# UFRRJ

## INSTITUTO DE AGRONOMIA

### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

### CIÊNCIA DO SOLO


**DISSERTAÇÃO**

# Caracterização Funcional do Transportador OsAAP1 e Avaliação de Mecanismos Associados à Eficiência de Uso de Nitrogênio, Utilizando-se o Sistema CRISPR-Cas 9


**Erinaldo Gomes Pereira**



**2019**

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

# CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO TRANSPORTADOR OSAAP1 E AVALIAÇÃO DE MECANISMOS ASSOCIADOS À EFICIÊNCIA DE USO DE NITROGÊNIO, UTILIZANDO-SE O SISTEMA CRISPR-CAS 9

**ERINALDO GOMES PEREIRA**

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

*e Co-orientação da Dra*
**Cassia Pereira Coelho Bucher**

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2019

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

Ficha catalográfica elaborada
Com os dados fornecidos pelo autor

P436c

Pereira, Erinaldo Gomes, 1992-
Caracterização Funcional do Transportador OsAAP1 e Avaliação de Mecanismos Associados à Eficiência de Uso de Nitrogênio, Utilizando-se o Sistema CRISPR-Cas 9 / Erinaldo Gomes Pereira. – 2019.
95 f.: il.

Orientador: Manlio Silvestre Fernandes
Coorientadora: Cassia Pereira Coelho Bucher.
Dissertação (Mestrado). – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

1. Transportador de Aminoácidos. 2. Eficiência de Uso de Nitrogênio. 3. Oryza sativa L. . I. Fernandes, Manlio Silvestre, 1939-. Orient. II. Bucher, Cassia Pereira Coelho, 1984-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós-Graduação em Agronomia, . IV. Título

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

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

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

**ERINALDO GOMES PEREIRA**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2019

PhD. Manlio Silvestre Fernandes - UFRRJ
(Orientador)

Dra. Silvia Aparecida Martim - UFRRJ

Dr. Altamiro Souza de Lima Ferraz Junior - UEMA

**DEDICATÓRIA**

*À minha avó Selvina de Jesus, pela alegria proporcionada a esse seu neto, que hoje caminha com a saudade de sua presença, porém agradecido pela sua passagem!!!*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que até aqui, foi bem melhor do eu realmente merecia;

Aos meus pais, Sebastião do Rosário Pereira Moreira e Cleusa Maria Gomes de Souza, por todo apoio que recebi durante toda a minha vida;

Aos meus irmãos Eduardo Gomes Pereira e Nayara Gomes Pereira, que foram muito importantes para a minha formação pessoal, até mesmo durante as brigas!!!

Aos meus amigos, que mesmo com a minha ausência em determinados momentos, nunca desistiram de mim;

Ao professor Manlio Silvestre Fernandes, principalmente pela empolgação e entusiasmo direcionada a pesquisa durante os anos que conviví, o que serviu de incentivo para realização de minhas atividades de pesquisa;

À Cassia Pereira Coelho Bucher, que apesar de ser muito brava, sempre me apoiou e me ajudou (com alguns xingos, é claro) durante os quase seis anos de convívio, e foi essencial para que eu pudesse chegar até aqui, muito obrigado!!!

Ao professor Carlos Alberto Bucher por toda a ajuda, orientação e visão de pesquisa repassada durante o mestrado;

Ao professor Leandro Azevedo dos Santos, por algumas dicas valiosas que contribuíram para a minha formação;

A professora Sonia Regina de Souza, que infelizmente nos deixou cedo demais. A professora, assim como as flores, que nos encantam por um determinado período de nossas vidas, nos encantou durante a sua passagem, com a sua personalidade, inteligência e cuidado com os mais simples detalhes e com as mais simples pessoas;

À Elvia Mariam Lis Martinez Stark por sempre passar positividade, se preocupar comigo e com as pessoas que a cerca, por ter feito uma promessa que sem dúvida alguma me ajudou durante os exames de seleção para o Doutorado, e por sempre me ver e perguntar de um jeito engraçado: “Erinaldo meu bem, como vão as coisas?”

À estagiária Ana Carolina Oliveira Chapeta e aos bolsistas de iniciação científica Pedro Miller Mangueira Frade, Aline Júnia Garcia e Maria Eduarda Pimentel por toda a ajuda durante as análises, pelas brincadeiras e pela leveza do convívio.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas da UFRRJ pela amizade e ajuda;

Ao pessoal da limpeza pelas brincadeiras durantes esses anos, e ao Marquinhos da secretaria de pós graduação pela paciência e apoio;

À CAPES, FAPERJ e ao CNPq pela concessão da bolsa e financiamento do trabalho de pesquisa;

Ao CPGA-CS e sua coordenação pela estrutura e apoio para realização do trabalho;

À UFRRJ, que sem dúvida alguma é a Universidade mais linda do Brasil, a qual me proporcionou diariamente paisagens exuberantes, tornando toda a caminhada mais suave e empolgante!!!

## BIOGRAFIA

Erinaldo Gomes Pereira, nascido em Minas Novas – Minas Gerais, cursou o ensino básico no Colégio Estadual José Bento Nogueira e o ensino fundamental no Colégio Estadual Presidente Costa e Silva, ambos em sua cidade Natal. No ano de 2009, ingressou no curso de Técnico Agrícola com Habilitação em Agropecuária concomitante ao ensino médio, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – Minas Gerais – Campus São João Evangelista. Em 2012, ingressou no curso de graduação em Agronomia da UFRRJ. Durante a graduação foi estagiário durante três anos no Laboratório de Fertilidade de Solos sob a orientação do professor Dr. Luiz Rodrigues Freire. Foi bolsista de iniciação científica do CNPq por quatro anos no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, sob orientação do professor Phd. Manlio Silvestre Fernandes, trabalhando com o estudo de cultivares de arroz tradicionais do Maranhão e manipulação genética de plantas de arroz. Em março de 2017, ingressou no Mestrado no Curso de Pós Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, na UFRRJ, sob orientação do professor Manlio Silvestre Fernandes.

## RESUMO

PEREIRA, Erinaldo Gomes. **Caracterização funcional do transportador OsAAP1 e avaliação de mecanismos associados à eficiência de uso de nitrogênio, utilizando-se o sistema CRISPR-Cas 9.** 2019. 95f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2019.

A integração de conhecimentos adquiridos sobre os processos de regulação, transporte e metabolismo de N-inorgânico, com o estudo do N-orgânico, utilizando ferramentas modernas como o sistema CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), é um dos caminhos para a otimização dos processos de produção, podendo contribuir para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável. Os principais objetivos do trabalho foram verificar o papel do transportador de aminoácidos *OsAAP1* (Aminoácido Permease 1) de arroz (*Oryza sativa* L.) no desenvolvimento inicial das plantas, sua influência nos transportadores de N inorgânico e orgânico, possíveis alterações na expressão de genes que codificam enzimas chaves para o metabolismo de carbono, bem como a atuação desse transportador na produção de grãos e na eficiência do uso de nitrogênio (EUN). Para isso, o gene *OsAAP1* foi nocauteado em plantas da variedade Piauí com o uso do sistema CRISPR-Cas9 e duas linhagens foram selecionadas para o estudo (L3 e L5). Dois experimentos foram realizados com as linhagens obtidas, e como controle foram utilizadas plantas selvagens da mesma variedade: o experimento 1, para caracterização metabólica e estudo da expressão de genes envolvidos no transporte de N-inorgânico e no metabolismo de carbono, foi conduzido em câmara de crescimento da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), com 2 mM e 0,2 mM de N-nítrico ($KNO_3^-$) como única fonte de N, durante 40 dias. O experimento 2, para caracterização metabólica, estudo da expressão de genes envolvidos no transporte de N-orgânico e no metabolismo de carbono, determinação dos parâmetros de produção e da eficiência no uso de N, foi conduzido em casa de vegetação do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas (LNMP), em vasos contendo terra de um horizonte A de um PLANOSSOLO coletado no campus da UFRRJ. Foi realizada uma adubação basal, aos 30 dias após germinação, equivalente a 60 kg/ha de N-nítrico ($KNO_3^-$). No final do estudo foi possível verificar que o gene *AAP1* está envolvido no fluxo interno de N em plantas de arroz, e seu nocaute interfere de forma negativa nos processos de absorção e assimilação de N inorgânico, causando uma regulação na expressão de genes que codificam para transportadores de nitrato, aminoácidos e enzimas do ciclo do carbono, além de levar a uma diminuição na produção de grãos e EUN.



**Palavras-chave:** Transportador de aminoácidos. Variedade Piauí. *Oryza sativa* L.

## ABSTRACT

PEREIRA, Erinaldo Gomes. **Functional characterization of the OsAAP1 transporter and evaluation of mechanisms associated to the efficiency of nitrogen use, using the CRISPR-Cas system 9.** 2019. 95p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

The integration of acquired knowledge on the processes of N-inorganic regulation, transport and metabolism, with the study of N-organic, using modern tools such as the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) system, is one of the paths for optimization production processes and can contribute to the development of more sustainable agriculture. The main objectives of this work were to verify the role of the transporter of amino acids OsAAP1 (Amino acid Permease 1) of rice (*Oryza sativa* L.) in the initial development of the plants, its influence on inorganic and organic N transporters, possible alterations in the expression of genes that encode key enzymes for carbon metabolism, as well as the performance of this transporter in grain production and in the use of nitrogen (NUE). For this, the *OsAAP1* gene was knocked out in plants of the Piauí variety using the CRISPR-Cas9 system and two lines were selected for the study (L3 and L5). Two experiments were carried out with the obtained strains, and as control wild plants of the same variety were used: experiment 1, for metabolic characterization and study of the expression of genes involved in N-inorganic transport and carbon metabolism, was conducted in chamber of the Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFRRJ), in nutrient solution of Hoagland and Arnon (1950), with 2 mM and 0.2 mM of N-nitric ($KNO_3^-$) as the only source of N for 40 days. The experiment 2, for metabolic characterization, study of the expression of genes involved in N-organic transport and carbon metabolism, determination of production parameters and efficiency in the use of N, was conducted in a greenhouse of the Laboratory of Mineral Nutrition (LNMP), in pots containing soil from a horizon A of a PLANOSOL collected at the UFRRJ campus. A basal fertilization, at 30 days after germination, was performed, equivalent to 60 kg / ha of N-nitric ($KNO_3^-$). At the end of the study it was possible to verify that the *AAP1* gene is involved in the internal flow of N in rice plants, and its knockout negatively interferes in the processes of absorption and assimilation of inorganic N, causing a regulation in the expression of genes coding for nitrate transporters, amino acids and carbon cycle enzymes, in addition to leading to a decrease in grain yield and NUE.


**Key words:** Amino acids transporter. Piauí variety. *Oryza sativa* L.

## LISTA DE ABREVIAÇÕES

| | |
|---|---|
| **CRISPR** | Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (Repetições Palindômicas Curtas e Regularmente Interespaçadas) |
| **WT** | wild type (Tipo Selvagem) |
| ***OsAAP1*** | Oryza sativa Aminoácido Permease 1 |
| **EUN** | Eficiência de Uso de Nitrogênio |
| **EUtN** | Eficiência de Utilização de Nitrogênio |
| **EAN** | Eficiência de Absorção de Nitrogênio |
| **ERN** | Eficiência de Remobilização de Nitrogênio |

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Sequência dos gRNAs para reconhecimento de uma região específica no gene OsAAP1. ..... 13

**Tabela 2**. Primers utilizados para amplificação do fragmento de DNA ..... 19

**Tabela 3.** Iniciadores (primers) utilizados nos experimentos de perfil de expressão das enzimas do ciclo N e C, e transportadores de aminoácidos ..... 23

**Tabela 4.** Análise de rotina de fertilidade do solo ..... 24

**Tabela 5**. Porcentagem de aminoácidos por proteína de reserva (dados obtidos na plataforma Rice Genome Annotation Project) ..... 68

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1**. Reconhecimento e corte do DNA alvo pelo complexo gRNA+Cas9 (Xie & Yang, 2013). ..... 13

**Figura 2.** Mapa do vetor pRGEB31 (Addgene plasmid, 51295). ..... 15

**Figura 3.** Fragmento de DNA bacteriano sequenciado pelo método Sanger. Em destaque a região de inserção do gRNA. ..... 17

**Figura 4**. Fragmentos do gene OsAAP1 amplificados de DNA contendo aproximadamente 342 pb. No centro está localizado o marcador de DNA de 1kb (Avati). ..... 20

**Figura 5.** a) Sementes de arroz da variedade Piauí em meio nutritivo (N6D) contendo auxina (2,4D a 2mg $L^{-1}$) como regulador para indução de calos embriogênicos; b e c). Calos em estádio de desenvolvimento após 7 e 14 dias em meio nutritivo, respectivamente, sendo os mais friáveis utilizados para dar prosseguimento ao processo de transformação; d) Calos transferidos para meio nutritivo (N6D) por mais três dias para aumentar o rendimento. ..... 27

**Figura 6.** a) Plântula após 2 semanas em meio de regeneração de parte aérea; b) Linhagem transferida para o meio de formação de raízes após duas semanas; c) linhagens em vaso de 700 mL na câmara de crescimento (fitotron); d) Linhagens (T1) na casa de vegetação do Departamento de Solos para produção de sementes. ..... 27

**Figura 7**. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do tipo Sanger da planta wild type (A), linhagem 3 (B) e linhagem 5 (C). Setas amarelas indicam o local editado pelo sistema CRISPR-Cas9. ..... 28

**Figura 8**. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do tipo Sanger da planta wild type (A), linhagem 3 (B) e linhagem 5 (C). Setas amarelas indicam o local editado pelo sistema CRISPR-Cas9. ..... 29

**Figura 9**. Resultado da PCR para o gene da higromicina, visualizado em gel de agarose a 1%. Representado com o símbolo "+" o controle positivo (vetor PRGEB31 puro) e com o símbolo "-" o controle negativo (água miliq) e com os números 1 e 2 (DNA de plantas WT) os controles negativos. No centro, representado com a letra "M", encontra-se o marcador de DNA de 1 kb (AVATI). Os números representam as diferentes linhagens. ..... 30

**Figura 10**. Massa fresca (A e C) e relação raiz/parte aérea (B e D) aos 40 dias após germinação (DAG) nas diferentes partes das plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a dois tratamentos: 0,2 mM constante N-$NO_3^-$ (A e B) e 2 mM constante de N-$NO_3^-$ (C e D). Letras minúsculas entre colunas diferem entre sí pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade..... 31

**Figura 11** – Plantas selvagens da variedade Piauí (WT), linhagens mutantes 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a dois tratamentos: 0,2 mM constante N-$NO_3^-$ (A e B) e 2 mM constante de N-$NO_3^-$ (C e D) ..... 32

