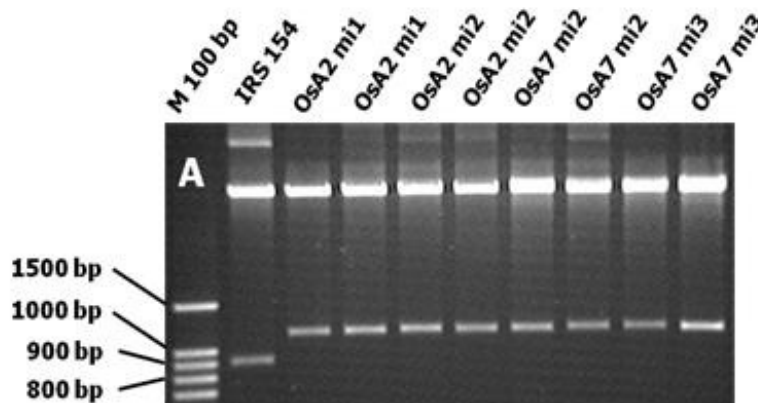


Figura 7. Gel de agarose dos produtos de digestão das construções contendo o amiRNA no vetor IRS154 para silenciar os genes de PM H⁺-ATPase *OsA2* e *OsA7*. Os géis foram corados durante 30 minutos com Brometo de Etídio 0,5 µg.ml⁻¹.

Após a transformação de *A. tumefaciens*, a confirmação foi feita por PCR de colônia de *A. tumefaciens* (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Nessa etapa, foi possível fazer três possíveis confirmações por PCR das colônias de *A. tumefaciens* contendo as construções de interesse. A primeira PCR feita usa os primers do amiRNA, a outra usa os primers que amplifica uma região do gene da Higromicina (gene de resistência expresso na planta transformada com o vetor IRS154) e a terceira PCR usando um primer anelando no amiRNA e outro no gene da Higromicina. Para a terceira PCR por ser mais complexa, foi realizado um teste usando os primers forward e reverso do amiRNA e Higromicina, usando *OsA2mi1* como teste e o vetor sem amiRNA (IRS154) como controle.

Como pode ser observada na Figura 8, a única combinação de primers que amplificou o produto correto de 2600 pares de base de forma específica foi usando primer reverso do amiRNA (p4 miRNA) e forward da Higromicina. No controle usando o vetor IRS154, somente foi observado produtos inespecíficos de amplificação. Desse modo, para confirmar as

construções contendo o amiRNA, foi usado a combinação de primers correta (Figura 8), exceto a construção do vetor vazio (IRS154) porque não possui amiRNA inserido (WARTHMAN et al. 2008).

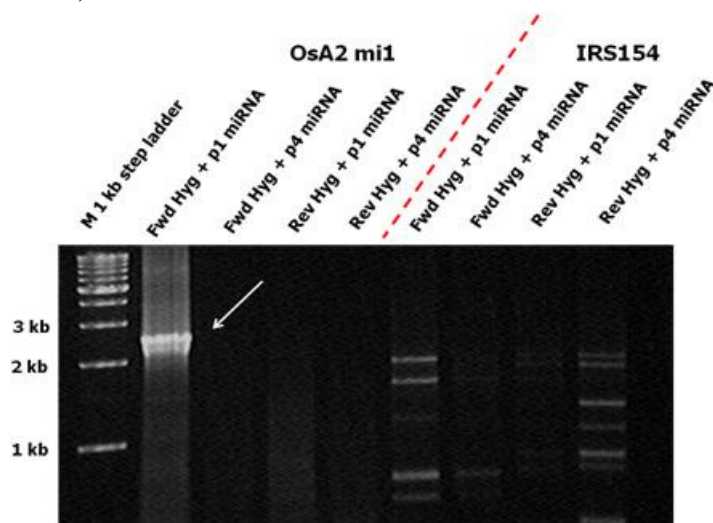


Figura 8. Teste para a reação de PCR usando os primers forward e reverso de OsA2mi1 e Higromicina. p1: primer reverso de OsA2mi1, p4: primer forward de OsA2mi1. Como controle, foi usado o vetor vazio (IRS154) como controle. O gel foi corado durante 30 minutos com Brometo de Etídio 0,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

A reação de PCR de colônia usando os primers do amiRNA e Higromicina são mostrados na Figura 9. Todas as colônias testadas contendo o amiRNA de OsA2mi1, OsA2mi2, OsA7mi2 e OsA7mi3 foram positivas.

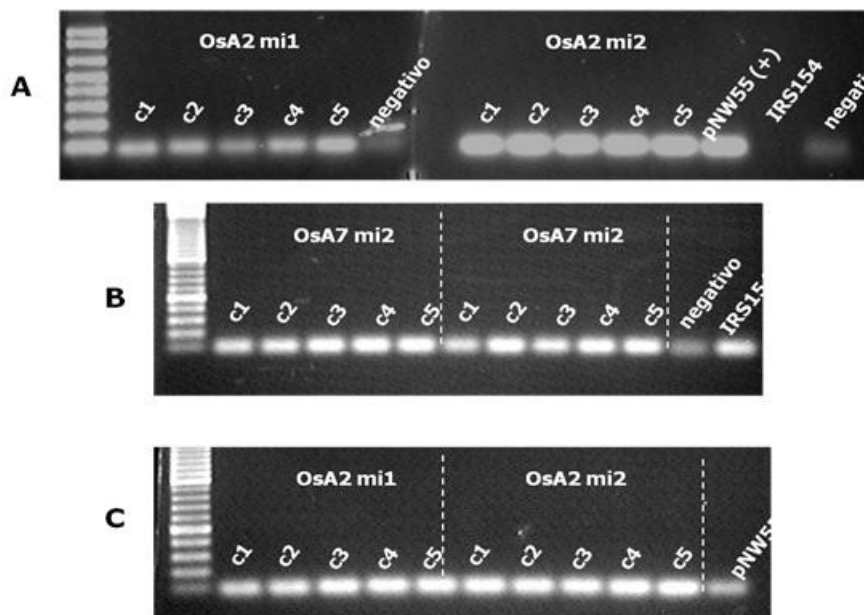


Figura 9. Reações de PCR de colônia com as construções de amiRNA para *OsA2* (OsA2mi1 e OsA2mi2) e *OsA7* (OsA7mi2 e OsA7mi3) usando os primers para o amiRNA (A) e para a Higromicina (B e C). Os géis foram corados durante 30 minutos com Brometo de Etídio 0,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

A transformação de *A. tumefaciens* ocorreu de forma eficiente, sendo que duas colônias foram usadas para transformar calos embriogênicos de arroz variedade Nipponbare. A última confirmação foi feita usando os primers do amiRNA e da Higromicina. Como

esperado, todas as amostras testadas foram positivas (Figura 10). Apesar da PCR de colônia de OsA2mi1 ter falhado na primeira tentativa (Figura 10A), a reação de PCR foi repetida e o produto de 2600 pares de base foi amplificado com sucesso (Figura 10B).

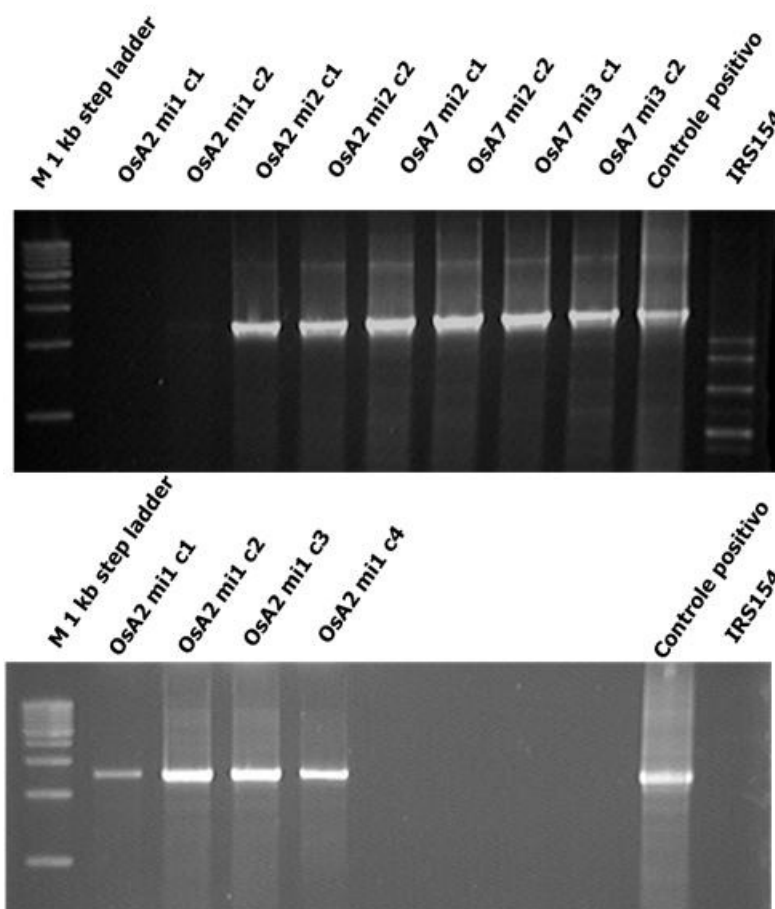


Figura 10. Reações de PCR usando os primers do amiRNA e Higromicina para OsA2mi1, OsA2mi2, OsA7mi2 e OsA7mi3. Os géis foram corados durante 30 minutos com Brometo de Etídio $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

4.5.2. Transformação de arroz com as construções contendo o amiRNA para silenciar os genes *OsA2* e *OsA7*

A transformação de arroz se baseou nos protocolos de TOKI et al. (2006) e HIEI e KOMARI (2008), com ajustes feitos no Laboratório de Nutrição de Plantas (UFRRJ). A etapa inicial consiste em desinfestar sementes de arroz variedade Nipponbare com etanol e hipoclorito de sódio com tween. Após a desinfestação, as sementes foram acondicionadas em meio contendo N6D com 2 mg L^{-1} de 2,4-D. TOKI et al. (2006) propõe indução de calos de 5 dias enquanto HIEI e KOMARI (2008) propõe 21 dias de indução de calos. No entanto, foi observado que 14 dias de indução, o que gerou calos em boa atividade de divisão com qualidade para transformação de arroz.

Outra modificação na indução de calos foi o aumento da dose de Fe-EDTA. A dose indicada por TOKI de $0,0278 \text{ mg L}^{-1}$ de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi aumentada para $0,0556 \text{ mg L}^{-1}$. Desse modo, a indução de calos foi surpreendentemente melhorada, permitindo a obtenção de calos friáveis próprios para transformação de arroz (Figura 11B). Vale ressaltar que os calos gerados com $0,0278 \text{ mg L}^{-1}$ de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Figura 11A) não foi possível realizar a transformação de arroz.

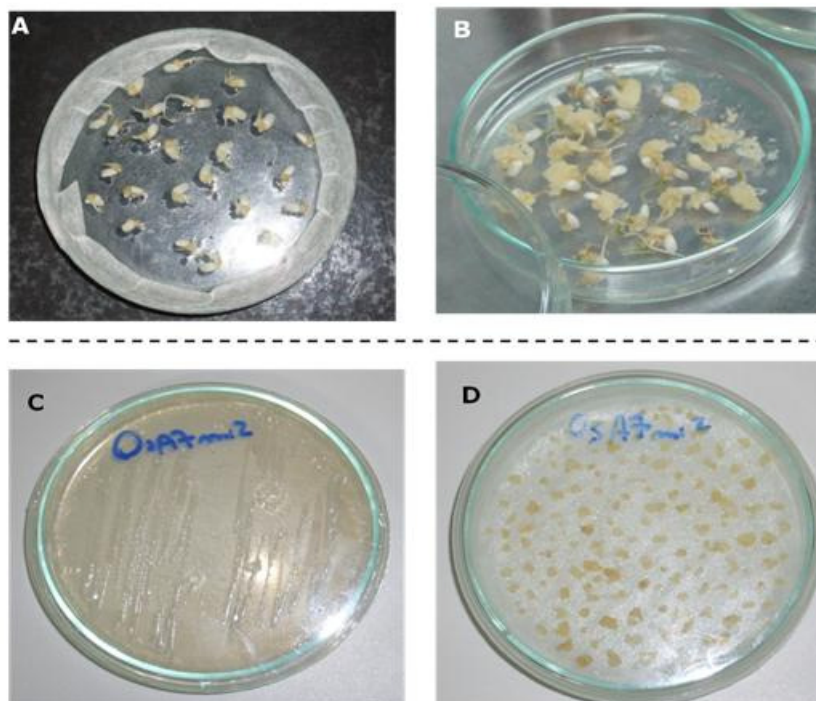


Figura 11. Etapas iniciais de transformação de arroz da variedade Nipponbare com as construções de amiRNA para *OsA2* (*OsA2mi1* e *OsA2mi2*) e *OsA7* (*OsA7mi2* e *OsA7mi3*). Indução de calos com 0,0278 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O (A) e com 0,0556 mg L⁻¹ FeSO₄.7H₂O (B). Cultivo de *Agrobacterium* em meio AB (C) e calos de arroz em co-cultivo com *Agrobacterium* (D).

Para a transformação dos calos com a construção desejada, duas colônias de *Agrobacterium* de cada construção foram riscadas em placa de petri contendo meio AB contendo 100 mg L⁻¹ de Higromicina (TOKI et al., 2006). Após três dias a *Agrobacterium* foi coletada do meio AB com o auxílio de uma alça de platina e diluída em meio AAM até DO₆₀₀ de 0,1 e os calos de arroz foram acondicionados no meio AAM por três minutos. Após a incubação por três minutos, o excesso de *Agrobacterium* foi drenado com papel de filtro autoclavado e acondicionados em meio N6D-As (Figura 11D) contendo Acetoseringona 19,2 mg L⁻¹ para induzir os genes de virulência e inserir a construção contida no vetor IRS154 dentro do genoma da planta. O protocolo de TOKI et al. (2006) estabelece que o co-cultivo (*Agrobacterium* com os calos de arroz) permaneça no escuro por três dias com temperatura de 28 °C. No entanto, a temperatura de 28 °C é a temperatura ótima de crescimento da *Agrobacterium* e o risco de contaminar os calos com excesso de bactéria é alto. Desse modo, para evitar contaminação foi usada temperatura de 25 °C que permitiu menor crescimento da *Agrobacterium* e calos sem contaminação no final do período de co-cultivo.

Após o período de co-cultivo, os calos foram desinfestados da *Agrobacterium*, sendo que qualquer aparecimento de *Agrobacterium* nas etapas posteriores seria contaminação e levaria à perda dos calos. Primeiramente os calos foram lavados com cinco vezes com água destilada autoclavada para remoção do excesso de *Agrobacterium* e depois mais cinco lavagens com solução de 200 mg L⁻¹ do antibiótico Timentim. O Timentim não é tóxico para os calos mas elimina *Agrobacterium* dos calos. O protocolo de TOKI et al. (2006) usa carbenicilina 500 mg L⁻¹ para eliminar *Agrobacterium* dos calos, no entanto, em diversos trabalhos foi relatado que o uso de Timentim seria mais adequado para eliminar *Agrobacterium* durante o processo de transformação (CHENG et al., 1998; MAMIDALA e NANNA, 2009).

Os calos de arroz foram então acondicionados em meio de seleção N6DH contendo Higromicina para selecionar os calos que tivessem a construção inserida (Figura 12A). A dose de Higromicina para seleção dos calos transformados foi de 50 mg L⁻¹ (TOKI et al., 2008; HIEI e KOMARI, 2008) por duas semanas, no entanto, foi observado que os calos transferidos para o meio contendo 50 mg L⁻¹ demoravam a desenvolver (Figura 12A). Para diminuir o efeito do Higromicina no desenvolvimento dos calos, foi usado a dose de 25 mg L⁻¹ de Higromicina (1/2 dose) na primeira semana e depois 50 mg L⁻¹ de Higromicina na segunda semana. Isso permitiu melhor desenvolvimento dos calos e a seleção dos calos transformados foi mais eficiente.

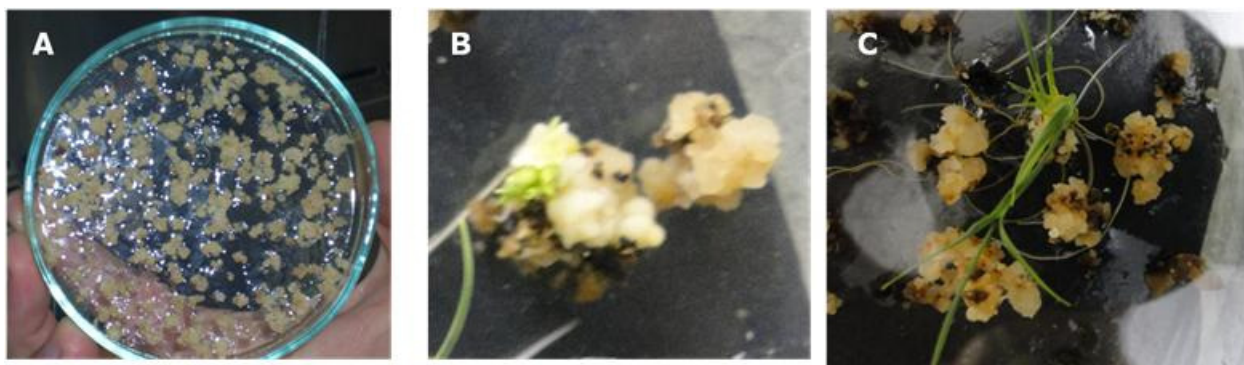


Figura 12. Etapas de seleção dos calos e regeneração de plantas de arroz provenientes dos calos transformados com as construções de amiRNA para *OsA2* (*OsA2mi1* e *OsA2mi2*) e *OsA7* (*OsA7mi2* e *OsA7mi3*). (A) calos em meio de seleção com 50 mg L⁻¹ de Higromicina; (B) início do aparecimento de “pontos-verdes” em meio de regeneração de parte aérea e (C) planta desenvolvida no meio de regeneração.

Os calos resistentes foram transferidos para meio de regeneração de parte aérea através do balanço hormonal promovido pela concentração de 2 mg L⁻¹ de Kinetim e 0,05 mg L⁻¹ ácido naftilacético, fornecendo citocinina e auxina sintética, respectivamente (TOKI et al., 2006). O meio de regeneração usado foi meio MS de acordo com HIEI e KOMARI et al. (2008). O 2,4-D foi removido do meio nessa etapa. Após duas semanas no meio de regeneração de parte aérea, começaram a surgir pontos verdes em alguns calos indicando que o processo de regeneração da planta tinha iniciado (Figura 12B). Para assegurar que a concentração hormonal fosse mantida constante, os calos foram transferidos para novo meio a cada semana nessa etapa.

Após quatro semanas no meio de regeneração de parte aérea, as plantas regeneradas foram transferidas para tubos contendo meio de regeneração de raiz com 50 mg L⁻¹ de Higromicina. Nesse meio não foi adicionado nenhum regulador de crescimento. Na Figura 13A é apresentada a regeneração das plantas em diferentes estágios de desenvolvimento, desde a transferência da parte aérea até a formação da planta completa duas semanas após a transferência para o meio de regeneração. Os protocolos de TOKI et al. (2006) e HIEI e KOMARI (2008) não usam Higromicina 50 mg L⁻¹ durante as etapas de regeneração, portanto, manter o antibiótico pode representar aumento do custo para produção da planta mutante mas diminui a possibilidade de ocorrer a regeneração de plantas não transformadas.

A) Regeneração de raiz

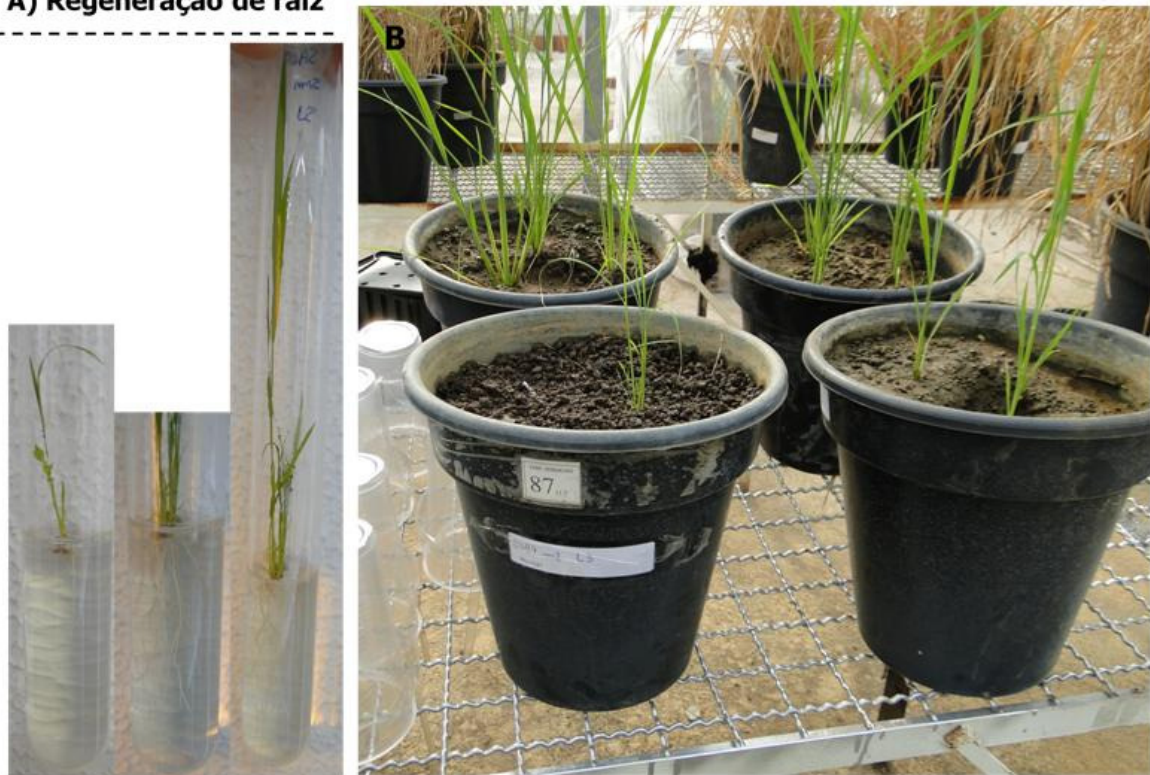


Figura 13. Etapas finais da transformação de arroz da variedade Nipponbare com as construções de amiRNA para *OsA2* (*OsA2mi1* e *OsA2mi2*) e *OsA7* (*OsA7mi2* e *OsA7mi3*). Tubos contendo meio de regeneração de raiz em diferentes estágios de desenvolvimento (A) e plantas após a regeneração de raízes plantadas em vasos de terra para produção de sementes de arroz transformado (B).

Após a regeneração completa, as plantas regeneradas foram transferidas para vasos contendo 8 Kg de terra para produção de sementes (Figura 13B). Após aproximadamente três meses de cultivo, as plantas transformadas apresentaram boa produção de grãos. Depois de avaliado os níveis de silenciamento dos genes alvos (*OsA2* e *OsA7*) foram multiplicadas as linhagens com maior nível de silenciamento.

4.5.3. Confirmação das plantas transformadas

Para confirmar que as plantas mutantes contém a construção de interesse, dois testes foram realizados: teste com a folha bandeira em solução com Higromicina (LIN et al., 2009) e por PCR usando primers para amplificar o gene *hpt* (*hygromycin phosphotransferase*) que confere resistência ao antibiótico Higromicina.

Para testar a resistência à Higromicina, foram cortadas três pedaços da folha bandeira de aproximadamente 2 cm cada e colocadas em placas de petri com 50 mg L⁻¹ de Higromicina e 1 mg L⁻¹ de BAP (6-benzil amino purina). A função do BAP é impedir que as folhas entrem em senescência após o corte, o que inviabilizaria o método. Além das plantas transformadas, também foi usada plantas não transformadas da variedade Nipponbare (WT) como controle do teste. As placas permaneceram em câmara de crescimento com fotoperíodo de 14 horas de luz e temperatura 28°C/24°C (diurna/noturna). Sete dias após o início do teste, as folhas foram fotografadas para verificar o estrado de necrose.

Na Figura 14, logo após os pedaços da folha bandeira serem colocadas na solução (dia zero), nenhuma das folhas apresenta necrose. Sete dias após o início do teste, foi verificado que as plantas transformadas ainda estavam verdes, enquanto a planta WT (não transformada)

apresentou forte necrose. A Figura 14 indica visualmente que as plantas obtidas ao final do processo tiveram a construção inserida com o gene *hpt* que confere resistência à higromicina, enquanto a planta não transformada (WT) apresentou necrose, validando o teste.

O teste de PCR feito usando DNA das plantas transformadas mostrou a inserção do gene *hpt*, de acordo com gel mostrado na Figura 15. A exceção foi a linhagem 3 da construção *OsA2* micro 1 (*OsA2mi1#L3*), que não apresentou a banda no gel correspondente à amplificação do gene *hpt*. No entanto, o teste usando a folha bandeira de *OsA2mi1#L3* não apresentou sinal de necrose indicando que a construção foi inserida mas não foi detectada na reação de PCR.

Vale ressaltar que também foi feita análise de PCR usando o DNA extraído de plantas não transformadas (WT) como controle negativo da reação. A reação de PCR na planta WT não apresentou a banda correspondente ao gene *hpt* (Figura 15), validando o teste por PCR. O sucesso para obter grande número de linhagens transformadas com a construção sem falsos positivos pode ser devido ao fato de que foi usado Higromicina durante toda a etapa de regeneração de parte aérea e raiz. Desse modo, se algum calo não transformado passasse pela etapa de seleção, morreria nas etapas seguintes porque não resistiria à regeneração da planta sem conter a construção e consequentemente o gene de resistência à higromicina (*hpt*).

Com as linhagens de arroz transformadas confirmadas, foi possível analisar por PCR em tempo real as linhagens com menor nível de expressão dos genes *OsA2* e *OsA7* e multiplicar em casa de vegetação para obtenção de sementes e montagem de experimentos para avaliar os efeitos do silenciamento dos genes *OsA2* e *OsA7* na nutrição níttrica em plantas de arroz e desenvolvimento vegetal.

Durante o processo de transformação podem ser obtidas linhagens com características que não são provenientes da construção inserida, mas por causa de outros efeitos do processo de transformação na planta. Um dos mecanismos que podem gerar plantas mal formadas no processo de transformação é a migração de transposons que geram plantas com problemas de crescimento (MIYAO et al., 2003). Desse modo, foi feita uma avaliação fenotípica das linhagens produzidas no processo de transformação no final do ciclo. Como parâmetro para crescimento e produção, as linhagens foram comparadas com plantas não transformadas (WT).

Entre as linhagens obtidas pelo processo de transformação de arroz, houve linhagens com porte baixo, panículas albinas e que não produziram sementes (Tabela 8). Esse fenômeno é causado pelas alterações no genoma que podem ocorrer durante o processo de transformação (variação somaclonal) provocado principalmente pela ação de elementos móveis do genoma como transposons e retrotransposons (TOKI et al., 2006).

As linhagens que não produziram sementes ocorreram com todas as construções, principalmente nas últimas linhagens produzidas durante a regeneração de parte aérea e raiz. Cada planta regenerada de um calo isolado representa uma linhagem, sendo a primeira chamada de “Linhagem 1” (L1) e assim sucessivamente. As últimas linhagens obtidas foram cultivadas em casa de vegetação durante o final do verão, onde os dias começam a encurtar e favorecem a esterilidade do arroz do tipo japônica. As primeiras linhagens foram cultivadas durante o início do verão com dias longos e favoreceram a produção de sementes.

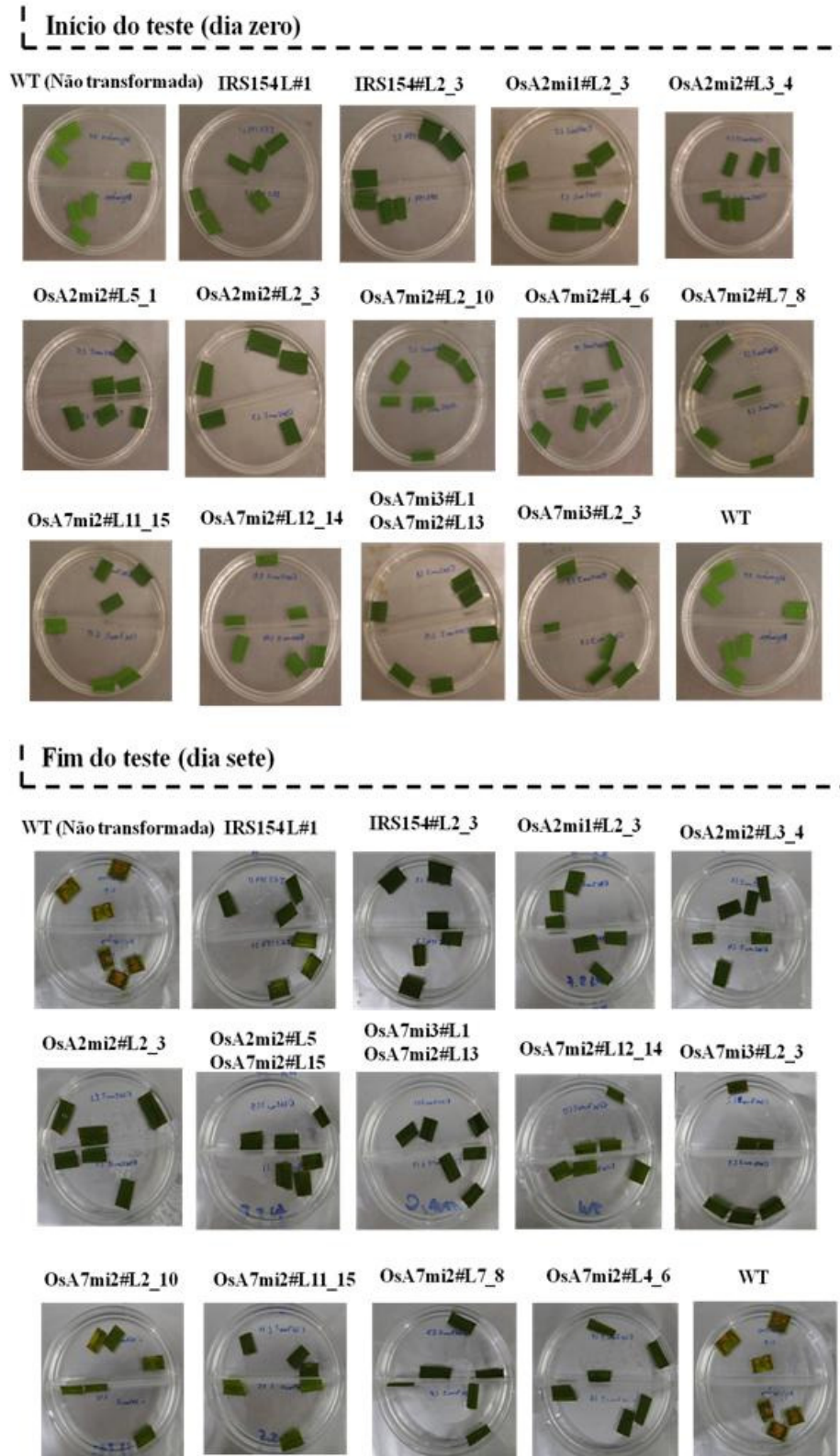


Figura 14. Teste de resistência da folha bandeira de algumas linhagens mutantes e não transformadas (WT) ao antibiótico higromicina no momento em que foram colocadas na placa de Petri (dia zero) na solução contendo 50 mg L⁻¹ de higromicina e 1 mg L⁻¹ de BAP (6-benzil amino purina) e sete dias após a aplicação da solução de Higromicina.

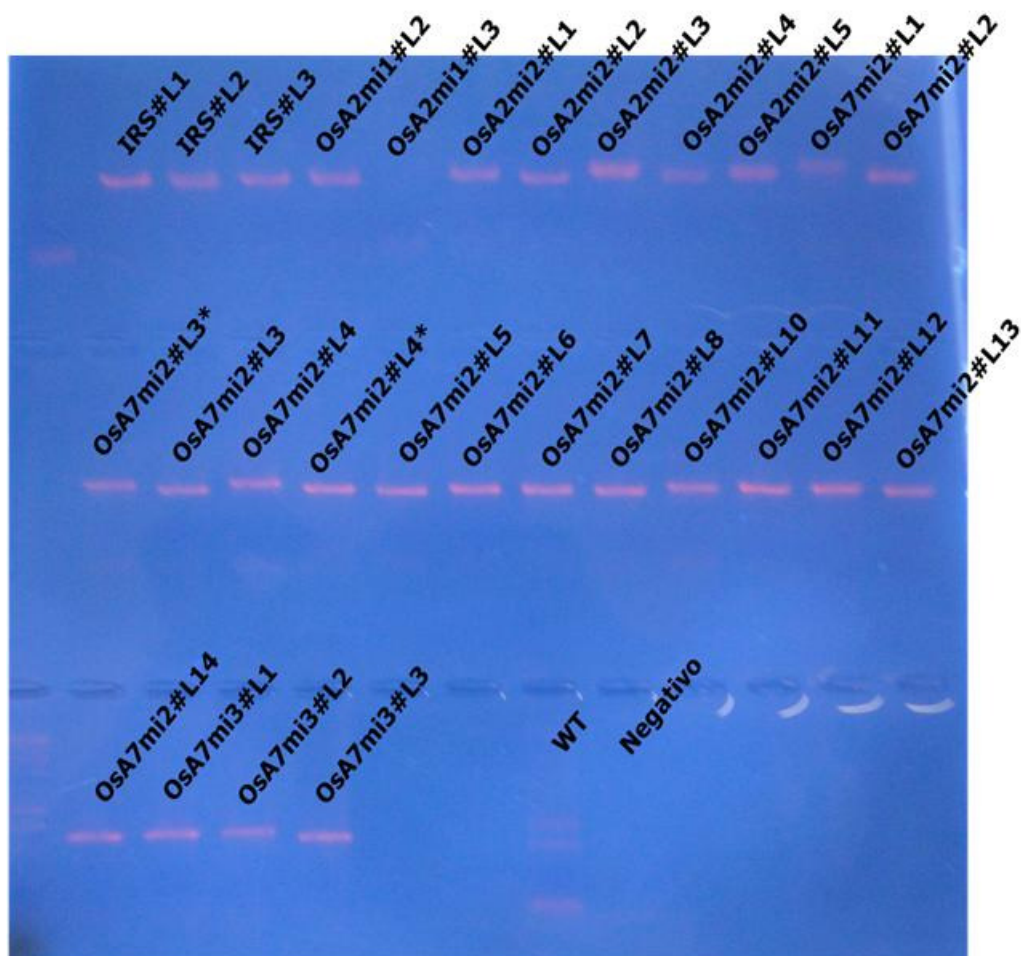


Figura 15. Gel de agarose contendo a reação de PCR para amplificar o gene *hpt* (*Hygromycin phosphotransferase*) de algumas linhagens transformadas e da planta não transformada (WT). Controle negativo ocorreu sem a adição de DNA. Gel corado com Gel-Red (Uniscience) de acordo com as recomendações do fabricante.