**Figura 12**. Depleção de nitrato e variação de pH em solução nutritiva aos 40 dias após germinação (DAG) de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a 0,2 mM constante de N-$NO_3^-$.....34

**Figura 13**. Depleção de nitrato e variação de pH em solução nutritiva aos 40 dias após germinação (DAG) de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a 2 mM constante de N-$NO_3^-$.....35

**Figura 14**. Teores de N-nitrato aos 40 dias após germinação (DAG) nas diferentes partes das plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a dois tratamentos: (A) 0,2 mM constante N-$NO_3^-$ e (B) 2 mM constante de N-$NO_3^-$. Letras minúsculas entre colunas diferem entre sí pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. .....38

**Figura 15**. Teores de N-amônio aos 40 dias após germinação (DAG) nas diferentes partes das plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a dois tratamentos: (A) 0,2 mM constante N-$NO_3^-$ e (B) 2 mM constante de N-$NO_3^-$. Letras minúsculas entre colunas diferem entre sí pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. .....39

**Figura 16**. Teores de N-amino aos 40 dias após germinação (DAG) nas diferentes partes das plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a dois tratamentos: (A) 0,2 mM constante N-$NO_3^-$ e (B) 2 mM constante de N-$NO_3^-$. Letras minúsculas entre colunas diferem entre sí pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. .....41

**Figura 17**.Atividade da glutamina sintetase (GS) aos 40 dias após germinação (DAG) nas raízes e folhas de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a dois tratamentos: (A) 0,2 mM constante N-$NO_3^-$ e (B) 2 mM constante de N-$NO_3^-$. Letras minúsculas entre colunas diferem entre sí pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. .....43

**Figura 18**. Teores de açúcares solúveis aos 40 dias após germinação (DAG) nas diferentes partes das plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a dois tratamentos: (A) 0,2 mM constante N-$NO_3^-$ e (B) 2 mM constante de N-$NO_3^-$. Letras minúsculas entre colunas diferem entre sí pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. .....44

**Figura 19**.Teores de proteínas solúvel aos 40 dias após germinação (DAG) nas raízes e folhas de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a dois tratamentos: (A) 0,2 mM constante N-$NO_3^-$ e (B) 2 mM constante de N-$NO_3^-$. Letras minúsculas entre colunas diferem entre sí pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. .....45

**Figura 20**. Expressão relativa dos genes OsNRT2.1 (transportador de nitrato 2.1), OsNRT2.4 (transportador de nitrato 2.4), OsNIA1 (nitrato redutase 1), OsGS2 (glutamina

sintetase 2), OsNADH-GOGAT (glutamato sintase), OsASN 1 (asparagina sintetase 1), OsNPF7.2 (transportador de nitrato/peptídeos 7.2), OsNPF7.3 (transportador de nitrato/peptídeos 7.3), aos 40 dias após germinação (DAG) em raízes de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a 0,2 mM constante de N-$NO_3^-$ ..... 47

**Figura 21**. Expressão relativa dos genes OsNIA 1(nitrato redutase 1), OsGS 2 (glutamina sintetase 1), OsFd-GOGAT glutamato sintase), OsNPF 7.2 (transportador de nitrato/peptídeos 7.2), OsAST 1 (aspartato aminotransferase) e OsASN 1(asparagina sintetase 1), aos 40 dias após germinação (DAG) em folhas de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a 0,2 mM constante de N-$NO_3^-$. ..... 48

**Figura 22**. Expressão relativa dos genes OsAAP1(aminoácido permeasse 1), OsNRT1.1 (transportador de nitrato/peptídeos 8.9), e OsNIA 1 (nitrato redutase 1), , OsNADH-GOGAT (glutamato sintase), OsGS 2 (glutamina sintetase 2), OsNPF7.2 (transportador de nitrato/peptídeos 7.2), OsNPF 7.3 (transportador de nitrato/peptídeos 7.3) e OsASN 1 (asparagina sintetase 1), aos 40 dias após germinação (DAG) em raízes de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a 2 mM constante de N-$NO_3^-$. ..... 50

**Figura 23**. Expressão relativa dos genes OsNIA 1, OsGS 2, OsFd-GOGAT, OsNPF 7.2, OsAST 1 e OsASN 1, aos 40 dias após germinação (DAG) em folhas de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a 2 mM constante de N-$NO_3^-$. ..... 51

**Figura 24**. Expressão relativa dos genes OsPPDK1 (fosfato diquinase 1), OsPK1 (piruvato quinase), OsPPC1 (fosfoenolpiruvato carboxilase), OsCYT-MDH (malato desidrogenase citosólica), OsNADP-MDH (malato desidrogenase) e OsICDH1(isocitrato desidrogenase), aos 40 dias após germinação (DAG) em folhas de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a 0,2 mM constante de N-$NO_3^-$. ..... 53

**Figura 25.** Expressão relativa dos genes OsPPDK1 (fosfato diquinase 1), OsPK1 (piruvato quinase), OsPPC1 (fosfoenolpiruvato carboxilase), OsCYT-MDH (malato desidrogenase citosólica), OsNADP-MDH (malato desidrogenase) e OsICDH1(isocitrato desidrogenase), aos 40 dias após germinação (DAG) em folhas de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a 2 mM constante de N-$NO_3^-$. ..... 54

**Figura 26**. Teores de N-nitrato durante a antese (A) e 10 dias após a antese (B) nas folhas bandeira (FB), folhas 2 (F2), outras folhas (OF), colmos (C) e panículas (P) de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene OsAAP1. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade. ..... 57

**Figura 27.** Teores de amônio durante a antese (A) e 10 dias após a antese (B) nas folhas bandeira (FB), folhas 2 (F2), outras folhas (OF), colmos (C) e panículas (P) de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene OsAAP1. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade. ..... 59

**Figura 28**. Teores de açúcares solúvel durante a antese (A) e 10 dias após a antese (B) nas folhas bandeira (FB), folhas 2 (F2), outras folhas (OF), colmos (C) e panículas (P) de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene OsAAP1. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade. ..... 60

**Figura 29**. Teores de N-amino durante a antese (A) e 10 dias após a antese (B) nas folhas bandeira (FB), folhas 2 (F2), outras folhas (OF), colmos (C) e panículas (P) de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene OsAAP1. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade. ..... 62

**Figura 30.** (A) Teores de N-total durante a antese e (B) final do ciclo nas folhas bandeira (FB), folhas 2 (F2), outras folhas (OF), colmos (C), Grãos e casca de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene OsAAP1. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade. ..... 64

**Figura 31.** (A) Conteúdo de N-total durante a antese e (B) final do ciclo nas folhas bandeira (FB), folhas 2 (F2), outras folhas (OF), colmos (C), Grãos e casca de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene OsAAP1. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade. ..... 65

**Figura 32.** Teor de proteína bruta em grãos de arroz no final do ciclo de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade modificadas por nocaute para o gene OsAAP1. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade. ..... 66

**Figura 33.** (A) Teor e (B) conteúdo de proteína em grãos de arroz no final do ciclo de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene OsAAP1. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade. ..... 67

**Figura 34.** Expressão relativa durante a antese e dez dias após a antese (10 DAA) dos genes OsASN 1 (asparagina sintetase 1), OsAST 1 (aspartato aminotransferase), OsFed-GOGAT (ferredoxina-glutamato sintase) OsGDH 1 (glutamato desidrogenase 1), OsGS 1.1 (glutamina sintetase 1) e OsGS 2 (glutamato sintase 2) em folhas 2 de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene OsAAP1. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade. ..... 69

**Figura 35.** Expressão relativa durante a antese e dez dias após a antese (10 DAA) dos genes OsASN 1 (asparagina sintetase 1), OsAST 1 (aspartato aminotransferase), OsFed-GOGAT (ferredoxina-glutamato sintase) OsGDH 1 (glutamato desidrogenase 1),

OsGS 1.1 (glutamina sintetase 1) e OsGS 2 (glutamato sintase 2) em folhas bandeira de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene OsAAP1. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade. ..... 70

**Figura 36.** Expressão relativa durante a antese e dez dias após a antese (10 DAA) dos genes OsAAP1 (aminoácido permease 1), OsAAP3 (aminoácido permease 3), OsAAP5 (aminoácido permease 5) OsAAP8 (aminoácido permease 8), OsAAP 18 (aminoácido permease 18) e OsCAT 1 (transportador de aminoácidos catiônicos) em folhas 2 de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene OsAAP1. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade. ..... 72

**Figura 37.** Expressão relativa durante a antese e dez dias após a antese (10 DAA) dos genes OsAAP1 (aminoácido permease 1), OsAAP3 (aminoácido permease 3), OsAAP5 (aminoácido permease 5) OsAAP8 (aminoácido permease 8), OsAAP18 (aminoácido permease 18) e OsCAT1(transportador de aminoácidos catiônicos) em folhas bandeira de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene OsAAP1. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade. ..... 73

**Figura 38.** Expressão relativa durante a antese e dez dias após a antese (10 DAA) dos genes OsGS 1.3 (glutamina sintetase 1.3), OsASN 1 (asparagina sintetase 1), OsCAT 1 (transportador de aminoácidos catiônicos), OsAAP1 (aminoácido permease 1), OsAAP 2 (aminoácido permease 2), OsAAP 3 (aminoácido permease 3), OsAAP 4 (aminoácido permease 4), OsAAP6 (aminoácido permease 6) e OsAAP 18 (aminoácido permease 18) grãos de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene OsAAP1. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade..... 74

**Figura 39.** (A) Massa seca total, (B) comprimento de perfilhos, (C) número de perfilhos e de panículas por vaso no final do ciclo de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene OsAAP1. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade..... 76

**Figura 40. (A)** Número de grãos (total, cheios e chochos), (B) peso de 100 grãos cheios, (C) número de grãos cheios (total, cheios e chochos) por vaso no final do ciclo de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene OsAAP1. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade. ..... 77

**Figura 41**. (A) Eficiência de Absorção de N (EAN), (B) Eficiência de Utilização de N (EUtN), (C) Eficiência de Uso de N (EUN), (D) Remobilização de N para os grãos e (E) Eficiência de Remobilização de N (ERN) de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene OsAAP1. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade..... 79

**SUMÁRIO**

1 INTRODUÇÃO ....1
2 REVISÃO DE LITERATURA ....3
2.1 Importância do Arroz ....3
2.2 Nitrogênio – Absorção, Assimilação e Transporte ....5
2.3 Transportadores de Aminoácidos ....6
2.4 Eficiência de Uso de Nitrogênio (EUN) ....8
2.5 Edição Gênica - Sistema CRISPR-Cas 9 ....9
3 MATERIAL E MÉTODOS ....12
3.1 Síntese dos gRNAs ....12
3.2 Região de Anelamento do gRNA-Cas9 ....13
3.3 Ligação dos gRNAs ao Vetor pRGEB31 ....15
3.4 Preparo de Células Competentes DH5α para Eletroporação ....16
3.5 Transformação de Células Competentes de E.coli DH5α ....16
3.6 Meio YEB para o Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* ....17
3.7 Preparo de *Agrobacterium tumefaciens* Competente ....17
3.8 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* ....17
3.9 Transformação de Arroz Mediada por *Agrobacterium tumefaciens* ....18
3.10 Extração de DNA ....19
3.11 Sequenciamento do DNA ....19
3.12 Seleção das Linhagens ....20
3.13 Condições experimentais – Experimento 1 ....20
3.13.1 Extração de rna total ....21
3.13.2 Tratamento com dnase I, síntese do cDNA e pcr em tempo real. ....22
3.13.3 Desenho dos iniciadores (“primers”) para os estudos de expressão gênica ....22
3.13.4 Análise de metabólitos solúveis ....23
3.13.5 Extração de proteína ....23
3.13.6 Atividade da glutamina sintetase ....24
3.14 Condições Experimentais – Experimento 2 ....24
3.14.1 Caracterização fenotípica ....25
3.14.2 Metabólitos solúveis ....25
3.14.3 Expressão gênica ....25
3.14.4 Fracionamento de proteína ....25
3.14.5 Determinação da eficiência de uso de n ....26

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 27
4.1 Transformação de Plantas ..... 27
4.2 Experimento 1 – Fitotron ..... 30
4.2.1 Massa fresca, relação raiz/parte aérea ..... 30
4.2.2 Depleção de nitrato ..... 33
4.2.3 Metabólitos solúveis, atividade da gs e proteína solúvel ..... 36
4.2.3.1 Nitrato ..... 36
4.2.3.2 Amônio ..... 39
4.2.3.3 Aminoácidos ..... 40
4.2.3.4 Glutamina sintetase ..... 42
4.2.3.5 Açúcares solúveis ..... 43
4.2.3.6 Proteínas solúveis ..... 45
4.2.2 Expressão gênica ..... 46
4.2.2.1 Genes do metabolismo de n - 0,2 mM de $NO_3^-$ ..... 46
4.2.2.3 Genes do metabolismo de carbono – 0,2 mM $NO_3^-$ ..... 52
4.2.2.4 Genes do metabolismo de carbono – 2mM $NO_3^-$ ..... 54
4.3 Experimento 2 (Casa de vegetação) ..... 56
4.3.1 Metabolitos solúveis e n-total ..... 56
4.3.1.1 Nitrato ..... 56
4.3.1.2 Amônio ..... 58
4.3.1.3 Açúcares solúveis ..... 60
4.3.1.4 Aminoácidos livres ..... 61
4.3.2 Teor e conteúdo de n-total ..... 63
4.3.3 Proteína bruta e frações proteicas ..... 65
4.3.4 Expressão gênica ..... 69
4.3.4.1 Genes do metabolismo de n ..... 69
4.3.4.2 Genes do metabolismo de n –transportadores de aminoácidos (FB e F2) ..... 71
4.3.4.3 Genes do metabolismo de n - transportadores de aminoácidos nos grãos ..... 74
4.3.5 Caracterização fenotípica ..... 76
4.3.6 Parâmetros associados a eficiência no uso de n ..... 78
5 CONCLUSÕES ..... 81
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 82
7 ANEXOS ..... 91

# 1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o segundo cereal mais consumido no mundo e ocupa um papel relevante para o combate à fome. É um produto agrícola de elevada importância econômica para a maioria dos países em desenvolvimento, constituindo-se alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas, sendo que a demanda por este cereal pode duplicar em poucos anos (AGROLINK, 2018). É um dos alimentos com melhor balanço nutricional, podendo fornecer 20 % da energia e 15 % da proteína per capita necessária ao homem, apresentando boa adaptação a diferentes condições de clima e solo (EMBRAPA, 2008).