SOUZA (2014) verificou que plantas de arroz da variedade Nipponbare cultivadas durante o inverno não produzem sementes, enquanto as plantas cultivadas durante o verão apresentaram alta produção. No entanto, a maioria das linhagens obtidas apresentou crescimento e produção de sementes favorável e foram multiplicadas em casa de vegetação para obtenção de sementes necessárias à realização dos experimentos para avaliar os efeitos do silenciamento das isoformas de PM H⁺-ATPase no crescimento e absorção de NO₃⁻.

4.5.4. Avaliação da expressão gênica dos genes *OsA2* e *OsA7* nas linhagens de arroz mutantes

Para avaliar o efeito da inserção do amiRNA na expressão das isoformas de *OsA2* e *OsA7*, a expressão desses genes foram avaliados por PCR em tempo real. Foram usadas amostras da folha 2 das plantas mutantes no estágio de enchimento de grãos, visto que *OsA2* e *OsA7* são as isoformas de PM H⁺-ATPase mais expressas em arroz, com altos níveis de expressão tanto na raiz como na parte aérea (ARANGO et al., 2003; SPERANDIO et al., 2011).

Tabela 8. Características fenotípicas das linhagens de arroz produzidas pelo processo de transformação para silenciar as isoformas de PM H⁺-ATPase *OsA2* (*OsA2* mi1 e *OsA2* mi2) e *OsA7* mi2 e *OsA7* mi3).

Plantas mutantes com vetor vazio (IRS)	Características de crescimento e produção *
L1, L2, L3, L4, L5	Crescimento normal e enchimento dos grãos
L6	Porte baixo (anã)
L7, L8	Não produziram sementes
Plantas mutantes com <i>OsA2</i> mi1	Características de crescimento e produção *
L2, L3, L4, L5	Crescimento normal e enchimento dos grãos
L1	Porte baixo (anã)
L7	Não produziu sementes
Plantas mutantes com <i>OsA2</i> mi2	Características de crescimento e produção *
L1, L5	Porte baixo (anã)
L2, L3, L4, L6, L7, L8, L9	Crescimento normal e enchimento dos grãos
L10, L11	Não produziram sementes
Plantas mutantes <i>OsA7</i> mi2	Características de crescimento e produção *
L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L11, L13, L15, L16	Crescimento normal e enchimento dos grãos
L10	Porte baixo (anã)
L12, L14	Folhas e panículas albinas
L15, L16	Não produziram sementes
Plantas mutantes <i>OsA7</i> mi3	Características de crescimento e produção *
L1, L2, L3, L5, L6, L7, L8	Crescimento normal e enchimento dos grãos
L4, L9	Porte baixo (anã)
L10	Paniculas albinas
L11	Não produziram sementes

* Comparação com plantas não transformadas (WT)

Foram usadas as linhagens que apresentaram crescimento normal para a análise de expressão gênica (Tabela 8). Entre as linhagens mutantes obtidas para silenciar *OsA2*, mi1 gerou pequena redução na expressão de *OsA2* enquanto mi2 gerou silenciamento mais efetivo de *OsA2* (Figura 16). Como controle foi analisada a expressão de *OsA7* nos mutantes *OsA2*mi1 e *OsA2*mi2, por ser da mesma família gênica e verificar se o silenciamento nas plantas de arroz mutantes foi específico. Como observado por WARTHMAN et al. (2008), o silenciamento gênico foi eficiente, não afetando a expressão de *OsA7* nas linhagens dos mutantes *OsA2*mi1 e *OsA2*mi2. A expressão na planta WT foi igual à planta IRS, confirmando que as linhagens transformadas com o vetor vazio (sem amiRNA) não afetaram a expressão do gene alvo. Quando WATHMANN et al. (2008) desenvolveram o sistema de amiRNA para arroz, para cada gene testando o silenciamento foram feitos dois amiRNA e somente um gerou silenciamento do gene alvo. A transformação de arroz com dois amiRNA diferentes para *OsA2* mostraram diferentes níveis de silenciamento, o que pode ser decorrente de diferentes eficiências de processamento pela DCL1 ou acoplamento na AGO1 no complexo RISC (LI et al., 2014).

Nos mutantes para silenciar *OsA7* somente *OsA7*mi3 mostrou redução da expressão, enquanto *OsA7*mi2 não apresentou redução da expressão em nenhuma linhagem obtida (Figura 17). A expressão de *OsA2* não foi alterada nos mutantes *OsA7*mi2 e *OsA7*mi3. Os resultados de expressão obtidos mostram que o amiRNA para silenciar *OsA7* não alterou a expressão de *OsA2*.

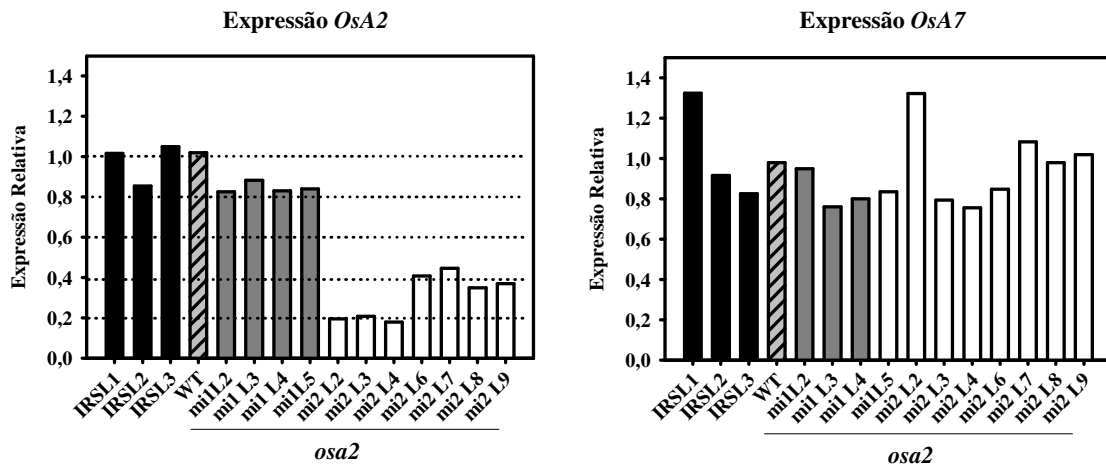


Figura 16. Expressão dos genes *OsA2* e *OsA7* nos mutantes *OsA2mi1* e *OsA2mi2*. Como controle, foram usadas três linhagens de arroz da variedade Nipponbare transformadas com o vetor IRS154 vazio (sem amiRNA).

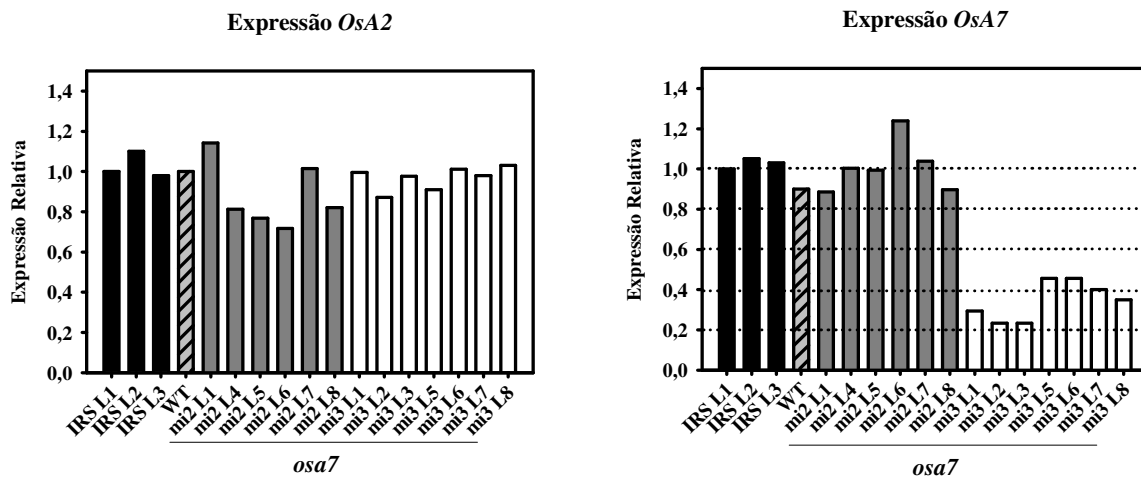


Figura 17. Expressão dos genes *OsA2* e *OsA7* nos mutantes *OsA7mi2* e *OsA7mi3*. Como controle, foram usadas três linhagens de arroz da variedade Nipponbare transformadas com o vetor IRS154 vazio (sem amiRNA).

Juntando a expressão das linhagens de cada construção, podemos saber qual amiRNA foi o mais efetivo no silenciamento. A Figura 18 mostra a eficiência de silenciamento de cada construção e se houve silenciamento inespecífico nos mutantes. Os mutantes *OsA2mi2* e *OsA7mi3* apresentaram silenciamento altamente específico, não afetando a expressão da outra isoforma de PM H⁺-ATPase analisada.

Os resultados indicam que somente um amiRNA funcionou de maneira satisfatória, com silenciamento de pelo menos 70% do gene alvo. Desse modo, foi usado somente o mi2 para a isoforma *OsA2* e o mi3 para a isoforma *OsA7* (Figura 18). Os amiRNAs usados nesse estudo foram obtidos por bioinformática usando a plataforma WMD3 (Web microRNA Designer), onde diversos amiRNAs são desenhados para silenciar um gene específico.

O sistema de silenciamento via amiRNA usando a plataforma WMD foi usado em outros estudos em arroz. SHEN et al. (2012) usaram o sistema de amiRNA para silenciar o gene *OsBADH2* em arroz e obteve aproximadamente 80% de silenciamento do gene alvo, enquanto a outra isoforma *OsBADH1* não sofreu alteração, mostrando a alta especificidade do silenciamento via amiRNA.

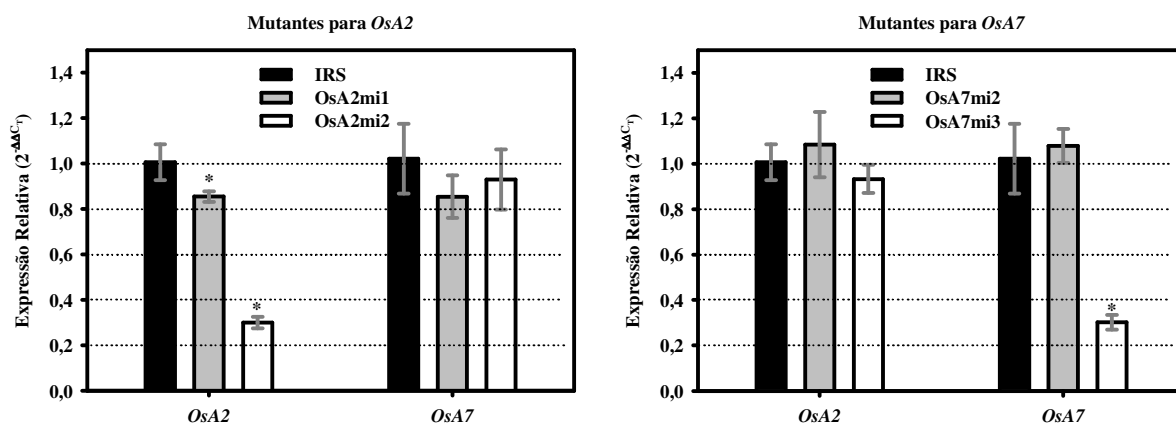


Figura 18. Média da expressão nos mutantes *OsA2mi1*, *OsA2mi2*, *OsA7mi2* e *OsA7mi3*. Plantas transformadas com o vetor vazio IRS154 foram usadas como controle (valor 1). * indica diferença entre as linhagens *osa2* ou *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

4.3.5. Avaliação do crescimento das plantas mutantes silenciando os genes *OsA2* e *OsA7* em casa de vegetação

Após a verificação do silenciamento dos amiRNAs nas isoformas de PM H^+ -ATPases *OsA2* e *OsA7*, foi feita a avaliação do crescimento, produção de massa e sementes nos mutantes para verificar se houve efeito na morfologia da planta. O experimento foi conduzido em casa de vegetação durante os meses de outubro de 2013 e fevereiro de 2014. Somente foram avaliadas as linhagens mutantes *osa2* e *osa7* que apresentaram silenciamento do gene alvo.

Não houve diferença na produção de massa fresca da parte aérea e produção dos grãos entre a planta não transformada (WT) e a planta transformada com o vetor vazio (IRS) sem a inserção do amiRNA (Figura 19). Essa característica é desejada e mostra que as plantas transformadas com o vetor vazio podem ser usadas como controle experimental, pois passaram pelo processo de transformação. O vetor de expressão IRS154 permite que seja feito um processo de transformação exclusivo para o vetor vazio que é utilizado posteriormente durante os experimentos para avaliar os efeitos da construção inserida no genoma da planta. As plantas mutantes transformadas com o amiRNA para silenciar *OsA2* e *OsA7* apresentaram redução de massa fresca e massa de grãos quando comparada com plantas não transformadas e plantas transformadas com o vetor IRS154 vazio (Figura 19). O silenciamento das PM H^+ -ATPases pode prejudicar o desenvolvimento vegetal por se essencial em diversos eventos fisiológicos. A atividade da PM H^+ -ATPase é essencial para o desenvolvimento da planta por permitir o fluxo de nutrientes, açúcares e hormônios (FUGLSANG et al., 2011). A PM H^+ -ATPase também está associada ao carregamento de açúcares no floema e sua redistribuição na planta (BAKER et al., 2012). As isoformas de PM H^+ -ATPase *OsA2* e *OsA7* silenciadas nesse estudo podem ter afetado o fluxo interno de solutos e diminuído o crescimento da planta. A menor atividade da PM H^+ -ATPase em *Arabidopsis* causa menor crescimento de raiz e parte aérea por causa do menor transporte de açúcar na planta (LI et al., 2005), enquanto a maior atividade da PM H^+ -ATPase induz maior crescimento vegetativo (PAEZ-VALENCIA et al., 2013). Vale ressaltar que a alteração da atividade da PM H^+ -ATPase nos estudos de LI et al. (2005) e PAEZ-VALENCIA et al. (2013) foi feita pela manipulação da H^+ -PPase vacuolar, não ocorrendo a manipulação genética direta da PM H^+ -ATPase.

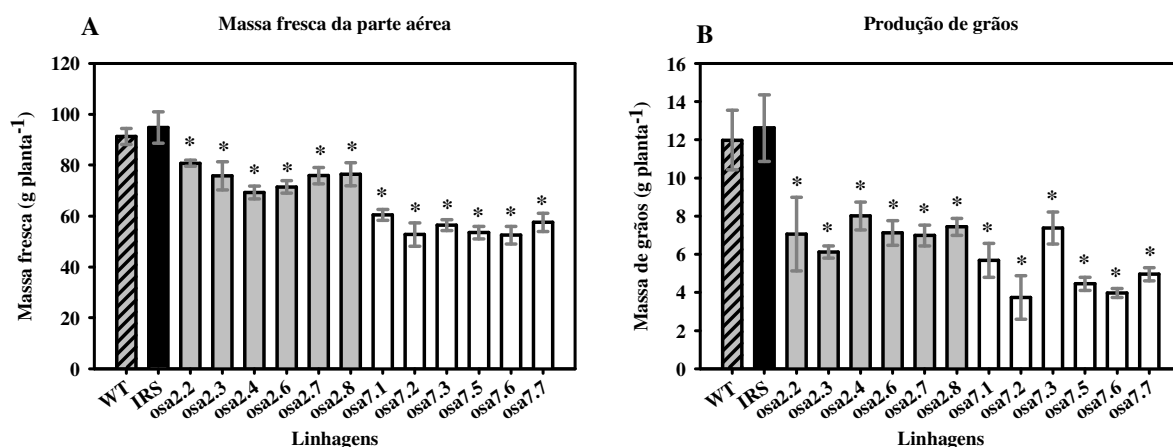


Figura 19. Avaliação do crescimento e produção das plantas obtidas no processo de transformação em casa de vegetação em plantas não transformadas (WT), transformadas com vetor IRS vazio e linhagens silenciando os genes *Osa2* e *Osa7*. (A) produção de massa fresca da parte aérea e (B) produção de grãos. * indica que houve diferença entre as plantas não transformadas (WT) e os mutantes ($P < 0,05$).

De acordo com a teoria do crescimento ácido, a PM H^+ -ATPase também está envolvida no crescimento celular por atuar na acidificação do apoplasto e ativar expansinas, uma das enzimas responsáveis pelo alongamento celular (GAXIOLA et al., 2007). Desse modo, as plantas mutantes *osa2* e *osa7* obtidas no presente estudo podem ter afetado o crescimento vegetativo por afetar algum processo celular que requer a atividade da PM H^+ -ATPase. A atividade da PM H^+ -ATPase afeta o enchimento de grãos de arroz (ARANGO et al., 2003), podendo o silenciamento da isoforma *Osa2* e *Osa7* ter afetado o enchimento dos grãos de arroz. Plantas superexpressando a V- H^+ -PPase apresentam maior atividade da PM H^+ -ATPase e apresentam maior produção de massa fresca e grãos (LI et al., 2005; GAXIOLA et al., 2012; LI et al., 2014). CHEN et al. (2012) mostraram que a PM H^+ -ATPase é essencial para o desenvolvimento da parte reprodutiva em tabaco. Apesar de ser difícil especular os processos que podem ter causado menor crescimento e produção de grãos nos mutantes *osa2* e *osa7*, pode-se concluir que as isoformas *Osa2* e *Osa7* são importantes para o desenvolvimento vegetal.

Em arroz existem 10 isoformas de PM H^+ -ATPase (BAXTER et al., 2003) e seis são expressas na parte aérea (SPERANDIO et al., 2011), no entanto, o silenciamento de uma única isoforma em cada mutante afeta significativamente o crescimento e produção do arroz. BAXTER et al. (2003) sugeriram que poderia ocorrer redundância funcional e o decréscimo da expressão de uma isoforma de PM H^+ -ATPase pode ser compensada por outra isoforma. Os resultados desse trabalho mostram que as isoformas *Osa2* e *Osa7* desempenham papel fundamental para o arroz obter seu máximo potencial produtivo. Vale ressaltar que não houve mudança no ciclo produtivo ou crescimento entre as plantas transformadas e não transformadas.

As linhagens das plantas mutantes *osa7* apresentaram menor altura (Figura 20), mostrando que a redução de crescimento nos mutantes *osa7* também afeta a altura das plantas. ARANGO et al. (2003) sugeriram que as subfamílias de PM H^+ -ATPase I e II são as mais expressas e importantes para o desenvolvimento vegetal, sendo *Osa2* e *Osa7* das subfamílias I e II, respectivamente. O decréscimo de crescimento e produção nos mutantes silenciando as isoformas *Osa2* e *Osa7* confirmam a hipótese de ARANGO et al. (2003), mostrando que determinadas isoformas de PM H^+ -ATPase possuem forte influência no desenvolvimento

vegetal. A menor produção de grãos nos mutantes pode estar relacionado com a importância da PM H⁺-ATPase para o desenvolvimento do grão de pólen (ROBERTSON et al., 2004).

AKTER et al. (2014) trataram sementes de arroz com o agente mutagênico N-metil-N-nitroureia em busca de mutantes com reduzida produção de sementes em arroz. Esses autores isolaram um mutante com a mutação de uma base na isoforma de PM H⁺-ATPase OsA7. Os resultados de menor altura e menor produção nos mutantes *osa7* também foram encontrados por AKTER et al. (2014). Curiosamente, o silenciamento de *Osa2* não afetou a altura das plantas, mas afetou a produção e massa fresca. Os resultados encontrados com os mutantes *osa2* e *osa7*, bem como o trabalho de AKTER et al. (2014) mostram a importância da PM H⁺-ATPase na fase reprodutiva do arroz, com forte influência sobre a produção de grãos.

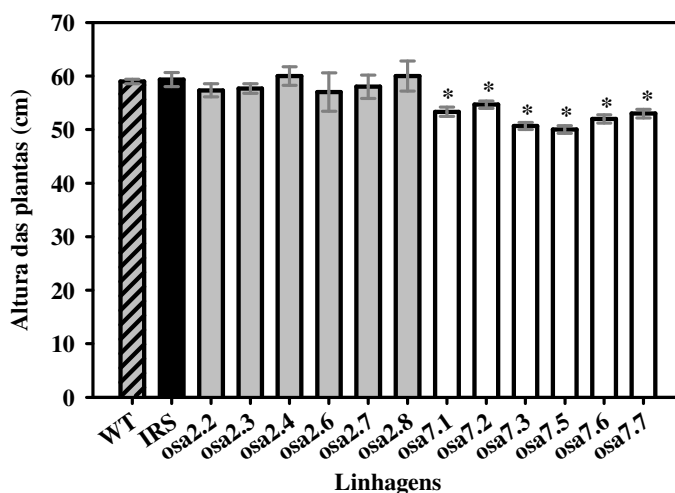


Figura 20. Altura das plantas obtidas no processo de transformação em casa de vegetação em plantas não transformadas (WT), transformadas com vetor IRS vazio e linhagens silenciando os genes *Osa2* e *Osa7* ao final do ciclo. * indica que houve diferença entre as plantas não transformadas (WT) e os mutantes silenciando os genes *Osa2* e *Osa7* ($P < 0,05$).

4.5.6 Efeitos do silenciamento das isoformas *Osa2* e *Osa7* no influxo de NO₃⁻ e crescimento vegetativo em diferentes doses de N-NO₃⁻

a) Acúmulo de massa fresca e influxo de NO₃⁻ nas linhagens mutantes silenciando as isoformas *Osa2* e *Osa7*

As PM H⁺-ATPases desempenham papel fundamental na absorção e fluxo interno de nutrientes, assim como açúcares e hormônios (SONDERGAARD et al., 2004). Apesar do papel fundamental da PM H⁺-ATPase na absorção de nutrientes e crescimento celular, ainda não foi feito trabalho relacionando as isoformas de PM H⁺-ATPase nos processos celulares em arroz. A primeira avaliação feita nos mutantes *osa2* e *osa7* foi avaliar seu desempenho quando cultivadas com diferentes doses de NO₃⁻.

Todas as linhagens *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) apresentaram menor massa fresca de parte aérea e raiz quando comparadas com as plantas transformadas com vetor vazio (IRS) (Tabela 9). As plantas cultivadas sem N durante três dias e com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante durante todo o período experimental (30 dias) apresentaram menor relação raiz/parte aérea, enquanto as plantas cultivadas com 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante não apresentaram redução da relação raiz/parte aérea (Tabela 9).

Os resultados mostram que a isoforma de PM H⁺-ATPase OsA7 possui papel fundamental no crescimento da planta e aparentemente não houve compensação de outra isoforma de PM H⁺-ATPase nos mutantes *osa7*. Outro fato curioso foi a redução do

crescimento da raiz em relação à parte aérea nas plantas cultivadas sem N durante três dias e com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante.

Tabela 9. Massa fresca (MF) de parte aérea (PA) e raiz, assim como relação raiz/parte aérea (R/PA) das linhagens mutantes silenciando *Osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) cultivadas durante três dias sem N (deficiência), 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante por 30 dias, ressurgimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ após três dias de deficiência e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante durante 30 dias. Como controle foram usadas plantas transformadas com o vetor vazio (IRS) sem a inserção de qualquer amiRNA.

Sem N (deficiência)			
	MF PA	MF raiz	Razão R/PA
IRS	6,06	3,23	0,54
<i>osa7.1</i>	3,02 *	1,30 *	0,43 *
<i>osa7.2</i>	3,69 *	1,65 *	0,45 *
<i>osa7.3</i>	4,94 *	2,27 *	0,46 *
0,2 mM N-NO ₃ ⁻ constante			
	MF PA	MF raiz	Razão R/PA
IRS	2,72	1,59	0,58
<i>osa7.1</i>	2,41 *	1,18 *	0,49 *
<i>osa7.2</i>	2,49 *	1,26 *	0,51 *
<i>osa7.3</i>	2,67 *	1,40 *	0,52 *
0,2 mM N-NO ₃ ⁻ ressurgimento			
	MF PA	MF raiz	Razão R/PA
IRS	5,33	2,86	0,54
<i>osa7.1</i>	3,53 *	1,61 *	0,46 *
<i>osa7.2</i>	3,16 *	1,78 *	0,56
<i>osa7.3</i>	3,54 *	1,98 *	0,56
2,0 mM N-NO ₃ ⁻ constante			
	MF PA	MF Raiz	Razão R/PA
IRS	6,69	2,56	0,38
<i>osa7.1</i>	4,84 *	1,66 *	0,34
<i>osa7.2</i>	4,04 *	1,70 *	0,42
<i>osa7.3</i>	4,30 *	1,84 *	0,43

* representa diferença significativa entre as linhagens do mutante *osa7* em relação à planta controle IRS pelo teste F (P<0,05).

Plantas em deficiência de N ou cultivadas com baixa dose de N tendem a aumentar a produção de raiz para aumentar a absorção de N, assim como maior atividade da PM H⁺-ATPase nas raízes (SOUZA e FERNANDES, 2006; SANTOS et al., 2009; DUBY e BOUTRY 2009; SPERANDIO et al., 2011).

O aumento da produção de raízes nas plantas cultivadas sem N e com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante é evidenciado pela maior relação R/PA na planta controle (IRS) de 0,54 e 0,58, respectivamente, enquanto as plantas cultivadas com 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante apresentam relação R/PA de 0,38 (Tabela 9). O crescimento da raiz em condições limitantes de N é uma resposta ao stress nutricional e, as linhagens mutantes *osa7* apresentaram menor resposta quando submetidas a baixas doses de N. Os resultados corroboram com HARUTA e SUSSMAN (2012), que estudaram mutantes de *Arabidopsis* sem a isoforma de PM H⁺-ATPase *AHA1* e *AHA2*, verificando que as plantas mutantes apresentam menor adaptação às condições de estresse nutricional.

As linhagens do mutante *osa2* não apresentaram diferença na massa fresca de raiz e parte aérea comparado com as plantas controle (IRS), com exceção da linhagem *osa2.2* no tratamento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante e 0,2 mM de N-NO₃⁻ ressurgimento, além da linhagem *osa2.4* no ressurgimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ (Tabela 10). Também não foi verificada alteração na relação R/PA das plantas mutantes, seguindo o mesmo padrão da

planta controle. Os resultados nos mutantes *osa2* comparados aos obtidos com os mutantes *osa7* sugerem que a isoforma *OsA2* possui menor participação no crescimento vegetal. A relação R/PA nos mutantes *osa2* semelhante à planta controle nos tratamentos sem N e 0,2 mM de N-NO₃⁻ mostra que a isoforma *OsA2* possui papel limitado na adaptação do crescimento do sistema radicular a situações de estresse por N.

A deleção da isoforma de arroz *OsA8* também afetou o crescimento da raiz e parte aérea (CHANG et al., 2009). Os resultados de massa fresca de raiz e parte aérea nos mutantes *osa2* e *osa7* mostram a diversidade de funções das isoformas de PM H⁺-ATPase no crescimento das plantas arroz.

A partir da depleção do NO₃⁻ da solução nutritiva foi calculado o influxo desse nutriente nas plantas mutantes *osa2*, *osa7* e IRS (Figura 21). O influxo de NO₃⁻ foi menor nas linhagens mutantes *osa2* e *osa7* no tratamento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante quando comparado com as plantas controle (IRS), enquanto nos tratamentos com 0,2 mM de N-NO₃⁻ ressuprimento e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante não houve alteração do influxo de N-NO₃⁻. A menor absorção de N-NO₃⁻ somente nos mutantes *osa2* e *osa7* cultivadas com baixa dose de N-NO₃⁻ corrobora com os resultados encontrados no Capítulo I comparando as variedades de arroz IAC-47 e Piauí (Tabela 4).

Tabela 10. Massa fresca (MF) de parte aérea (PA) e raiz, assim como relação raiz/parte aérea (R/PA) das linhagens mutantes silenciando *OsA2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) cultivadas durante três dias sem N (deficiência), 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante por 30 dias, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ após três dias de deficiência e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante durante 30 dias. Como controle foram usadas plantas transformadas com o vetor vazio (IRS) sem a inserção de qualquer amiRNA.

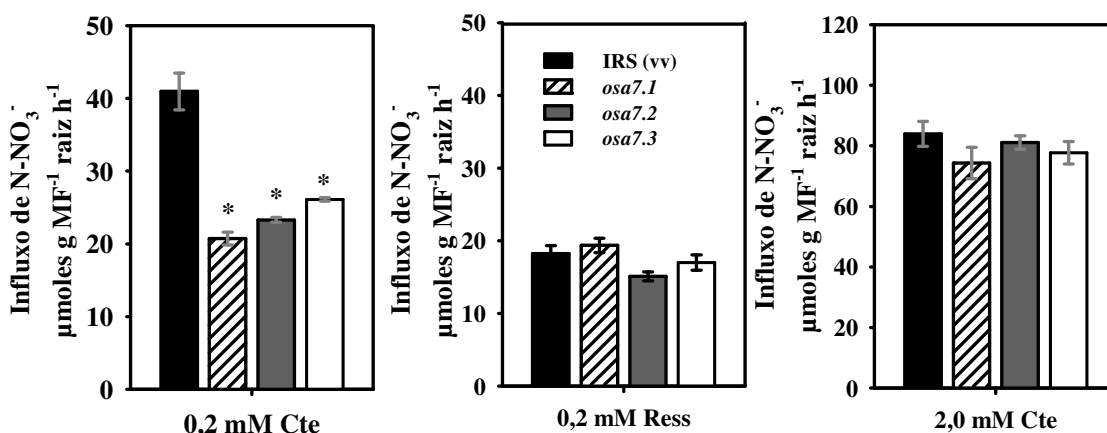
Sem N			
	MF PA	MF raiz	Razão R/PA
IRS	5,84	3,13	0,54
<i>osa2.2</i>	5,37	2,71	0,50
<i>osa2.3</i>	5,79	2,95	0,51
<i>osa2.4</i>	6,23	2,90	0,47
0,2 mM N-NO ₃ ⁻ constante			
	MF PA	MF raiz	Razão R/PA
IRS	2,72	1,78	0,66
<i>osa2.2</i>	2,33 *	1,48 *	0,63
<i>osa2.3</i>	2,61	1,58	0,61
<i>osa2.4</i>	2,76	1,67	0,60
0,2 mM N-NO ₃ ⁻ ressuprimento			
	MF PA	MF raiz	Razão R/PA
IRS	7,17	3,56	0,50
<i>osa2.2</i>	5,38 *	2,61 *	0,49
<i>osa2.3</i>	6,29	3,11	0,50
<i>osa2.4</i>	5,52 *	2,52 *	0,46
2,0 mM N-NO ₃ ⁻ constante			
	MF PA	MF Raiz	Razão R/PA
IRS	7,94	3,35	0,43
<i>osa2.2</i>	6,12	2,49	0,41
<i>osa2.3</i>	6,28	2,41	0,40
<i>osa2.4</i>	7,79	2,89	0,37

* representa diferença significativa entre as linhagens do mutante *osa2* em relação à planta controle IRS pelo teste F (P<0,05).

A absorção de nutrientes depende do gradiente químico entre o citossol e o apoplasto, assim como o gradiente de potencial eletroquímico ($\Delta\psi$) (SOUZA e FERNANDES, 2006). Quanto menor a concentração do NO₃⁻ na solução externa, maior será o potencial de

eletroquímico para que ocorra o influxo do íon na célula. Para aumentar o potencial de membrana é necessário maior atividade da PM H⁺-ATPase (GAXIOLA et al., 2007).