Acredita-se que o arroz foi tenha como origem o sudeste da Ásia (EMBRAPA, 2008). Foi introduzido no Brasil por volta de 1530 pela frota de Pedro Álvares Cabral e espalhando mais tarde por outras regiões do litoral brasileiro, principalmente na região do Nordeste, em pequenas lavouras de subsistência (PEREIRA, 2002).

A produção mundial estimada deste cereal é de 475 milhões de toneladas, sendo produzida no Brasil cerca de 8,3 milhões de toneladas (USDA/FAS, 2015). Na Ásia, é cultivado e consumido cerca de 90 % do arroz do mundo, em mais de 250 milhões de pequenas propriedades em sistema tipicamente irrigado. Os principais estados brasileiros produtores de arroz são o Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Mato Grosso, Maranhão e Pará, respectivamente. O cultivo pode ser realizado em sistema irrigado, no qual uma lâmina de água é mantida sobre o solo até a maturação do arroz, ou no sistema de cultivo de terras altas (sequeiro) em que a lavoura é totalmente dependente da água da chuva para alcançar um desenvolvimento satisfatório.

Para obtenção de uma produção satisfatória alguns fatores devem ser analisados, entre eles, a adubação mineral do solo, especialmente a adubação nitrogenada, uma vez que, o nitrogênio (N) é o nutriente de maior demanda metabólica para as plantas, sendo fator determinante para o crescimento e limitante da produtividade, devido a sua baixa disponibilidade no solo (TABUCHI et al, 2007), exigindo aplicações sucessivas. Na China por exemplo a adubação nitrogenada é feita muitas vezes de forma indiscriminada, sem que uma análise da disponibilidade desse nutriente no solo seja realizada, o que leva a diminuição na eficiência de uso de N e problemas ambientais.

Uma questão que ameaça a sustentabilidade da produção de grãos na China é o uso ineficiente de recursos (água e fertilizantes) e a poluição ambiental causada pelo excesso de fertilização (JIAO et al., 2016). Muitas vezes essa aplicação indiscriminada é realizada devido ao fator cultural de acreditar que, com o aumento contínuo da dose de nitrogênio aplicada no solo a planta responderá em produtividade, o que não é verdade, pois essa resposta só ocorre até uma certa concentração do nutriente, acima da qual poderá resultar em toxidez para a planta. Concentração elevada de nitrogênio no solo está associada a danos ambientais, como por exemplo, a contaminação dos cursos d´água e consequente eutrofização do mesmo, além do aumento do custo de produção (GOOD et al., 2004).

Plantas adquirem, através de suas raízes, N tanto na forma orgânica (ureia, aminoácidos, peptídeos) quanto na forma inorgânica (nitrato ou amônio), porém absorvem principalmente sob formas inorgânicas (WILLIAMS & MILER, 2001). Apesar da planta absorver preferencialmente nitrato e não amônio (FERNANDES, 1976), existem limitações ao seu uso como fertilizante, especialmente em condições de solos tropicais, nos quais ocorrem grandes perdas de N por imobilização, lixiviação, volatilização e/ou desnitrificação. Sendo assim, mecanismos que amenizem essas perdas devem ser desenvolvidos e aplicados de forma a minimizar perdas (EIRA, et al., 1968). Aumentar a Eficiência de Uso de

Nitrogênio (EUN) pode ser a melhor forma de conciliar, simultaneamente, segurança alimentar global e respeito às políticas ambientais (CHARDON et al, 2012).

O aumento na eficiência de uso de N passa pelo desenvolvimento de cultivares que sejam capazes de absorver e, uma vez absorvido, utilizarem o N de forma mais eficiente possível, resultando em uma boa produção.

O estado do Maranhão, historicamente um grande produtor de arroz, possui uma grande quantidade de variedades locais, as quais se constituem em um banco de germoplasma de valor inestimável para programas de melhoramento genético de arroz no País (FONSECA et al., 1982). Por ser uma região em que o solo está sujeito a intensos processos de intemperismo devido, entre outros fatores, ao alto índice de chuvas durante a época de cultivo, o nitrogênio aplicado, caso não seja absorvido rapidamente pelas plantas, é perdido ao longo do perfil do solo. Devido a estas condições climáticas, acredita-se que, variedades maranhenses possuem mecanismos que propiciam o melhor aproveitamento do N aplicado no solo.

Foi estabelecida como hipótese científica que o transportador OsAAP1 interfere no metabolismo de nitrogênio e carbono, e o seu nocaute reduz a Eficiência no Uso de N (EUN) em plantas de arroz.

O presente trabalho teve como objetivo principal realizar a caracterização funcional do transportador OsAAP1 e verificar a influência do mesmo na Eficiência de Uso de N, utilizando plantas de arroz que passaram pelo nocaute do gene *OsAAP1* com o uso da técnica do CRISPR/Cas 9. Os objetivos específicos foram avaliar possíveis alterações no metabolismo de nitrogênio e do carbono, bem como a influência desse gene nos parâmetros de produção e de uso de N pelas plantas.

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 Importância do Arroz

O arroz é um dos principais cereais produzidos e consumidos no mundo, juntamente com o trigo e o milho. Em todos os continentes ocorre o cultivo e o consumo de arroz, portanto esse cereal desempenha um importante papel, tanto econômico quanto social, principalmente em países em desenvolvimento da Ásia e da Oceania, onde vivem cerca de dois terços da população subnutrida mundial (AGROLINK, 2018). Possui um ótimo balanço nutricional, fornecendo 715 kcal per capita por dia, 27% dos carboidratos, 20% das proteínas e 3% dos lipídeos da alimentação (Walter, 2008), sendo que essa composição nutricional pode ser afetada pelas características fenotípicas, adubação, radiação solar e temperatura durante o período de desenvolvimento do grão (JULIANO, 1995). A glutelina proteína de alto valor nutricional, corresponde aproximadamente 80% das proteínas presentes no endosperma (WALTER, 2008).

A partir da década de 80 houve um grande salto no consumo de arroz em todo o mundo, desde então os padrões de consumo foram divididos em três modelos: o modelo asiático que se caracteriza por um consumo médio per capita superior a 100 Kg ao ano, podendo alcançar o valor de 200 Kg em alguns países. O modelo subtropical, no qual o Brasil está incluído, o consumo per capita gira em torno de 35 a 65 Kg ao ano. No terceiro modelo, ocidental, o consumo per capita é baixo, cerca de 10 Kg ao ano, na França o consumo é menor ainda, apenas 5 Kg ao ano (EMBRAPA, 2018).

No continente asiático tem-se disparadamente a maior produção e consumo de arroz mundial, cerca de 90%, sendo a China o maior produtor, consumidor e importador, e a Tailândia o maior exportador no período que compreendeu a safra de 2017/2018. Devido a grande demanda, nos últimos anos a China vem mantendo uma tendência de aumento dos estoques de passagem, por meio da aquisição de outros países (CONAB, 2018). No entanto, a produção mundial não vem acompanhando a demanda pelo produto, nos últimos anos a produção teve um aumento de 1,09% ao ano, enquanto a população cresceu 1,32% e o consumo 1,27%, o que leva a uma preocupação em relação a oferta desse cereal (AGROLINK, 2016).

A América Latina possui um papel de destaque no mercado, ocupando o segundo lugar em produção e o terceiro em consumo, sendo que o Brasil é o maior produtor fora do continente asiático, com cerca de 11 milhões de toneladas base seca produzidas e 11,7 milhões de toneladas consumidas. O déficit de cerca de 0,7 milhões de toneladas é suprido historicamente pela Argentina e Uruguai, sendo que a partir de 2015 o Paraguai assumiu o papel de maior exportador para o mercado Brasileiro (CONAB, 2018). Os principais estados produtores brasileiros são Tocantins (TO), Maranhão (MA), Mato Grosso (MT), Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS), produzindo 688,4 mil toneladas (mil t), 295,1 mil t, 472, 8 mil t, 1113, 0 mil t e 7858,9 mil t, respectivamente (CONAB, 2018).

No Brasil são adotados dois sistemas de cultivo: arroz alagado e de arroz de terras altas (FERREIRA, 2005). O sistema de arroz alagado possui como principal vantagem o maior potencial de rendimento (cerca de 12 t $ha^{-1}$) quando comparado ao arroz do sistema em terras altas (cerca de 6 t $ha^{-1}$) (PINHEIRO, 2006), porém o arroz irrigado não é viável em áreas nas quais não se consegue manter o alagamento do solo (Embrapa, 2003). Ancielo (2003), estudando a produtividade de cultivares desenvolvidas para terras altas e das desenvolvidas para cultivo alagado, quando irrigadas por aspersão, relatou produtividades semelhantes dessas cultivares quando comparado apenas parâmetros relacionados ao

rendimento da cultura, o que pode ser de grande utilidade para reduzir a principal limitação do cultivo alagado, o uso excessivo de água durante o ciclo da cultura.

Se a orizicultura brasileira for dividida nesses dois sistemas de cultivo, é possível perceber que 60 % da produção nacional é oriunda da orizicultura irrigada, a qual possui maior representação na região sul, sendo insignificante nas demais. O Rio Grande do Sul representa aproximadamente 83% das áreas em cultivo alagado, suprindo mais de 50 % da demanda nacional. Por outro lado, o cultivo em terras altas, menos representativo do que o cultivo alagado, é de grande importância, principalmente em estados do Norte, Nordeste e Mato Grosso. Esse sistema de cultivo foi mais representativo entre as décadas de 60 e 80, durante o processo de ocupação do cerrado. Período marcado por pesquisas que tinham como foco o desenvolvimento de alternativas para a minimização da adversidade climática encontradas no cerrado, como cultivares tolerantes a seca, adequação da época de semeadura e do ciclo da cultivar e manejo do solo (AGROLINK, 2018).

O Brasil, possui uma ampla diversidade de recursos genéticos, a qual deve ser estudada, visando a identificação de características interessantes para programas de melhoramento genético. O valor de um germoplasma pode ser medido em termos de suas características úteis para o melhoramento de outras variedades e o impacto econômico que pode ocasionar na produção e na produtividade do arroz (JACKSON, 1997).

Conscientes da importância da diversidade dos recursos genéticos de arroz existentes no mundo, mais de 80000 variedades registradas são conservadas no banco internacional de arroz (IRG) no Instituto Internacional de Pesquisa de Arroz (IRRI), em Los Banos, Filipinas (JACKSON, 1997).

O estado do Maranhão possui uma ampla diversidade de variedades de arroz, adaptadas a condições de clima tropical, caracterizado por disponibilidade sazonal de chuvas e nutrientes, levando, ao longo dos ciclos de cultivo a variações que permitiu um bom desenvolvimento em condições adversas.

O Laboratório de Nutrição de Mineral de Plantas (LNMP) da UFRRJ, vem realizando estudos no intuito de identificar os mecanismos adaptativos adquiridos por essas cultivares, e resultados promissores vem sendo obtidos. A variedade Piauí, utilizada no presente estudo, se mostrou como uma das mais promissoras em estudos de metabolismo e expressão gênica. COELHO (2016), ao estudar a Eficiência de Uso de Nitrogênio (EUN) da variedade Piauí e IAC-47, variedade melhorada para cultivo com alto N, verificou que a variedade Piauí, quando cultivada com baixo N, apresenta uma Eficiência de Remobilização de Nitrogênio (ERN) cerca de duas vezes maior que a variedade IAC-47. SPERANDIO (2014), estudando o a expressão de transportadores de nitrato de alta afinidade e de isoformas de $H^+$-ATPase de membrana plasmática nas mesmas variedades verificou que a variedade Piauí, comparada a IAC-47, quando cultivadas com baixo N, apresenta maior expressão de OsNRT2.1-2.2, OsNAR2.1, OsA2 e OsA7, revelando, possivelmente, uma estratégia dessa variedade para um melhor aproveitamento do N disponível na solução do solo. SOUZA et al. (1998) trabalhando com a variedade Piauí verificou a maior eficiência dessa variedade na utilização do N acumulado, sugerindo assim a menor dependência de suplementação externa desse nutriente no período de enchimento de grãos comparado uma variedade melhorada. PEREIRA (2018), estudando o comportamento de três variedades, duas locais do Maranhão, Piauí e Manteiga, e uma variedade melhorada, IAC-47, verificou que quando cultivadas com baixo suprimento de $N\text{-}NH_4^+$ a variedade Piauí apresenta um maior investimento na remobilização de compostos nitrogenadas através da indução de genes relacionados ao transporte de aminoácidos (dados ainda não publicados).

A utilização bem sucedida da variedade Piauí, no processo de manipulação genética, pode representar uma gama de possibilidades para melhor exploração, entendimento e uso dos mecanismos adaptativos adquiridos, possibilitando até mesmo a transferência de certas

características para outras variedades, locais ou não, o que representará um grande ganho no que tange a melhor absorção e uso de N.

## 2.2 Nitrogênio – Absorção, Assimilação e Transporte

O nitrogênio é um macronutriente essencial para o crescimento e reprodução das plantas (VITOUSEK, 2010). Após a água, é o segundo fator que mais limita a produção em todo o mundo. Grande parte das variedades comerciais foram selecionadas em condições ótimas de nitrogênio, se desenvolvendo melhor sob maior suprimento de N, desse modo no intervalo entre 1963 a 2013 o consumo de fertilizantes nitrogenadas aumentou cerca de oito vezes (SURYA, 2017).

O nitrogênio é encontrado no solo em formas orgânicas como aminoácidos, peptídeos livres e proteínas, e em formas minerais como o nitrato ($NO_3^-$) e amônio ($NH_4^+$), sendo as formas minerais as maiores fontes de N para as plantas (YA-YUN, 2018). Em solos aeróbicos o nitrato é usualmente a forma mineral mais abundante (FAN, 2017), enquanto que em solos anaeróbicos há a predominância do amônio.

As raízes das plantas absorvem preferencialmente as formas minerais de N, porém, em alguns solos, formas orgânicas são fontes importantes de N (BLOOM, 2015). A absorção de nitrato e amônio é mediada por transportadores de alta (HATS) e baixa afinidade (LATS), localizados na membrana plasmática das células (FAN, 2017).

A absorção de íons é mais pronunciada nas zonas dos pelos radiculares, esses pelos são extensões de células epidérmicas específicas, que servem para aumentar a área de superfície disponível para a absorção de íons (TAIZ e ZAIGER, 2017). Os íons ao penetrarem nas raízes, podem ser transportados via simplástica ou apoplástica. Na via simplástica os íons são transportados por plasmodemos, que são pontes citoplasmáticas que interconectam as células. Na via apoplástica, os íons são transportados através dos espaços intercelulares, até atingirem a endoderme, onde devido a presença das estrias de caspary, são obrigados a seguirem pela rota simplástica.