Experimento mutantes *osa7*



Experimento mutantes *osa2*

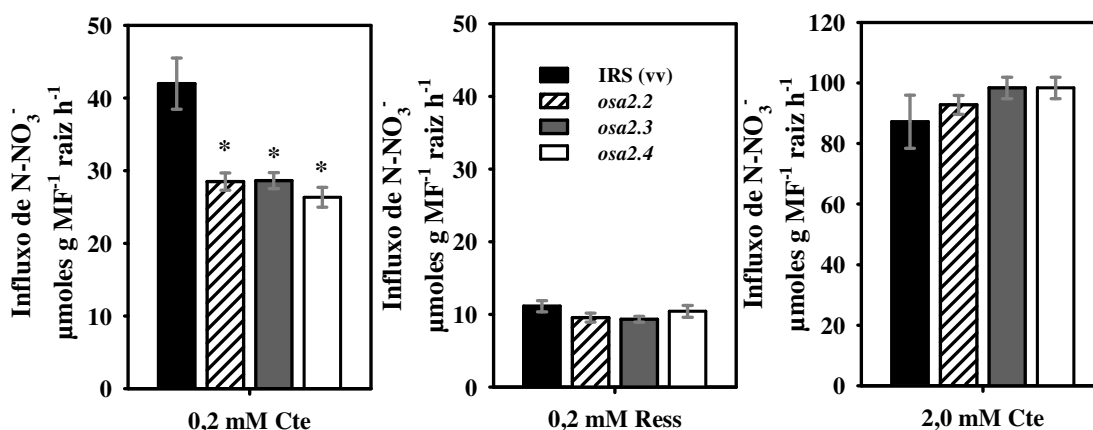


Figura 21. Influxo de N-NO₃⁻ pelas raízes de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*), *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa2* ou *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05).

Não foi avaliado o potencial de membrana nesse estudo, mas o silenciamento das isoformas de PM H⁺-ATPase que são induzidas pelo fornecimento de NO₃⁻ (*OsA2* e *OsA7*) pode ter causado menor potencial de membrana e diminuído a absorção de NO₃⁻ nas plantas cultivadas com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante. Nas plantas cultivadas em alta dose de N-NO₃⁻ (2 mM) não foi observado diferença no influxo de NO₃⁻, provavelmente porque a maior concentração externa do íon diminui a dependência da força próton motriz para a absorção.

A menor adaptação das plantas de *Arabidopsis* mutantes sem a isoforma de PM H⁺-ATPase *AHA2* às condições de estresse por alto pH ou alta concentração externa de K⁺ encontrado no estudo de HARUTA e SUSSMAN (2012), também foi encontrado no presente estudo, onde uma maior ação da PM H⁺-ATPase é necessário para suportar um estresse nutricional como baixa disponibilidade de NO₃⁻. Esse fato é evidenciado pela menor absorção somente nas plantas com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante.

As plantas mutantes *osa2* e *osa7* que sofreram ressurgimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ não apresentaram diferenças no influxo de N-NO₃⁻, provavelmente porque as plantas foram cultivadas por 27 dias com alta dose de N-NO₃⁻ (2 mM) e o período de deficiência de três dias não afetou de forma significativa o status de N.

b) Atividade das bombas de H⁺(PM H⁺-ATPase, V-H⁺-ATPase e H⁺-PPase)

A introdução do amiRNA para silenciar as isoformas de PM H⁺-ATPase *OsA2* e *OsA7* foi eficiente para diminuir o número de transcritos dos genes correspondentes. Desse modo, foi avaliado a atividade da PM H⁺-ATPase, assim como as bombas vacuolares V-H⁺-ATPase e V-H⁺-PPase. A atividade das PM H⁺-ATPase é apresentada na Figura 22.

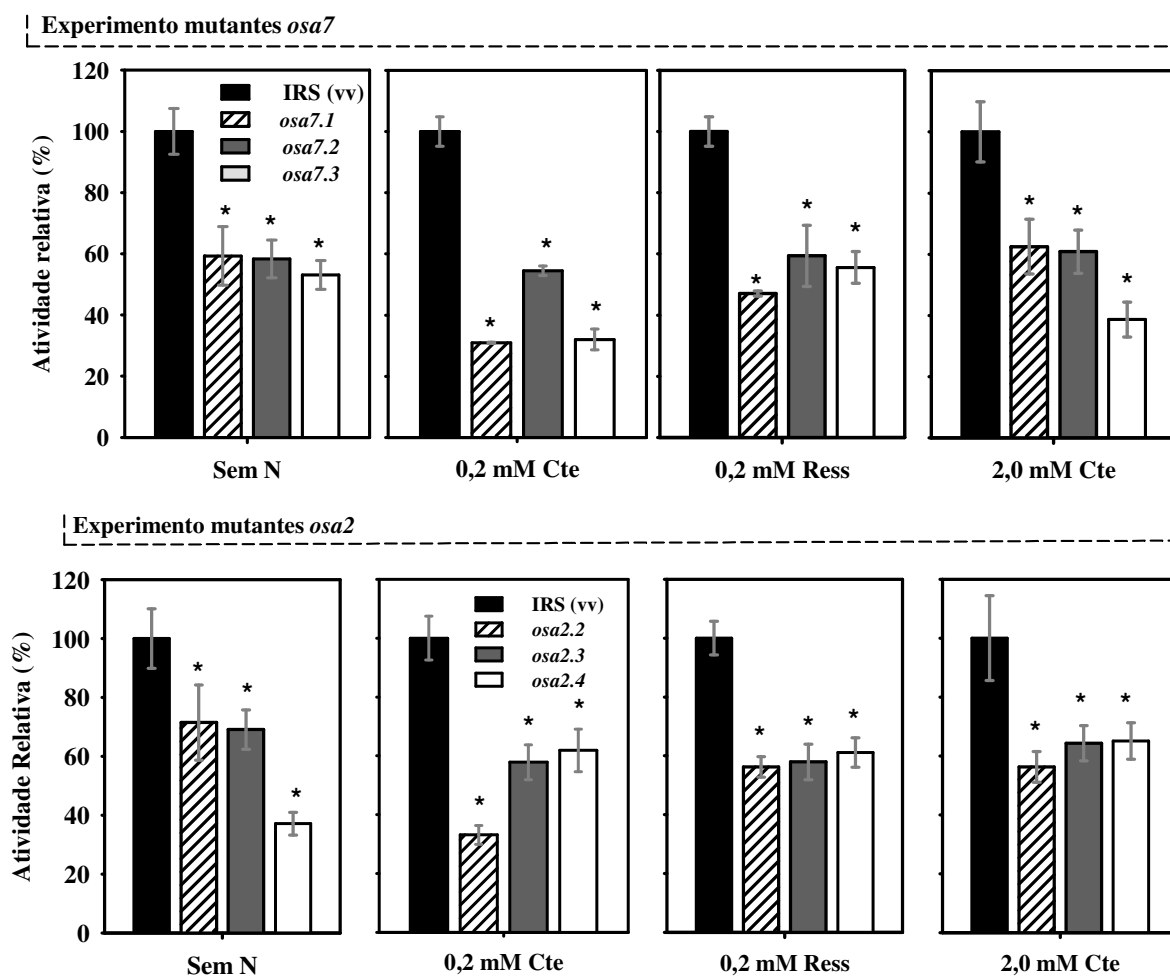


Figura 22. Atividade da PM H⁺-ATPase em raízes de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*), *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N por três dias, 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressurgimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa2* ou *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05). A atividade foi relativizada em relação à planta controle IRS em cada tratamento.

As linhagens mutantes *osa2* e *osa7* apresentaram menor atividade da PM H⁺-ATPase em todos os tratamentos usados, quando comparados com as plantas controle (IRS) (Figura 22). Desse modo, fica evidente que *OsA2* e *OsA7* são isoformas que contribuem de forma significativa para a atividade da PM H⁺-ATPases totais. Curiosamente, o silenciamento da isoforma *OsA8* teve efeito contrário com aumento da atividade da PM H⁺-ATPase por causa

da maior expressão das isoformas *Osa1* e *Osa2* nas raízes de arroz (CHANG et al., 2009). No entanto, a análise da atividade da PM H⁺-ATPase (Figura 22) mostra que as isoformas *Osa2* e *Osa7* são essenciais para as plantas, pois não ocorre compensação de atividade das outras isoformas de PM H⁺-ATPase. A menor absorção de NO₃⁻ no tratamento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ (baixa dose) pode ter sido resultado da menor atividade da PM H⁺-ATPase (Figura 21). Conforme explicado anteriormente, a menor atividade da PM H⁺-ATPase afeta de maneira significativa a absorção de NO₃⁻ em baixas concentrações.

Apesar da menor atividade da PM H⁺-ATPase em ambos os mutantes, somente os mutantes *osa7* apresentam menor crescimento. Os resultados obtidos com massa fresca nos mutantes *osa2* e *osa7* sugerem participação diferenciada das isoformas de PM H⁺-ATPase no crescimento e adaptação ao estresse nutricional. *Osa2* e *Osa7* podem ser as isoformas de PM H⁺-ATPase mais expressas em raiz e parte aérea de arroz (SPERANDIO et al., 2011) e mais prováveis de alterar o crescimento vegetativo. Vale ressaltar que nas plantas cultivadas até o final do ciclo ocorreu redução da massa fresca nas plantas mutantes *osa2* e *osa7* (Figura 19), sugerindo que *Osa2* pode ter participação maior no decorrer do ciclo do arroz ou estar associada à remobilização de açúcares e aminoácidos na etapa reprodutiva.

Os mutantes de PM H⁺-ATPase obtidas nesse trabalho mostram claramente que as isoformas de PM H⁺-ATPase estudadas desempenham funções distintas. Vale ressaltar que as plantas transformadas não tiveram alterados seu ciclo de crescimento e produção, mostrando que uma única isoforma apesar de afetar o crescimento da planta não afeta o ciclo. HARUTA e SUSSMAN (2012) também verificaram que o silenciamento de uma única isoforma de PM H⁺-ATPase em *Arabidopsis* não alterava o ciclo de produção, enquanto o mutante duplo (*aha1-aha2*) foi letal para o crescimento.

A alteração da atividade da PM H⁺-ATPase pode resultar em alteração da estequiometria entre hidrólise de ATP e transporte de H⁺. A diminuição no conteúdo de ATP pode resultar em maior taxa de acoplamento, ou seja, mais H⁺ bombeado por ATP hidrolisado. No entanto, como a taxa de acoplamento H⁺/ATPase pode mudar, a atividade da PM H⁺-ATPase baseado na hidrólise de ATP é mais adequado para estudar o decréscimo do número de sítios ativos da PM H⁺-ATPase.

Também foram analisadas as bombas de H⁺ vacuolares para verificar se ocorre relação entre a atividade da PM H⁺-ATPase com a V-H⁺ATPase e V-H⁺-PPase. ZANDONADI et al. (2010) verificaram que ocorre sincronismo entre a atividade a PM H⁺-ATPase e V-H⁺-ATPase em resposta à aplicação de promotores de crescimento como o ácido húmico e auxina. Não houve alteração da atividade da V-H⁺-ATPase nas plantas mutantes *osa2* e *osa7* nos tratamentos usados (Figura 23).

A V-H⁺-ATPase é a proteína mais abundante no vacúolo, correspondente a 6,5-35% da proteína total do vacúolo (BRUX et al., 2008). V-H⁺-ATPase usa energia da hidrólise do ATP para bombear H⁺ para dentro do vacúolo e permitir a dinâmica de solutos (WANG et al., 2000). A V-H⁺-ATPase é crucial para a coordenação entre bombeamento de H⁺, transporte para o vacúolo e os sinais de transporte que coordenam a atividade da V-H⁺-ATPase e as proteínas de transporte (XIN et al., 2003). No entanto, não houve alteração da atividade da V-H⁺-ATPase nos mutantes *osa2* e *osa7* com menor atividade da PM H⁺-ATPase (Figura 23). A menor absorção de NO₃⁻ nas linhagens mutantes de *osa2* e *osa7* no tratamento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante não alterou a atividade da V-H⁺-ATPase. A atividade da V-H⁺-ATPase é essencial para o acúmulo de NO₃⁻ no vacúolo (KREBS et al., 2010), no entanto, a alteração da atividade da PM H⁺-ATPase e/ou menor absorção de NO₃⁻ não teve influência na atividade da V-H⁺-ATPase.

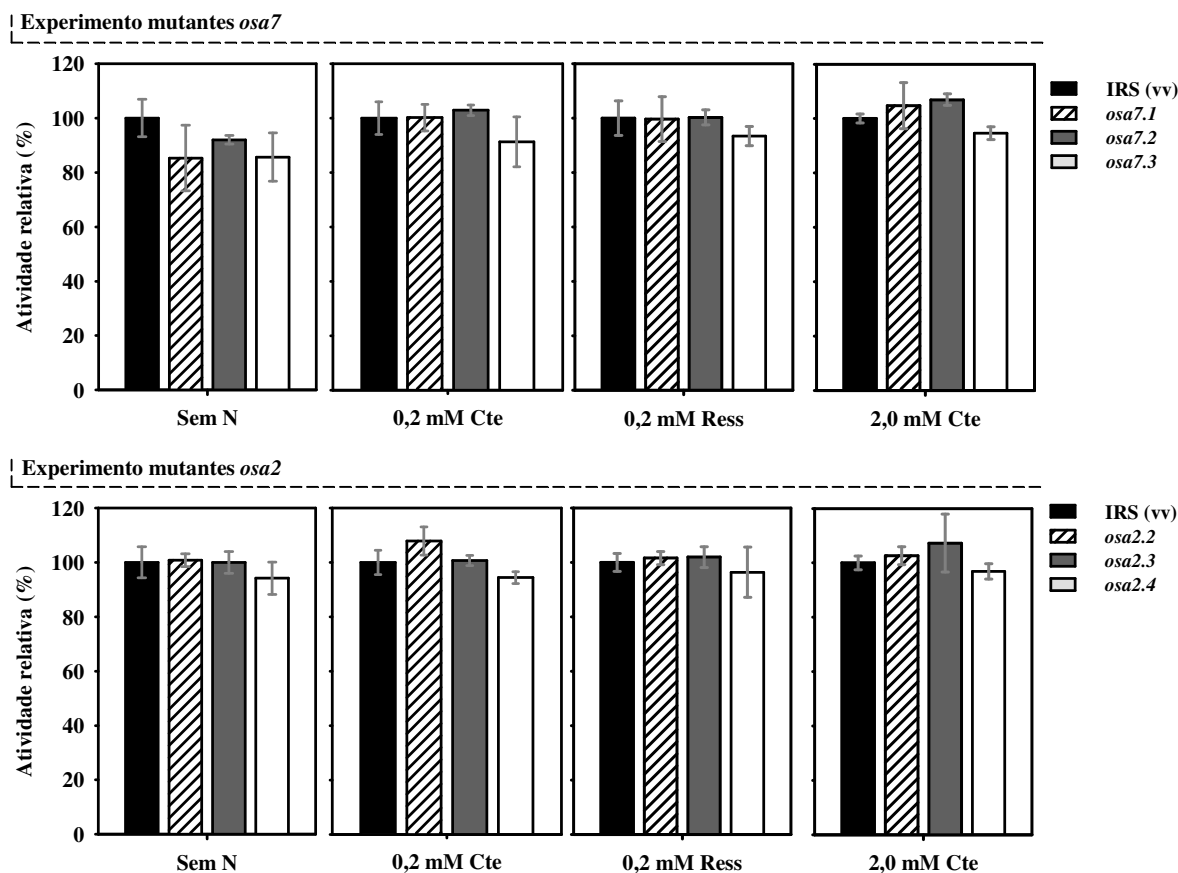


Figura 23. Atividade da V-H⁺-ATPase em raízes de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*), *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N por três dias, 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa2* ou *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05). A atividade foi relativizada em relação à planta controle IRS em cada tratamento.

A V-H⁺-PPase usa a energia da hidrólise do PPi para o bombeamento de H⁺ do citossol para o vacúolo, sendo uma proteína abundante no tonoplasto correspondendo 1-10% (BAO et al., 2006). Também é sugerido que a H⁺-PPase pode estar na membrana plasmática e atuar de forma reversível (Pi + Pi → PPi) (FAÇANHA e DE MEIS, 1998). A H⁺-PPase possui papel importante no crescimento celular, sendo que a superexpressão da isoforma de V-H⁺-PPase AVP1 causa maior crescimento vegetativo e maior tolerância a diversos tipos de estresses abióticos como salinidade e falta de nutrientes (ZHANG et al., 2012).

A atividade da H⁺-PPase foi menor nas linhagens dos mutantes *osa7* em comparação ao controle (IRS), enquanto as linhagens dos mutantes *osa2* não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle IRS (Figura 24).

Curiosamente, os mutantes *osa7* apresentaram menor massa fresca (Tabela 9), enquanto os mutantes *osa2* não apresentaram menor acúmulo de massa fresca em relação ao controle (Tabela 10). O menor crescimento nos mutantes *osa7* pode ser resultado da menor atividade da H⁺-PPase. LI et al. (2005) superexpressaram e silenciaram a isoforma AVP1 (H⁺-PPase) e verificaram que existe correlação entre crescimento e atividade da H⁺-PPase. Esses autores ainda verificaram que existe correlação entre a atividade da V-H⁺-PPase e da PM H⁺-ATPase.

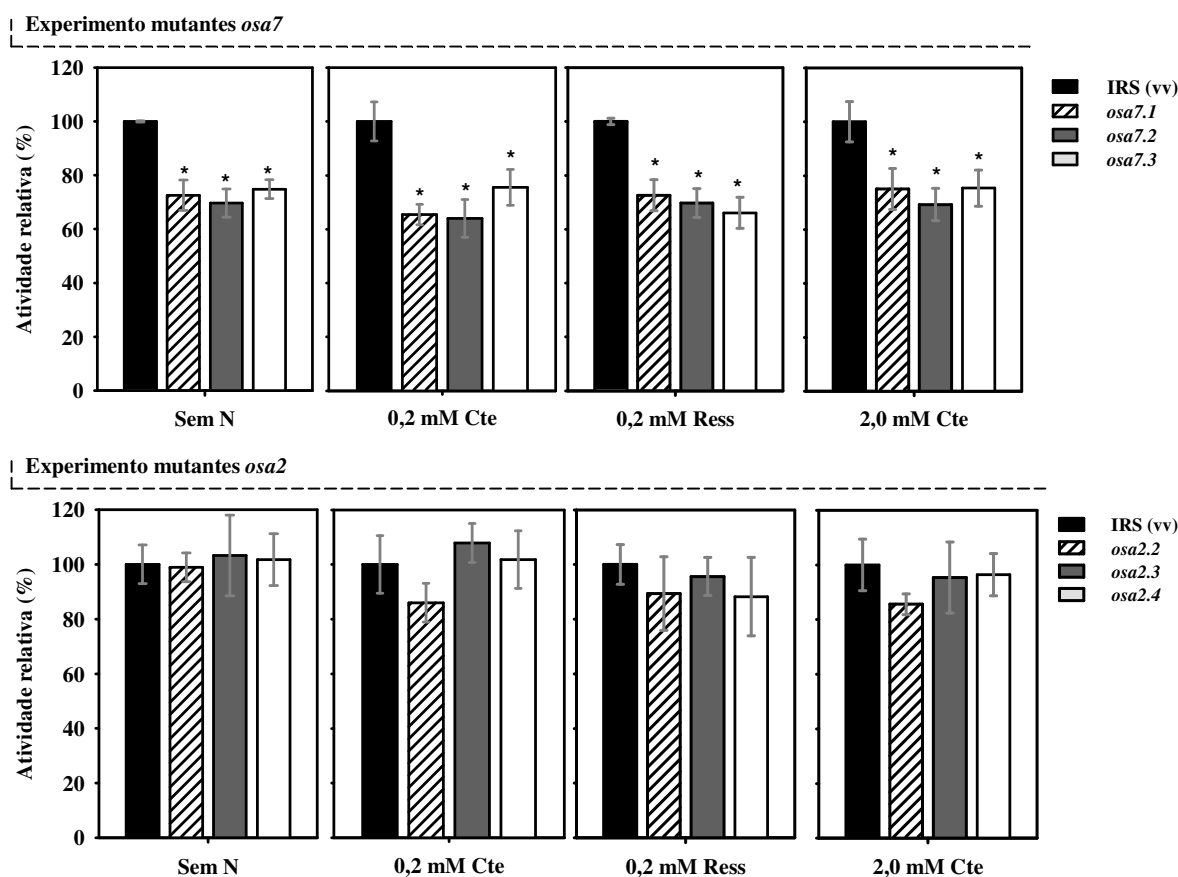


Figura 24. Atividade da V-H⁺-PPase em raízes de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*), *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N por três dias, 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa2* ou *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F (P<0,05). A atividade foi relativizada em relação à planta controle IRS em cada tratamento.

Um modelo formulado por GAXIOLA et al. (2012) relacionando a superexpressão da H⁺-PPase com a atividade da PM H⁺-ATPase e maior crescimento vegetativo envolve o carregamento do floema e transporte de açúcares na planta. A maior expressão da H⁺-PPase aumenta a abundância dessa enzima na plasmalema das células companheiras do floema, que operam no sentido contrário (Pi + Pi → PPi) com entrada de H⁺ no citossol. Desse modo, o PPi que é usado como co-fator de enzimas da glicólise (ex.: frutose-6-P) aumenta a taxa de formação de ATP que consequentemente aumenta a atividade da PM H⁺-ATPase. A maior atividade da PM H⁺-ATPase aumenta o carregamento do floema porque a sacarose é carregada em simporte com dois H⁺ pelo transportador de sacarose (GAXIOLA et al., 2012).

Outra possibilidade para a menor atividade da V-H⁺-PPase no mutante *osa7* pode ter sido provocado pelo menor crescimento vegetativo. As reações de biosíntese na planta (DNA, RNA, proteína, etc) gera PPi como subproduto, podendo o menor crescimento dos mutantes *osa7* ter gerado menor produção de PPi que diminuiu a atividade da V-H⁺-PPase. Tecidos meristemáticos em pleno crescimento possuem alta produção de PPi, aumentando a atividade da V-H⁺-PPase nesses tecidos (SANTOS et al., 2009). Provavelmente a isoforma de PM H⁺-ATPase *OsA7* pode estar diretamente envolvida no crescimento vegetativo de acordo com a teoria do crescimento ácido.

c) Análise de expressão gênica das isoformas de PM H⁺-ATPase (*Osa*) e transportadores de NO₃⁻ de alta afinidade (*OsnRT2*) nas plantas de arroz mutantes *osa7* e *osa2*

Apesar de *Osa2* e *Osa7* serem as isoformas de PM H⁺-ATPase mais expressas em raízes de arroz (SPERANDIO et al., 2011), é preciso verificar se houve alteração de expressão de outras isoformas de PM H⁺-ATPase para uma possível compensação decorrente do silenciamento de *Osa2* ou *Osa7*. A expressão das isoformas de PM H⁺-ATPase nos mutantes *osa7* é apresentada na Figura 25. O silenciamento da isoforma *Osa7* ocorreu de maneira específica, não ocorrendo aumento de expressão de outra isoforma de PM H⁺-ATPase (Figura 25). Como esperado, não foi detectada expressão dos genes *Osa4*, *Osa6*, *Osa9* e *Osa10* pois são pouco expressos em raízes de arroz (ARANGO et al., 2003; SPERANDIO et al., 2011).

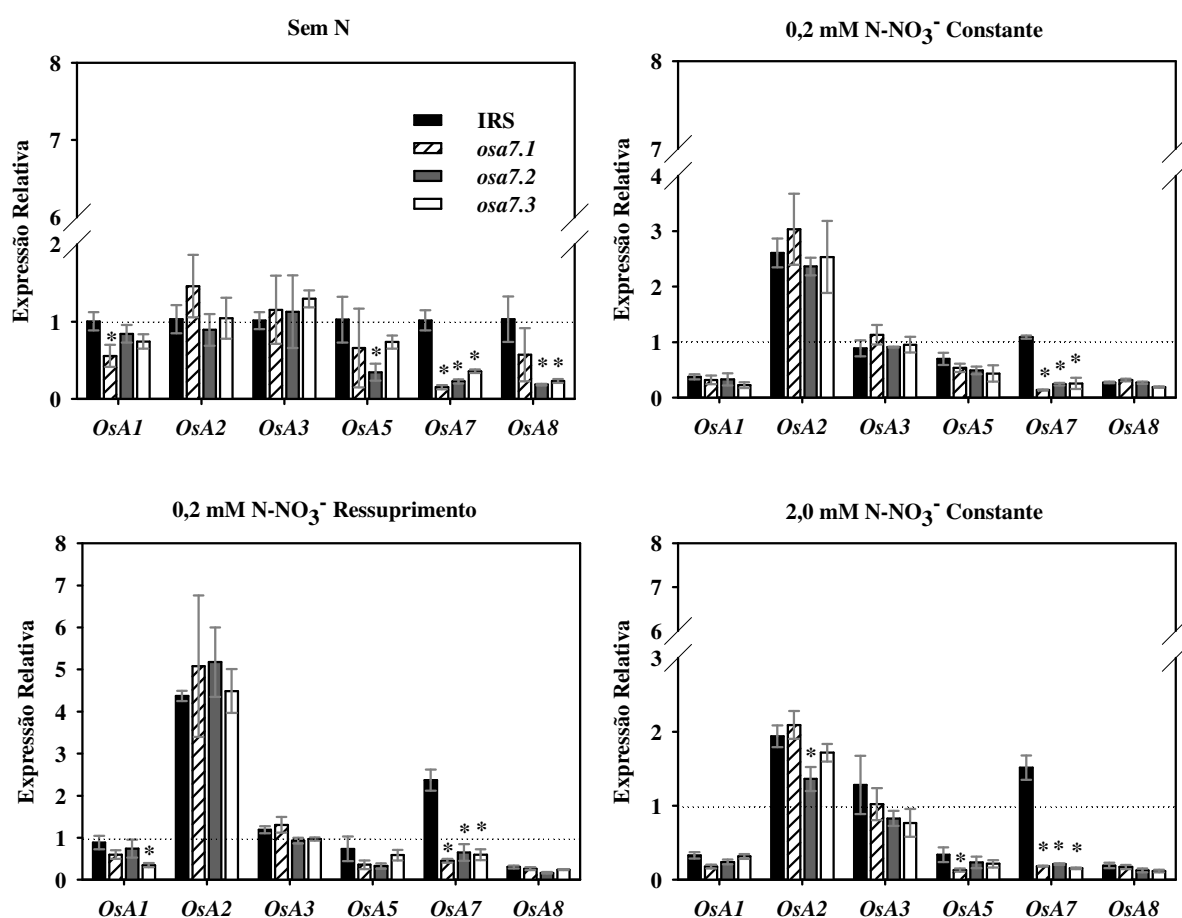


Figura 25. Expressão das isoformas de PM H⁺-ATPase (*Osa*) em raízes de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. Como amostra referência foi usada a planta IRS sem N (valor 1). Os valores de expressão de cada gene foi relativizado usando os genes constitutivos *OsaAct*, *OsaUBQ5* e *OsaEF1-α*. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

Algumas linhagens apresentaram menor expressão de outras isoformas de *Osa* em relação ao controle IRS, como nas plantas cultivadas sem N. *Osa5* teve menor expressão na linhagem *osa7.2* e *Osa8* nas linhagens *osa7.2* e *osa7.3* (Figura 25). No entanto, nos outros tratamentos não houve alteração da expressão de *Osa5* e *Osa7*. Por outro lado, *Osa7* foi silenciada nas três linhagens *osa7* em todos os tratamentos, mostrando que as diferenças no acúmulo de massa fresca e absorção de NO₃⁻ foi provocado pelo silenciamento do gene *Osa7*.

Um possível problema para o estudo do efeito do silenciamento da isoforma *OsA7* no crescimento e absorção de NO_3^- seria a compensação de expressão de outra isoforma de PM H^+ -ATPase. CHANG et al. (2009) verificaram que em plantas de arroz silenciando a isoforma de PM H^+ -ATPase *OsA8*, ocorria maior expressão das isoformas *OsA1*, *OsA2* e *OsA3*, levando ao aumento da atividade da PM H^+ -ATPase. Em *Arabidopsis*, o silenciamento das isoformas *AHA1* ou *AHA2* não provocou compensação de expressão de outra isoforma de PM H^+ -ATPase (HARUTA et al., 2010). Os resultados obtidos silenciando *OsA7* estão de acordo com HARUTA et al. (2010), possivelmente porque do mesmo modo que *AHA1* e *AHA2* são as mais expressas em *Arabidopsis*, *OsA7* é altamente expressa em arroz enquanto *OsA8* possui baixa expressão (SPERANDIO, 2011).

Do mesmo modo que os mutantes *osa7*, o amiRNA inserido nos mutantes *osa2* foi específico para a isoforma *OsA2* (Figura 26). Alguns genes não alvo do amiRNA apresentaram menor expressão nas linhagens mutantes, como *OsA1* na linhagem *osa2.4* nas plantas cultivadas sem N em comparação com o controle IRS. O silenciamento de *OsA2* ocorreu em todos os tratamentos usados e não houve compensação de expressão de outra isoforma.

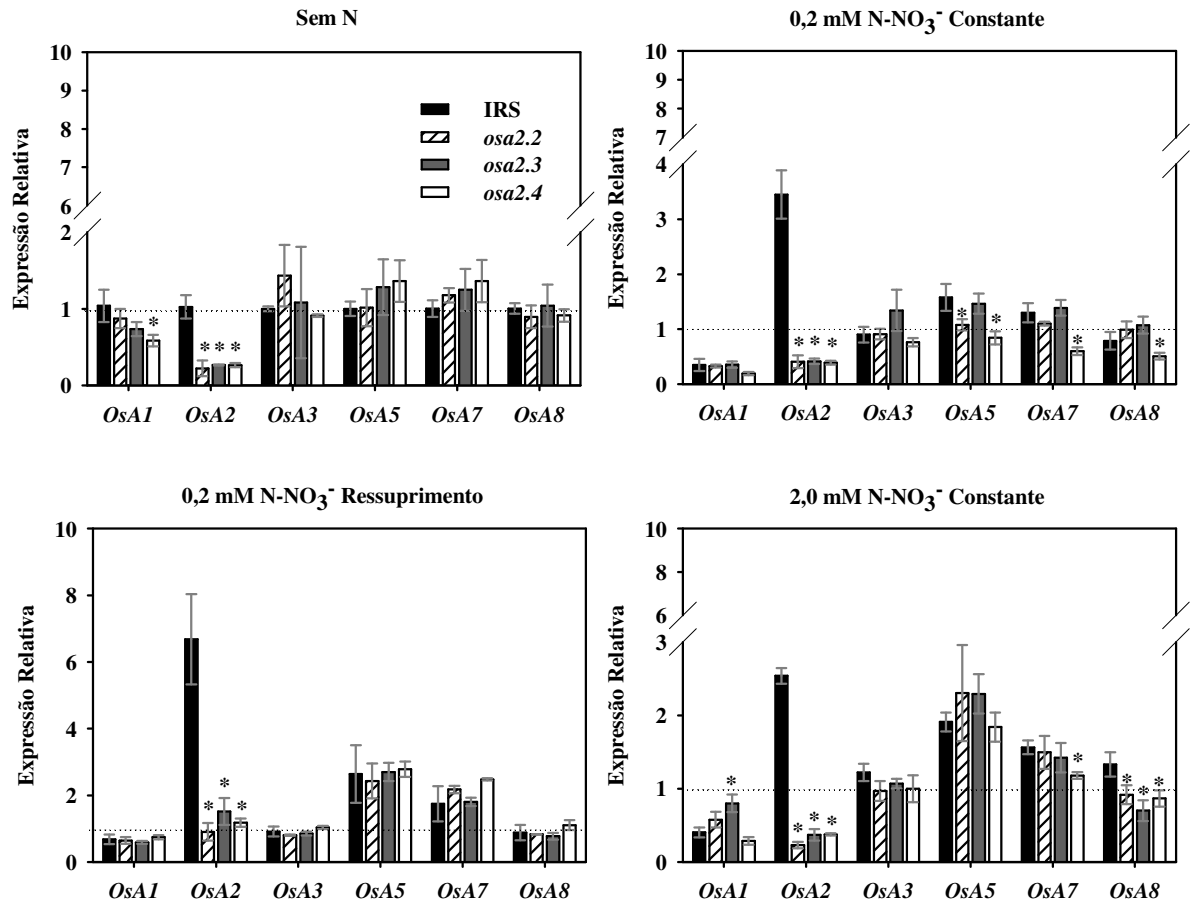


Figura 26. Expressão das isoformas de PM H^+ -ATPase (*OsA*) em raízes de arroz das linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. Como amostra referência foi usada a planta IRS sem N (valor 1). Os valores de expressão de cada gene foi relativizado usando os genes constitutivos *OsAct*, *OsUBQ5* e *OsEF1- α* . * indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

Apesar de não ter ocorrido regulação transcricional nos mutantes *osa2* e *osa7*, a regulação pós-traducional pode ocorrer. Mudança na fosforilação do resíduo de Thr na extremidade C-terminal da PM H⁺-ATPase é um forte alvo de regulação da atividade da PM H⁺-ATPase (GAXIOLA et al., 2007; FULGSANG et al., 2011; GAXIOLA et al., 2012). Em tabaco, somente 44% da isoforma PMA4 está ativa na forma fosforilada e PMA4 32% (BOBIK et al., 2010). Isso significa que pode ocorrer ativação da PM H⁺-ATPase sem ocorrer aumento de expressão de qualquer isoforma de PM H⁺-ATPase. HARUTA et al. (2010) verificaram que com o silenciamento de *AHA1* ou *AHA2* em *Arabidopsis* ocorria uma pequena compensação da fosforilação da PM H⁺-ATPase, no entanto não foi suficiente para compensar o bombeamento de H⁺, já que os mutantes *aha1* e *aha2* apresentaram menor bombeamento de H⁺. É provável que tenha ocorrido aumento da fosforilação da PM H⁺-ATPase para compensar a menor expressão de *OsA2* ou *OsA7*, no entanto, não foi suficiente para compensar o silenciamento efetuado, visto que a atividade da PM H⁺-ATPase foi menor nos mutantes *osa7* e *osa2* (Figura 22). O silenciamento da isoforma *PMA4* de tabaco também diminuiu a atividade da PM H⁺-ATPase (ZHAO et al., 2000).

Deve ser ressaltado que cada isoforma de PM H⁺-ATPase sofre regulação diferenciada, visto que a região C-terminal (região regulatória) possui 36% de semelhança entre as diferentes isoformas de PM H⁺-ATPases, enquanto a região central possui 73% de semelhança entre as diferentes isoformas (BAXTER et al., 2003). Apesar da dificuldade para estudar a fosforilação de cada isoforma, a atividade da PM H⁺-ATPase é o método mais rápido e prático para estudar as bombas de H⁺.

Apesar do silenciamento de uma única isoforma de PM H⁺-ATPase afetar a atividade da enzima, a superexpressão da isoforma *PMA4* em tabaco não afetou a atividade da PM H⁺-ATPase e o crescimento das plantas de tabaco (GÉVAUDANT et al., 2007). Esses autores concluem que apesar da superexpressão de *PMA4*, não ocorre a ativação da PM H⁺-ATPase pela fosforilação, como comprovado pela superexpressão da *PMA4* sem a região C-terminal, onde a enzima permaneceu ativa. Por outro lado, a superexpressão de *OsA8* em arroz aumentou a colonização micorrízica e absorção de P pela planta, por causa da dependência de *OsA8* para energizar o transporte de P da micorriza para a planta pelo espaço periarbuscular (WANG et al., 2014). Apesar da isoforma *OsA8* possuir baixa expressão em relação às outras isoformas, essa isoforma está ligada à absorção de P pelas raízes.

Os resultados de atividade da PM H⁺-ATPase (Figura 22) juntamente com os resultados de expressão gênica das isoformas de PM H⁺-ATPase indicam claramente a importância das isoformas *OsA2* e *OsA7* para a atividade da PM H⁺-ATPase. O silenciamento via amiRNA da isoforma de PM H⁺-ATPase *MtHA1* de *M. truncatula* permitiu KRAJINSKI et al. (2014) concluir que *MtHA1* é uma isoforma de PM H⁺-ATPase ativa em *M. truncatula*. Do mesmo modo, o silenciamento específico de *OsA2* ou *OsA7* afetou a atividade da PM H⁺-ATPase (Figura 22), indicando que *OsA2* e *OsA7* de fato possuem atividade catalítica em raízes de arroz e são importantes na formação da força próton motriz.

Plantas de *Arabidopsis* com menor força próton motriz por causa do silenciamento de *AHA1* ou *AHA2* apresentaram crescimento reduzido em condições que afetam o gradiente de H⁺, como alto pH (8,0) ou alta concentração de KCl (100 mM) (HARUTA et al., 2010). Os mutantes *osa2* e *osa7* apresentaram menor absorção de NO₃⁻ em baixa dose NO₃⁻ (0,2 mM constante) (Figura 21) que necessita de maior força próton motriz para a absorção (SOUZA e FERNANDES, 2006). Apesar de ambas as isoformas afetarem a absorção de NO₃⁻ em baixa dose, *OsA2* e *OsA7* não possuem funções totalmente redundantes, visto que *OsA7* afetou o crescimento (Tabela 9).

Os resultados de expressão permitem também verificar o padrão de expressão das isoformas de PM H⁺-ATPase em plantas cultivadas com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, já que SPERANDIO et al. (2011) cultivaram plantas sem N, ressuprimento com 2,0 mM de N-NO₃⁻ e

constante com 2,0 mM de N-NO₃⁻. Quando plantas de arroz são cultivadas constantemente com 0,2 mM de N-NO₃⁻, somente *OsA2* apresentou indução da expressão. A indução de *OsA2* no tratamento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ não foi capaz de compensar o silenciamento de *OsA7* na atividade da PM H⁺-ATPase (Figura 22).

A análise das isoformas de PM H⁺-ATPase no banco de dados “NCBI Unigene” mostra que os genes *OsA* são diferencialmente expressos na planta de arroz (Tabela 11). *OsA2* e *OsA7* são expressos em toda a planta (flor, folha, panícula, raiz, semente e colmo), sendo que *OsA7* é a isoforma de PM H⁺-ATPase mais expressa em arroz. A alta expressão de *OsA2* e *OsA7* na parte reprodutiva de arroz (flor, panícula e semente) pode explicar em parte porque o silenciamento de *OsA2* e *OsA7* afetou a produção de sementes nos mutantes *osa2* e *osa7* (Figura 19). De acordo com a contagem de transcritos do banco de dados “NCBI Unigene” *OsA7* é a isoforma de PM H⁺-ATPase mais expressa (Tabela 11), afetando o crescimento de raiz e parte aérea no experimento de casa de vegetação e fitotron (Figura 19, Tabela 9, Tabela 10). As isoformas *OsA4*, *OsA6*, *OsA9* e *OsA10* que não foram detectadas na análise de expressão por PCR em tempo real, apresentaram contagem zero nas raízes no “NCBI Unigene”. Curiosamente, *OsA4*, *OsA6*, *OsA9* e *OsA10* são expressos somente na parte reprodutiva de arroz (panícula e flor), mostrando a importância da PM H⁺-ATPase na fase reprodutiva com expressão de isoformas específicas.

Tabela 11. Representação do perfil de EST (Expressed Sequence Tag) das isoformas PM H⁺-ATPase (*OsA*) de acordo com o banco de dados “NCBI Unigene” para arroz ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/UGOrg.cgi?TAXID = 4530](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/UGOrg.cgi?TAXID=4530)).

	Total	Calos	Flor	Folha	Panícula	Raiz	Semente	Colmo
<i>OsA1</i>	736	24	565	0	0	0	123	24
<i>OsA2</i>	3423	370	1272	28	44	148	1049	512
<i>OsA3</i>	243	37	59	28	36	29	30	24
<i>OsA4</i>	199	0	148	0	51	0	0	0
<i>OsA5</i>	6	6	0	0	0	0	0	0
<i>OsA6</i>	74	0	52	0	22	0	0	0
<i>OsA7</i>	12377	1308	1547	905	1174	2321	3640	1482
<i>OsA8</i>	35	12	7	0	0	0	0	16
<i>OsA9</i>	59	0	37	0	22	0	0	0
<i>OsA10</i>	125	0	52	0	73	0	0	0
Total	17277	1757	3739	961	1422	2498	4842	2058

Os principais transportadores de NO₃⁻ expressos em arroz são *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* (ARAKI e HASEGAWA, 2006; FENG et al., 2011), assim como a proteína *OsNAR2.1* responsável pela atividade dos transportadores de NO₃⁻ *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* (YAN et al., 2011). Os transportadores de NO₃⁻ *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* são de alta afinidade e são induzidos pela presença de NO₃⁻ e reprimidos por feedback pelos produtos da assimilação de N (KRAPP et al., 2014). Desse modo, para analisar o efeito do silenciamento de *OsA2* e *OsA7* na expressão dos transportadores de NO₃⁻, foi analisado a expressão dos genes *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* nas linhagens mutantes *osa2* e *osa7*.

A Figura 27 mostra a expressão dos genes *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* no mutante *osa7*. Nos tratamentos sem N e 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, a expressão de *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* foi similar nas linhagens mutantes *osa7* e no controle IRS, exceção para *OsNRT2.1* na linhagem *osa7.3* no tratamento sem N que apresentou maior expressão que o controle IRS e na linhagem *osa7.1* no tratamento com 0,2 mM de N-NO₃⁻. O tratamento com ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ não apresentou diferença de expressão entre os transportadores de NO₃⁻ analisados e com 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante as três linhagens *osa7* apresentaram menor expressão de *OsNRT2.1* e *OsNAR2.1*.

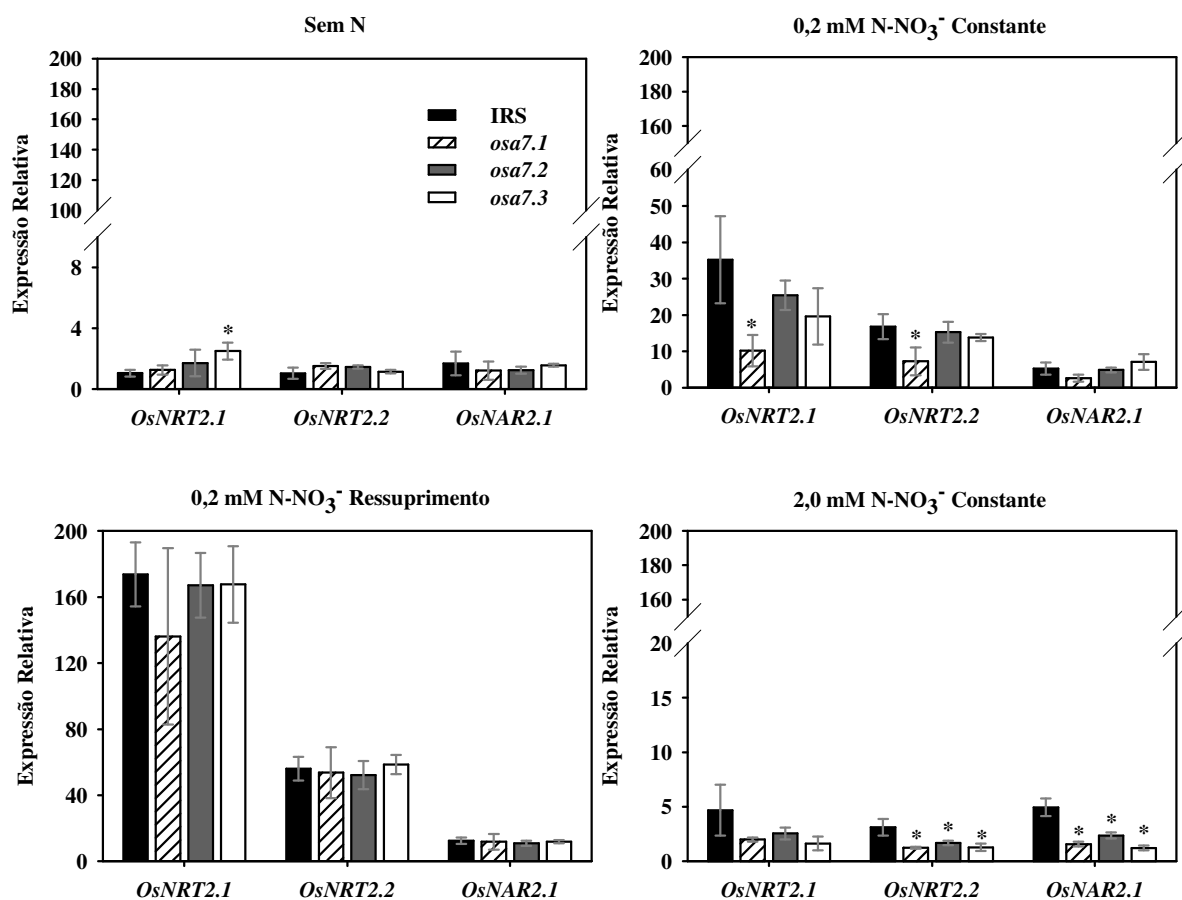


Figura 27. Expressão dos transportadores de NO_3^- de alta afinidade (*OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*) e proteína *OsNAR2.1* em raízes de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. Como amostra referência foi usada a planta IRS sem N (valor 1). Os valores de expressão de cada gene foi relativizado usando os genes constitutivos *OsAct*, *OsUBQ5* e *OsEF1- α* . * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

O principal objetivo de analisar a expressão dos principais transportadores de NO_3^- em arroz é avaliar se as diferenças de absorção no mutante *osa7* em relação à planta controle IRS possuem relação com os transportadores de NO_3^- . Todas as linhagens *osa7* cultivadas com 0,2 mM de N-NO_3^- constante apresentaram redução da absorção de NO_3^- , no entanto, como somente *osa7.1* apresentou menor expressão de *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* a menor absorção de NO_3^- nos mutantes *osa7* não está relacionado com a expressão dos transportadores de NO_3^- . Deve-se ressaltar que ocorreu indução de 30, 20 e 10 vezes na planta controle IRS para *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1*, respectivamente (Figura 27).

No ressoprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- ocorreu a indução dos transportadores de NO_3^- , sendo de 160, 60 e 20 vezes para *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* respectivamente (Figura 27). O ressoprimento com baixa dose de NO_3^- possui alto efeito indutor da expressão dos transportadores de NO_3^- da família *NRT2*, no entanto, em poucas horas ocorre forte inibição da expressão por feedback negativo da assimilação do NO_3^- e/ou ciclo circadiano da planta (ARAKI e HASEGAWA, 2006; SPERANDIO, 2011; BUCHER et al., 2014). Em *Arabidopsis*, apesar da forte indução do gene *NRT2.1* ocorre forte controle pós-transcricional,

visto que o aumento de expressão de *NRT2.1* não corresponde ao aumento do transportador *NRT2.1* na membrana plasmática (LAUGIER et al., 2012). Ainda não foi verificado se ocorre forte regulação pós-transcricional do gene *OsNRT2.1* em arroz, no entanto é provável que o controle pós-transcricional ocorra por causa da falta de correlação entre expressão de *OsNRT2.1* e absorção de NO_3^- (KATAYAMA et al., 2009).

No tratamento com 2,0 mM de N-NO_3^- constante, a expressão de *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* foi reduzida nos mutantes *osa7*. A análise das frações solúveis posteriormente poderá informar as diferenças de expressão entre a expressão dos transportadores de NO_3^- nas plantas controle IRS e mutantes *osa7*. Os mutantes *osa2* apresentaram o mesmo padrão de expressão dos transportadores de NO_3^- quando comparada com as plantas controle IRS, com exceção das linhagens *osa2.4* no tratamento sem N e 0,2 mM de N-NO_3^- constante (Figura 28). A linhagem *osa2.2* apresentou maior expressão dos genes *OsNRT2.1* e *OsNAR2.1* em comparação com as plantas controle IRS no tratamento 2,0 mM de N-NO_3^- constante.

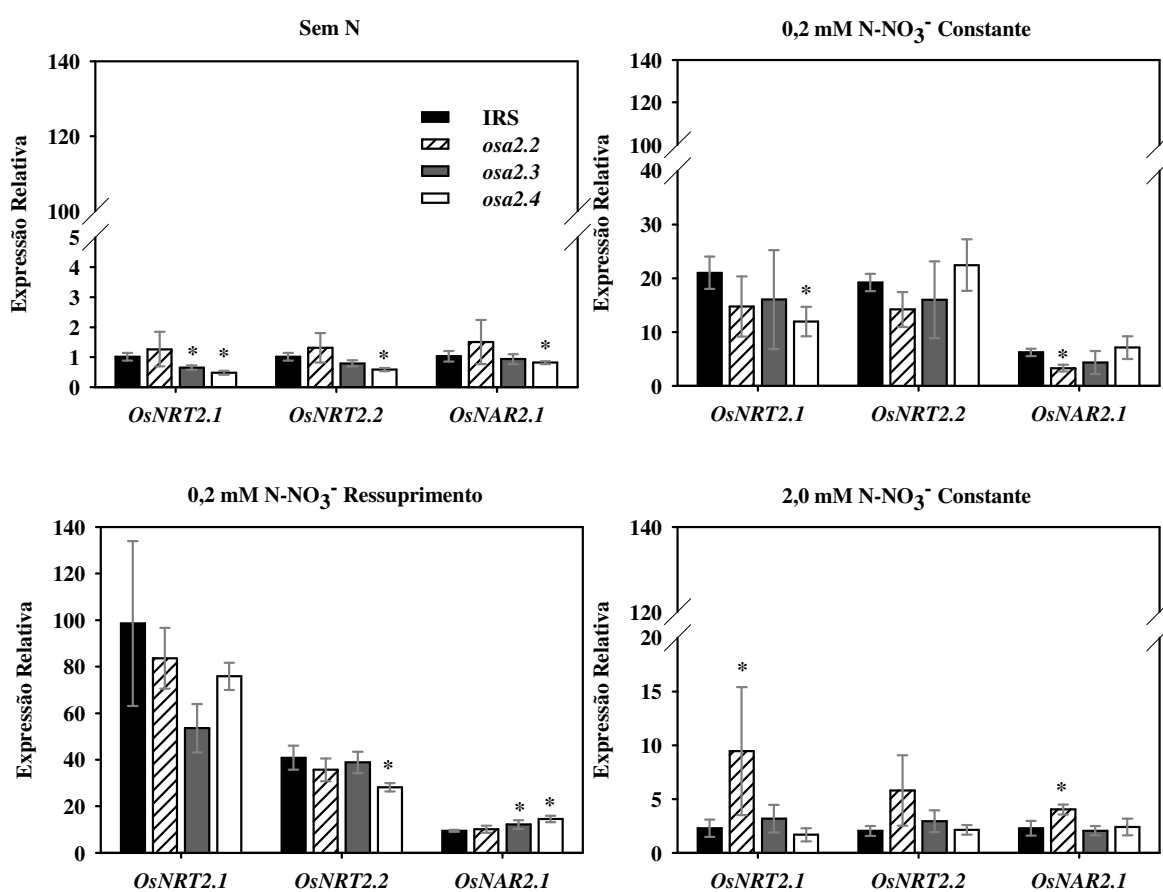


Figura 28. Expressão dos transportadores de NO_3^- de alta afinidade (*OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*) e proteína *OsNAR2.1* em raízes de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. Como amostra referência foi usada a planta IRS sem N (valor 1). Os valores de expressão de cada gene foi relativizado usando os genes constitutivos *OsAct*, *OsUBQ5* e *OsEF1- α* . * indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

Comparando a expressão dos genes *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* nas plantas IRS com ressuprimento ou dose constante de 0,2 mM de N-NO_3^- , ocorreu a maior indução dos genes no ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- , no entanto o maior influxo de N-NO_3^- foi

observado no tratamento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante (Figura 21). Isso é um forte indício que o controle pós-traducional esteja ocorrendo nos genes responsáveis pela absorção de NO₃⁻ em arroz, do mesmo modo que LAUGIER et al. (2012) observaram em *Arabidopsis*.

A superexpressão da V-H⁺-PPase em trigo aumentou o conteúdo total de N na parte aérea, no entanto, não houve alteração da expressão dos transportadores de N (LI et al., 2014). Esses autores atribuem o aumento de N na planta por causa do aumento da massa de raiz. A superexpressão da V-H⁺-PPase é conhecida por aumentar a massa da planta com aumento da atividade da PM H⁺-ATPase (LI et al., 2005). Os resultados obtidos com os mutantes de arroz *osa7* e *osa2* estão de acordo com a literatura, onde a alteração da atividade da PM H⁺-ATPase não afeta a expressão dos transportadores de N. Desse modo, a diminuição da absorção de NO₃⁻ nos mutantes *osa2* e *osa7* cultivados com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante (Figura 21) foi decorrente da menor atividade da PM H⁺-ATPase (Figura 22) provocado pelo silenciamento específico de *OsA7* (Figura 25) e *OsA2* (Figura 26).

d) Análise das frações nitrogenadas (N-NO₃⁻, N-NH₄⁺ e N-amino livre) e açúcares solúveis nas plantas de arroz mutantes *osa7* e *osa2*

O conteúdo de N-NO₃⁻ foi alterado nas plantas mutantes *osa7* (Figura 29). Com exceção do tratamento sem N, as plantas cultivadas com 0,2 mM de N-NO₃⁻ (constante e ressuprimento) e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante apresentaram menores teores de N-NO₃⁻ nas raízes. O menor conteúdo de N-NO₃⁻ nas linhagens mutantes comparado com a planta controle (IRS) foi influenciado pelo menor crescimento vegetativo provocado pelo silenciamento da isoforma *OsA7* (Tabela 9). Nas raízes das plantas cultivadas com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, a concentração de N-NO₃⁻ foi menor nas linhagens mutantes *osa7* (Figura anexo 2).

Os mutantes silenciando o gene *OsA2* não apresentaram menor crescimento da raiz e parte aérea (Tabela 10) e poderão fornecer melhores resultados da alteração da absorção de NO₃⁻ em baixa dose (0,2 mM de N-NO₃⁻ constante) no acúmulo de N-NO₃⁻ nos tecidos. Ao contrário dos mutantes *osa7*, os mutantes *osa2* não apresentaram redução do conteúdo de N-NO₃⁻ nas linhagens cultivadas com 2,0 mM de N-NO₃⁻ (Figura 30). As linhagens *osa2* cultivadas com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante mostraram redução do conteúdo de N-NO₃⁻ nas raízes e folhas. As diferenças nos teores de N-NO₃⁻ no mutante *osa2* estão relacionadas com as diferenças de absorção de NO₃⁻ provocadas pelo silenciamento da isoforma de PM H⁺-ATPase *OsA2*, enquanto nos mutantes silenciando a isoforma *OsA7* a redução dos teores de NO₃⁻ também é afetado pelo crescimento das linhagens. A concentração de N-NO₃⁻ no tecido dos mutantes *osa2* em relação ao controle IRS é similar ao conteúdo de N-NO₃⁻ (Figura anexo 3).

Plantas mais eficientes apresentam maior acúmulo de NO₃⁻ (SOUZA e FERNANDES, 2006). BUCHER et al. (2014) verificaram que plantas de arroz com maior eficiência de absorção de NO₃⁻ apresentam maior teor de NO₃⁻, correlacionando positivamente com o sistema de absorção de NO₃⁻ de alta afinidade (*OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*). O menor acúmulo de NO₃⁻ nos mutantes *osa2* e *osa7* no tratamento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ foi causado pela menor atividade da PM H⁺-ATPase, visto que não houve diferença de expressão dos transportadores de alta afinidade nas raízes.

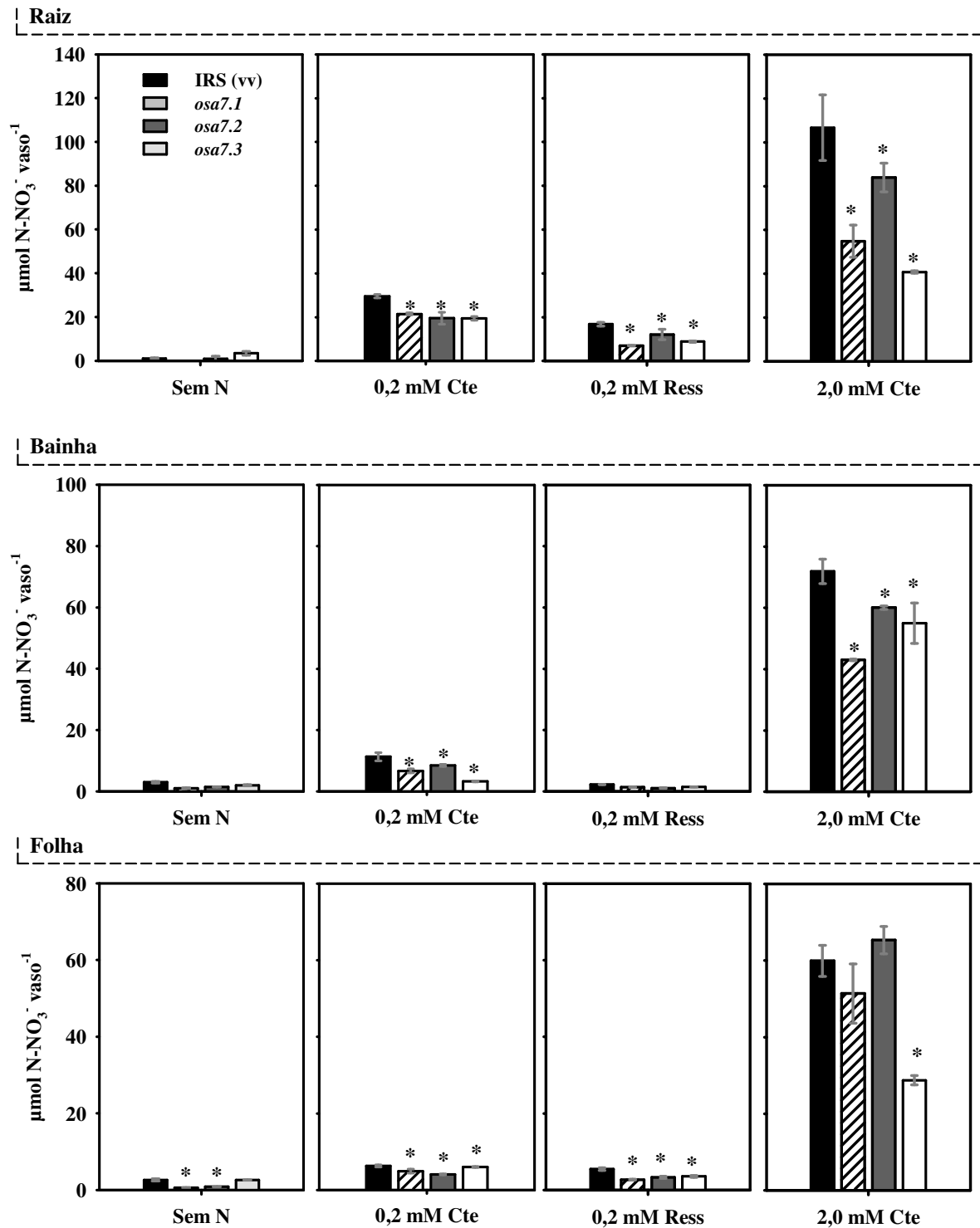


Figura 29. Conteúdo de N-NO_3^- nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

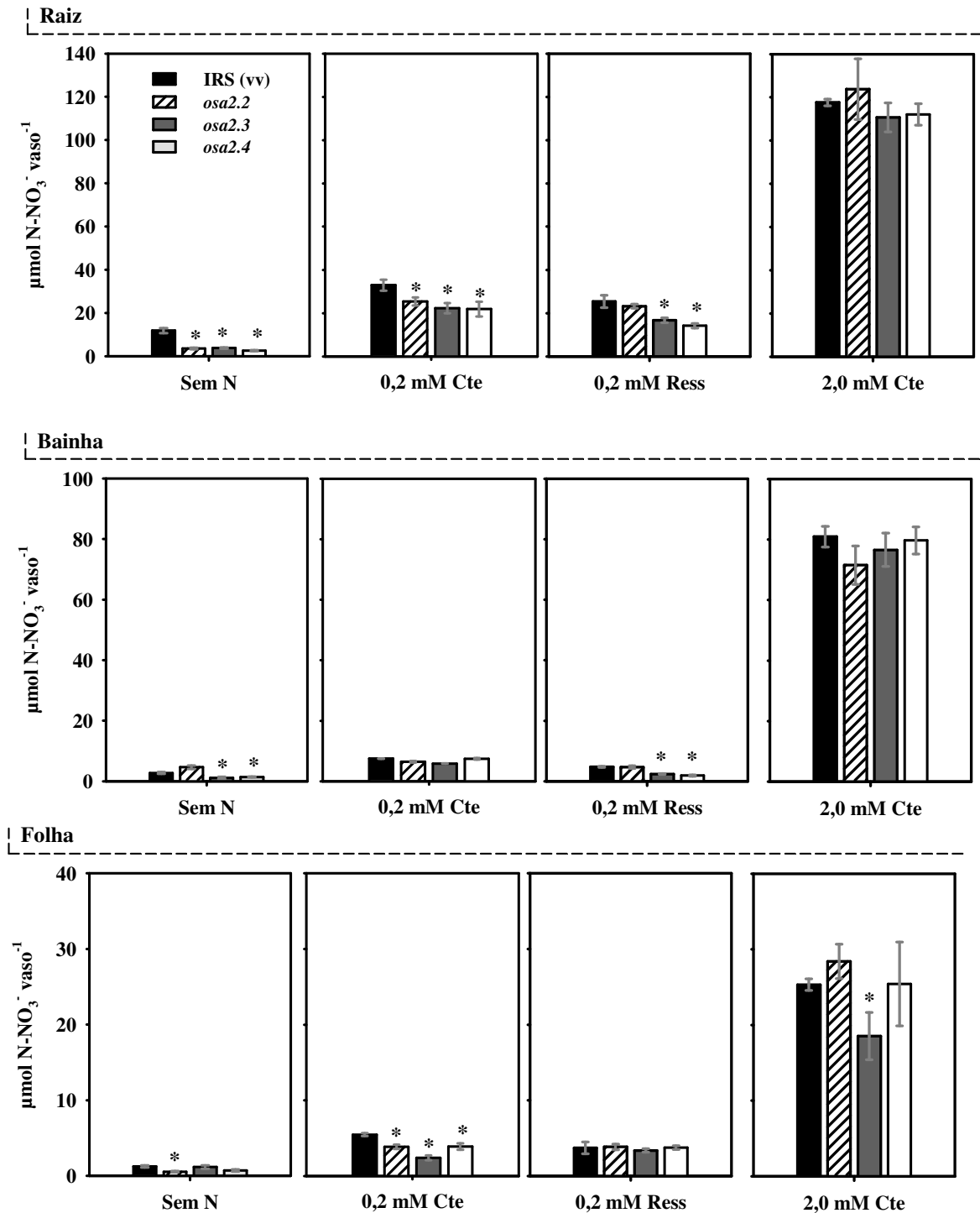


Figura 30. Conteúdo de N-NO_3^- nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

A bainha é um órgão com alto acúmulo de NO_3^- , sendo uma importante reserva de N para períodos de deficiência de N (SOUZA e FERNANDES, 2006). Mesmo com suprimento de 2,0 mM de N-NO_3^- (alta dose de N), as bainhas do mutante *osa7* apresentaram menor conteúdo de NO_3^- (Figura 25). Possivelmente a isoforma de PM H^+ -ATPase *OsA7* está envolvida no crescimento da raiz e conseqüentemente afetou o acúmulo de NO_3^- . Nas folhas o

teor de N-NO₃⁻ também foi menor nos tratamentos com 0,2 mM de N-NO₃⁻ (constante e ressuprimento), enquanto com 2,0 mM de N-NO₃⁻ somente *osa7.3* apresentou menor teor de NO₃⁻ acumulado. Três dias sem N causaram forte redução dos teores de N-NO₃⁻ em todas as partes da planta (Figura 29 e Figura 30). A bainha possui baixa atividade metabólica (SOUZA e FERNANDES, 2006), sendo o NO₃⁻ armazenado remobilizado para a parte aérea e raiz para permitir o crescimento na falta de N.

Os teores de NO₃⁻ nas plantas mutantes e a absorção de NO₃⁻ assemelham ao silenciamento de algum transportador de alta afinidade. Por exemplo, o silenciamento da proteína NAR2.1 afeta a absorção de NO₃⁻ somente na faixa de alta afinidade (ORSEL et al., 2006). O silenciamento de NRT2.1 e NRT2.2 afeta a absorção de NO₃⁻ somente na faixa de alta afinidade (LI et al., 2007). Os mutantes *osa2* e *osa7* com menor atividade da PM H⁺-ATPase afetaram a absorção de NO₃⁻ somente na faixa de alta afinidade (Figura 21), destacando o papel que a PM H⁺-ATPase e as isoformas *OsA2* e *OsA7* representam para a absorção de NO₃⁻ em baixas concentrações desse nutriente. A importância da PM H⁺-ATPase para a absorção de NO₃⁻ é ainda mais destacada porque os transportadores de alta afinidade não apresentaram mudança de expressão em baixa dose de NO₃⁻ quando comparado com o controle IRS (Figura 27 e Figura 28).

A absorção de NO₃⁻ altera o status de N, sendo o conteúdo de NO₃⁻, NH₄⁺ e aminoácidos livres os melhores indicativos do status de N (LIU et al., 2009; XU et al., 2012; NACRY et al., 2013). A indução da expressão dos transportadores de alta afinidade pelo NO₃⁻ é controlada negativamente principalmente pelos produtos da assimilação de NO₃⁻, principalmente NH₄⁺ e aminoácidos livres (LIU et al., 2009).

Do mesmo modo que houve redução dos teores de N-NO₃⁻ nos mutantes *osa7*, ocorreu redução do conteúdo de N-NH₄⁺, com exceção da folha nos tratamentos sem N e 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante (Figura 31). Os mutantes *osa2* também apresentaram redução do conteúdo de N-NH₄⁺, com exceção do tratamento com 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante (Figura 32). A redução da absorção de NO₃⁻ no tratamento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ nos mutantes *osa2* pode explicar em parte o menor conteúdo de N-NH₄⁺, no entanto, as plantas sem N e com ressuplicamento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ também apresentaram redução do conteúdo de NH₄⁺.

A concentração de N-NH₄⁺ nos mutantes *osa7* no tratamento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante não diferiu em relação às plantas controle IRS, enquanto no tratamento sem N e ressuplicamento apresentou menor concentração de N-NH₄⁺ (Figura anexa 4). Nos mutantes *osa2*, ocorreu redução da concentração de N-NH₄⁺ nos tratamentos sem N e 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante (Figura anexa 5).

O conteúdo de N-amino livre nos mutantes *osa7* foi menor em comparação com o controle IRS (Figura 33), enquanto a concentração de N-amino livre foi menor nas folhas das plantas com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante (Figura anexo 6). Apesar do menor conteúdo e teor de N-NH₄⁺ nos mutantes *osa2* cultivados sem N, não houve diferença no conteúdo (Figura 34) e teor de N-amino livre (Figura anexa 6).

Apesar da menor absorção de NO₃⁻ nos mutantes cultivados com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante em comparação com as plantas controle IRS, os mutantes apresentaram menor conteúdo de N-amino livre nas folhas enquanto nas raízes o teor de N-amino livre é igual entre as linhagens e a planta controle IRS. A razão raiz/parte aérea foi menor nas plantas mutantes *osa7* comparado a plantas IRS (Fig), ou seja, as raízes das plantas mutantes cresceram proporcionalmente menos que a parte aérea quando comparado com as plantas IRS, resultando em diminuição da capacidade de absorção de nutrientes pelas plantas mutantes.