O amônio é absorvido de forma passiva, a favor do gradiente de potencial eletroquímico, por membros da família dos transportadores de amônio (AMT1 e AMT2). Os membros da família AMT1 operam quando a concentração de $NH_4^+$ na solução do solo está baixa, geralmente menor que 1 mM. Em concentrações maiores que 1 mM passa operar o sistema de baixa afinidade (AMT2) (FERNANDES, 2006).

A absorção de nitrato é ativa, ocorre contra um gradiente de potencial eletroquímico, por membros de duas famílias distintas de transportadores de nitrato (NRT1 e NRT2). Os membros da família NRT1 são constitutivos (LATS), enquanto os membros da família NRT2 podem ser constitutivos (cHATS) e passíveis de indução (iHATS), os quais são estimulados pela presença externa de nitrato no meio e reprimidos pela presença interna de glutamina. Em trabalho recente, LERAN (2013) reclassificou os membros da família NRT1 em oito subfamílias, NPF1-NPF8, com base em relações filogenéticas.

O nitrato, após absorvido pelas raízes, pode ser convertido em aminoácidos, estocado nos vacúolos ou exportado para a parte aérea. Para ser convertido em aminoácido, precisa passar por uma série de reações enzimáticas, iniciando com a redução a nitrito pela ação da enzima nitrato redutase (NR), processo que ocorre no citosol. O nitrito é exportado para os plastídeos, onde é reduzido a amônio pela enzima nitrito redutase (NiR). Glutamina sintetase (GS), glutamine oxoglutarate aminotransferase (GOGAT) e Asparagina sintetase (AS) são as enzimas responsáveis pela assimilação de amônio em aminoácidos (MASCLAUX, 2010). O amônio, oriundo da redução do nitrato, é transferido para o glutamato pela GS e convertido em glutamina, sendo necessário o uso de energia fornecida pelo ATP. A GS pode ser

citosólica, GS1, ou plastidial, GS2 (ISHIYAMA et al., 2004), as quais possuem funções específicas na assimilação e reciclagem do $NH_4^+$. Em cloroplastos, a GS2 contribui para a assimilação primária de N e reassimilação de amônio de origem fotorrespiratória. Em raízes a enzima GS1 contribui para a assimilação primária do N citosólico, especialmente em altas concentrações de nitrato (GUAN, 2016). Durante a senescência a atividade da GS1 é induzida para que seja possível a reassimilação de amônio oriundo do catabolismo de aminoácidos (BRUGIÉRE, 2010). O grupamento amino ($-NH_2$) da glutamina é transferido, pela enzima GOGAT, para o α-cetoglutarato, proveniente do ciclo de Krebs, com energia fornecida pela ferredoxina (Fd) na parte aérea ou pela NADH na raiz, originando duas moléculas de glutamato (SOUZA & FERNANDES, 2006). Uma das moléculas permanece no ciclo, para permitir que outra molécula de amônio seja assimilada. O outro glutamato é desviado para reações de transaminação, por enzimas transaminases, dando origem a outros aminoácidos (TISCHNER, 2000).

A enzima glutamato desidrogenase (GDH), até meados da década de 70, era considerada a responsável pela incorporação do $NH_4^+$ ao α-cetoglutarato, via aminação redutiva direta (FERNANDES, 2016). Porém, estudos posteriores demostraram que essa enzima possuía um papel mais importante para a deaminação, catalisando a oxidação do glutamato a α-cetoglutarato, fornecendo esqueletos de carbono ao ciclo de Krebs, isso porque durante a senescência há um grande aumento na atividade dessa enzima (LAURIERE, 1983).

## 2.3 Transportadores de Aminoácidos

O nitrogênio inorgânico, absorvido pelas raízes, é convertido em aminoácidos diretamente nas raízes ou nas folhas, em seguida, caso não sejam utilizados em reações no local de síntese, são transportados para raízes, folhas, flores, pólen e embriões. Características fenotípicas como número de flores, sementes, tamanho e qualidade dos grãos são diretamente dependentes dos processos de transporte de aminoácidos (YONGEN, 2012). Arabidopsis thaliana Aminoácido Permease 1 (*AtAAP1/Nat2*) foi o primeiro transportador de aminoácidos caracterizado, por meio da técnica de complementação em leveduras mutantes deficientes no transporte de aminoácidos (FROMMER, 1993).

Os transportadores de aminoácidos são proteínas integrais de membrana que regulam a aquisição e distribuição de N orgânico através de membranas celulares em plantas superiores, desempenhando um papel indispensável em inúmeros processos (ZHAO, et al., 2012), sendo os principais mediadores da distribuição, bem como, da alocação de N nas plantas.

No genoma de *Arabidopsis* 53 genes foram classificados como transportadores de aminoácidos, com possíveis funções de transporte intra e intercelular, captação de aminoácidos no apoplasto, absorção direta de aminoácidos da solução do solo (LALONDE, 2004). De acordo com a análise de sequências, os transportadores de aminoácidos de *Arabidopsis* foram classificados em duas superfamílias: superfamília dos transportadores de aminoácidos, poliamina e colina (APCs) e superfamília dos transportadores de aminoácidos (ATFs) (SU, 2004). A superfamília APCs compreende duas famílias: CATs (transportadores de aminoácidos catiônicos) e GABA permeases. A superfamília ATF compreende cinco famílias: AtAAPs (aminoácido permeases), AtProTs (transportadores de prolina, AtLHTs (transportadores de lisina e histidina), AtANTs (transportadores de aminoácidos netros e aromáticos) e AtAUX (possíveis transportadores de auxina) (CHEN, 2001). O grande número e variados tipos de transportadores em *Arabidopsis* sugere que são funcionalmente diferenciados, possuindo especificidade por diferentes substratos, células e tecidos, possuindo padrões específicos de expressão, de acordo com as condições ambientais em que as plantas se encontrarem. Os transportadores de aminoácidos de *Arabidopsis* respondem a sinais

ambientais como ataque de patógenos (CARGINALE, 2004) e luz, sacarose, glicose, nitrato, amônio, glutamato e glutamina (GUO, 2004).

Embora o genoma do arroz tenha sido completamente sequenciado e as informações divulgadas, ainda hoje existem poucos estudos conclusivos sobre genes transportadores de aminoácidos em arroz. LU (2012) com base em ferramentas de bioinformática, identificou 79 genes que codificam para transportadores de aminoácidos, e forneceu informações como localização cromossômica, análise filogenética, estrutura gênica, análise de proteínas, motivos conservados, estruturas proteicas e análise de elementos cis de promotores, realizando também um estudo abrangente de expressão de *OsAAT* em tecidos e órgãos de arroz sob privação de N.

ZHAO (2012), utilizando bancos de dados, identificou 85 possíveis transportadores de aminoácidos em arroz, e com base em análise filogenética separou esses transportadores em duas famílias principais: AAAP (aminoácido/auxina permease) e APC (transportador de aminoácidos-poliamina-colina. A família APC é constituída de 58 OsAATs, inclusos em 8 subfamílias distintas: aminoácidos permeases (AAPs), transportadores de lisina e histidina (LHTs), transportadores de prolina (ProTs), transportadores de GABA (GATs), transportadores de auxina (AUXs), transportadores de aminoácidos aromáticos e neutros (ANTs) e subfamílias semelhantes a transportadores de aminoácidos (ATLa e ATLb). A família APC é composta de 27 OsAATs, divididos em três subfamílias distintas, incluindo os transportadores de aminoácidos catiônicos (CATs), transportadores de aminoácido/colina (ACTs) e poliamina $H^+$-simporte (PHSs).

Para validação dos resultados obtidos nos bancos de dados, o mesmo autor investigou por análise de PCR em tempo real a expressão de vários transportadores de aminoácidos e identificou que, na maioria dos casos, os resultados estavam de acordo com os experimentos de microarranjo. Os genes *OsAAP15*, *OsATL15*, *OsauxX4* e *OsAAP8* foram significamente expressos no caule, sendo também expressos em raízes e folhas. *OsauX4* foi expresso na raiz e na panícula no estágio inicial de desenvolvimento. *OsATL9*, *OsCAT1*, *OsBAT7*, *OsAAP5*, *OsANT1*, *OsATL6* e *OsAAP7* são predominantemente e altamente expressos nas folhas.

Verificou também que sob condições de estresse por fatores abióticos, como seca, frio e sal, 21 genes teve uma expressão diminuída em pelo menos uma das condições de estresse, sendo que os genes *OsAAP15*, *OsATL6* e *OsANT3* foi regulada pelos três estresses, cinco genes (*OsATL13*, *OsAAP6*, *OsAAP13*, *OsAAP11* e *OsAAP5*) foram regulados pela seca e pelo sal, e dois genes (OsGAT2 e OsCAT6) e três genes OsANT4, OsBAT7 e OsATL11) foram especificamente regulados pelo estresse hídrico e salino, respectivamente, demonstrando a grande complexidade e especificidade da rede regulatória dos transportadores de aminoácidos em resposta aos estímulos ambientais.

A subfamília AAPs é a mais populosa, com 19 representantes, é também a mais estudada. KATHLEEN (2008) realizando a superexpressão do gene *VfAAP1* em ervilha relatou um aumento no fornecimento de aminoácidos e os níveis de N e proteína nas sementes além do aumento na expressão de outros genes. LEE, 2007 estudando plantas de *Arabidopsis* deficientes na expressão do gene *AtAAP1* e plantas selvagens, cultivadas em meios de cultura com diferentes aminoácidos, relatou uma diminuição na captação de aminoácidos nas raízes nas plantas mutantes, e que essa diminuição era seletiva, demonstrando a especificidade desse transportador por diferentes substratos. Demostrou também que, em concentrações ecologicamente relevantes, *AtAAP1* têm um papel na importação de aminoácidos através das células radiculares. SANDERS et al. (2009), estudando o papel do gene *AtAAP1* em plantas de *Arabidospis* relatou que mutantes, quando comparadas com plantas selvagens, acumularam aminoácidos no endosperma e diminuiram a absorção pelo embrião. Em decorrência desse acúmulo de aminoácidos, houve um aumento no número de corpos proteicos no endosperma.

O peso das sementes, bem como o número total de silículas e sementes, foi reduzido nas plantas mutantes.

Em meio contendo L-glutamina como única fonte de N, foi impróprio para o desenvolvimento de plantas de *Arabidopsis* mutantes por nocaute para o gene *AtCAT6* (HAMMES, 2006). Mutantes *AtLHT1*, quando cultivados em solução contendo uma gama de aminoácidos, exibiram uma menor capacidade de absorção e crescimento, quando comparadas a plantas tipo selvagem (HIRNER, 2006). LIU (2010), trabalhando com o gene *AtLHT1*, relatou que as plantas mutantes apresentaram resistência a um amplo espectro de doenças.

Apesar da descrição de um grande número de transportadores de aminoácidos nas mais diversas culturas, a compreensão da função fisiológica da maioria dos transportadores ainda é desconhecida, especialmente em arroz, necessitando de mais atenção por parte dos pesquisadores em todo o mundo. Essa missão é ao mesmo tempo desafiadora e estimulante, e certamente resultará em informações preciosas para o meio científico.

## 2.4 Eficiência de Uso de Nitrogênio (EUN)

No cultivo de arroz o nitrogênio é o nutriente mais limitante durante o ciclo da cultura, dessa forma, se faz necessária a aplicação de uma grande quantidade desse nutriente, no intuito de atender a demanda de produção (ZHAO, 2014).

A EUN, definida basicamente como o rendimento de grãos por unidade de N aplicado no solo, é descrita pela combinação de dois parâmetros: eficiência de absorção de N (EAN), calculada pela divisão do N total da parte aérea pelo N aplicado no solo, e eficiência de utilização e N (EUtN), calculada pela divisão da produção total de grãos pelo N total da parte aérea, resultando na fórmula EUN = NUtE x NUpE.

A EUN geralmente é baixa, variando em torno de 20 a 40% do N aplicado no solo (JIN, 2012), sendo que em cultivos de terras altas a EUN pode chegar até 60% (HAEFELE, 2003). O nitrogênio apresenta um grande dinamismo no solo, devido à grande variação do número de oxidação (-3 até +5), sofrendo transformações mediadas pelos microrganismos do solo.

As perdas por volatilização, desnitrificação e lixiviação, além da imobilização microbiana são alguns dos fatores responsáveis pela baixa EUN. As perdas por volatilização, transformação do $NH_4^+$ a $NH_3^+$ (gás), podem atingir até 78% do N aplicado (LARA, 1997). Na desnitrificação o $NO_3^-$ é oxidado primeiramente a óxido nitroso ($N_2O$) e logo em seguida a $N_2$, sendo perdido para a atmosfera. Para a natureza, o processo de lixiviação talvez seja o mais prejudicial, uma vez que pode ocasionar a eutrofização de recursos hídricos, levando a morte de uma grande parcela de formas de vida ali existentes. A imobilização microbiana, apesar de tornar indisponível temporariamente o N para as plantas, caracteriza-se como uma fonte potencialmente mineralizável à medida que ocorre a morte dos microrganismos, processo conhecido como remineralização (MARY, 1996).

A melhoria na EUN é uma questão urgente para agricultura, no intuito de minimizar gastos e impactos ambientais. No entanto, a EUN é uma característica agronômica complicada, uma vez que envolve múltiplas etapas (absorção, assimilação, transporte e sinalização), as quais se interligam (YA-YUN, 2018).

A manipulação de enzimas de assimilação de nitrogênio se mostrou como alternativa viável para aumento da EUN. A expressão do gene glutamina sintetase (*SbGln1.2*) em sorgo, dirigida pelo promotor 35S, levou ao aumento do rendimento de grãos (URRIOLA, 2015). A superexpressão do transportador OsNRT2.3 em arroz, melhorou a absorção de nitrato e ferro, além do rendimento de grãos, sob condições de baixo e alto N no campo (FAN, 2016). O gene *OsNRT 2.1* sob controle do promotor da ubiquitina resultou em um decréscimo na EUN e no

rendimento de grãos, porém o mesmo gene, sob controle do promotor do gene *OsNAR2.1* teve um efeito oposto (CHEN, 2016), demonstrando que alguns transportadores necessitam de promotores específicos para melhorar a EUN da cultura.

Outra alternativa viável para a melhoria da EUN é a seleção de variedades que sejam naturalmente mais eficientes, que após identificadas, podem ser utilizadas para estudos visando elucidar os mecanismos que levam determinada variedade a possuir uma maior EUN, posteriormente esses mecanismos podem ser introduzidos em outras variedades de interesse. A eficiência de remobilização de N (ERN), determinada pela razão entre remobilização de N para os grãos (N total na parte aérea durante a antese - n total da palha no final do ciclo) / N total na antese, é um dos pontos chaves para aumentar a EUN. COELHO (2011) trabalhando com duas variedades de arroz, IAC-47 e Piauí, verificou uma maior eficiência de remobilização de N (ERN) na variedade Piauí quando comparada a variedade IAC-47, sob condições de baixo N, o que é de grande importância na busca do aumento da EUN, uma vez que a eficiência de remobilização está diretamente relacionada a eficiência de uso de N.