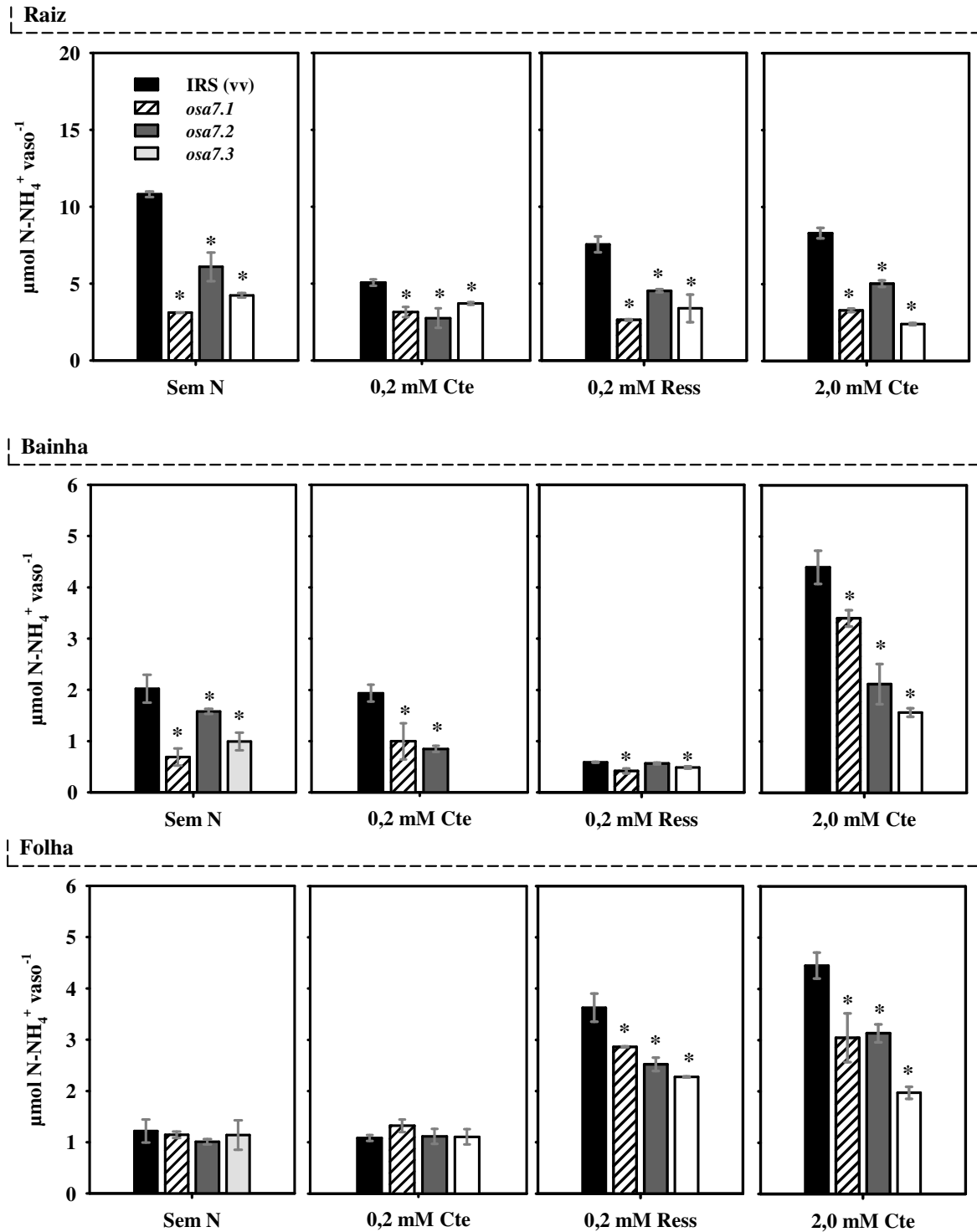


Figura 31. Conteúdo de $N-NH_4^+$ nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ constante, ressuprimento com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ e 2,0 mM de $N-NO_3^-$ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

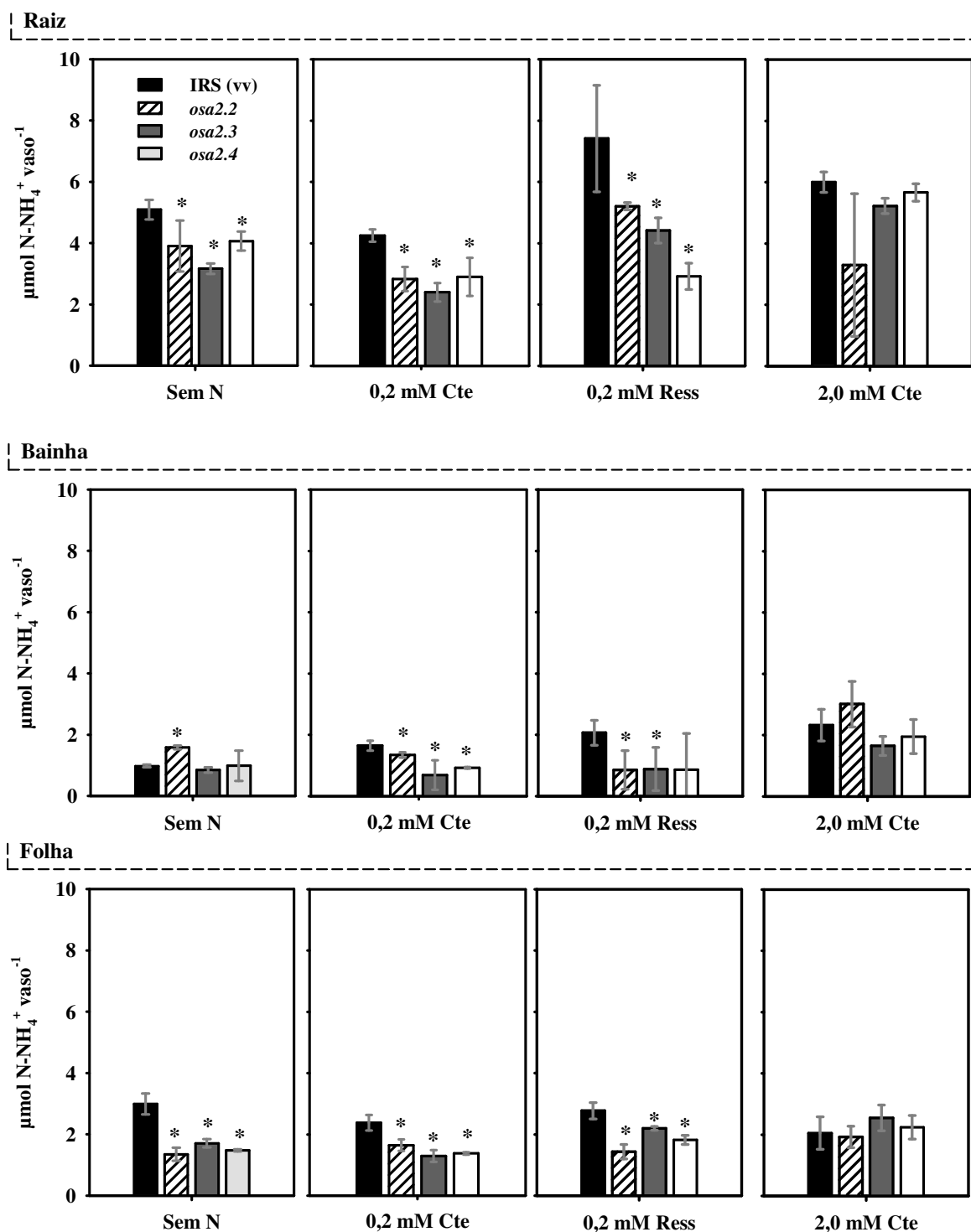


Figura 32. Conteúdo de $N-NH_4^+$ nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ constante, ressuprimento com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ e 2,0 mM de $N-NO_3^-$ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

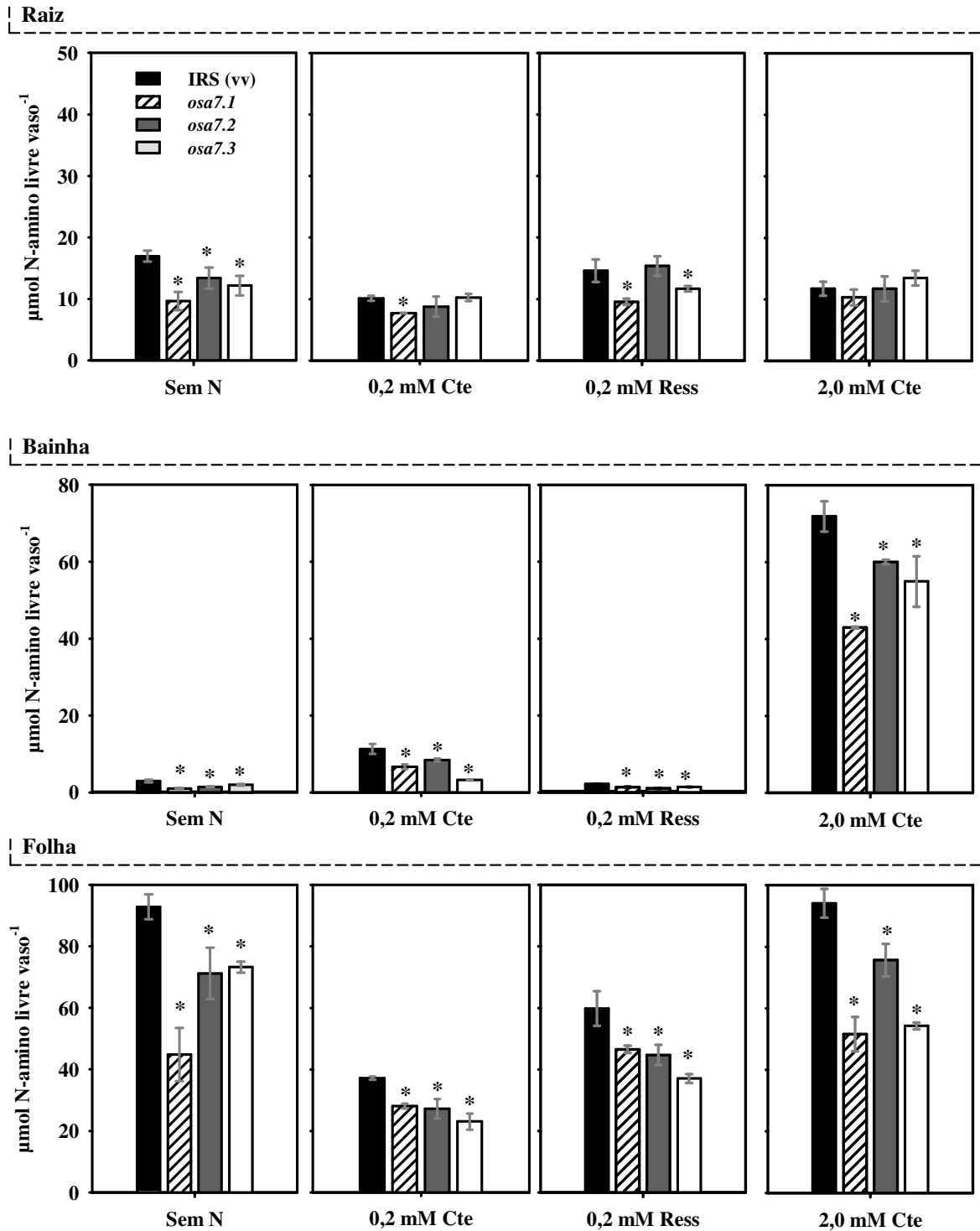


Figura 33. Conteúdo de N-amino livre nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ constante, ressuprimento com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ e 2,0 mM de $N-NO_3^-$ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

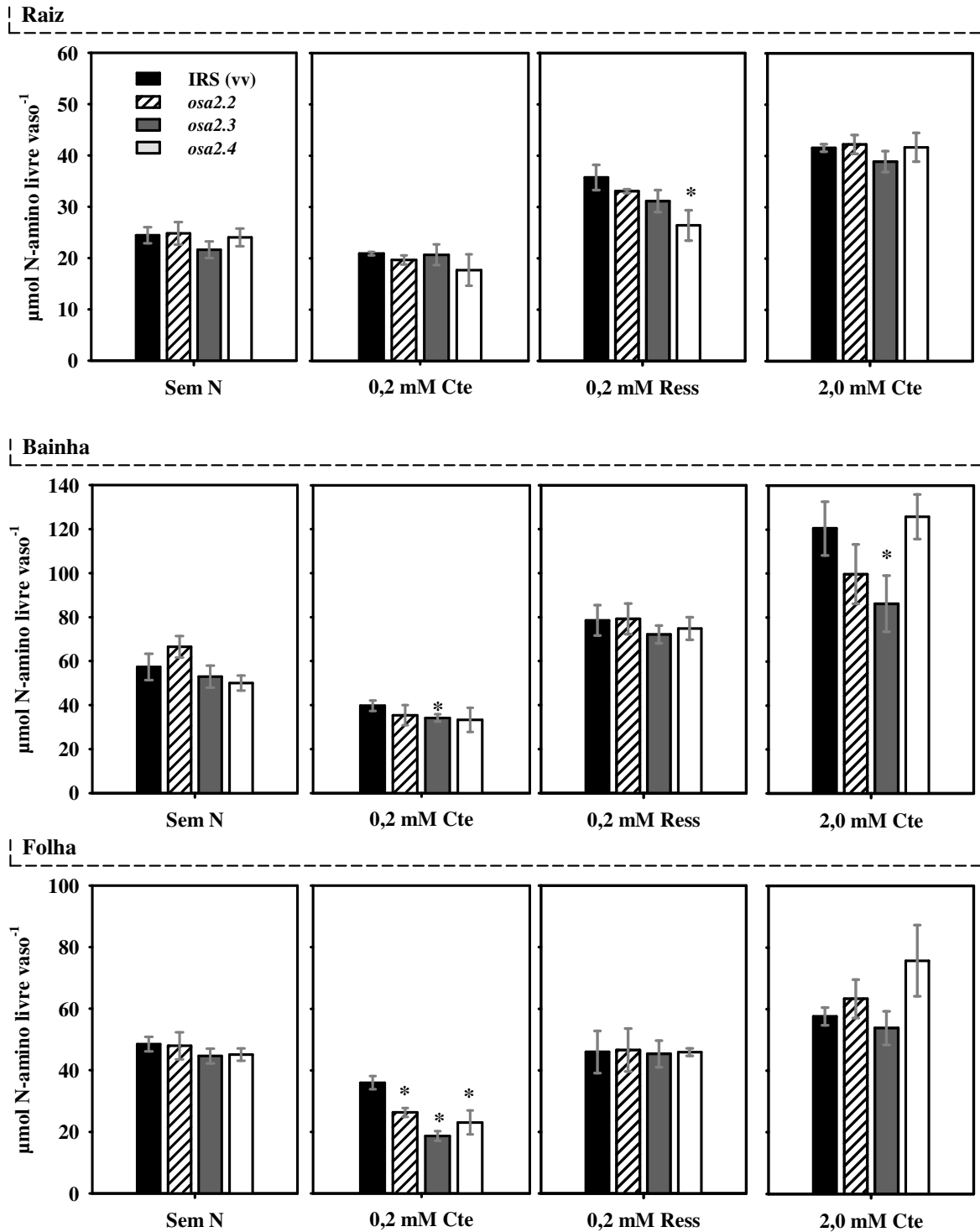


Figura 34. Conteúdo de N-amino livre nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. * indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

As plantas cultivadas com 0,2 mM de N-NO_3^- constante apresentam maior relação raiz/parte aérea em comparação com as plantas cultivadas com 2,0 mM de N-NO_3^- constante (Tabela 9 e Tabela 10). Plantas cultivadas com doses baixas de N apresentam maior crescimento da raiz para explorar maior volume de solo, representando maior dreno de

açúcares e aminoácidos da parte aérea (SOUZA e FERNANDES, 2006). Possivelmente a menor absorção de NO_3^- nos mutantes *osa2* e *osa7* cultivados com 0,2 mM de N- NO_3^- constante afetou mais o teor de N-amino livre na parte aérea por causa do envio de aminoácidos para a raiz. Os teores de N-amino livre nas raízes podem explicar em parte porque não houve diferença na expressão dos transportadores de NO_3^- de alta afinidade entre os mutantes e as plantas controle IRS. Por outro lado, o alto teor de aminoácidos livres na parte aérea pode regular a expressão dos transportadores de NO_3^- na raiz a partir do envio de mensageiros (aminoácidos, miRNAs, hormônios) da parte aérea pelo floema (LIU et al., 2007).

Além do NO_3^- , NH_4^+ e aminoácidos, existem outros fatores que influenciam na expressão dos transportadores, como hormônios e possivelmente microRNAs (RUFFEL et al., 2008; NACRY et al., 2013). Os transportadores de NO_3^- de arroz respondem também ao suprimento com glicose e sacarose (FENG et al., 2011). Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o silenciamento das isoformas *OsA2* e *OsA7* não afetam a expressão dos transportadores de NO_3^- , mesmo afetando a absorção de NO_3^- e crescimento.

Aparentemente, ocorreu a manutenção do conteúdo e concentração de N-amino livre nas raízes das plantas mutantes *osa2* e *osa7* quando cultivadas com 0,2 mM de N- NO_3^- , em comparação com a planta controle IRS. Em contraste, a concentração de N- NO_3^- nas raízes dos mutantes *osa2* e *osa7* cultivadas com 0,2 mM de N- NO_3^- constante é menor quando comparadas com a planta controle IRS. Possivelmente, está ocorrendo o translocação de aminoácidos livres pelo floema da parte aérea para a raiz para suprir a falta de aminoácidos e permitir o crescimento radicular (SOUZA e FERNANDES, 2006).

No tratamento com 2,0 mM de N- NO_3^- não houve diferença nos teores de NO_3^- e N-amino livre nas diferentes partes da planta, mostrando que provavelmente não houve alteração da translocação de N na planta. As diferenças de N- NO_3^- , N- NH_4^+ e N-amino livre entre os mutantes *osa7* e a planta IRS foi primariamente causada pela diferença de absorção de NO_3^- em baixa dose e o crescimento vegetativo.

A manipulação da atividade da V- H^+ -PPase altera o fluxo de açúcares na planta (GAXIOLA et al., 2012). Para estudar se a PM H^+ -ATPase alterou o conteúdo de açúcares na planta, foi avaliado o os açúcares solúveis totais nas diferentes partes das plantas mutantes. Nas linhagens mutantes *osa7* ocorreu redução do conteúdo de açúcares solúveis na raiz das plantas cultivadas sem N e com ressurgimento de 0,2 mM de N- NO_3^- (Figura 35). Nos mutantes *osa7* cultivadas com 0,2 mM de N- NO_3^- constante não ocorreu alteração do conteúdo de açúcares solúveis, assim como nas plantas cultivadas com 2,0 mM de N- NO_3^- constante. Nas plantas mutantes *osa2*, somente ocorreu redução do conteúdo de açúcares solúveis nas raízes das linhagens *osa2.3* e *osa2.4* no tratamento com 0,2 mM de N- NO_3^- constante (Figura 36).

Entre os diversos fatores que controlam a expressão dos transportadores de NO_3^- de alta afinidade, os açúcares estão envolvidos no controle da expressão do transportador *NRT2.1* de Arabidopsis (GIRIM et al., 2007) e *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* em arroz (FENG et al., 2011). O suprimento concomitante de NO_3^- e açúcares nas raízes em solução nutritiva eleva a expressão de *LsNRT2.1* em alface (PAEZ-VALENCIA et al., 2011). No tratamento com ressurgimento de 0,2 mM de N- NO_3^- não houve alteração de expressão dos genes *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* entre as plantas mutantes *osa7* e controle (IRS), enquanto o conteúdo de açúcares solúveis foi menor nos mutantes *osa7*. Os resultados obtidos indicam que o conteúdo de açúcares solúveis nas plantas mutantes *osa7* e *osa2* provavelmente não teve efeito significativo na expressão dos transportadores de *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1*.

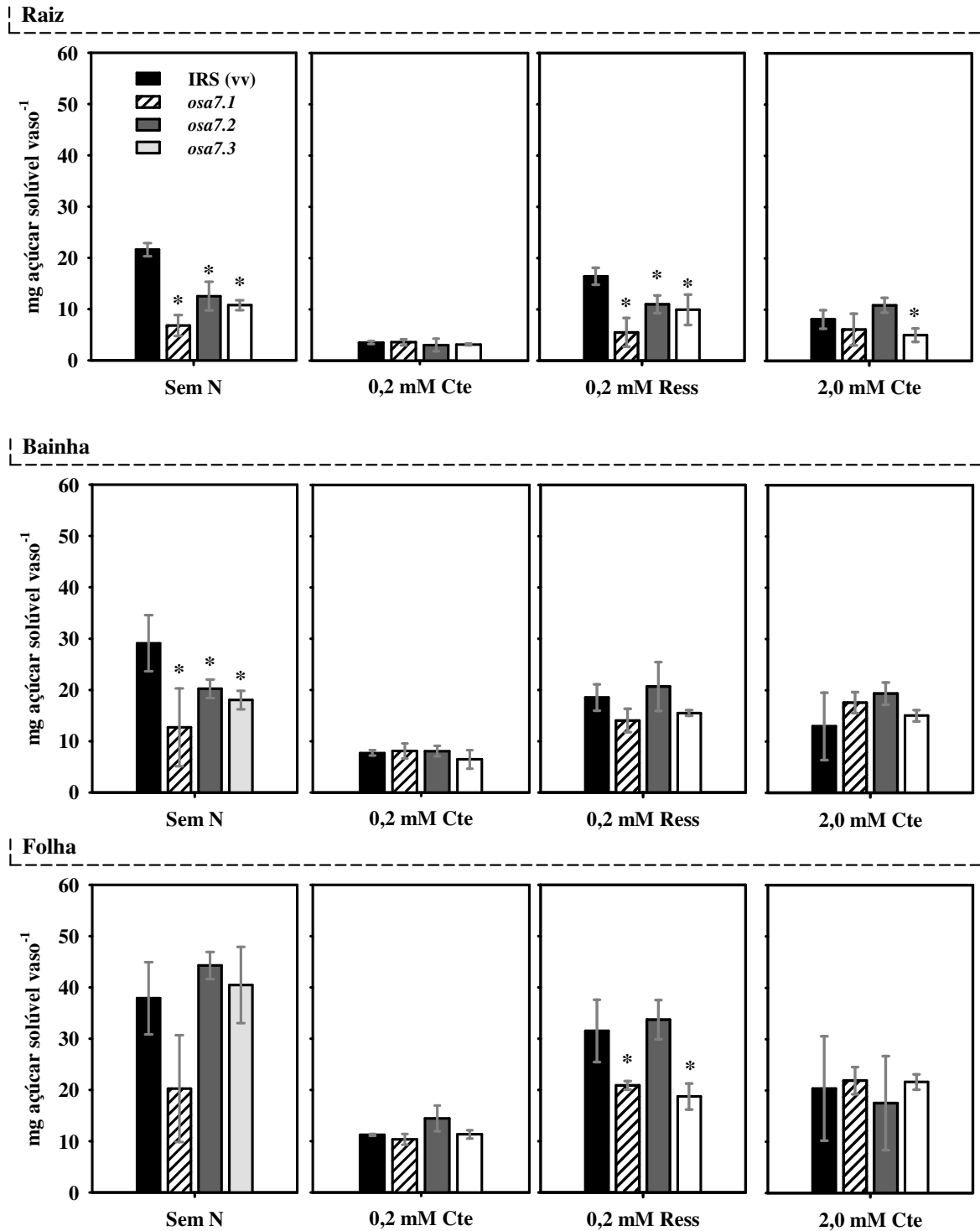


Figura 35. Conteúdo de açúcares solúveis nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

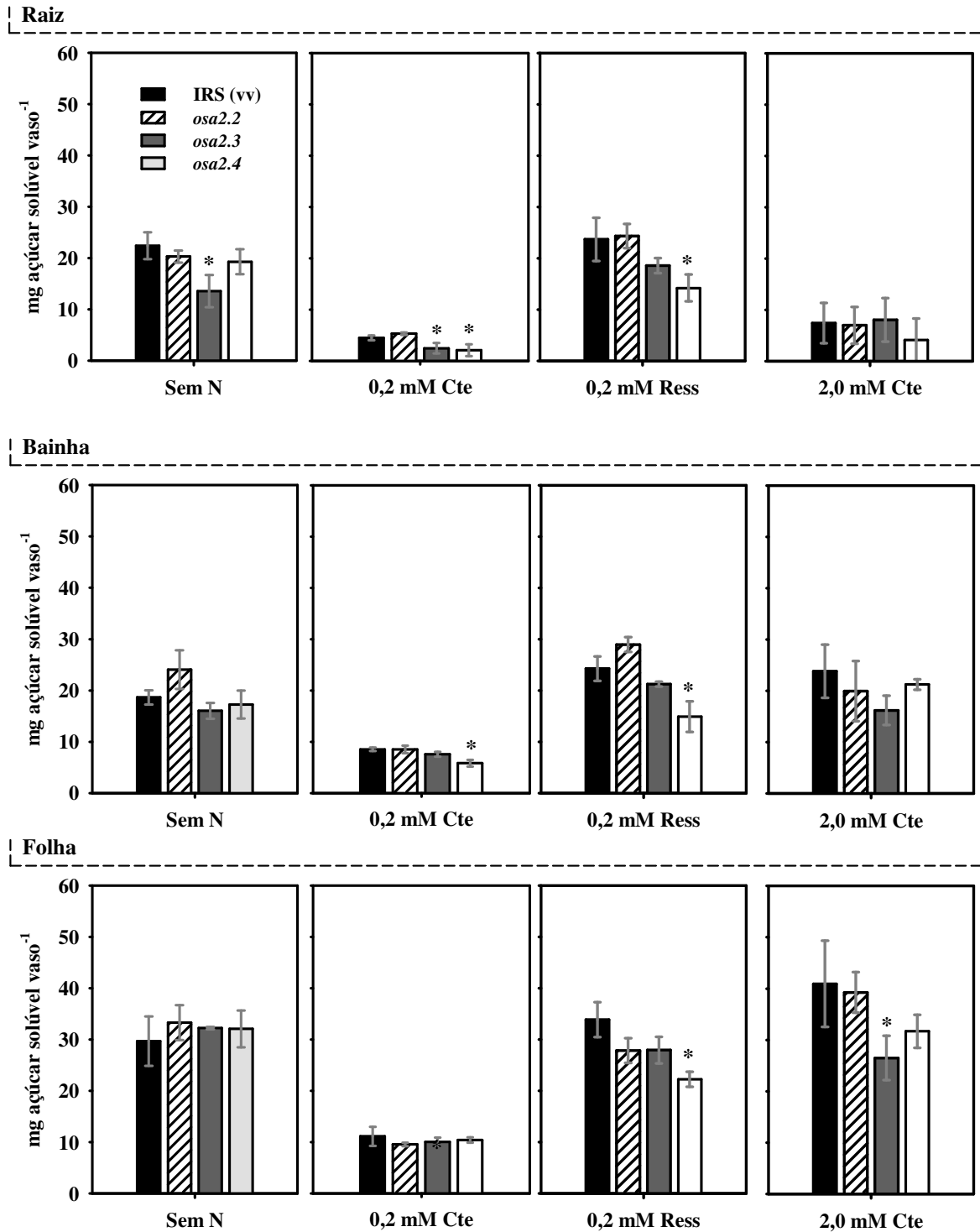


Figura 36. Conteúdo de açúcares solúveis nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

4.5.7. Análise do N-total e eficiência de absorção de N nas plantas mutantes *osa7* e *osa2*

Com as diferenças no acúmulo de N-NO_3^- e N-amino livre nos mutantes em relação a planta controle IRS, foi avaliado o N-total para verificar a absorção total de N durante o período de cultivo. O conteúdo de N-total nas plantas mutantes *osa7* é apresentado na Figura 37.

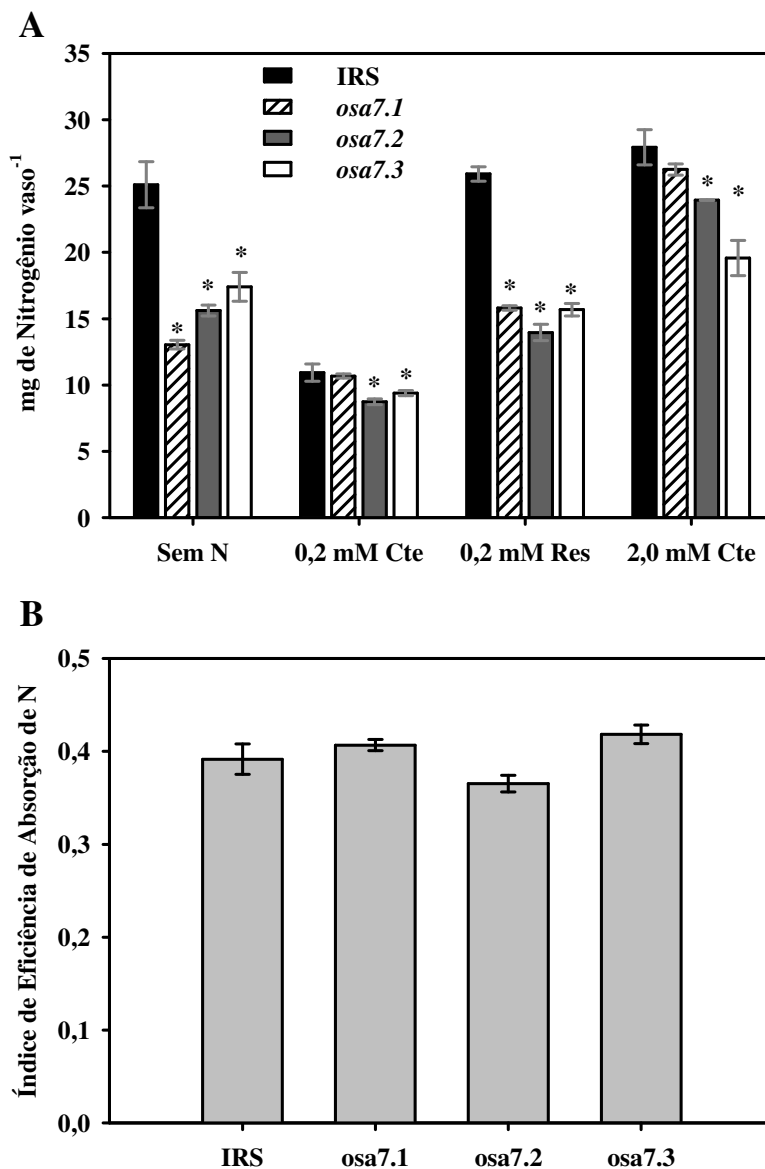


Figura 37. (A) Conteúdo de N-total nas linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. (B) Índice de Eficiência de Absorção de N (iEAN) entre a planta controle IRS e os mutantes *osa7*, calculado a partir da relação entre o N-total das plantas cultivadas com 0,2 mM (baixa dose) e 2,0 mM de N-NO_3^- (alta dose). * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

Como observado nas análises das frações nitrogenadas (N-NO_3^- , N-NH_4^+ e N-amino livre), o conteúdo de N-total nos mutantes *osa7* foi alterado em comparação com a planta controle IRS principalmente por causa do menor crescimento dessas linhagens provocado pelo silenciamento do gene *OsA7* (Figura 37A). Com exceção da linhagem *osa7.1* que apresentou conteúdo de N-total semelhante a planta IRS nos tratamentos com 0,2 e 2,0 mM de

N-NO₃⁻ constante, as demais linhagens apresentaram redução do teor de N-total. O teor de N-total foi reduzido no tratamento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante nas linhagens *osa7.2* e *osa7.3* em comparação com as plantas IRS, enquanto as três linhagens mutantes *osa7* apresentaram redução de N-total no ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ (Figura anexo 8).

Para calcular a eficiência de absorção de N causada pelo silenciamento do gene *OsA7*, foi usado o método de cálculo apresentado por WANG et al. (2015). De acordo com esses autores, para gerar o Índice de Eficiência de Absorção de N (iEAN), deve-se realizar a razão do conteúdo de N nas plantas cultivadas com baixa dose de N (0,2 mM de N-NO₃⁻ constante) e alta dose de N (2,0 mM de N-NO₃⁻ constante). O uso do N-total é mais apropriado para o cálculo do iEAN porque leva em consideração todo o N absorvido durante o cultivo da planta. A eficiência de absorção de N pode ser definida pela capacidade da planta de absorver N em baixas doses quando comparado com altas doses.

Não foi observado diferenças no iEAN entre as plantas mutantes *osa7* e IRS (Figura 37B), mesmo com menor influxo de NO₃⁻ no tratamento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante. Esse resultado pode ter sido provocado pelo menor crescimento dos mutantes *osa7* em comparação com IRS. O menor crescimento vegetal de *osa7* em todos os tratamentos de N usados gera menor demanda de N (GARNETT et al., 2013), como pode ser observado no conteúdo de N-total das plantas *osa7* (Figura 37A).

O menor crescimento dos mutantes *osa7* dificulta a interpretação dos resultados do iEAN, no entanto, os mutantes *osa2* não apresentaram mudanças no crescimento e podem fornecer melhor panorama do acúmulo de N-total e o iEAN. Em comparação com a planta controle IRS, o conteúdo de N-total dos mutantes *osa2* foi reduzido nas plantas sem N (*osa2.2* e *osa2.3*), com suprimento constante e ressuprimento de 0,2 mM de N-NO₃⁻ (Figura 38A). Quando é avaliado o teor de N-total nos mutantes *osa2*, verifica-se que somente no tratamento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante ocorreu redução do teor de N-total (Figura anexo 9). Desse modo, verifica-se que a quantidade total de N no mutante *osa2* não difere da planta controle IRS, com exceção do tratamento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, mostrando que a menor absorção de NO₃⁻ em baixa dose no mutante *osa2* alterou o acúmulo de N-total no mutante.

O cálculo do iEAN mostra claramente a menor eficiência de absorção de N nos mutantes *osa2* (Figura 38B). Resultado semelhante também é encontrado calculando o iEAN com os teores de N-total (Figura anexo 9). A importância da PM H⁺-ATPase na absorção em baixa dose de NO₃⁻ é corroborada pela expressão dos transportadores *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1*, que não apresentaram variação entre o controle IRS e os mutantes *osa2*. SHI et al. (2010) verificaram que variedades de arroz mais eficientes na absorção de NO₃⁻ possuem maior expressão dos transportadores de N de alta afinidade. Os estudos comparando as variedades de arroz IAC-47 (melhorada) e Piauí (tradicional) também mostram a maior expressão dos transportadores de NO₃⁻ como fator chave para a eficiência de absorção de N (SPERANDIO, 2011; BUCHER et al., 2014).

O padrão de acúmulo de N-total nas plantas mutantes *osa2* assemelha-se ao encontrado em plantas de *Arabidopsis* mutantes sem o transportador de alta afinidade NRT2.1 (ORSEL et al., 2004). Plantas de *Arabidopsis* sem o gene NRT2.1 apresentam redução do conteúdo de N-total somente quando cultivadas com baixa dose de NO₃⁻ (0,2 mM) comparado com plantas tipo-selvagem, enquanto não é observado variação do N-total nas plantas cultivadas com alta dose de NO₃⁻ (6 mM) (ORSEL et al., 2004). Esses autores ainda verificaram menor absorção de NO₃⁻ nos mutantes somente quando cultivado com baixa dose de NO₃⁻. O conteúdo de N-total nas plantas de arroz mutantes com menor atividade da PM H⁺-ATPase mostra a importância dessa enzima para a absorção de NO₃⁻ no sistema de alta afinidade.

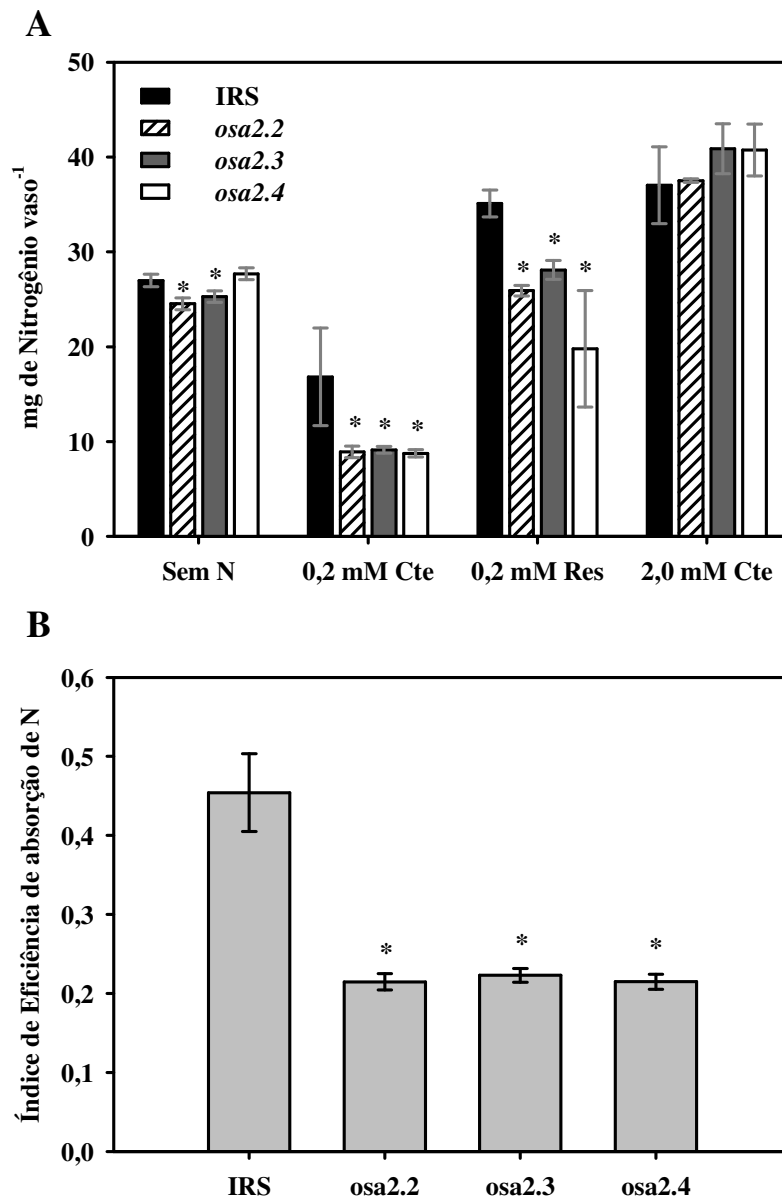


Figura 38. (A) Conteúdo de N-total nas linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressurgimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. (B) Índice de Eficiência de Absorção de N (iEAN) entre a planta controle IRS e os mutantes *osa2*, calculado a partir da relação entre o N-total das plantas cultivadas com 0,2 mM (baixa dose) e 2,0 mM de N-NO₃⁻ (alta dose). * indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

O conceito usual da função da PM H⁺-ATPase na absorção de nutrientes é manter o gradiente de potencial eletroquímico durante o processo de absorção (MILLER e CRAMER, 2004). Durante o processo de absorção de NO₃⁻, ocorre a despolarização da membrana plasmática (co-transporte de 2H⁺/NO₃⁻) e a PM H⁺-ATPase reestabelece o potencial de membrana com o bombeamento de H⁺ do citossol para o apoplasto. Os resultados obtidos com as plantas mutantes *osa2* e *osa7* sugerem que a função da PM H⁺-ATPase vai além da manutenção do potencial eletroquímico durante a absorção de NO₃⁻, mas que também favorece a absorção de NO₃⁻ em baixas doses desse nutriente por causa da força próton-motriz necessária para a entrada do NO₃⁻.

A eficiência de absorção de N é um processo chave para a produção em solos pobres em nutrientes (KANT et al., 2011). A comparação entre a atividade da PM H⁺-ATPase em baixa dose de NO₃⁻ entre IAC-47 e Piauí também indica a participação da PM H⁺-ATPase na eficiência de absorção de N (Tabela 4). Os resultados indicam a participação da PM H⁺-ATPase na eficiência de absorção de NO₃⁻, podendo ser um futuro alvo para aumentar a eficiência de absorção de N. Plantas de alface superexpressando o gene da V-H⁺-PPase (*AVPI*) possuem maior atividade da PM H⁺-ATPase e possuem maior eficiência de uso N (PAEZ-VALENCIA et al., 2011; LI et al., 2014). Existem substâncias naturais que aumentam a atividade da PM H⁺-ATPase, como os ácidos húmicos. A aplicação de ácido húmico de baixa peso molecular aumenta a expressão da PM H⁺-ATPase e a absorção de NO₃⁻ em plantas de milho (QUAGGIOTTI et al., 2003). Desse modo, formas de aumentar a atividade da PM H⁺-ATPase e conseqüentemente a força próton motriz pode contribuir de forma significativa para o aumento da eficiência de absorção de N.

4.5.8. Expressão das isoformas de PM H⁺-ATPases em raiz e parte aérea

As diferenças no fenótipo de crescimento entre os mutantes *osa2* e *osa7* foi evidente no acúmulo de massa fresca, sendo que uma característica marcante foi a menor relação R/PA nos mutantes *osa7*, ou seja, menor crescimento da raiz em relação a parte aérea (Tabela 9). Para verificar as diferenças no crescimento da raiz entre os mutantes *osa2* e *osa7*, foi avaliado a expressão das isoformas de PM H⁺-ATPase nas raízes e parte aérea usando plantas da variedade Nipponbare cultivadas com suprimento constante de 2,0 mM de N-NO₃⁻. As isoformas *Osa4*, *Osa6*, *Osa9* e *Osa10* não foram expressas nas condições do experimento (Figura 27). As isoformas *Osa6* e *Osa10* pertencem à subfamília IV e *Osa9* pertence a subfamília III, que apresentam expressão reduzida ou específica em determinados estágios de crescimento (BAXTER et al., 2003; SONDERGAARD et al., 2004). Por exemplo, em *Arabidopsis* *Osa10* é expresso em panículas de arroz durante o estágio de florescimento (BAXTER et al., 2003). ZHU et al. (2009) e CHANG et al. (2009) também não verificaram a expressão das isoformas *Osa9* e *Osa10* em arroz.

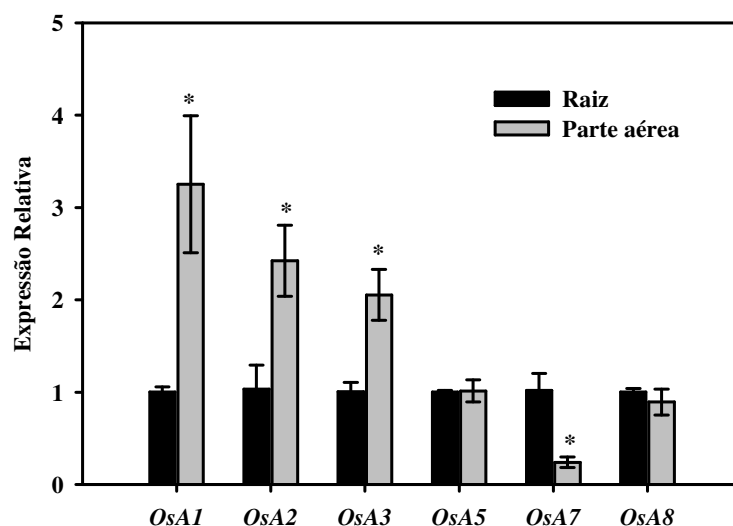


Figura 39. Expressão das isoformas de PM H⁺-ATPase nas raízes e parte de arroz da variedade Nipponbare crescidas com suprimento constante de 2,0 mM de N-NO₃⁻. * indica diferença entre raiz e parte aérea pelo teste F (P<0,05)

As isoformas *Osa1*, *Osa2* e *Osa3* são mais expressas na parte aérea, enquanto *Osa7* é mais expressa nas raízes (Figura 27). As diferenças de expressão entre *Osa2* e *Osa7* na raiz e parte aérea pode explicar em parte as diferenças no acúmulo de massa fresca, principalmente

na menor produção de raiz nos mutantes *osa7* cultivadas sem N e 0,2 mM de N-NO_3^- constante (Tabela 9). *OsA7* é mais expressa nas raízes, fazendo que o silenciamento dessa isoforma cause redução da raiz em cultivos com baixo N, condição que induz maior crescimento radicular (SANTOS et al, 2009). *OsA2* é mais expressa na parte aérea, no entanto, não foi observada redução de massa fresca na parte aérea nos mutantes *osa2*. Deve ser ressaltado que também houve redução de massa fresca na parte aérea dos mutantes *osa7* mesmo com a maior expressão das isoformas *OsA1*, *OsA2* e *OsA3* na parte aérea, mostrando que *OsA7* apesar de ser mais expresso nas raízes também desempenha papel fundamental na parte aérea.

As isoformas de PM H^+ -ATPase são expressas de maneira distinta entre raiz e parte aérea. Somente as isoformas *OsA5* e *OsA8* não possuem expressão diferenciada entre raiz e parte aérea (Figura 27). De acordo com CHEN et al. (2009) *OsA8* é mais expressa na raiz em relação à parte aérea, o que pode ser provocado pelo diferente modelo experimental usado por CHEN et al. (2009), que avaliou a expressão da PM H^+ -ATPase em resposta à deficiência de P, enquanto no presente experimento as plantas foram cultivadas sem privação deste nutriente.

A expressão isoforma *AHA2* de Arabidopsis é induzida pelo suprimento com NO_3^- e está relacionada com o crescimento radicular em resposta ao suprimento de NO_3^- (MŁODZIŃSKA et al., 2015). Anteriormente HARUTA et al. (2010) já verificaram que *AHA2* é a isoforma de PM H^+ -ATPase mais expressa em raízes de Arabidopsis. Do mesmo modo observado em arroz com a isoforma *OsA7*, a isoforma de PM H^+ -ATPase mais expressa nas raízes de Arabidopsis controla o desenvolvimento radicular.

Apesar das diferenças de expressão de *OsA2* e *OsA7* entre partes da planta, ambos os mutantes *osa2* e *osa7* apresentaram menor influxo no tratamento com 0,2 mM de N-NO_3^- constante (Figura 21). O ressuprimento com NO_3^- induz as isoformas *OsA2* e *OsA7* nas raízes e parte aérea (SPERANDIO et al., 2011), mostrando que mesmo *OsA2* sendo mais expressa na parte aérea também desempenha papel fundamental na absorção de NO_3^- nas raízes.

4.6. CONCLUSÕES

O silenciamento das isoformas *OsA2* e *OsA7* de PM H⁺-ATPase em arroz prejudica o crescimento vegetativo e produção de grãos. O menor crescimento das plantas de arroz nos mutantes *osa7* em comparação com a planta controle indica a importância dessa isoforma para o crescimento.

A menor absorção de NO₃⁻ nos mutantes *osa2* e *osa7* em cultivo sob baixa dose de NO₃⁻ (0,2 mM) mostra que as PM H⁺-ATPases são enzimas-chaves para a eficiência de absorção de N.

A menor absorção de NO₃⁻ nos mutantes *osa2* e *osa7* com baixa dose de NO₃⁻ (0,2 mM) afetou o status de N, diminuindo o conteúdo e teor de NH₄⁺ e N-amino. Os mutantes *osa2* e *osa7* mesmo com status de N alterado, não apresentaram diferenças na expressão dos transportadores de NO₃⁻.

Não ocorreu regulação transcricional das outras isoformas de PM H⁺-ATPase nos mutantes *osa2* e *osa7*, evidenciando a importância de *OsA2* e *OsA7* para o crescimento vegetal.

5. CONCLUSÕES GERAIS

A expressão dos genes *OsNRT1.1* demonstrou que as isoformas *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* podem estar relacionadas com a absorção de NO_3^- . *OsNRT1.1C* apresentou baixa expressão.

O estudo com as variedades de arroz Piauí e IAC-47 indica que as bombas de H^+ de membrana plasmática desempenham papel fundamental na absorção de NO_3^- em baixas doses, devendo ser levado em consideração a atividade e expressão das PM H^+ -ATPases em estudos de eficiência de absorção de N.

O silenciamento dos genes *OsA2* e *OsA7* afetou a absorção de NO_3^- quando em baixa concentração. *OsA7* afetou o crescimento da planta, principalmente da raiz. As isoformas *OsA2* e *OsA7* são essenciais para a atividade das PM H^+ -ATPases nas raízes.

Dentre as diversas isoformas de PM H^+ -ATPase, *OsA2* e *OsA7* são as mais expressas e seu silenciamento acarreta menor produção de grãos e crescimento da parte aérea. Os mutantes *osa2* e *osa7* demonstraram que a PM H^+ -ATPase é de vital importância para a eficiência de absorção de N, corroborando com os resultados nas variedades de arroz IAC-47 e Piauí.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Analisando a expressão dos genes *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B* e *OsNRT1.1C*, verificamos que *OsNRT1.1B* é induzido por NO_3^- e reprimido por feedback negativo na raiz, enquanto *OsNRT1.1A* sofre menor regulação por feedback negativo. Esses genes também podem atuar na sinalização de NO_3^- , sendo interessante analisar como plantas mutantes sem *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* reponderiam ao NO_3^- .

Dentre as diversas isoformas de PM H^+ -ATPase, *Osa2* e *Osa7* são as mais expressas e seu silenciamento acarreta menor produção de grãos e crescimento da parte aérea. Os mutantes *osa2* e *osa7* demonstraram que a PM H^+ -ATPase é de vital importância para a eficiência de absorção de N, corroborando com os resultados nas variedades de arroz IAC-47 e Piauí. Plantas que são adaptadas em condições de baixo suprimento de N apresentam maior expressão e atividade da PM H^+ -ATPase, sendo as isoformas *Osa2* e *Osa7* importantes na manutenção da atividade da PM H^+ -ATPase.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, M., YOSHIKAWA, T., NOSAKA, M., SAKAKIBARA, H., SATO, Y., NAGATO, Y., ITOH, J. I. WAVY LEAF1, an ortholog of Arabidopsis HEN1, regulates shoot development by maintaining microRNA and trans-acting small interfering RNA accumulation in rice. **Plant physiology**, v. 154, p. 1335-1346, 2010.
- AKTER, M. B.; PIAO, R.; KIM, B.; LEE, Y.; KOH, E.; KOH, H. J. Fine mapping and candidate gene analysis of a new mutant gene for panicle apical abortion in rice. **Euphytica**, v. 197, p. 387, 398, 2014.
- ALMAGRO, A.; LIN, S.; TSAY, Y. Characterization of the Arabidopsis nitrate transporter NRT1.6 reveals a role of nitrate in early embryo development. **The Plant Cell**, v. 20, p. 3289–3299, 2008.
- 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.
- ARANGO, M.; GÉVAUDANT, F; OUFATTOL, M; BOUTRY, M. The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. **Planta**, 216: 355–365, 2003.
- ARAÚJO, A. M. S. **Absorção e metabolismo de nitrogênio por arroz em diferentes agroecossistemas sob disponibilidade sazonal de N-NO₃⁻**. 2011. 204f. Tese de Doutorado. (Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.
- ARIKIT, S.; ZHAI, J.; MEYERS, B. C. Biogenesis and function of rice small RNAs from non-coding RNA precursors. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 16, p. 1-10, 2013.
- 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.
- BAKER, R. F; LEACH, K A.; BRAUN, D. M. SWEET as sugar: new sucrose effluxers in plants. **Molecular plant**. v. 5, p. 766-768, 2012.
- BARI, R.; DATT-PANT, B.; STITT, M.; SCHEIBLE, W. R. PHO2, microRNA399, PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. **Plant Physiology**. v. 141, p. 988-999, 2006.
- BAXTER, I.; TCHIEU, J.; SUSSMAN, M. R.; BOUTRY, M.; PALMGREN, M. G.; GRIBSKOV, M.; HARPER, J. F.; AXELSEN, K. B. Genomic comparison of P-type ATPase ion pump in Arabidopsis and rice. **Plant Physiology**, v.132, p.618-628, 2003.
- BOBIK, K.; DUBY, G.; NIZET, Y.; VANDERMEEREN, C.; STIERNET, P.; KANCZEWSKA, J.; BOUTRY, M. Two widely expressed plasma membrane H⁺-ATPase isoforms of *Nicotiana tabacum* are differentially regulated by phosphorylation of their penultimate threonine. **The Plant Journal**, v. 62, p. 291-301, 2010.
- BOLOGNA, N. G.; SCHAPIRE, A. L.; PALATNIK, J. F. Processing of plant microRNA precursors. **Briefings in Functional Genomics**. v. 12, p. 37-45, 2012.

- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRUX, A.; LIU, T. Y.; KREBS, M.; STIERHOF, Y. D.; LOHMANN, J. U.; MIERSCH, O.; WASTERACK, C.; SCHUMACHER, K. Reduced V-ATPase activity in the trans-Golgi network causes oxylipin-dependent hypocotyl growth inhibition in Arabidopsis. **The Plant Cell Online**, v. 20, n. 4, p. 1088-1100, 2008.
- BUCHER, C. A.; SANTOS, L. A.; NOGUEIRA, E. M.; RANGEL, R. P.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. The transcription of nitrate transporters in upland rice varieties with contrasting nitrate uptake kinetics. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 177, p. 395-403, 2014.
- BUCHNER, P.; HAWKESFORD, M. J. Complex phylogeny and gene expression patterns of members of the NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family (NPF) in wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 5697-5710, 2014.
- BURESH, R. J.; DE DATTA, S. K. Nitrogen dynamics and management in rice-legume cropping systems. **Advances in Agronomy**, v. 45, p. 1–59, 1991.
- BUTARDO, V. M.; FITZGERALD, M. A.; BIRD, A. R.; GIDLEY, M. J.; FLANAGAN, B. M.; LARROQUE, O.; RESURRECCION, A. P.; LAIDLAW, H. K. C.; JOBLING, S. A.; MORELL, M. K.; RAHMAN, S. Impact of down-regulation of *starch branching enzyme IIb* in rice by artificial microRNA- and hairpin RNA-mediated RNA silencing. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 4927-4941, 2011.
- CHANG, C.; HU, Y.; SUN, S.; ZHU, Y.; MA, G.; XU, G. Proton pump OsA8 is linked to phosphorus uptake and translocation in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 557–565, 2009.
- CHAPIN, F.S.; MATSON III, P.; MOONEY, H. Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology. **Springer Verlag**, New York, 2002.
- CHEN, D.; DENG, Y.; ZHAO, J. Distribution and change patterns of free IAA, ABP 1 and PM H⁺-ATPase during ovary and ovule development of *Nicotiana tabacum* L. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 127-136, 2012.
- CHEN, M.; WEI, X.; SHAO, G.; TANG, S.; LUO, J.; HU, P. Fragrance of the rice grain achieved via artificial microRNA-induced down-regulation of *OsBADH2*. **Plant Breeding**, v. 131, p. 584-590, 2012.
- CHEN, Y.; WU, C-Y.; TANG, X.; YANG, S-M.; WANG, J-Y. Fate of Nitrogen from Organic and Inorganic Sources in Rice-Wheat Rotation Cropping System. **Agricultural Sciences in China**, v.9, p. 1017-1025, 2010.
- CHIU, C.-C.; LIN, C.-S.; HSIA, A.-P.; SU, R.-C.; LIN, H.-L.; TSAY, Y.-F. Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1:4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. **Plant Cell Physiology**, v. 45, p. 1139–1148, 2004.
- CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, Sexto levantamento, março 2013. **Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab**, 25p. 2013.
- COOPER, H. D.; CLARKSON, D. T. Cycling of amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals- A possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient uptake. **Journal of Experimental Botany**, v. 40, p.753–762, 1989.
- CORNEJO, M-J.; LUTH, D.; BLANKENSHIP, K. M.; ANDERSON, O. D.; BLECHL, A. E. Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice, **Plant Molecular Biology**, v. 23, p.

567-581, 1993.

DAVIES, J. M.; DARLEY, C. P.; SANDERS, D. Energetics of the plasma membrane pyrophosphatase. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 9–10, 1997.

DHIR, A.; PROUDFOOT, N. J. Feed backwards model for microRNA processing and splicing in plants. **EMBO Reports**. v. 14, p. 581-582, 2013.

DI, H. J.; CAMERON, K. C.; SHEN, J-P.; WINEFIELD, C. S.; O'CALLAGHAN, M.; BOWATTE, S.; HE, J-Z. Ammonia-oxidizing bacteria and archaea grow under contrasting soil nitrogen conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 72, p. 386–394, 2010.

DONG, Z.; HAN, M-H.; FEDOROFF, N. The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 105, p. 9070-9075, 2008.

DUAN Y. H., ZHANG Y. L., YE L. T., FAN X. R., XU G. H., SHEN Q. R. Responses of Rice Cultivars with Different Nitrogen Use Efficiency to Partial Nitrate Nutrition. **Annals of Botany**, v.99, p.1153–1160, 2007.

DUBY, G.; BOUTRY, M. The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. **European Journal of Physiology**. v. 457, p. 645-655, 2009.

ENGELSBERGER, W. R.; SCHULZE, W. X. Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen-starved Arabidopsis seedlings. **Plant Journal**, v. 69, p. 978-995, 2012.

FAÇANHA, A. R.; DE MEIS, L. Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. **Plant Physiology**, v. 108, p. 241-246, 1995.

FAÇANHA, A. R.; DE MEIS, L. Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. **Plant Physiology**, v. 116, p. 1487–1495, 1998.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Lowland rice response to nitrogen fertilization. **Communication Soil Science Plant Analysis**, v. 32, p. 1405-1428, 2001.

FAN, S.-C.; LIN, C.-S.; HSEU, P.-K.; LIN, S.-H.; TSAY, Y.-F. The arabidopsis nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. **The Plant Cell**, v. 21(9), p. 2750-2761, 2009.

FANG, Y.; SPECTOR, D. L. Identification of Nuclear Dicing Bodies Containing Proteins for MicroRNA Biogenesis in Living Arabidopsis Plants. **Current Biology**. v. 17, p. 818-823, 2007.

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

FERNANDES, M. S. 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.

- FISCHER, J. J.; BEATTY, P. H.; GOOD, A. G.; MUENCH, D. G. Manipulation of microRNA expression to improve nitrogen use efficiency. **Plant Science**. v. 210, p. 70-81, 2013.
- FUGLSANG, A. T.; PAZ-VALENCIA, J.; GAXIOLA, R. A. Plant Proton Pumps: Regulatory Circuits Involving H⁺-ATPase and H⁺-PPase. **Transporters and Pumps in Plant Signaling**. v. 7, p. 39 - 64, 2011.
- GANSEL, X.; MUÑOS, S.; TILLARD, P.; GOJON, A. Differential regulation of the NO₃⁻ and NH₄⁺ transporter genes *AtNrt2.1* and *AtAmt1.1* in Arabidopsis: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. **The Plant Journal**, v. 26, p.143-155, 2001.
- 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.
- GARCÍA, A. C.; SANTOS, L. A.; IZQUIERDO, F. G.; SPERANDIO, M. V. L.; CASTRO, R. N.; BERBARA, R. L. L. Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. *Ecological Engineering*, v. 47, p. 203-208, 2012.
- GARCIA-RUIZ, H.; TAKEDA, A.; CHAPMAN, E. J.; SULLIVAN, C. M.; FAHLGREN, N.; BREMPELIS, K. J.; CARRINGTON, J. C. Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during turnip mosaic virus infection. **Plant Cell**. v. 22, p.481-496, 2010.
- GARNETT, T.; CONN, V.; PLETT, D.; CONN, S.; ZANGHELLINI, J.; MACKENZIE, N.; ENJU, A.; FRANCIS, K.; HOLTHAM, L.; ROESSNER, U.; BOUGHTON, B.; BACIC, A.; SHIRLEY, N.; RAFALSKI, A.; DHUGGA, K.; TESTER, M.; KAISER, B. N. The response of the maize nitrate transport system to nitrogen demand and supply across the lifecycle. **New Phytologist**, v. 198, p. 82-94, 2013.
- GAXIOLA, R. A., PALMGREN, M. G., SCHUMACHER, K. Plant Proton Pumps. **FEBS Letters**, v. 581, p.2204 – 2214, 2007.
- GAXIOLA, R. A.; SANCHEZ, C. A.; PAEZ-VALENCIA, J.; AYRE, B. G., ELSER, J. J. Genetic manipulation of a “vacuolar” H⁺-PPase: from salt tolerance to yield enhancement under phosphorus-deficient soils. **Plant physiology**, v. 159, p. 3-11, 2012.
- GEISSELER, D.; HORWATH, W. R.; JOERGENSEN, R. G.; LUDWIG, B. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms - A review. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 2058-2067, 2010.
- GÉVAUDANT, F.; DUBY, G.; STEDINGK, E. V.; ZHAO, R.; MORSOMME, P.; BOUTRY, M. Expression of a constitutively activated plasma membrane H⁺-ATPase alters plant development and increases salt tolerance. **Plant Physiology**, v. 144, 1763-1776, 2007.
- GIFFORD, M. L.; DEAN, A.; GUTIERREZ, R. A.; CORUZZI, G. M.; BIRNBAUM, K. D. Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 105, p. 803-808, 2008.
- GIRIM, T., LEJAY, L., WIRTH, J., WIDIEZ, T., PALENCHAR, P. M., NAZOA, P., TOURAINÉ, B., GOJON, A., LEPETIT, M. Identification of a 150 bp cis-activating element of the *AtNRT2.1* promoter involved in the regulation of gene expression by the N and C status in the plant. **Plant, Cell and Environment**, v. 30 p. 1366-1380, 2007.
- GLASS, A. D. Nitrogen Use Efficiency of Crop Plants: Physiological Constraints upon Nitrogen Absorption. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p. 453–470, 2003.

- GOJON, A.; KROUK, G.; PERRINE-WLAKER, F.; LAUGIER, E. Nitrate Transceptor(s) in Plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 2299-2308, 2011.
- GULERIA, P.; MAHAJAN, M.; BHARDWAJ, J.; YADAV, S. K. Plant Small RNAs: Biogenesis, Mode of Action and Their Roles in Abiotic Stresses. **Genomics Proteomics Bioinformatics**. v. 9, p. 183-199, 2011.
- HAGER, A. Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. **Journal of Plant Research**, v. 116, p. 483–505. 2003.
- HARUTA, M.; BURCH, H. L.; NELSON, R. B.; Barrett-Wilt, G.; KLINE, K. G.; Mohsin, S. B.; YOUNG, J. C.; OTEGUI, M. S.; SUSSMAN, M. R. Molecular Characterization of Mutant Arabidopsis Plants with Reduced Plasma Membrane Proton Pump Activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 17918–17929, 2010.
- HARUTA, M.; SUSSMAN, M. R. The effect of a genetically reduced plasma membrane protonmotive force on vegetative growth of Arabidopsis. **Plant physiology**. v. 158, p. 1158-1171, 2012.
- HIEI, Y.; KOMARI, T. *Agrobacterium*-mediated transformation of Rice using immature embryos or calli induced from mature seed. **Nature Protocols**, v. 3, p. 824 – 834, 2008.
- HIREL, B.; ANDRIEU, B.; VALADIER, M. H.; RANARD, S.; QUILLERÉ, I.; CHELLE, M.; POMMEL, B.; FOURNIER, C.; DROUET, J. L. Physiology of maize II: Identification of physiological markers representative of the nitrogen status of maize (*Zea mays*) leaves during grain filling. **Physiologia Plantarum**, v. 124, p. 178-188, 2005.
- HIROCHIKA, H. Retrotransposons of rice: their regulation and use for genome analysis. **Plant Molecular Biology**. v. 35, 231 – 240, 1997.
- 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.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural of Experimental Stn. Bull*, v.347, p.1-32, 1950.
- HU, H. C., WANG, Y. Y., TSAY, Y. F. AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. **The Plant Journal**, v. 57, p. 264–278, 2009.
- HUANG, N. C.; LIU, K. H.; LO, H. J.; TSAY, Y. F. Cloning and functional characterization of an Arabidopsis nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. **The Plant Cell**, v. 11, p. 1381–1392, 1999.
- ISHII, S.; IKEDA, S.; MINAMIZAWA, K.; SENOO, K. Nitrogen Cycling in Rice Paddy Environments: Past Achievements and Future Challenges. **Microbes and Environments**. v. 26, p. 282–292, 2011.
- JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 646-651, 2006.
- JANICKA-RUSSAK, M.; KABAŁA, K.; WDOWIKOWSKA, A.; KŁOBUS, G. Modification of plasma membrane proton pumps in cucumber roots as an adaptation mechanism to salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 915-922, 2013.
- JEUFFROY, M. H.; NEY, B.; OURRY, A. Integrated physiological and agronomic modelling of N capture and use within the plant. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 809–823, 2002.

- KANNO, Y.; HANADA, A.; CHIBA, Y.; ICHIKAWA, T.; NAKAZAWA, M.; MATSUI, M.; KOSHIBA, T.; KAMIYA, Y.; SEO, M. Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** v. 109, p. 9653–9658, 2012.
- KATAYAMA, H.; MORI, M.; KAWAMURA, Y.; TANAKA, T.; MORI, M.; HASEGAWA, H. Production and characterization of transgenic plants carrying a high-affinity nitrate transporter gene (*OsNRT2.1*). **Breeding Science**, v. 59, p. 237–243, 2009.
- KAWASHIMA, C. G.; YOSHIMOTO, N.; MARUYAMA-NAKASHITA, A.; TSUCHIYA, Y. N.; SAITO, K.; TAKAHASHI, H.; DALMAY, T. Sulphur starvation induces the expression of microRNA-395 and one of its target genes but in different cell types. **Plant Journal**, v. 57, p. 313–321, 2009.
- KHANDAY, I.; YADAV, S. R.; VIJAYRAGHAVAN, U. Rice LHS1/OsMADS1 Controls Floret Meristem Specification by Coordinated Regulation of Transcription Factors and Hormone Signaling Pathways. **Plant Physiology**, v. 161, p. 1970–1983, 2013.
- KIBA, T.; FERIA-BOURRELLIER, A. B.; LAFOUGE, F.; LEZHNEVA, L.; BOUTET-MERCEY, S.; ORSEL, M.; BRÉHAUT, V.; MILLER, A.; DANIEL-VEDELE, F.; SAKAKIBARA, H.; KRAPP, A. The Arabidopsis Nitrate Transporter NRT2.4 Plays a Double Role in Roots and Shoots of Nitrogen-Starved Plants. **The Plant Cell**, v. 24, p. 245–258, 2012.
- KIRK, G. J. D.; KRONZUCKER, H. J. The Potential for Nitrification and Nitrate Uptake in the Rhizosphere of Wetland Plants: A Modelling Study. **Annals of Botany**, v. 96, p. 639–646, 2005.
- KÖGEL-KNABNER, I.; AMELUNG, W.; CAO, Z.; FIEDLER, S.; FRENZEL, P.; JAHN, R.; KALBITZ, K.; KOELBL, A.; SCHLOTER, M. Biogeochemistry of paddy soils. **Geoderma**, v. 157, p. 1–14, 2010.
- KOTUR, Z.; MACKENZIE, N.; RAMESH, S.; TYERMAN, S. D.; KAISER, B. N.; GLASS, A. D. Nitrate transport capacity of the Arabidopsis thaliana NRT2 family members and their interactions with AtNAR2.1. **New Phytologist**, v. 194, p. 724–731. 2012.
- KRAJINSKI, F., COURTY, P. E., SIEH, D., FRANKEN, P., ZHANG, H., BUCHER, M., GERLACH, N.; KRYVORUCHKO, I.; ZOELLER, D.; UDVARDI, M.; HAUSE, B. The H⁺-ATPase HA1 of *Medicago truncatula* is essential for phosphate transport and plant growth during arbuscular mycorrhizal symbiosis. **The Plant Cell**, v. 26, p. 1808–1817, 2014.
- KRAPP, A.; DAVID, L. C.; CHARDIN, C.; GIRIN, T.; MARMAGNE, A.; LEPRINCE, A. S.; CHAILLOU, S.; FERRARIO-MÉRY, S.; MEYER, C.; DANIEL-VEDELE, F. Nitrate transport and signalling in Arabidopsis. **Journal of experimental botany**, v. 65, p. 789–798, 2014.
- KRONZUCKER, H. J.; GLASS, A. D. M.; SIDDIQI, M. Y.; KIRK, G. J. D. Comparative kinetic analysis of ammonium and nitrate acquisition by tropical lowland rice: implications for rice cultivation and yield potential. **New Phytologist**, v. 145, p. 471–476, 2000.
- KROUK G.; LACOMBE B.; BIELACH A.; PERRINE-Walker, F.; MALINSKA K.; MOUNIER E.; HOYEROVA K.; PASCAL T.; LEON S.; LJUNG K.; ZAZIMALOVA E.; BENKOVA E.; NACRY, P.; GOJON, A. Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. **Developmental Cell** 18, 927–937, 2010.