Em pesquisas realizadas por COELHO (2016) nas plataformas Genevestigator e RiceXpro para determinação dos locais e épocas de expressão do gene *OsAAP1*, foi possível observar esse gene *OsAAP1* tem uma expressão de média a alta em grande parte dos tecidos, que sendo que durante a fase reprodutiva a expressão é aumentada em plantas de arroz, especialmente na antese. De acordo com a mesma autora, em plantas de arroz da variedade Piauí, o gene *OsAAP1* tem um aumento de expressão nas panículas aos 7 e 15 dias após a antese (DDA), indicando que este gene participa no transporte de aminoácidos para os grãos, com a finalidade de formação de proteínas de reserva.

Os transportadores de aminoácidos possuem relação direta com a maior ou menor ERN das mais variadas espécies. O enchimento dos grãos em plantas de arroz é diretamente dependente da atuação dos transportadores de aminoácidos, os quais são responsáveis pelo envio dos aminoácidos das folhas fonte para os grãos em formação (drenos). Quanto mais eficiente esse processo melhor será a ERN e, consequentemente, a EUN.

## 2.5 Edição Gênica - Sistema CRISPR-Cas 9

Com a enorme quantidade de informações disponibilizada pelo sequenciamento completo do genoma de algumas espécies, as atividades de pesquisa adquiriram um conjunto de dados preciosos, os quais devem ser convertidos em um conhecimento funcional e relevante. Para avanços ainda mais significativos, torna-se necessário o desenvolvimento de ferramentas, que sejam confiantes e de fácil aplicação, que permita determinar como o genótipo influencia o fenótipo em diferentes espécies.

Recombinação homóloga, apesar de ser um método poderoso e capaz de fornecer informações conclusivas a respeito da função gênica, é uma técnica de difícil uso, uma vez que possui baixa eficiência e necessitam de estratégias de seleção demorada (GAJ, 2013).

O nocaute gênico direcionado por RNA interferente (RNAi), surgiu como uma alternativa rápida, barata e de alto rendimento para recombinação homóloga (McMANUS, 2002). Porém o nocaute gerado pelo RNAi é incompleto, apresentando variação entre experimentos, além de ter efeitos imprevisíveis fora do alvo, não permitindo uma associação segura entre o fenótipo e o genótipo, limitando o uso dessa técnica.

Novas tecnologias, surgidas na década passada, direcionaram os estudos dos genes para a era da edição genômica, a qual se baseia no uso de nucleases modificadas que direcionam a clivagem na dupla fita de DNA (DSBs) estimulando o reparo do DNA celular por junção endêmica não propensa a erros (NHEJ) e reparo homólogo direto (HDR) (WYMAN, 2006). Essa abordagem é facilitada pela possibilidade de programação dos domínios de ligação ao DNA de nucleases de dedos de zinco (ZFNs) e nucleases efetoras do

tipo ativador transcricional (TALENS). Devido a simplicidade e flexibilidade ZFNs e TALENs assumiram um papel primordial para a engenharia genética.

O sistema CRISPR/Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) surgiu como uma alternativa eficiente, de fácil aplicação e barata, para indução de alterações genéticas direcionadas. Em comparação com ZFNs e TALENs, esse sistema é mais econômico, preciso, e altamente eficiente, mesmo na edição de genomas complexos (WANG, 2018). Certamente a descoberta dessa técnica foi um dos achados científicos de maior relevância para todo a humanidade, fato que poderá ser confirmado no decorrer das pesquisas que estão em andamento.

CRISPR/Cas é um sistema natural, presente em bactérias que permite respostas adaptativas frente a vírus. Por serem procariontes, as bactérias possuem um DNA que fica solto no citoplasma, sujeito ao ataque por determinados microrganismos, com isso, se faz necessário um sistema de defesa eficiente, que evite a morte bacteriana (MARTINEZ, 2005). Em um meio natural, após a entrada de um DNA viral, a bactéria detecta e envia uma sequência de RNA capaz de copiar até 20 nucleotídeos do DNA do vírus. Esta sequência é unida à proteína de corte Cas, em seguida essa proteína, direcionada pelo RNA bacteriano, se encaixa no DNA viral, na região reconhecida por esse RNA, e a enzima Cas 9 realiza um corte no DNA invasor. Jennifer Doudna e Emmanuelle Charpentier, em artigo publicado em 2012, detalham o processo de programação celular para realização de edição gênica. Atualmente essa técnica encontra-se bem difundida pelos laboratórios de todo o mundo.

Em 1987 foi registrado pela primeira vez a descoberta de sequências repetidas em Escherichia coli (ISHINO, 1987), o que veio a ser a base para o desenvolvimento da tecnologia CRISPR atualmente utilizada. Essas sequências, anteriormente nomeadas de short regulary spaced repeats (SRSs) por Martínez Mojica, foram renomeadas como CRISPR pelo pesquisador Ruud Jansen no ano de 2002. Em 2005 Mojica identificou semelhanças entre essas sequências e o DNA de certo grupo de vírus que afetava o desenvolvimento bacteriano, descobrindo nessa ocasião a real função dessas sequências repetidas, que era a defesa bacteriana frente a vírus. Este sistema é hereditário aos processos de reprodução bacteriano (MARTINEZ, 2005). Essa descoberta rendeu a Martínez Mojica uma nomeação ao Nobel de Medicina de 2016, vencido por Yoshinori Ohsumi.

O grupo de pesquisa liderado por Doudna e Charpentier foi o primeiro a realizar um corte in vitro de uma fita de DNA utilizando o sistema CRISPR/Cas9, e relataram a possibilidade de uso desse sistema para a edição gênica em outros organismos. Como reconhecimento da importância desse estudo, no ano de 2015 foram contempladas com o prêmio Princesa de Austrias de pesquisa científica. Neste mesmo ano Feng Zhang realizou o primeiro corte utilizando o sistema CRISPR/Cas 9 sobre o genoma de uma célula viva de mamífero (CONG, 2013), e registrou esse feito no registro de patentes dos Estados Unidos da América (EUA), o que resultou em um processo judicial com as pesquisadoras Doudna e Charpentier.

As possibilidades de aplicação dessa técnica são as mais diversas e de acordo com o informe do Nuffield Council on Bioethics, além de aplicações sanitárias, que são as que despertam mais interesse da comunidade científica, a agricultura é outra área importante.

Fato é que inúmeros estudos, nas mais variadas áreas de conhecimento vem sendo realizado. Cientistas chineses já utilizaram essas técnicas em um paciente com câncer de pulmão, o qual atualmente passa por acompanhamento médico para a comprovação da eficácia e segurança desse método. Estudos envolvendo embriões também foram realizados na China (CONG, 2013), apesar de toda a polêmica que envolvida em estudos com embriões. De certo, sabe-se que, a utilização dessa ferramenta na área médica, enfrenta alguns princípios éticos, como a não utilização para princípios terapêutico, por exemplo, escolha da cor dos olhos.

A modificação de ecossistemas também é possível com o uso dessa técnica. Por exemplo, mosquitos considerados vetores de doenças, podem ser alterados geneticamente e liberados no ambiente, interagindo com suas populações e transmitindo as modificações genéticas desejadas.

Na agricultura é uma ferramenta promissora para enfrentar os problemas emergentes, principalmente nas regiões tropicais que, devido alterações climáticas severas que estão previstas no futuro próximo, vão enfrentar epidemia de pragas e estresses abióticos, o que representará um grande risco a produção de culturas. Apesar da grande contribuição dos métodos convencionais de melhoramento, como a hibridação, para o aumento do rendimento das culturas, o rendimento real está estagnando (ANSARI, 2017). Essa estagnação vem sendo relatada em sistemas de cultivo intensivo, como o arroz no leste da Ásia, o milho no sul da Europa e o trigo no Noroeste da Europa (HAQUE, 2018).

RODRIGUEZ, et al., (2017), utilizando o sistema CRISPR/Cas 9, realizou pequenas alterações em genes relacionados a características quantitativas no tomateiro e obteve plantas de maior porte, melhor arquitetura e frutos com um melhor formato. XU (2016), trabalhando com plantas de arroz, editou ao mesmo tempo os genes *GW2, GW5* e *TGW6,* que regulam negativamente o tamanho das sementes, como resultado, as sementes aumentaram 30% o comprimento. A mandioca, cultura de grande importância nas regiões tropicais, vem sendo alvo de estudos com o sistema CRISPR/Cas9 (ODIPIO, et al., 2017), demonstrando que essa tecnologia pode ser utilizada com sucesso para a melhoria direcionada dessa e de outras culturas tropicais. WANG et al. (2016) projetaram o sistema CRISPR/Cas9 para editar o gene *OsERF922* de arroz, que regula negativamente a resistência à brusone do arroz. Na geração T0, a transformação genética de calos, mediada por *Agrobacterium*, obteve uma frequência mutagênica de 42%.

Apesar do grande sucesso o sistema CRISPR/Cas 9 apresenta algumas limitações (LEDFORD, 2016). Os componentes desse sistema são muito grandes para que seja introduzido no genoma do vírus utilizado em terapias genéticas, uma solução é a utilização de uma mini-Cas9 obtida da bactéria *Staphylococus aureus* (RAN, 2015). Uma outra limitação é a possibilidade de cortes fora do alvo pela Cas9, porém pesquisadores vem buscando enzimas com atividade de nucleases para suprir a Cas9. Uma dessas enzimas é a Cpf1, menor que a Cas9 e altamente específica (KIM, 2016)). Pesquisas futuras irão ditar de forma inequívoca o real potencial dessa técnica.

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

Em plantas de arabidospis, o transportador AAP1 é responsável pelo envio de aminoácidos para o embrião em desenvolvimento, o seu nocaute ocasiona uma diminuição na absorção de aminoácidos por esse órgão e leva à um acúmulo de aminoácidos na casca/ endosperma de sementes, bem como um aumento no número de corpos proteicos e uma diminuição no número e no peso de sementes (SANDERS et al., 2009). A superexpressão do gene *AtAAP1* em plantas de ervilha levou a um maior carregamento de aminoácidos no floema e resultou em uma maior produção de biomassa e produtividade (ZHANG, et al., 2012).

O transportador AAP1 em plantas de arroz é expresso durante todo o ciclo de desenvolvimento, sendo mais expresso nas raízes jovens, folhas maduras e panículas durante o período de enchimento de grãos (ZHAO, et al., 2012), indicando um papel no fluxo interno de aminoácidos, principalmente nessas fases. COELHO, 2015 por meio de análises filogenéticas de transportadores de aminoácidos da família Aminoácido Permease (AAP) de plantas de arroz, sorgo e arabidopsis, verificou uma proximidade entre o gene *OsAAP1* de arroz e o gene *AtAAP1* de arabidopsis, e sugeriu que em arroz o transportador codificado por esse gene possui uma função similar a apresentada em arabidopsis.

O presente trabalho teve como objetivo principal realizar a caracterização funcional desse transportador e verificar a influência do mesmo na Eficiência de Uso de N, utilizando plantas de arroz que passaram pelo nocaute do gene *OsAAP1* com o uso da técnica do CRISPR/Cas 9.

Os procedimentos necessários para obtenção das plantas mutantes encontram-se descritos nos itens 3.1 – 3.12, abrangendo a construção do vetor (itens 3.1-3.3), inserção em bactérias (*E-coli* DH5α (itens 3.4-3.5) e *Agrobacterium tumefaciens* (itens 3.6-3.8)) e em calos de arroz (iten 3.9), obtenção e seleção de linhagens (itens 3.10-3.12). Posteriormente são descritas as análises realizadas para determinação das alterações ocasionadas pelo nocaute gênico (itens 3.13-3.14).

A construção gênica por meio da ligação do gRNA (específico para o gene de interesse) com o vetor pRGEb31, foi realizada de acordo com (XIE & YANG, 2014).

## 3.1 Síntese dos gRNAs

No sistema CRISPR-Cas9, a nuclease Cas9 é direcionada por um RNA guia (gRNA) para gerar cortes na dupla fita de DNA cromossomal em sítios específicos e durante o processo de reparo celular, através da união de extremidades não homólogas, são geradas mutações na região de corte (XIE and YANG, 2014). A proteína Cas9 reconhece a região alvo do DNA com base na complementaridade entre o gRNA, de aproximadamente 20 nucleotídeos, e seu DNA alvo, o qual precede um motivo protospacer adjacente (PAM) (Figura 1).