- KROUK, G.; TILLARD, P.; GOJON, A. Regulation of the high-affinity NO_3^- Uptake System by a NRT1.1-mediated “ NO_3^- demand” signalling in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 142, p.1075–1086, 2006.
- LANGHANS, M.; RATAJCZAK, R.; LUTZELSCHWAB, M.; MICHALKE, W.; WACHTER, R.; FISCHER-SCHLIEBS, E.; ULLRICH, C. I. Immunolocalization of plasma-membrane H^+ -ATPase and tonoplast-type pyrophosphatase in the plasma membrane of the sieve element-companion cell complex in the stem of *Ricinus communis* L. **Planta**, v. 213, p. 11–19, 2001.
- LAUBINGER, S.; ZELLER, G.; HENZ, S. R.; BUECHEL, S.; SACHSENBERG, T.; WANG, J-W.; RÄTSCH.; WEIGEL, D. Global effects of the small RNA biogenesis machinery on the Arabidopsis thaliana transcriptome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 110, p. 17466-17473, 2010.
- LAUGIER, E.; BOUGUYON, E.; MAURIÈS, A.; TILLARD, P.; GOJON, A.; LEJAY, L. Regulation of High-Affinity Nitrate Uptake in Roots of Arabidopsis Depends Predominantly on Posttranscriptional Control of the NRT2.1/NAR2.1 Transport System. **Plant Physiology**, v. 158, p. 1067-1078, 2012.
- LEE, Y.; CHOI, H. S.; SHIN, J. H.; LEE, S. M. Mineralized N of plant residues with different C:N ratios under upland and rice paddy condition. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.10, p. 808-812, 2012.
- LEJAY, L.; TILLARD, P.; LEPETIT, M.; OLIVE, F.; FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, F.; GOJON, A. Molecular and functional regulation of two NO_3^- uptake systems by N- and C-status of Arabidopsis plants. **Plant Journal**, v. 18, p. 509–519, 1999.
- LÉRAN, S.; MUÑOS, S.; BRACHET, C.; TILLARD, P.; GOJON, A.; LACOMBE, B. Arabidopsis NRT1.1 is a bidirectional transporter involved in root-to-shoot nitrate translocation. **Molecular Plant**, v. 6, p. 1984–1987, 2013.
- LÉRAN, S.; VARALA, K.; BOYER, J.-C.; CHIURAZZI, M.; CRAWFORD, N.; DANIEL-VEDELE, F.; DAVID, L.; DICKSTEIN, R.; FERNANDEZ, E.; FORDE, B.; GASSMAN, W.; GEIGER, D.; GOJON, A.; GONG, J. M.; HALKIER, B. A.; HARRIS, J. M.; HEDRICH, R.; LIMANI, A. N.; 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. **Trend in Plant Science**, v. 19, p. 5-9, 2014.
- LI, J. Y.; FU, Y. L.; PIKE, S. M. The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. **The Plant Cell**, v. 22, p. 1633–1646, 2010.
- LI, J.; REICHEL, M.; LI, Y.; MILLAR, A. A. The functional scope of plant microRNA-mediated silencing. **Trends in Plant Science**, v. 19, p. 750-756, 2014.
- LI, J.-Y.; FU, Y.-L.; PIKE, S. M.; BAO, J.; TIAN, W.; ZHANG, Y.; CHEN, C.-Z.; ZHANG, Y.; LI, H.-M. HUANG, J.; LI, L.-G.; SCHROEDER, J. I.; GASSMANN, W.; GONG, J.-M. The arabidopsis nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. **The Plant Cell**, v. 22(5), p. 1633-1646, 2010.
- LI, J; YANG, H; PEER, W. A.; RICHTER, G.; BLASKELEE, J.; BANDYOPADHYAY, A.; TITAPIWANTAKUN, B.; UNDURRAGA, S.; KHODAKOVSKAYA, M.; RICHARDS, E. L.; KRIZEK, B.; MURPHY, A. S.; GILROY, S; GAXIOLA, R. Arabidopsis H^+ -PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. **Science**, v. 310, p. 121-125, 2005.

- LI, W.; WANG, Y.; OKAMOTO, M.; CRAWFORD, N. M.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. **Plant Physiology**, v. 143, p. 423-433, 2007.
- LI, X., GUO, C., GU, J., DUAN, W., ZHAO, M., MA, C., DU, X.; LU, W.; XIAO, K. Overexpression of VP, a vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene in wheat (*Triticum aestivum* L.), improves tobacco plant growth under Pi and N deprivation, high salinity, and drought. **Journal of experimental botany**, v. 65, p. 683-696, 2014.
- LIN, C. M.; KOH, S.; STACEY, G.; YU, S. M.; LIN, T. Y.; TSAY, Y. F. Cloning and Functional Characterization of a Constitutively Expressed Nitrate Transporter Gene, OsNRT1, from Rice. **Plant Physiology**, v. 122, p. 379-388, 2000.
- LIN, J.; ZHOU, B.; YANG, Y.; ZHAO, X.; GUO, X.; HUANG, X.; TANG, D.; LIU, X. Piercing and vacuum infiltration of the mature embryo: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of indica rice. **Plant Cell Reports**, v. 28, p. 1065-1074, 2009.
- LINQUIST, B. A.; BROUDER, S.M.; HILL, J. E. Winter straw and water management effects on soil nitrogen dynamics in California rice systems. **Agronomy Journal**, v. 98, p.1050–1059, 2006.
- LINQUIST, B. A.; KOFFLER, K.; HILL, J. E.; van KESSEL, C. Rice field drainage affects nitrogen dynamics and management. **California Agriculture**, v. 65, p. 80-84, 2011.
- LIU, K. H., TSAY, Y. F. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. **EMBO Journal**, v. 22, p. 1005–1013, 2003.
- LIU, T. Y.; CHANG, C. Y.; CHIOU, T. J. The long-distance signaling of mineral macronutrients. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 312-319, 2009.
- LIU, T.-Y.; HUANG, T.-K.; TSENG, C.-Y.; LAI, Y.-S.; LIN, S.-I.; LIN, W.-Y.; CHEN, J.-W.; CHIOU, T.-J. PHO2-Dependent Degradation of PHO1 Modulates Phosphate Homeostasis in Arabidopsis. **The Plant Cell**. v. 24, p. 2168-2183, 2012.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LU, C.; TEJ, S. S.; LUO, S.; HAUDENSCHILD, C. D.; MEYERS, B. C.; GREEN, P. J. Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. **Science**. v. 309, 1567-1569, 2005.
- LU, R.; MARTIN-HERNANDEZ, A. M.; PEART, J. R., MALCUIT, I. BAULCOMBE, D. C. Virus-induced gene silencing in plants. **Methods**, v. 30, p. 296–303, 2003.
- MAESHIMA, M. Tonoplast transporters: organization and function. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 52, p. 469–497, 2001.
- MALLORY, A. C.; REINHART, B. J.; JONES-RHOADES, M. W.; TANG, G.; ZAMORE, P. D.; BARTON, M. K.; BARTEL, D. P. MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. **Embo Journal**, v. 23, p. 3356–3364, 2004.
- MAMIDALA, P.; NANNA, R. S. Influence of antibiotics on regeneration efficiency in tomato, **Plant Omics Journal**, v. 2, p. 135-140, 2009.
- MANAVELLA, P. A.; HAGMANN, J.; OTT, F.; LAUBINGER, S.; FRANZ, M.; MACEK, B.; WEIGEL, D. Fast-forward genetics identifies plant CPL phosphatases as regulators of miRNA processing factor HYL1. **Cell**. v. 151, p. 859–870, 2012.

- MARGIS, R.; FUSARO, A. F.; SMITH, N. A.; CURTIN, S. J.; WATSON, J. M.; FINNEGAN, E. J.; WATERHOUSE, P. M. The evolution and diversification of Dicers in plants. **FEBS Letters**, v. 580, p. 2442-2450, 2006.
- MASCLAUX, C.; VALADIER, M. H.; BRUGIÈRE, N.; MOROT-GAUDRY, J. F.; HIREL, B. Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. **Planta**, v. 211, p. 510–518, 2000.
- MEGRAW, M.; BAEV, V.; RUSINOV, V.; JENSEN, S. T.; KALANTIDIS, K.; HATZIGEORGIOU, A. G. MicroRNA promoter element discovery in Arabidopsis. **RNA**, v. 12, p. 1612-1619, 2006.
- MENG, Y.; HUANG, F.; SHI, Q.; CAO, J.; CHEN, D.; ZHANG, J.; NI, J.; WU, P.; CHEN, M. Genome-wide survey of rice microRNAs and microRNA target pairs in the root of a novel auxin-resistant mutant. **Planta**, v. 230, p. 883-898, 2009.
- MERIGOUT, P.; LELANDAIS, M.; BITTON, F.; RENOU, J. P.; BRIAND, X.; MEYER, C.; DANIEL-VEDELE, F. Physiological and transcriptomic aspects of urea uptake and assimilation in Arabidopsis plants. **Plant Physiology**, v. 147, p. 1225–1238, 2008.
- MILLER, A. J.; CRAMER, M. D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, v. 274, p. 1-36, 2004.
- MINGOTTE, F. L. C.; HANASHIRO, R. K.; FORNASIERI FILHO, D. Características físico-químicas do grão de cultivares de arroz em função da adubação nitrogenada. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 2605-2618, 2012.
- MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**, v. 5, p. 62-71, 2001.
- MITSUDA, N.; ENAMI, K.; NAKATA, M.; TAKEYASU, K.; SATO, M. H. Novel type Arabidopsis thaliana H⁺-PPase is localized to the golgi apparatus. **FEBS Letter**, v. 488, p. 29–33, 2001.
- MITSUDA, N.; HISABORI, T.; TAKEYASU, K.; SATO, M. H. VOZ; isolation and characterization of novel vascular plant transcription factors with a one-zink finger from Arabidopsis thaliana. **Plant Cell Physiology**, v. 45, p. 845–854, 2004.
- MIYAO, A., TANAKA, K.; MURATA, K.; SAWAKI, H.; TAKEDA, S.; ABE, K.; SHINOZUKA, Y.; ONOSATO, K.; HIROCHIKA, H. Target Site Specificity of the Tos17 Retrotransposon Shows a Preference for Insertion within Genes and against Insertion in Retrotransposon-Rich Regions of the Genome. **The Plant Cell**, v. 15, p. 1771 – 1780, 2003.
- MŁODZIŃSKA, E., KŁOBUS, G., CHRISTENSEN, M. D., & FUGLSANG, A. T. The plasma membrane H⁺ATPase AHA2 contributes to the root architecture in response to different nitrogen supply. *Physiologia plantarum*, 2014 (*in press*).
- NACRY, P.; BOUGUYON, E.; GOJON, A. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. **Plant and Soil**, v. 370, p. 1-29, 2013.
- NANNIPIERI, P.; ELDOR, P. The chemical and functional characterization of soil N and its biotic components. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 41, p. 2357-2369, 2009.
- NARDOTO, G. B.; BUSTAMANTE, M. C. Effects of fire on soil nitrogen dynamics and microbial biomass in savannas of Central Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 955–962, 2003.

- NAZOA, P.; VIDMAR, J. J.; TRANBARGER, T. J.; MOULINE, K.; DAMIANI, I.; TILLARD, P.; ZHUO, D.; GLASS, A. D.; TOURAINE, B. Regulation of the nitrate transporter gene *AtNRT2.1* in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. **Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 689–703, 2003.
- OKAMOTO, M.; VIDMAR, J. J. & GLASS, A. D. M. Regulation of NRT1 and NRT2 genes families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. **Plant and Cell Physiology**, v.44, n.3, p.304-317, 2003.
- ORSEL, M.; CHOPIN, F.; LELEU, O.; SMITH, S. J.; KRAPP, A.; DANIEL-VEDELE, F.; MILLER, A. Characterization of a Two-Component High-Affinity Nitrate Uptake System in *Arabidopsis*. Physiology and Protein-Protein Interaction. **Plant Physiology**, v. 142, p. 1304-1317, 2006.
- 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.
- OSSOWSKI S.; SCHWAB, R.; WEIGEL D. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. **The Plant Journal**, v. 53, p. 674–690, 2008.
- PAEZ-VALENCIA, J., SANCHEZ-LARES, J., MARSH, E., DORNELES, L. T., SANTOS, M. P., SANCHEZ, D., WINTER, D.; MURPHY, S.; COX, J.; TRZASKA, M.; METLER, J.; KOZIC, A.; FACANHA, A. R.; SCHACHTMAN, D.; SANCHEZ, C. A.; GAXIOLA, R. A. Enhanced proton translocating pyrophosphatase activity improves nitrogen use efficiency in romaine lettuce. **Plant physiology**, v. 161, p. 1557-1569, 2013.
- PALMGREN, M.G.; CHRISTENSEN, G. Functional comparisons between plant plasma membrane H⁺-ATPase isoforms expressed in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 3027–3033, 1994.
- PANT, B. D.; BUHTZ, A.; KEHR, J.; SCHEIBLE, W. R. MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. **Plant Journal**, v. 53, p. 731–738, 2008.
- PARK, S.; LI, J.; PITTMAN, J. K.; Berkowitz, G. A.; YANG, H.; UNDURRAGA, S.; MORRIS, J.; Hirschi, K. D.; GAXIOLA, R. A. Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** v. 102, p. 18830-18835, 2005.
- PATTANAYAK, D.; SOLANKE, A. U.; KUMAR, P. A. Plant RNA Interference Pathways: Diversity in Function, Similarity in Action. **Plant Molecular Biology Reports**. v. 31, p. 493–506, 2013.
- PAVEN, M. C. M-L.; VIAU, L.; HAMON, A.; VANDECASTEELE, C.; PELLIZARO, A.; BOURDIN, C.; LAFFONT, C.; LAPIED, B.; LEPETIT, M.; FRUGIER, F.; LEGROS, C.; LIMAMI, A. N. Characterization of a dual-affinity nitrate transporter *MtNRT1.3* in the model legume *Medicago truncatula*. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 5595–5605, 2011.
- PELLIZZARO, A.; CLOCHARD, T.; PLANCHET, E.; LIMAMI, A. M.; LE PAVEN, M. C. M. Identification and molecular characterization of *Medicago truncatula* NRT2 and NAR2 families. **Physiologia Plantarum**, 2015 (*In press*).
- PLETT D.; TOUBIA J., GARNETT T.; TESTE M.; KAISER B. N.; BAUMANN U. Dichotomy in the NRT Gene Families of Dicots and Grass Species. **PLoS ONE**, v. 5 (12) p.15289-15289, 2010.

- QUAGGIOTTI, S.; RUPERTI, B.; BORSA, P.; DESTRO, T. & MALAGOLI, M. Expression of a putative high-affinity NO₃⁻ transporter and of an H⁺-ATPase in relation to whole plant nitrate transport physiology in two maize genotypes differently responsive to low nitrogen availability. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.384, p.1023-1031, 2003.
- QUAGGIOTTI, S.; RUPERTI, B.; PIZZEGHELLO, D.; FRANCIOSO, O.; TUGNOLI, V.; NARDI, S. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.398, p.803-813, 2004.
- RACZYNSKA, K. D.; SIMPSON, C. G.; CIESIOLKA, A.; SZEWC, L.; LEWANDOWSKA, D.; McNICOL, J.; SZWEYKOWSKA-KULINSKA, Z.; BROWN, J. W. S.; JARMOLOWSKI, A. Involvement of the nuclear cap-binding protein complex in alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. **Nucleic Acids Research**. v. 38, p. 265-278, 2010.
- REN, G.; XIE, M.; DOU, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, C.; YU, B. Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 109, p. 12817–12821, 2012.
- ROGERS, K; CHEN, X. Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs. **The Plant Cell**. v. 25, p. 2383-2399, 2013.
- SAHOO, K. K.; TRIPATHI, A. M.; PAREEK, A.; SOPORY, S.; SINGLA-PAREEK, S. An improved protocol for efficient transformation and regeneration of diverse indica rice cultivars. **Plant Methods**, v. 7, i. 49, p. 1-11, 2011.
- SAHRAWAT, K. L. Ammonium production in submerged soils and sediments: The role of reducible iron. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.35, p. 399–411, 2004.
- SAHRAWAT, K. L. Nitrogen mineralization in lowland rice soils: The role of organic matter quantity and quality. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 56, p.337-353, 2010.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406–425, 1987.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning. A laboratory manual. 3^a Ed. CSHL PRESS, New York, 2001. 999p.
- SANTI, S.; CESCO, S.; VARANINI, Z.; PINTON, R. Two plasma membrane H⁺-ATPase genes are differentially expressed in iron-deficient cucumber plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43p. 287–292, 2005.
- SANTI, S.; LOCCI, G.; MONTE, R.; PINTON, R.; AND VARANINI, Z. Induction of nitrate uptake in maize roots: expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H⁺-ATPase isoforms. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 389, p. 1851-1864, 2003.
- SANTI, S.; LOCCI, G.; PINTON, R; CESCO, S.; VARANINI, Z. Plasma Membrane H⁺-ATPase in Maize Roots Induced for NO₃⁻ Uptake. **Plant Physiology**, v. 109, p. 1277-1283, 1995.
- SANTI, S.; SCHMIDT, W. Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. **New Phytologist**, v.183, p.1072-1084, 2009.
- SANTOS, L. A. Efeito da Superexpressão dos Fatores de Transcrição *ZmDof1* e *OsDof25* sobre a Eficiência de Uso de Nitrogênio em *Arabidopsis thaliana* L. 2009. 81f. Tese de

Doutorado. (Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

SANTOS, L. A., BUCHER, C. A., SOUZA, S. R., FERNANDES, M. S. Effects of nitrogen stress on proton-pumping and nitrogen metabolism in rice. **Journal of Plant Nutrition**, v. 32, p. 549 – 564, 2009.

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

SCHWAB, R.; PALATNIK, J. F.; RIESTER, M.; SCHOMMER, C.; SCHMID, M.; WEIGEL, D. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. **Dev. Cell**, v. 8, p. 517–527, 2005.

SCHWARZ, D. S.; DING, H.; KENNINGTON, L.; MOORE, J. T.; SCHELTER, J.; BURCHARD, J.; LINSLEY, P. S.; ARONIN, N.; XU, Z.; ZAMORE, P. D. Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide. **PLoS Genet.** v. 2, e140, 2006.

SCIVITTARO, W. B.; GONÇALVES, D. R. N.; VALE, M. L. C.; RICORDI, V. G. Perdas de nitrogênio por volatilização de amônia e resposta do arroz irrigado à aplicação de ureia tratada com o inibidor de urease NBPT. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1283-1289, 2010.

SCIVITTARO, W. B.; SILVA, C. A. S.; ANDRES, A.; REIS, J. C. L.; MATTOS, M. L. T.; TRIVELIN, MURAOKA, T. Potencial de Utilização de Leguminosas de Inverno como Fonte Alternativa de Nitrogênio para a Cultura do Arroz Irrigado. EMBRAPA (Comunicado Técnico 81), 2002.

SHEN, H.; CHEN, J.; WANG, Z.; YANG, C.; SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H.; YAN, X. Root plasma membrane H⁺-ATPase is involved in the adaptation of soybean to phosphorus starvation **Journal of Experimental Botany**, v. 57(6), p. 1353-1362, 2006.

SHIBU, M. E.; LEFELAAR, P. A.; van KEULEN, H.; AGGARWAL, P. K. Quantitative description of soil organic matter dynamics—A review of approaches with reference to rice-based cropping systems. **Geoderma**, v.137, p. 1–18, 2006.

SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M.; RUTH, T. J. & RUFTY, T. Studies of the uptake of nitrate in barley: I. Kinetics of ¹³NO₃⁻ influx. **Plant Physiology**, v.93, p.1426-1432, 1990.

SILVA, L. S.; POCOJESKI, E.; RHODEN, A. C. Dinâmica de nitrogênio mineral após alagamento em solos de várzea do Rio Grande do Sul. **Semina: Ciências agrárias**, v. 32, p. 583-590, 2011.

SONDERGAARD, T. E.; SCHULZ, A.; PALMGREN, M. G. Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H⁺-ATPase. **Plant Physiology**, v.136, p.2475-2482, 2004.

SONODA, Y.; IKEDA, A.; SAIKI, S.; WIRÉN, N. V.; YAMAYA, T.; YAMAGUCHI, J. Distinct Expression and Function of Three Ammonium Transporter Genes (OsAMT1;1 – 1;3) in Rice. **Plant Cell Physiology**. v. 44, p. 726-734, 2003.

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.

SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L. M. & FERNANDES, M. S. Nitrogen Remobilization During the Reproductive Period in Two Brazilian Rice Varieties. **Journal of Plant Nutrition**, New York, US, v.21, n.10, p.2049-2063, 1998.

SPERANDIO, M. V. L. **Expressão gênica de transportadores de nitrato e amônio, proteína reguladora NAR e bombas de prótons em arroz (*Oryza Sativa* L.) e seus efeitos na eficiência de absorção de nitrogênio**. 2011. 69f. Dissertação de Mestrado. (Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

SPERANDIO, M. V. L.; SANTOS, L. A.; BUCHER, C. A.; FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Isoforms of plasma membrane H⁺-ATPase in rice root and shoot are differentially induced by starvation and resupply of NO₃⁻ or NH₄⁺. **Plant Science**, v. 180, p. 251-258, 2011.

TEDESCO, M. J. Extração simultânea de N, P, K, Ca e Mg em tecido de plantas por digestão com H₂O₂-H₂SO₄. UFRGS. 1982. 23p.

TILLARD, P.; PASSAMA, L.; GOJON, A. Are phloem amino acids involved in the shoot to root control of NO₃⁻ uptake in *Ricinus communis* plants? **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 1371–1379, 1998.

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

TOKI, S.; HARA, N.; ONO, K.; ONODERA, H.; TAGIRI, A.; OKA, S.; TANAKA, H. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. **The Plant Journal**, v. 47, p. 969 – 976, 2006.

TSAY, Y. F.; CHIU, C. C.; TSAI, C. B.; HO, C. H.; HSU, P. K. Nitrate transporters and peptide transporters. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2290–2300, 2007.

UNDURRAGA, S. F.; SANTOS, M. P.; PAEZ-VALENCIA, J.; YANG, H.; HEPLER, P. K.; FACANHA, A. R.; HIRSCHI, K. D.; GAXIOLA, R. A. Arabidopsis sodium dependent and independent phenotypes triggered by H⁺-PPase up-regulation are SOS1 dependent. **Plant Science**, v. 183, p. 96–105, 2012.

VIDAL, E. A.; ARAUS, V.; LU, C.; PARRY, G.; GREEN, P. J.; CORUZZI, G. M.; GUTIÉRREZ, R. A. Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in Arabidopsis thaliana. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 107, p. 4477-4482, 2010.

VOINNET, O. Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. **Cell**. v. 136, p. 669-687, 2009.

VON WITTGENSTEIN, N. J., LE, C. H., HAWKINS, B. J., EHLTING, J. Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. **BMC evolutionary biology**, v. 14, p. 11, 2014.

WANG, E.; YU, N.; BANO, S. A.; LIU, C.; MILLER, A. J.; COUSINS, D.; ZHANG, X.; RATET, P.; TADEGE, M.; MYSORE, K. S.; DOWNIE, J. A.; MURRAY, J. D.; OLDROYD, G. E. D.; SCHULTZE, M. A H⁺-ATPase That Energizes Nutrient Uptake during Mycorrhizal Symbioses in Rice and *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, v. 26, p. 1818-1830, 2014.

WANG, G. L.; DING, G. D.; XU, F. S.; CAI, H. M.; ZOU, J.; YE, X. S. Genotype differences in photosynthetic characteristics and nitrogen efficiency of new-type oilseed rape responding to low nitrogen stress. **Journal of Agricultural Science**, 2015 (*in press*).

- WANG, H.; WANG, T. Z.; DONG, C. H.; WANG, Z. Q. Purification and reconstitution of tonoplast H⁺-ATPases from soybean. **Chine Journal Biochemistry Molecular Biology**, v. 16, p. 110-115, 2000.
- WANG, L.; SONG, X.; GU, L.; LI, X.; CAO, S.; CHU, C.; CUI, X.; CHEN, X.; CAO, X. NOT2 Proteins Promote Polymerase II-Dependent Transcription and Interact with Multiple MicroRNA Biogenesis Factors in Arabidopsis. **The Plant Cell**. v. 25, p. 715-727, 2013.
- WANG, R.; OKAMOTO, M.; XING, X.; CRAWFORD, N. M. Microarray analysis of the nitrate response in Arabidopsis roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. **Plant Physiol.** v. 132, p. 556–567, 2003.
- WANG, Y. Y.; TSAY, Y. F. Arabidopsis nitrate transporter NRT1.9 is important in phloem nitrate transport. **The Plant Cell**, v.23, p. 1945–1957, 2011.
- WARTHMAN, N.; CHEN, H.; OSSOWSKI, S.; WEIGEL, D.; HERVÉ, P. Highly Specific Gene Silencing by Artificial miRNAs in Rice. **Plos One**, v. 3, i. 3, e1829, 2008.
- WATSON, J. M.; FUSARO, A. F.; WANG, M.; WATERHOUSE, P. M. RNA silencing platforms in plants. **FEBS Letter**, v. 579, p. 5982–5987, 2005.
- WENG, X.; WANG, L.; WANG, J.; HU, Y.; DU, H.; XU, C.; XING, Y.; LI, X.; XIAO, J.; ZHANG, Q. *Grain Number, Plant Height, and Heading Date7* Is a Central Regulator of Growth, Development, and Stress Response. **Plant Physiology**, v. 164, p. 735-747, 2014.
- WIDIEZ, T.; EL KAFABI e S, GIRIN, T.; BERR, A.; RUFFEL, S.; KROUK, G.; VAYSSIÈRES, A.; SHEN, W. H.; CORUZZI, G. M.; GOJON, A.; LEPETIT, M. High nitrogen insensitive 9 (HNI9)-mediated systemic repression of root NO₃- uptake is associated with changes in histone methylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 108, p. 13329–13334, 2011.
- XIA, X.; FAN, X.; WEI, J.; FENG, H.; QU, H.; XIE, D.; MILLER, A. M.; XU, G. Rice nitrate transporter OsNPF2.4 functions in low-affinity acquisition and long-distance transport. *Journal of Experimental Botany*, v. 66, p. 317-331, 2015.
- XIN, Y.; WANG, Y. Q.; ZHANG, S. Q.; HUANG, C. L.; WU, Z. Y.; JIA, W. S. The effect of protein tyrosine phosphatases, PPases on ABA accumulation and involved in signal transportation of water tolerant in plant. **Chine Science Bullet**, v. 48, p. 369-374, 2003.
- XU, G.; FAN, X.; MILLER, A. J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 153–182, 2012.
- 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.
- YANG, H.; KNAPP, J.; KOIRALA, P.; RAJAGOPAL, D.; PEER, W. A.; SILBART, L. K.; MURPHY, A.; GAXIOLA, R. A. Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H⁺-pyrophosphatase. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, p. 735–745, 2007.
- YANG, H.; ZHANG, X.; GAXIOLA, R. A.; XU, G.; PEER, W. A.; MURPHY, A. S. Over-expression of the Arabidopsis proton-pyrophosphatase AVP1 enhances transplant survival, root mass, and fruit development under limiting phosphorus conditions. **Journal of experimental botany**, v. 65, p. 3045-3053, 2014.

- YANG, X.; SUN F.; XIONG, A.; WANG, F.; KONG M.; WANG.; Q.; WANG, J.; DAI, W.; XIA, X.; HOU, X. BcNRT1, a plasma membrane-localized nitrate transporter from non-heading Chinese cabbage. *Molecular Biology Reports*, v. 39, p. 7997 – 8006, 2012.
- YEMM, E. W. AND COCKING, E. C. The determination of amino-acid with ninhydrin. *Analytical Biochemical.*, v.80, p.209-213, 1955.
- YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of Carbohydrates In Plant Extracts By Anthrone. *Biochemical Journal*, v. 57, p.508-514, 1954.
- YU, B.; YANG, Z.; LI, J.; MINAKHINA, S.; YANG, M.; PADGETT, R. W.; STEWARD, R.; CHEN, X. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, v. 307, p. 932–935, 2005.
- ZANDONADI, D. B.; CANELLAS, L. P.; FAÇANHA, A. R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta*, v. 225, p. 1583-1589, 2007.
- ZHANG, L.; HOU, D.; CHEN, X.; LI, D.; ZHU, L.; ZHANG, Y.; LI, J.; BIAN, Z.; LIANG, X.; CAI, X.; YIN, Y.; WANG, C.; ZHANG, T.; ZHU, D.; ZHANG, D.; XU, J.; ZHANG, J.; ZEN, K.; ZHANG, C.-Y. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research*. v. 22, p. 107-126, 2012.
- ZHANG, R.; LIU, G.; WU, N.; GU, M.; ZENG, H.; ZHU, Y.; XU, G. Adaptation of plasma membrane H⁺ATPase and H⁺ pump to P deficiency in rice roots. *Plant Soil*, v. 349, p. 3-11, 2011.
- ZHANG, Z. H.; HUANG, H. T.; SONG, H. X.; LIU, Q.; RONG, X. M.; PENG, J. W.; XIE, G-X.; ZHANG, Y-P; GUAN, C. Y. Research advances on nitrate nitrogen reutilization by proton pump of tonoplast and its relation to nitrogen use efficiency. *Australian Journal of Crop Science*, v. 6, n. 9, p. 1377, 2012.
- ZHAO R. M., DIELEN V., KINET J. M., BOUTRY, M. Cosuppression of a plasma membrane H⁺-ATPase isoform impairs sucrose translocation, stomatal opening, plant growth, and male fertility. *Plant Cell*, v.12, v.4, p.535-546, 2000.
- ZHAO, M.; DING, H.; ZHU, J.-K.; ZHANG, F.; LI, W.-X. Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in Arabidopsis. *New Phytologist*. v. 190, p. 906-915, 2011.
- ZHAO, X.; ZHANG, H.; LI, L. Identification and analysis of the proximal promoters of microRNA genes in Arabidopsis. *Genomics*. v. 101, p. 187–194, 2013.
- ZHU, Y.; DI, T.; XU, G. CHEN, X.; ZENG, H.; YAN, F.; SHEN, Q. Adaptation of plasma membrane H⁺-ATPase of rice roots to low pH as related to ammonium nutrition. *Plant, cell & environment*, v. 32, p. 1428-1440, 2009.