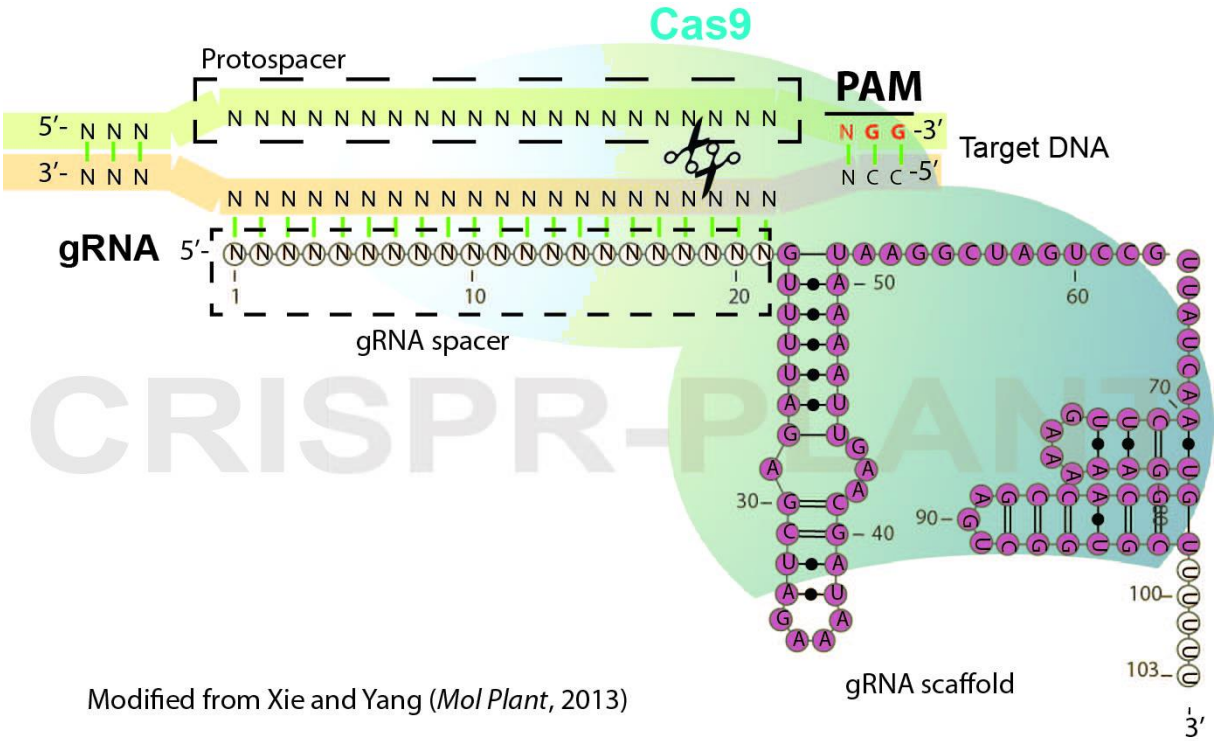



**Figura 1**. Reconhecimento e corte do DNA alvo pelo complexo gRNA+Cas9 (Xie & Yang, 2013).

A síntese dos gRNAs que direcionaram o corte do gene *OsAAP1* pela proteína Cas9, foi realizada na plataforma CRISPR-PLANT database (www.genome.arizona.edu/crispr) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Sequência dos gRNAs para reconhecimento de uma região específica no gene *OsAAP1*.

| Gene | gRNAS | Sequências |
|---|---|---|
| *OsAAP1* | AAP1 f | 5'-GGC-CCCACCTGTGCGCTTCTCG-3' |
| | AAP1 r | 5'-AAAC-CGAGAAGCGCACAGGTGGG-3' |

## 3.2 Região de Anelamento do gRNA-Cas9

Para confirmação da região de anelamento do gRNA sintetizado na plataforma CRISPR-PLANT database, a sequência completa do gene foi obtida na plataforma rice genomic annotation project, e foi confirmado a especificidade do primer, assim como o local de anelamento. A sequência completa do gene foi anexada abaixo (Figura 1) para o melhor entendimento da região a ser editada. Em sublinhado o local de anelamento do primer reverse (gRNA).

ATGGGGATGGAGAGGCCGCAAGAGAAGGTGGCCACCACCACCACCGCCGCCTTCAACCTCGCCGAGTCCGG
CTACGCCGACCGCCCCGACCTCGACGACGACGGCCG<u>CGAGAAGCGCACAGGTGGG</u>TGTATGTCCGGTGTCC
ATGGATGAGGTAGCTAGAGCTAAGCTAATTAAGCAAGCTAATGGGTTGGTAATAACAATGGCGGCGGCCGG
ACGAACACTTGGATGCATATATGCAGGGACGCTGGTGACGGCGAGCGCGCACATAATAACGGCGGTGATCG
GCTCCGGCGTGCTGTCGCTGGCGTGGGCGATAGCGCAGCTGGGGTGGGTGATCGGGCCGGCCGTGCTGGTG
GCGTTCTCGGTCATAACCTGGTTCTGCTCCAGCCTCCTCGCCGACTGCTACCGATCTCCCGACCCCGTCCA

TGGCAAGCGCAACTACACCTACGGCCAAGCCGTCAGGGCCAACCTAGGTAAATTTAATTAATCACTACAAT
TACTGCTAATTAATACTGTAATAATTACTGTACTTAGCTTGTTACTAATATGGAGATGGAGATATTTTGTG
GGTGCAGGTGTGGCCAAGTACAGGCTCTGCTCGGTGGCACAGTACGTCAATCTCGTCGGCGTCACCATTGG
CTACACCATCACTACGGCCATCAGCATGGGGTACCTACTGTCTACTATGACTAATTACTCTAGTAAATTTG
GGCAGTAAGCTTTTAGCTATGAATCAGTATAACTTATGTACTCTTGATTGTGGTTTAGACTGTGTACACCT
TCTGAGGTGTAGAGGCCGGGTTAATATAATCCATTATCTAAAAAGTATAAGTAGCAGAGTCTGTTTAAATT
TATATGCGTTATTGTTATTGTATTTTAGGATGGAGAGAGCTAGCACGTACATAGTAGAGTGTGGAGTAAGC
TTAATCCTTGATTAGGACACTTCACTAACCCATTCTTCACGTTACTGCTACTGAGAGCTGTAGACTGTAGA
GTGAGTAGCAGTAGATGAGAAAATTCAGTCAATTTAATTAGCCGTGCAAGCATGCATGATGATGCATGTGT
ACAAGTACATGTCCTCCATCATATATCTCTGCATGCAGCCTGCCCCTCTGTTAATTTGTTTGTTTGTAACT
ATATATCTAGGTGGTAGGATAATGTTTTGCATGTCCCAAATTCCGTTTAGCTTTCGTCAGCTTCTTAATTT
AGTTTCTGGAGCGCAAATATATATCTCATTTCCATAATTCCACGTGCCTTTACTTACAGGCGGCACGCCCG
CGGCCCGACCACCTCAAAAAGAAAAAAAAAATACTCCCTCCGTATTTTAATGTATAACGTCGTTGACTTTT
CGACCAACGTTTGATCATTCATTTTATTCAAAAGTTTTGTGTAAATATGAAAATATTTATGTCATGCTTAA
AGAACATTTGATGATTCATCAAGTCACAATAAAATAAATAATAATTACATAAATTTTTTGAATAAGATGAA
TGGTCAAACGTTGGACAAAAAGTCAACGGCGTCATACATTAGGAGGTAGTATATGTTTTGGCCATTTGCAA
AAATTGTTGTCATAGTGAATGCGTCGCCATGTTTAATTAGGTTTGACAGTATGATTAGGACAACATAGGTA
AGAGGCTACTCATAATTCTCAAAAGCAAAGCAAATTGTAATTAAAGCATTCATTCATTCTCTGAAATGTCG
CATGGCTGCTATGACAGTCAAATTAATTAGGTTGAGTACGTTAGGTGGTCTTCTTGAGGATCCAACAAAGG
CAAAAAAAAGCAGAGTATATAGTGGGAGAGAAAAAGTTGGGGAAGATAACATTACTGGACAGTTCAAAAGT
AGTTGGAAAATATTCAGATTCTAGTGAGTATCCAAAACTTTTTCCACTGAAAAAGAAACAGCGAGCTAAAA
AGGAGTGGTTCTTGCTCTGCTCTGCATATTGGCATGGCTATGGAGAAGAATCTTATTCGTGATAAGCATCT
ACTAGACTACTACCACTAATGATTGATAAACAAAAAAATCAGACACTTTTACCTTGATTCCTACCTTTCAT
TTCATTTTCAGTACACTCCTTTTTCTTTCTGATATGATTTTCGTCAGTGTTACTCTGAATTTCTCTGAATA
CTAACATATGGTTAATTTACAAATCTGTTGATGATATGCAGTGCGATCAAACGGTCCAACTGGTTCCATCG
CAACGGCCACGACGCAGCCTGCTTGGCATCTGACACGACCAACATGATCATATTTGCTGGCATCCAAATCC
TCCTCTCGCAGCTGCCGAATTTTCACAAAATTTGGTGGCTCTCCATTGTCGCTGCTGTCATGTCACTGGCC
TACTCAACCATTGGCCTTGGCCTCTCCATTGCAAAAATTGCAGGTAAATATATACCATCTGATATATATGG
ATGACAAAAACAAATTTGTGTGGCTATCTTATTCTTAGGATTGCAAGAAATATTTTTTTCTGGTTCTCGCC
GCACATAGAACTGAAACTGGTTCCTGTGAAAATCCGACAAAATTCTTGTAAAACCGCTACTTTCCAAAGGA
GAGACCCAAGTCCTCCTCGGTCCAAAAATGGAGACCAAGTCTTTAATTTACTTCATCTATTCTGTTCCCGT
GTACACATCATGCAATTAATTCACAAGGGAAATGGACAAAACAAAGAAGATATGATGCTGATATTATAAAT
ATACATTTTTGGTAGGGCAGAAACAAAATTGAGGCGTGCAAAAATGTATATACATAGCCTGGGACACTTGA
CATGTTGGTTTTTGTTTGTATCATCCATGTTGGGGGGGGGGGGGGCCATGATGCAGTGCATTTGTATGAT
TGAATTCATGTGGTTCTCTGCAGGTGGGGCCCACCCCGAGGCAACCCTCACAGGGGTGACTGTTGGAGTGG
ATGTGTCTGCAAGTGAGAAAATCTGGAGAACTTTTCAGTCACTTGGTGACATTGCCTTTGCATACTCCTAC
TCCAATGTCCTCATAGAAATTCAGGTAAATTAATTTTAATTAACCTTTGCTTATATTTCTCTTGATACAAA
CATGAGCGATAAGCTATCTTTTTCAGTGAAACAAATTTAGACAAGTATAAAATGAGAAAAGTAAATTGATG
TAGTACTCTCTCCGTCTAAAAGAAAAAAATTAAACTCTAAGGATGAATCTATGTGTCCAAATTTATCCCTA
ATATTTAATTCTTTTTAGGAGGGAGGAAATAGTACATTAGGAAAAGTGAGAGAAAAAAATAGGAGGAAAAT
TTTGGGGATGTTCCGTATGCCCGTGATCTTTTGAGCTCTGTCAAAGAGGACAGATTTCTGAAAGATAGCAG
TATGGGTGAACCCTACAAGAGGACAGATTTTGCAGTTTCCTGCACATGAAAAATACTCTGAAAAATACAGA
TATATTCCTTTTCAGAATCTTGGTCATACTGGTCAACATAGAGTCTCTGTTCTTCATTGAAACCACTGGTT
TTGCCATGAAATTTGCAAGTAGATAGCGATATATCCCTTATTATACTTAACCTGTCGGCCATCAAATTTCA
GATCATGAATCGGCAGTCAGAAATTCAGAGTTCACATGCAAGAACATTTCTGAAAATGACTACCTAATCTA
ATTACTAATACCATTTCTGAAAATGACTGCCTAACCTAATTACTAAGAGCAAGTTTAATGGTATAGCATAG
TACTAGCTCCAAATTTTCTATAGCCAATGGAATAGCCAATTCATACAATAATTACTTGCTATACTAGTAAT
ACCTGGTCCCACCTGTCACACACATTACGTCTTGGAGTCCGTGCTGCAGCTGGCTACAGATCTGTAGCCCG
CTGCTTTTCTCTCTCTTCTTTTATCTCTTTAAAATATGTTTATAGCTAGCTTATAGCCTGTTATTGTACCT
GCTCTAATACTATATGAGCTTCAAATCTTGAAATGTCTTTGTCCTCAATCAAAATACTGTCCTTTCCTTTG
GCGTTTTGATGGATGACAAAAATGAGACAAGTCTCGAGGCAATACATTTCACTGCATTTATTGCACATTTA
CGTCTCACGCAAATCTCAACGCAACTCTAGTGGTACTTCTCCTAGCTAGGTCAATATTGCAATCAAACACA
AATTTTTACACTAATTTGTATGAAGTAGTGAGAAAATAATTTGATGCGTTTTGAGAGCATCTCATGATTGG
GTAATTTTATCATCCGATACCGATAGGTGAGTTACCGATAGGTGAGTATCTTCAAGTAATATGCATGTATC
TAGAGATATTAAAATATACTATTATTTTATAAAATTTAGATATCTCGAGTTAATGTACTGTAATTTTTTTT
CTATCCTTAAAAATATCGGGAAGTATAAAACTTGGTATCTTCTGATACTATGTATTCTGATATACCAAAAT
TTTTAGTCTAAATCTCGAACTACCTTTTCATTTCAAGAACCGTAAAATCTTTCCTATCCTTTTTCTTAAAA
AGATATCGGGAAGTATAAAACTTAATATCTCCTGATACTATGTATTTTATGTATTTTGAGATACCAAAATT

TTTAGTCTAAATCTCAATGTACTTTAATTTTTCAAGAACTGTAAAATTTCTCGAAATGACAAAAATGTGTG
CGTAAACGTGCAGGACACGCTGCGGTCGAGCCCGGCGGAGAACGAGGTGATGAAGAAGGCGTCGTTCATCG
GAGTCTCGACGACGACGACGTTCTACATGCTGTGCGGCGTGCTCGGCTACGCGGCGTTCGGCAACCGCGCG
CCGGGGAACTTCCTCACCGGCTTCGGCTTCTACGAGCCCTTCTGGCTCGTCGACGTCGGCAACGTCTGCAT
CGTCGTCCACCTCGTCGGCGCCTACCAGGTCTTCTGCCAGCCCATCTACCAGTTCGCCGAGGCCTGGGCGC
GCTCGCGGTGGCCGGACAGCGCCTTCGTCAACGGCGAGCGCGTGCTCCGGCTGCCGCTCGGCGCCGGCGAC
TTCCCCGTCAGCGCGCTCCGCCTCGTCTGGCGCACGGCCTACGTCGTGCTCACCGCCGTCGCCGCCATGGC
GTTCCCCTTCTTCAACGACTTCCTCGGCCTCATCGGCGCCGTCTCCTTCTGGCCGCTCACCGTCTACTTCC
CCGTCCAGATGTACATGTCTCAGGCCAAGGTCCGGCGATTCTCGCCGACGTGGACGTGGATGAACGTGCTC
AGCCTCGCCTGCCTCGTCGTCTCCCTCCTCGCCGCCGCCGGCTCCATCCAGGGCCTCATCAAATCCGTCGC
ACATTACAAGCCATTCAGCGTCTCCTCATGA

**Figura1.**Sequência genômica do gene *OsAAP1* (LOC_Os07g04180) (http://rice.plantbiology.msu.edu). Em destaque a região de anelamento dos gRNAs.

### 3.3 Ligação dos gRNAs ao Vetor pRGEB31

O pRGEB31 é um vetor binário derivado do vetor pRGE31, o qual possui um sítio específico para ligação dos gRNAS, bem como uma região codificante para a nuclease Cas9, para o gene de resistência a higromicina (hpt) e regiões promotoras (Figura 2).

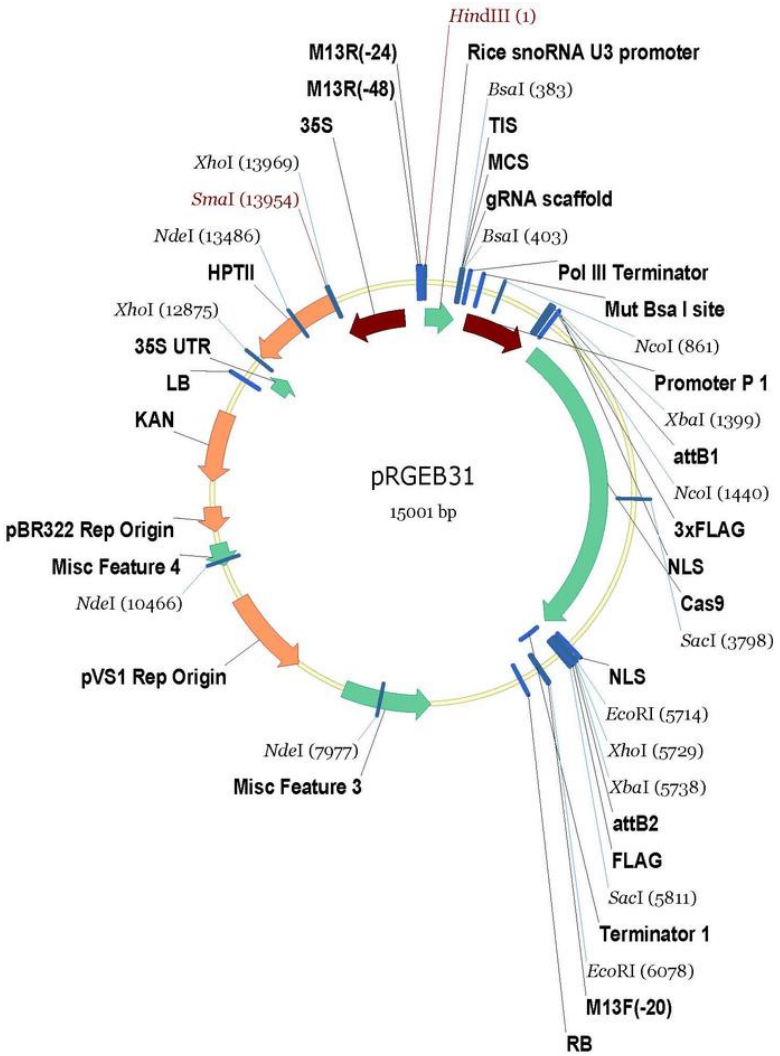



**Figura 2.** Mapa do vetor pRGEB31 (Addgene plasmid, 51295).

A ligação dos gRNAs ao vetor foi realizada após três reações. A primeira reação, abertura do vetor, foi realizada com a enzima BSA I da New England Biolabs (NEB), de acordo com a seguinte reação: em um microtubo tubo de 50 ul foi adicionado 2 µg d o vetor pRGEB31 fechado, 2 µl de NEB Buffer 4 a10x, 2 µl de BSA 10x, 1 µl Bsa I (NEB) e água milq ($H_2O$-miliq), completando 20 µl. O tubo foi incubado em termociclador por 4 horas a 37 °C, logo em seguida foi purificada com kit de purificação da promega (QIAquick PCR purification kit).

A segunda reação, anelamento dos gRNAs, foi realizada de acordo com a seguinte reação: em um microtubo de 50 ul, foi adicionado 1 µl de primer forward (100 uM), 1ul de primer reverse (100 uM), 1 µl de T4 DNA ligase Buffer 10x, 0.5 µl de T4 PNK (NEB) e 6.5 µl de $H_2O$ miliq. O tubo foi incubado em termociclador por 60 min a 37 °C, 10 min a 95 °C, seguido de resfriamento a 25 °C (0.1 °C /seg), e o produto final da reação foi então diluído 200 vezes.

A terceira reação, ligação dos gRNAs ao vetor, foi realizada em um tubo de 50 ul, com a adição de 1 µl de Vetor digerido com Bsa (~50 ng) (reação 1), 1 µl de primers diluídos (reação 2), 0.5 µl de T4 DNA ligase Buffer 10x, 1 µl de T4 ligase (NEB) e $H_2O$ até o volume de 5 µl. O tubo foi incubado por 4 horas em temperatura ambiente (25 °C). Após essas reações o vetor, já com o gRNA ligado, foi inserido em bactérias *E. coli* DH5α.

## 3.4 Preparo de Células Competentes DH5α para Eletroporação

O estoque de *E. coli* DH5α foi riscado em meio LB sólido e incubado overnight a 37$^o$C. Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB sólido e mantida sob agitação constante a 150 rpm, 37$^o$C, overnight. Na manhã seguinte, 3 mL da cultura fresca foram inoculados em 300 mL de meio LB líquido acondicionado em erlenmeyer de 2 L e transferido para agitador orbital constante a 200 rpm a 37$^o$C até a cultura atingir uma $DO_{600}$ de 0,6. De 3 e 4 horas de cultivo foram suficientes para alcançar uma $DO_{600}$ de 0,6. Atingida a $DO_{600}$, alíquotas de 50 mL da solução de células foram acondicionadas em seis tubos falcon e mantidas em descanso no gelo por 30 min. Em seguida as células foram precipitadas a 4.000 x g. por 15 min. a 4$^o$C. O sobrenadante foi descartado e as células foram cuidadosamente solubilizadas em 50 mL de água destilada estéril gelada (10ºC), para retirada do excesso de sais. As células foram novamente precipitadas como descrito acima e solubilizadas em 25 mL de água destilada estéril gelada. As células foram então acondicionadas em três tubos falcon de 50 mL e novamente precipitadas como já descrito. O precipitado de cada tubo foi solubilizado em 2 mL de glicerol (10%) gelado e as células transferidas para um único tubo. Finalmente, as células foram precipitadas e solubilizadas em 550 µL de glicerol (10%) gelado. A suspensão de células foi dividida em alíquotas de 50 µL, acondicionadas em microtubos de 1,5 mL e mantidas em freezer -80$^o$C para uso posterior.

## 3.5 Transformação de Células Competentes de E.coli DH5α

Para o processo de transformação, 1 uL do vetor pRGEB31 com os gRNAs inseridos, foi misturado com 50 uL de estoque de células competentes de ecoli DH5α e permaneceu em descanso no gelo por 5 min. Após esse período esse mix foi submetido a eletroporação a 1.700V, e logo em seguida, misturado com 400 µL de meio SOC. As bactérias transformadas, foram incubadas por 1h a 37ºC, em agitador orbital a 150 rpm. Para seleção das bactérias transformadas, 100 µL do caldo bacteriano foi riscado em meio LB contendo 50 µg. $mL^{-1}$ de Kanamicina. Para confirmação da ligação dos gRNAs ao vetor pRGEB31, bem como da transformação das bactérias, plasmídeos de três colônias isoladas foram extraídos e

sequenciados pelo método Sanger. De acordo com o resultado do sequenciamento, os gRNAs foram inseridos com sucesso no vetor e as bactérias foram transformadas (Figura 3).

```
GSKGKKYGGAWGCCTCTCTACMTCTGTGGGTTAGCATTCTTTCTGAAATTGAAAAGGCTAATCTGGGGACC
TGCAGGCATGCACGCGCTAAAAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACAAAAAA
GCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCT
AAAACCGAGAAGCGCACAGGTGGGTGCCACGGATCATCTGCACAACTCTTTTAAATCAGCTTTGATCTATG
TGGATAGCCGAGGTGGTACTAATACTAGTCTTTGTTGTCGTCCAATTGCGTAATGGGCCGGCCCATACTGC
AATACATGTCCTGAAAGGCTTCATGGCCCACTACGAAATGCTTTTCTCCTACAGTTTATCTTACTTCTTCA
CATCACGTGGTTTCCAACGTACCCAGTGTTCCCGGCTTCCAGCATTTGCTGGTAGCACCAGTAGAAGACGC
CTGTCTTGTGCTATGGTCCCTGACTGCACATCTGATTCCTCCAAGATCCATGCATGCCTGATAACTTTAAG
TTGCTTCAGAAGAACTTTAAGTGATCTGTTCGTATGTTTAAAGATTCCTTAAGCTTGGCGTAATCATGTCA
TAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTG
TAAAGCCTGGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAG
TCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATYCGGCCAACGCGCGGGGAGAGSMGGTTTGCGTATGC
CTAGAGCAGCTGCAACATGTGGRAGCACGMTCTCTCCGTCWMCTCCAAGRAATWATCMAAGAGATACMG
```

**Figura 3.** Fragmento de DNA bacteriano sequenciado pelo método Sanger. Em destaque a região de inserção do gRNA.

### 3.6 Meio YEB para o Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

Para cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* foi usado o meio YEB contendo 5 g. $L^{-1}$ de extrato de carne, 1 g. $L^{-1}$ de extrato de levedura, 1 g. $L^{-1}$ de peptona, 5 g. $L^{-1}$ de sacarose, 0,002 g. $L^{-1}$ de $MgSO_4$, pH 7,4. Para meios sólidos, foi adicionado agar (1,5%) ao meio de cultura.

### 3.7 Preparo de *Agrobacterium tumefaciens* Competente

O estoque de *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) foi riscado em meio YEB sólido contendo Rifamicina (Rf) 100 µg. $mL^{-1}$ e Gentamicina (Gm) 40 µg. $mL^{-1}$, e incubado a 28ºC por 24 horas. Com o auxílio de uma alça flambada apenas uma colônia isolada foi transferida para um tubo falcon de 50 mL contendo 3 mL de meio YEB (Rf/Gm) que foi incubado a 28ºC em agitador orbital a 150 rpm por 48 horas. Apenas 2 mL da cultura fresca foram inoculados em 50 mL de meio YEB contendo Rf e Gm em erlenmeyer de 250 mL. A incubação foi realizada a 28ºC sob agitação constante de 150 rpm, até atingir uma $DO_{600}$ de aproximadamente 0,6. A cultura foi então dividida em dois tubos falcon de 50mL e incubada no gelo por 20 minutos. A seguir, as células foram precipitadas a 1.000 xg por 5 minutos a 4 ºC. O sobrenadante foi descartado e o precipitado solubilizado em 500 µL de uma solução contendo $CaCl_2$ (20 mM) e glicerol (10%). As células foram divididas em alíquotas de 100 µL acondicionadas em microtubos estéreis de 1,5 mL e mantidas em freezer a -80ºC para uso posterior.

### 3.8 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Após confirmação por restrição, os plasmídeos foram inseridos em *Agrobacterium tumefaciens* estirpe LBA4404 de acordo com os procedimentos descritos a seguir: 1 ug de plasmídeo foi adicionado a 100 µL de *Agrobacterium* competente, a mistura foi homogeneizada suavemente e incubada no gelo por 30 minutos. As células com o plasmídio foram congeladas em nitrogênio líquido por cinco minutos e em seguida incubada a 37ºC em banho-maria por mais cinco minutos. Após este tempo, foi adicionado 1 mL de meio YEB, e

as células foram mantidas a 28ºC, em agitador orbital a 150 rpm durante duas horas. 1 mL dessa transformação foi plaqueada em meio YEB sólido com os antibióticos correspondentes a construção (Km) mais Rifamicina (Rf) a 100 µg. $mL^{-1}$. As placas foram incubadas a 28ºC até o aparecimento de colônias (dois a três dias).

### 3.9 Transformação de Arroz Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação das plantas de arroz foi realizada com base no protocolo de TOKI et al. (2006) com modificações. Cem sementes de arroz da variedade Piauí foram descascadas e desinfestadas em 50 mL de álcool 70% por 5 min, seguida de três lavagens com água destilada autoclavada. Em seguida foram desinfestadas em hipoclorito de sódio a 2,5 % e tween 20% (0,05%) por 30 min, seguida de cinco lavagens em 50 mL de água destilada autoclavada.

As sementes foram distribuídas em 5 placas de Petri com 20 sementes em cada. Na primeira etapa as sementes passaram por um processo de indução de calos embriogênicos em meio de cultivo N6D (ANEXO item 1) contendo 2,4D (2 mg. $L^{-1}$) onde foram mantidas a 32ºC por três semanas para obtenção dos calos.

Após este período, foi realizada uma repicagem dos calos para novas placas contendo meio de cultivo N6D por três dias com o objetivo de aumentar a quantidade e a atividade dos calos embriogênicos.

Após o período de indução, os calos foram transferidos para o meio de co-cultivo N6-As (ANEXO, item 2), onde calos e *Agrobacterium* foram cultivados juntos. Três dias antes dos calos serem transferidos para esse novo meio, a *Agrobacterium* transformada contendo a construção para o gene *OsAAP1*, foi colocada para crescer em meio AB (ANEXO, item 3). Uma solução foi preparada a partir do cultivo recente de *Agrobacterium tumefaciens*, que foi diluído em meio para solubilização AAM (ANEXO, item 4) até se obter uma densidade ótica de ($DO_{600}$) 0,1. Os calos foram então submersos na solução contendo *Agrobacterium* e homogeneizados por inversão durante três minutos. Após o contato com a *Agrobacterium* o excesso de bactéria foi drenado em papel filtro, depois foram colocados sobre o meio de co-cultivo contendo papel filtro + 0,5 mL de meio AAM, onde permaneceram por três dias no escuro a 25ºC.

Os calos foram retirados do meio de co-cultivo e lavados com água destilada estéril por aproximadamente cinco vezes, para retirada do excesso de *Agrobacterium* e posteriormente lavados por mais três vezes com uma solução contendo timentim (150 mg. $L^{-1}$) para eliminação da *Agrobacterium*. Após essa etapa os calos foram transferidos para o meio de seleção N6DH (ANEXO, item 5), onde permaneceram por duas semanas a 32ºC com luz contínua. Além dos nutrientes, ao meio de seleção foram adicionados o antibiótico timentim (150 mg. $L^{-1}$), para a completa eliminação da *Agrobacterium*, além de Higromicina (50 mg. $L^{-1}$) para eliminar os calos não transformados.

Após duas semanas os calos mais vigorosos foram transferidos para meio de regeneração N6RH50 (com o dobro da concentração de kinetin) (ANEXO, item 6) por 21 dias, onde foi possível regenerar parte aérea. As plântulas com cerca de 2 cm. foram transferidas para meio de indução de raízes N6FH50 (ANEXO, item 7) onde permaneceram por duas semanas, sendo transferidas em seguida para potes contendo terra do horizonte A de um Chernossolo. As plantas transformadas foram cultivadas em casa de vegetação até o final do ciclo para obtenção de sementes. Essas primeiras linhagens obtidas são denominadas de geração T1, as sementes dessa geração deram origem a geração T2. Apenas sementes de plantas homozigotas para a mutação e para a construção foram utilizadas nos experimentos, eliminando dessa forma efeitos de inserções em regiões regulatórias de outros genes ou até

mesmo em regiões com éxons, bem como efeitos da heterozigose. No final do processo de transformação foram obtidas 10 linhagens (geração T1), porém 4 linhagens morreram devido a variações de temperatura na BOD, restando assim apenas 6 linhagens.