8. ANEXOS

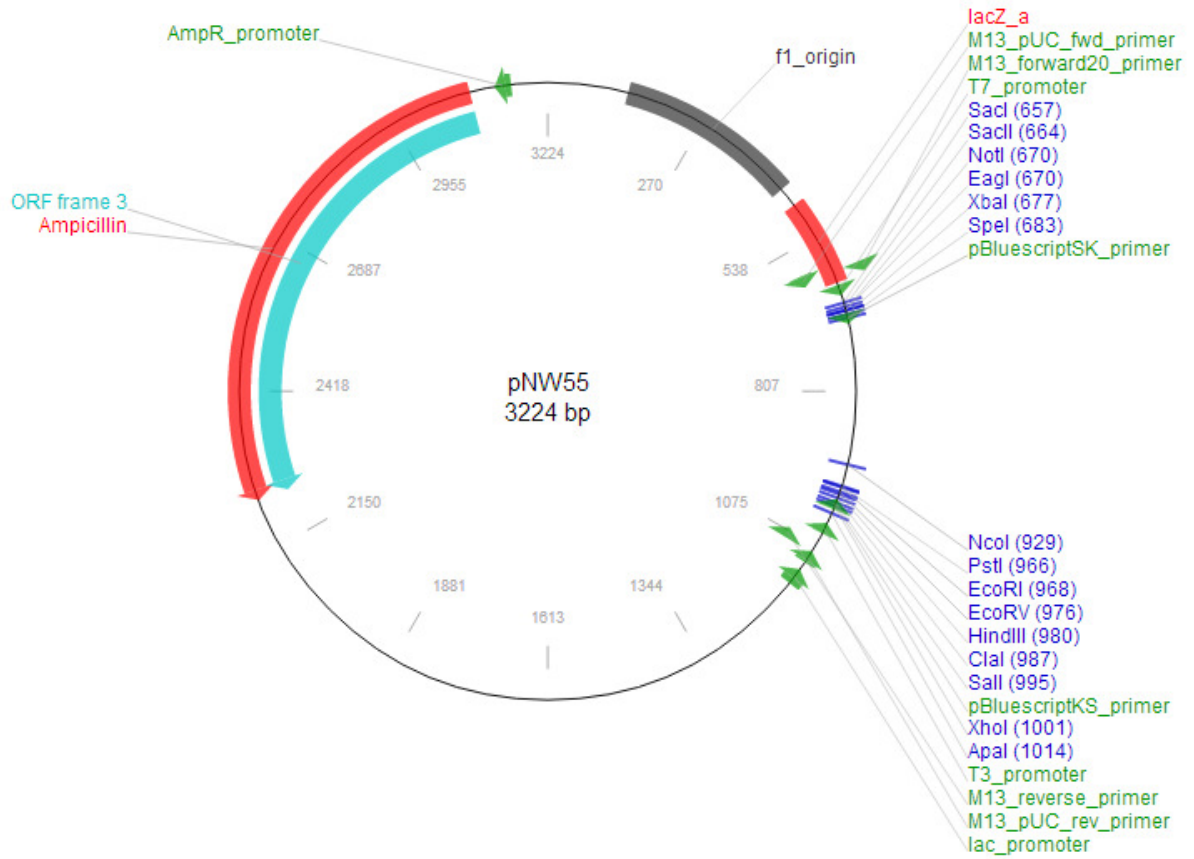


Figura anexo 1. Mapa do vetor pNW55 contendo osaMIR528 usado nas reações de PCR para inserir o amiRNA para silenciar os genes *Osa2* e *Osa7*.

9. APÊNDICE

Tabela anexa 1. Teste para verificar a segregação das linhagens mutantes IRS, *osa2.2*, *osa2.3*, *osa2.4*, *osa7.1*, *osa7.2*, e *osa7.3*.

Linhagem	Sem construção	Com construção	Segregação	X ² (3:1)*
IRS	14	30	2,14:1	0,2962
<i>osa2.2</i>	14	30	2,14:1	0,2962
<i>osa2.3</i>	4	40	10:1	0,0148
<i>osa2.4</i>	10	30	3:1	1
<i>osa7.1</i>	0	44	---	0,0001
<i>osa7.2</i>	8	36	4,5:1	0,2962
<i>osa7.3</i>	6	33	5,5:1	0,1655

* Linhagens com valor de X² maior que 0,05 possuem segregação 3:1 ($P < 0,05$).

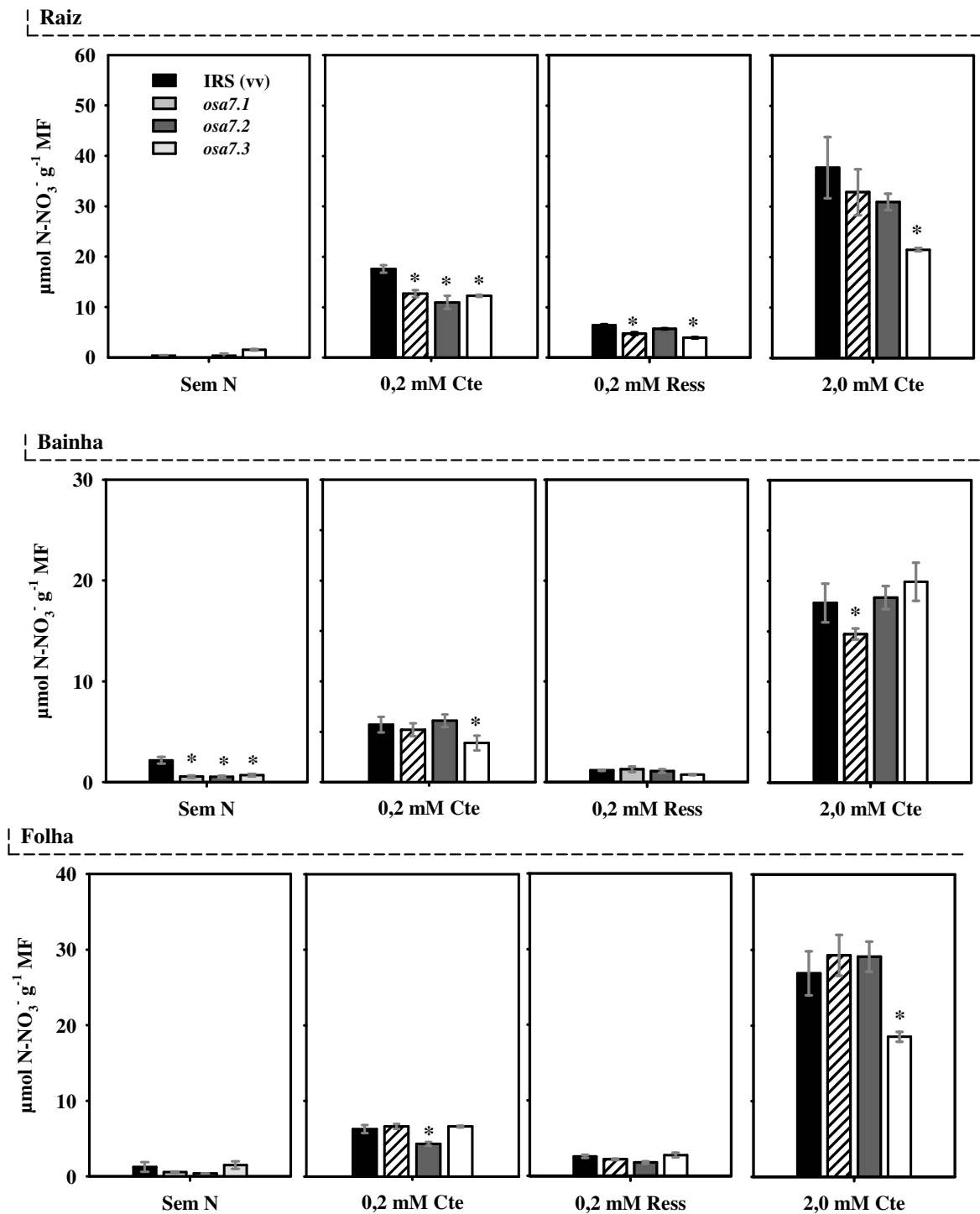


Figura anexo 2. Concentração de N-NO_3^- nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

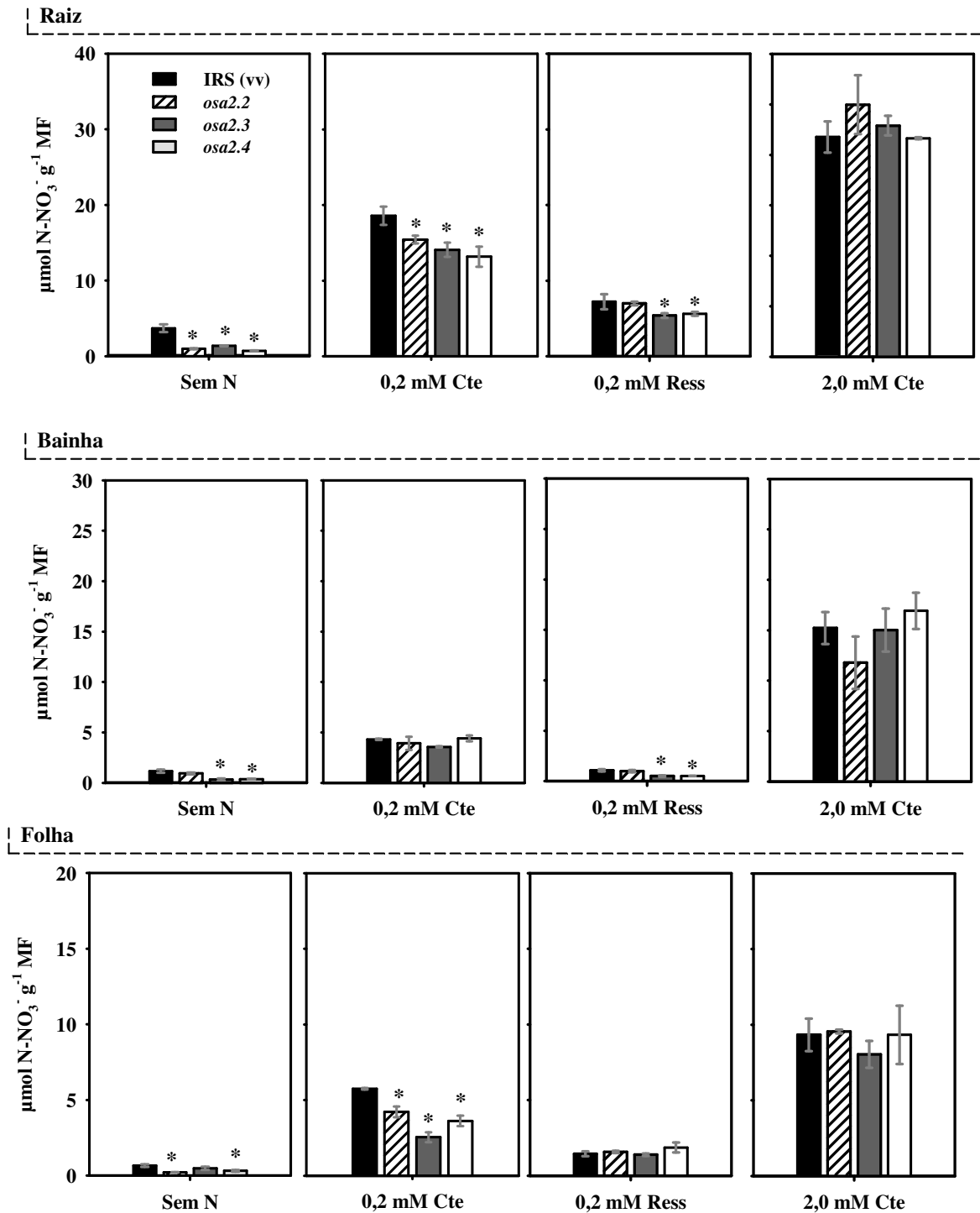


Figura anexo 3. Concentração de N-NO_3^- nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. * indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

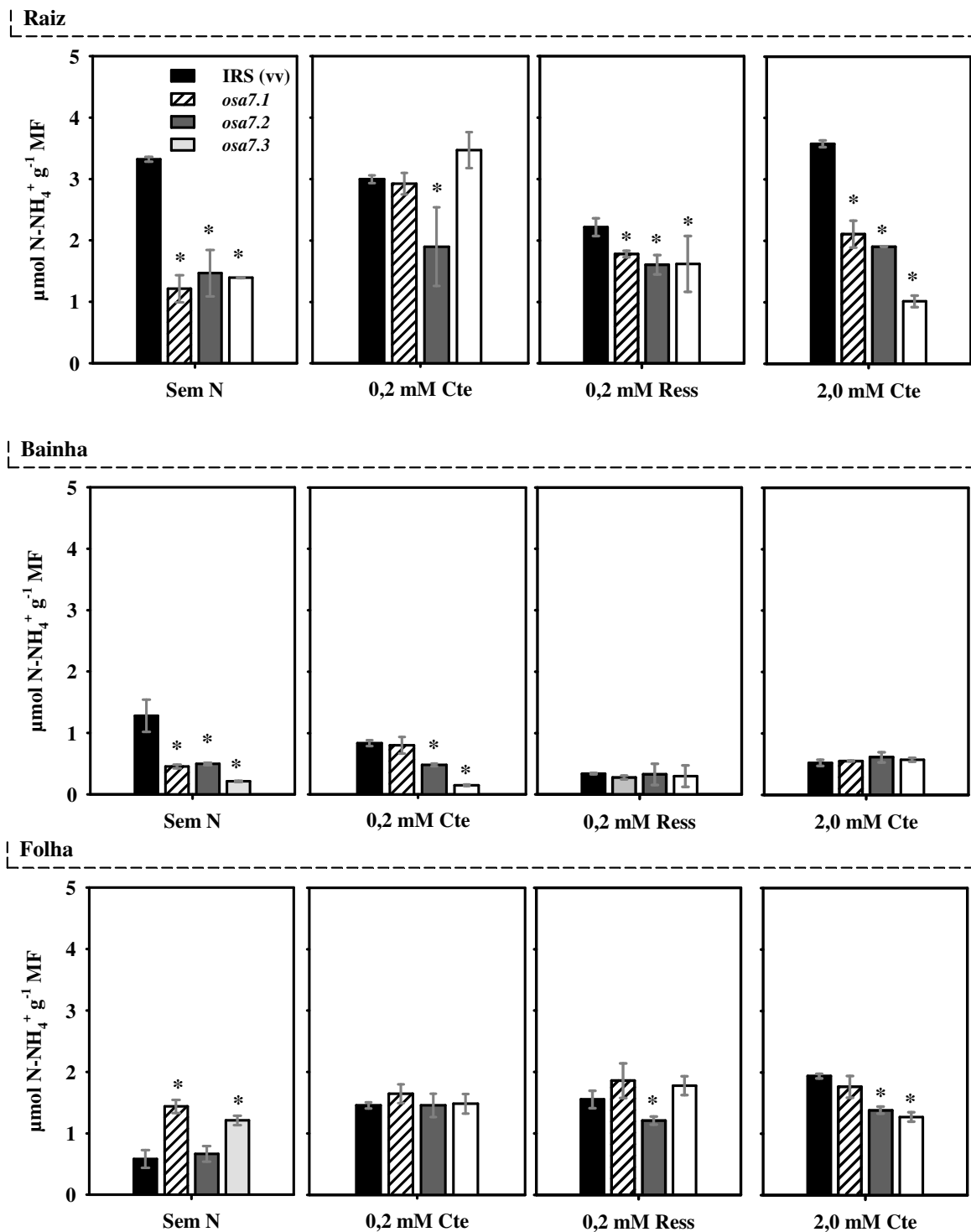


Figura anexo 4. Concentração de $N-NH_4^+$ nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ constante, ressuprimento com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ e 2,0 mM de $N-NO_3^-$ constante. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

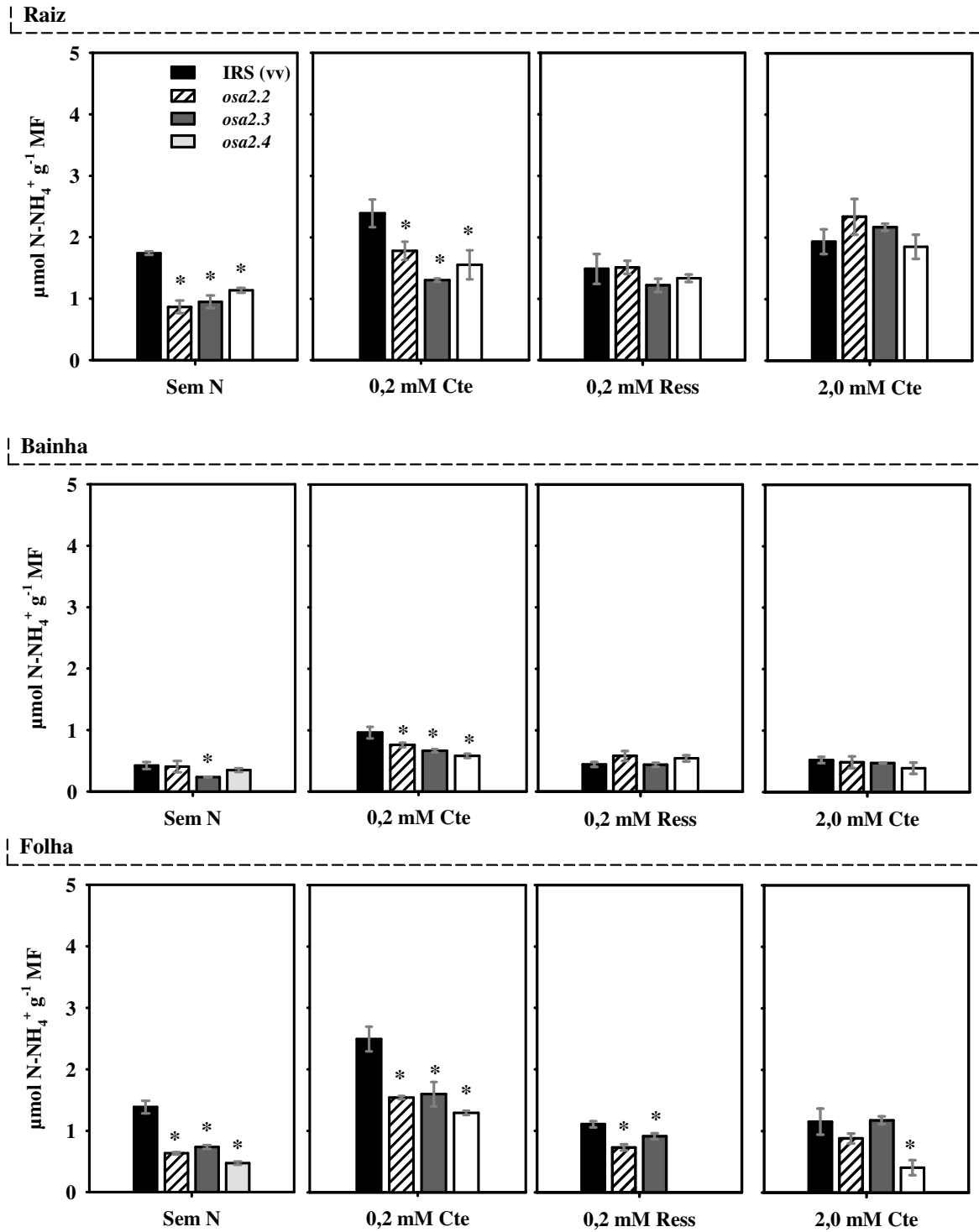


Figura anexo 5. Concentração de N-NH_4^+ nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. * indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

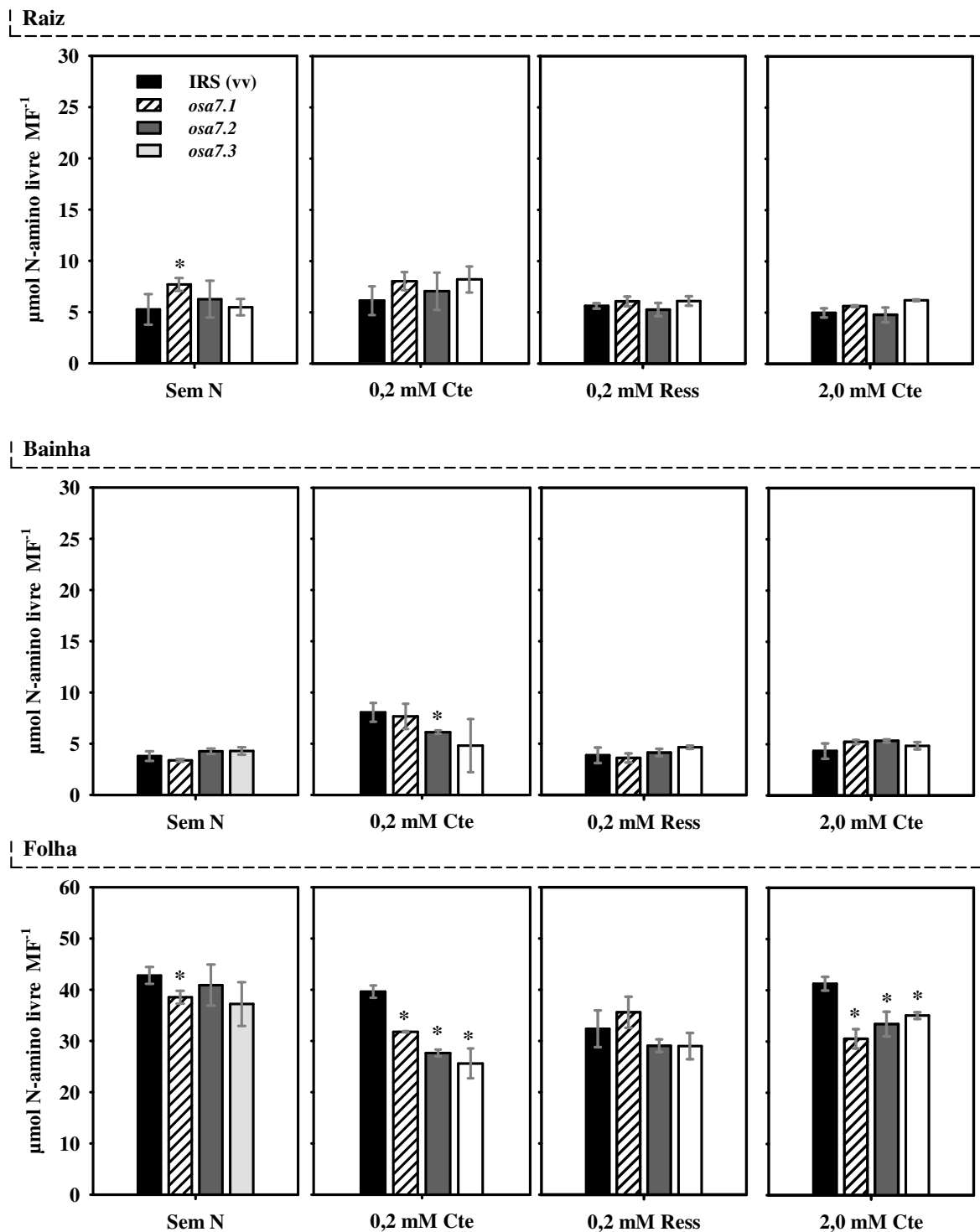


Figura anexo 6. Concentração de N-amino livre nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

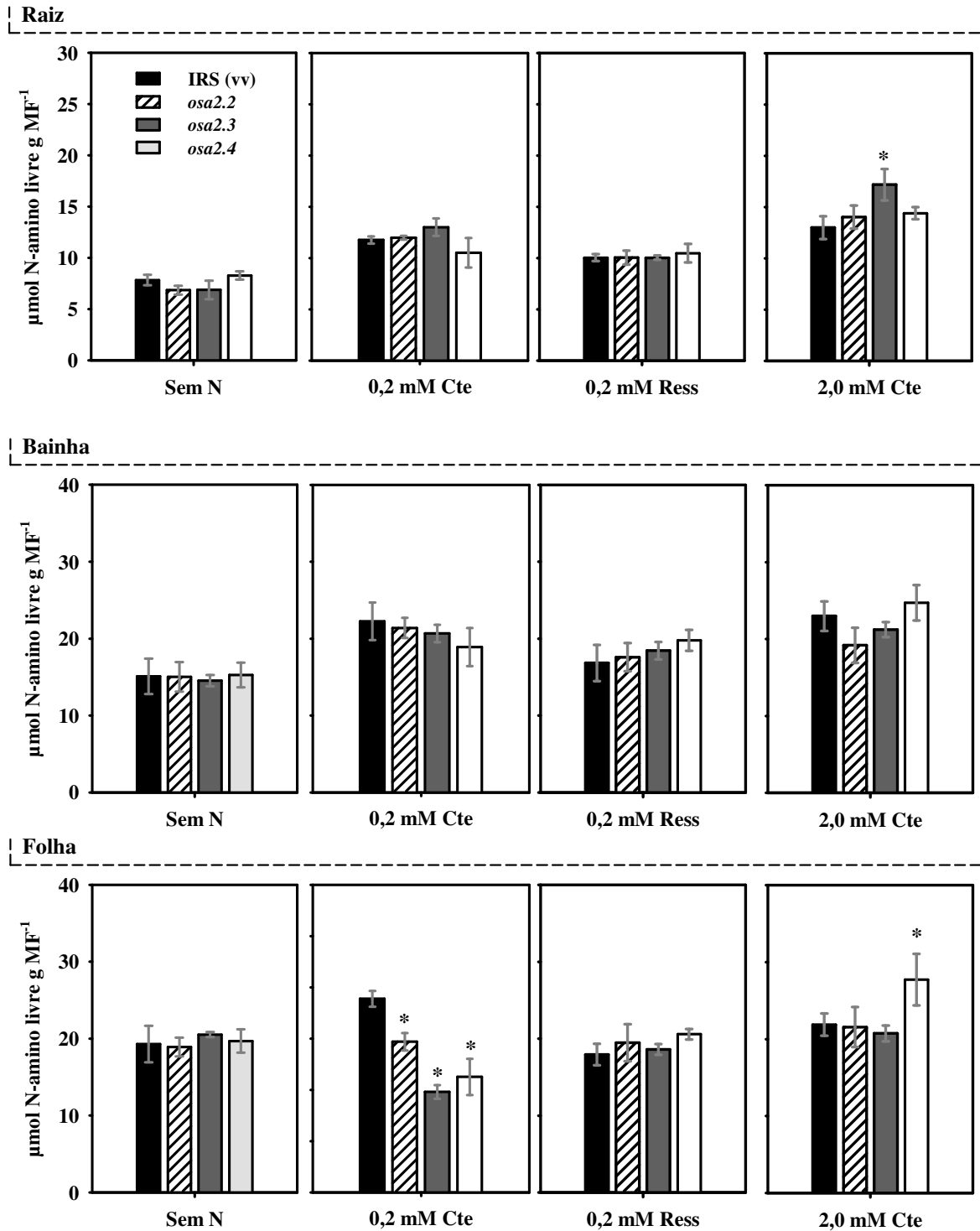


Figura anexo 7. Concentração de N-amino livre nas raízes, bainha e folha de arroz das linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. * indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

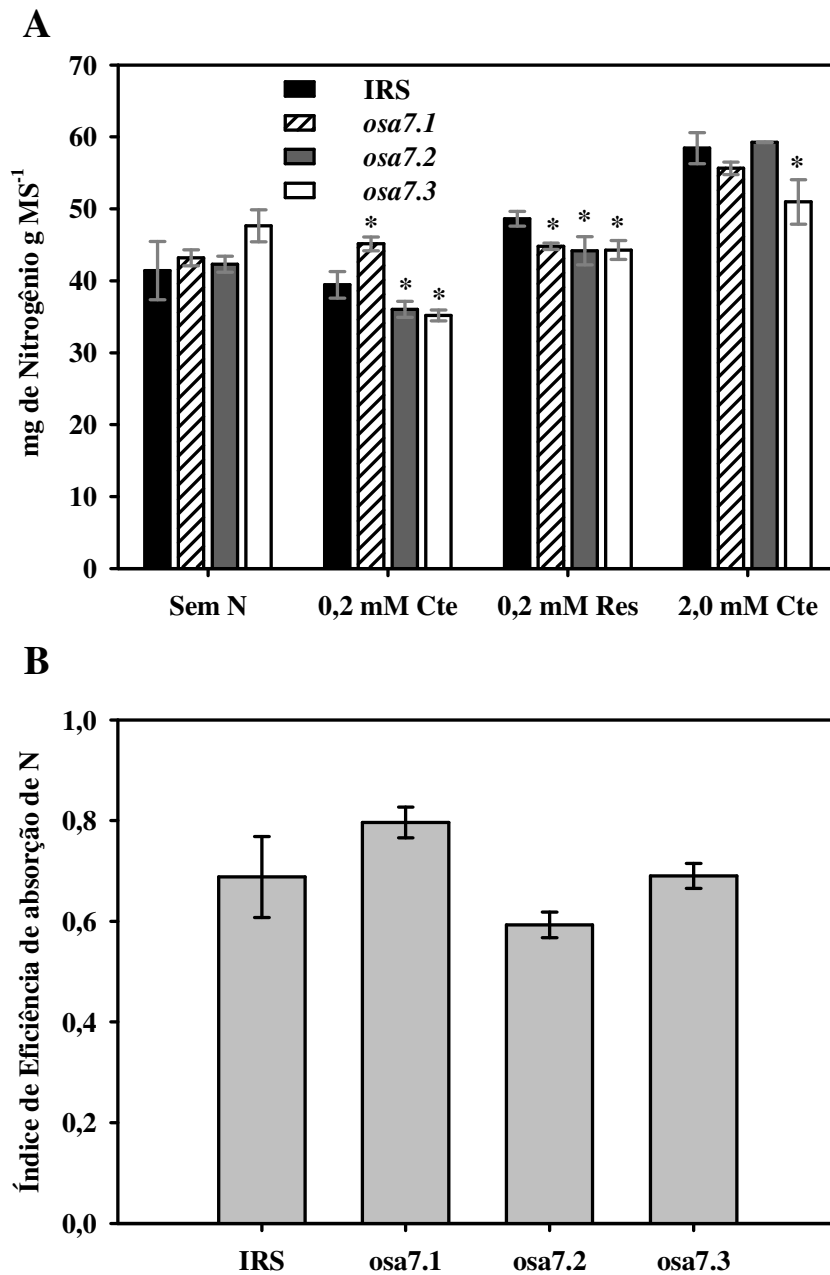


Figura anexo 8. (A) Teor de N-total nas linhagens mutantes *osa7* (*osa7.1*, *osa7.2* e *osa7.3*) IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO_3^- constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- e 2,0 mM de N-NO_3^- constante. (B) Índice de Eficiência de Absorção de N entre a planta controle IRS e os mutantes *osa7*, calculado a partir da relação entre o N-total das plantas cultivadas com 0,2 mM (baixa dose) e 2,0 mM de N-NO_3^- (alta dose). * indica diferença entre as linhagens *osa7* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).

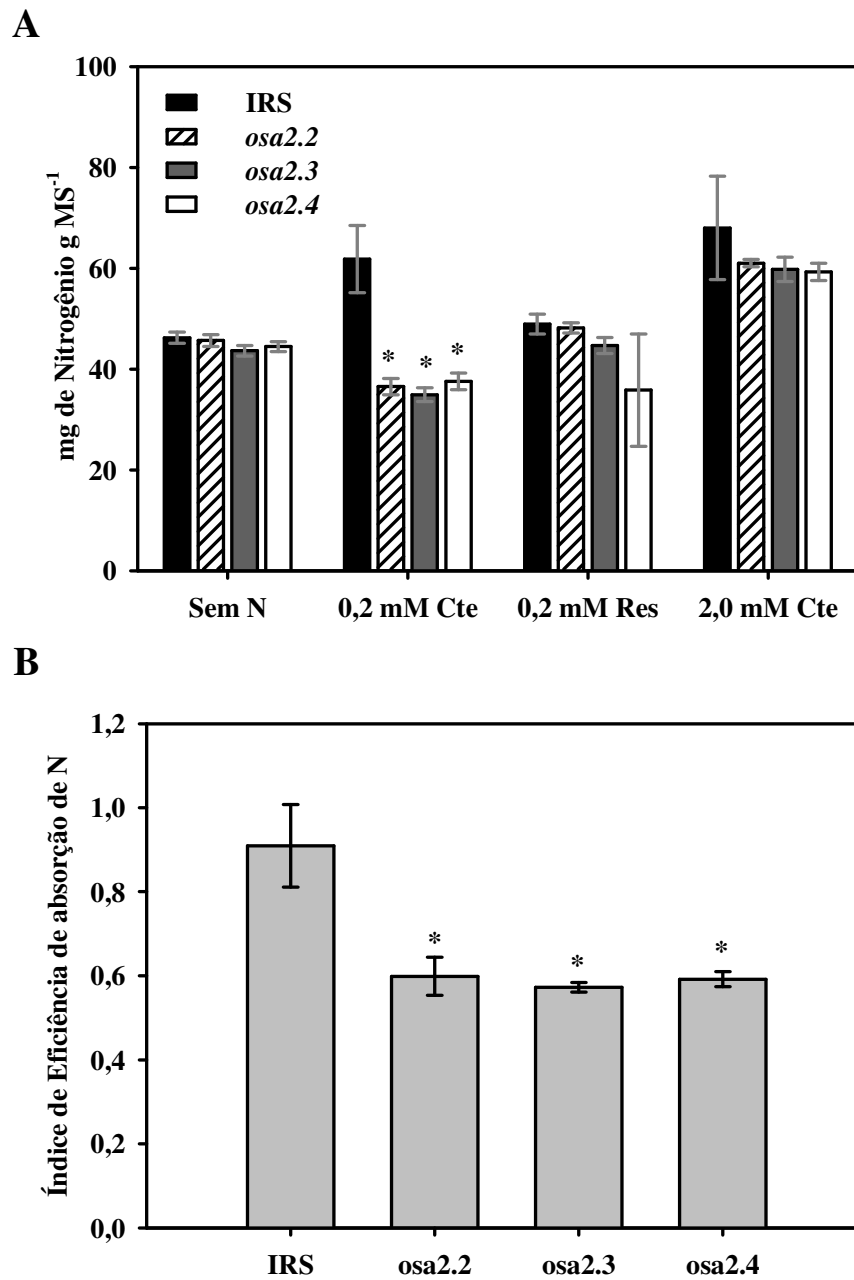


Figura anexo 9. (A) Teor de N-total nas linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de N-NO₃⁻ constante, ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ e 2,0 mM de N-NO₃⁻ constante. (B) Índice de Eficiência de Absorção de N entre a planta controle IRS e os mutantes *osa2*, calculado a partir da relação entre o N-total das plantas cultivadas com 0,2 mM (baixa dose) e 2,0 mM de N-NO₃⁻ (alta dose). * indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ($P < 0,05$).