### 3.10 Extração de DNA

O DNA das 6 linhagens obtidas foi extraído com tampão 2x CTAB (2 g CTAB, 8,12 g de NaCl, 4 mL EDTA 0,5 M pH 8, 10 mL Tris-Cl 1 M pH 8 e 1 g de Polyvinylpyrrolidone (PVP), acrescido de 2-mercaptoetanol na proporção de 2 uL para 1000 uL de tampão. Amostras de folhas foram maceradas em N-líquido, transferidas para tubos de 2 mL contendo 700 uL de tampão CTAB e homogeinizadas em banho maria por 50 min a 62,5 °C. Em seguida os tubos foram retirados do banho maria e resfriados em capela de exaustão, onde foi adicionado 600 uL de Clorofórmio-alcool isoamílico 24:1) para realização da primeira extração com solvente orgânico. Os tubos foram centrifugados em microcentrífuga, a velocidade de 18.000xg por 5 min. 500 uL da parte superior aquosa (sobrenadante) foram transferidos para um novo tubo. A essa fase aquosa foram adicionados 100 uL de uma solução 5% CTAB, 0,7 M NaCl, sendo homogeinzadas em vórtex por 5 min, centrifugadas por 5 min a 18000xg e a nova fase aquosa transferida para novo tubo de 1,5 mL. A essa nova fase aquosa foi acrescido 400 uL de isopropanol frio, para precipitação dos ácidos nucleicos. Em seguida os tubos foram centrifugados por 5 min por 12000xg, formando um pellet no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi lavado em 1 mL de etanol 70% por 5min e posteriormente em 1 mL de etanol absoluto por 3 min, sendo o excesso de etanol descartado e o pellet seco em centrífuga a vácuo por 10 min. O pellet foi ressuspendido em tampão TE contendo 10ug/mL de RNAse, incubado por 60 min, para digestão do RNA. Em seguida o DNA total foi quantificado com o uso do fluoróforo específico para DNA no fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen). Após a quantificação, as amostras foram corridas com gel red em gel de agarose 1%.

### 3.11 Sequenciamento do DNA

Para confirmação da mutação, uma região específica do DNA foi amplificada, sendo utilizada para reação de PCR a enzima phusion, uma enzima de alta fidelidade, para evitar erros durante a amplificação do fragmento, o que prejudicaria o resultado do sequenciamento. Os primers utilizados na reação foram desenhados na plataforma NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (Tabela 2). Para a reação de PCR foram adicionados em um tubo de 200 uL: 4 ul de 5X Phusion HF buffer, 0,4 uL de dNTPs 10mM, 1 uL de primer forward 100 mM, 1 uL de primer reverse 100 mM, 100 ng de DNA, 0,2 uL de Phusion DNA Polimerase (thermo scientific Phusion High-fidelity DNA Polymerase). A reação foi realizada em termociclador, de acordo com os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 98 °C por 30 s, 1 ciclo de desnaturação de anelamento a 98 °C 10 s, 30 ciclos para extensão do fragmento a 72 °C por 30s e 1 ciclo de extensão final a 72 ºC por 10 min, seguido des resfriamento a 4°C.

**Tabela 2**. Primers utilizados para amplificação do fragmento de DNA

| Gene | Primers | Sequências |
|---|---|---|
| *OsAAP1* | Forward | 5'-GCGCACTCAGTCTGTACTACC-3' |
| | Reverse | 5'-TCA-CCG-CCG-TTA-TTA-TGT-GC-3' |

A qualidade do produto da reação foi verificada em gel de agarose a 1 % (Figura 4). Em seguida os produtos das PCRs foram purificados com uso do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. A qualidade da purificação foi verificada em fluróforo de acordo com o item 3.9. Para sequenciamento do DNA foram utilizados 60 ng do DNA purificado mais 4,5 pmol do primer forward (Tabela 2). As amostras foram secas em centrífuga a vácuo e em seguida foram sequenciadas pelo método Sanger, equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

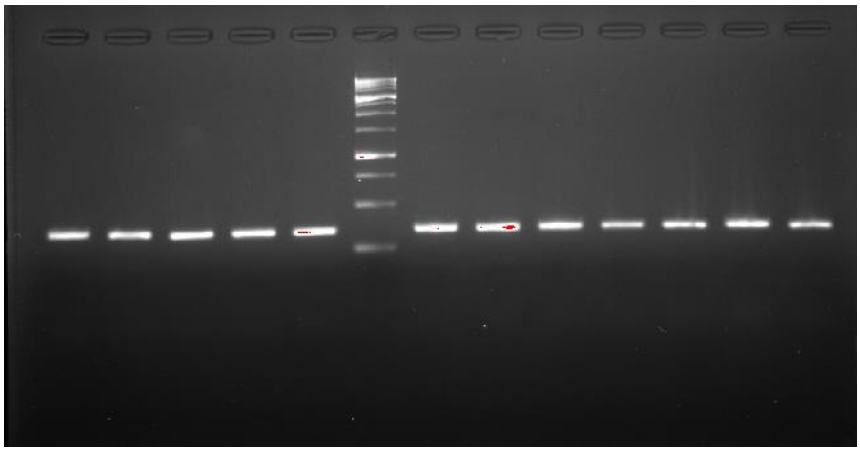


**Figura 4**. Fragmentos do gene *OsAAP1* amplificados de DNA contendo aproximadamente 342 pb. No centro está localizado o marcador de DNA de 1kb (Avati).

### 3.12 Seleção das Linhagens

Para a seleção das linhagens utilizadas para condução dos experimentos, DNA de linhagens da geração T1 foi extraído e sequenciado. Das seis linhagens sequenciadas, somente 2 estavam editadas (Linhagem 3 e linhagem 5), as quais apresentaram heterozigose para o gene *OsAAP1*. De acordo com o resultado do sequenciamento, as linhagens mutantes heterozigotas foram selecionadas e sementes dessas linhagens (geração T1) foram cultivadas novamente, no intuito de obter linhagens homozigotas tanto para a mutação, quanto para a construção. Somente após estes processos foi possível obter sementes de linhagens homozigotas para a construção e para a edição. Estas sementes (geração T2), foram utilizadas durante os dois experimentos realizados. Os resultados do sequenciamento encontram-se no item 4.2.

### 3.13 Condições experimentais – Experimento 1

O nocaute do gene *OsAAP1* pode implicar em alterações nas mais variadas rotas metabólicas, principalmente as que envolvem a síntese de aminoácidos, bem como as rotas do ciclo do carbono e no transporte de N-inorgânico. Sendo assim, reações do ciclo do N e do carbono foram pontos de estudo, além dos efeitos no crescimento e produção de plantas mutantes.

No experimento 1 buscou-se determinar a influência do transportador OsAAP1 no desenvolvimento inicial de plantas de arroz, na absorção e assimilação de N-inorgânico, e no metabolismo de carbono.

Foi implantado um experimento em câmara de crescimento no Departamento de Solos da UFRRJ As plantas foram submetidas a um fotoperíodo de 14h/10h (luz/escuro) com aproximadamente 400 µmol $m^{-2}$ $s^{-1}$ de fótons fotossinteticamente ativo, umidade relativa do ar

de 70% e temperatura de 28ºC/26ºC (dia/noite). As sementes das linhagens transformadas (L3 e L5) e tipo selvagem (WT) foram descascadas, desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (2%) durantes 60 minutos e depois lavadas cinco vezes em água deionizada. Foram colocadas para germinar sob gaze em vasos de 3 L contendo água destilada e deionizada. Quatro dias após a germinação a água foi substituída pela solução nutritiva de HOAGLAND & ARNON (1950) modificada a 1/8 de força iônica (FI) com 0,2 mM de N-$NO_3^-$. Dois dias depois uma solução de ¼ FI e 0,2 mM de $NO_3^-$ foi adicionada. Após quatro dias as plantas foram acondicionadas em vasos de 700 mL, contendo solução nutritiva a ½ Fi, permanecendo com 1 mM de nitrato por 18 dias, sendo a solução resposta a cada três dias. Após esse período as plantas foram dispostas em delineamento inteiramentente casualizado com os seguintes tratamentos: Três genótipos (duas linhagens e uma planta selvagem), dois níveis de N: 0,2 mM e 2 mM constante de N-$NO_3^-$ por 12 dias, com quatro repetições. Alta e baixa dose de nitrato foram utilizadas para verificar se as plantas mutantes apresentariam diferentes padrões de comportamento frente a essas doses, uma vez que em arabidopsis o sistema de transporte do AAP1 é classificado como um sistema de baixa a moderada afinidade.

No dia da coleta as plantas foram pesadas para determinação da massa fresca. Após serem pesadas, 0,25 g de raiz, bainha e folha foi separado e armazenada em etanol 80% para determinação das frações solúveis. Amostras de folha e raiz foram separadas, congeladas em N líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80ºC), para posterior extração de RNA e proteína, seguida da determinação da expressão gênica e atividade da glutamina sintetase, respectivamente.

### 3.13.1 Extração de rna total

O RNA total foi extraído utilizando tampão NTES (Tris-HCl (0,2 M) pH 8,0; EDTA (25 mM) pH 8,0; NaCl (0,3 M) e SDS (2%)). Amostras de raízes foram maceradas em N-líquido e homogeneizadas por 10 minutos em vórtex numa mistura contendo 800 µL de tampão NTES e 600 µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. O homogenato foi centrifugado a 18.000 x g. por 20 minutos a 4ºC e o sobrenadante transferido para um novo tubo e novamente centrifugado por 20 minutos com 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Após o procedimento, o RNA total foi precipitado pela adição de 1/10 volume de acetato de sódio 3M ($NaOAc_{DEPC}$) pH 4,8 (70 µL) e 1 volume de isopropanol puro (700 µL). A seguir a mistura foi mantida a -80ºC por 1 hora seguida de centrifugação a 18.000 x g. por 20 min. a 4ºC. Descartado o sobrenadante o precipitado foi lavado em $etanol_{DEPC}$ (70%) e centrifugado a 18.000 x g. por 10 minutos. O precipitado foi solubilizado em 600 µL $H_2O_{DEPC}$ e novamente precipitado com 600 µL de cloreto de lítio 4M ($LiCl_{DEPC}$) pH 4,8 durante 16 horas a 4ºC. Decorrido esse período a solução foi centrifugada a 18.000 x g. por 20 minutos a 4ºC e o precipitado foi novamente solubilizado em 450 µL $H_2O_{DEPC}$. Após a completa dissolução foi adicionado acetato de sódio 3M ($NaOAc_{DEPC}$) pH 4,8 (50 µL) e etanol absoluto (1000 µL). A mistura foi mantida por 45 minutos a -80ºC e centrifugada a 18.000 x g. por 20 min a 4ºC. O precipitado foi lavado com etanol (70%) e após a secagem do solubilizado com $H_2O_{DEPC}$ (50 µL), para armazenamento a -80ºC. O RNA total foi quantificado com uso de fluoróforo específico para RNA no fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen). Após a quantificação, 3 uL de amostras de cada extração foram corridas em gel de agarose (1%) e coradas com gel red, para detecção de possíveis sinais de degradação do RNA.

### 3.13.2 Tratamento com dnase I, síntese do cDNA e pcr em tempo real.

Amostras de 0,5 µg de RNA total foram tratadas com DNase ("*DNase I Amplification Grade – Invitrogen™")* seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente foi preparada uma solução estoque de 30 µL com concentração de 0,125 µg. $\mu L^{-1}$, para aumentar a alíquota a ser pipetada. Quatro microlitros de solução representado 0,5 µg de RNA foram misturados com 0,5 µL do tampão de reação da DNase I (10X), 0,5 µL da DNase I. A incubação da reação foi conduzida a 25$^{o}$C por 15 min., seguida da adição de 0,5 µL de EDTA (25 mM) e posterior inativação da DNase I a 70$^{o}$C por 10 minutos. A reação de síntese do cDNA foi realizada com o kit "*High Capacity RNA-to-cDNA*" (*Life Technologies*) seguindo as instruções do fabricante.

O gene do fator de alongamento 1-α de arroz (*eEF1-α*) foi utilizado como controle endógeno para normalização da expressão gênica (JAIN, 2009). As reações foram feitas no aparelho "*StepOne Plus Real-Time PCR System*" *("Applied Biosystems")* utilizando o "*kit Power SYBR® Green PCR Master Mix*" *("Applied Biosystems")* seguindo as recomendações do fabricante. Todas as reações foram feitas em duplicata. A reação foi montada em placas de PCR da seguinte maneira: 6 µL do tampão "*Power SYBR Green PCR Master Mix"* (2X), 3 µL de uma solução de *"primers"* (3,6 µM) cada e 3 µL do cDNA diluído, com volume final de 12 µL. A placa foi selada com filme ótico apropriado, agitada por três minutos em vórtex próprio e centrifugada a 3.000g por 3 min a 25$^{o}$C. Cada reação foi realizada da seguinte maneira: dez minutos a 95ºC, quarenta ciclos de amplificação com 95ºC por 15 segundos e 60ºC por um minuto. Uma curva de dissociação ("*melting"*) foi adicionada à programação para identificar possíveis amplificações inespecíficas.

### 3.13.3 Desenho dos iniciadores ("primers") para os estudos de expressão gênica

Os primers utilizados foram desenhados por estudantes do grupo de pesquisa do LNMP por ocasião de trabalhos anteriores. Para confecção desses primers foi utilizada a plataforma do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), os quais foram testados quanto a especificidade através do alinhamento de sequências neste mesmo site (Tabela 3). Experimentalmente foram testados quanto a especificidade, ao fim da reação de PCR, durante a "*curva de melting*". Todos os "*primers"* apresentaram especificidade.

**Tabela 3.** Iniciadores (primers) utilizados nos experimentos de perfil de expressão das enzimas do ciclo N e C, e transportadores de aminoácidos

| Gene | Forward Primer | Reverse Primer |
|---|---|---|
| OsNRT 2.1 | GCGACCGAGACCAGCAATAC | TTCATCACCGTTTGCAACAAG |
| OsNRT 2.4 | ACGAAGCTGGTGGAAGAAGAAG | ACGACGCCATCGCCATA |
| OsNRT 1.1 | CGAGGTTGGTGCATTTTGG | GCCGTGGTGTCTTTTTT |
| OsNPF 7.2 | AAGACACTGACCTCTTCGGC | CGCCGCGTTTCTTATCCTTG |
| OsNPF 7.3 | ACGCGACTGTTACTGACCAC | CAGTCGGCAATGCACAGAAG |
| OsNIA 1 | CTACATCGACGTCAAGGGGC | TGGATGACCTGGTACATGGG |
| OsGS 1.1 | CCGGAGTCGTCGTCTCATTT | GAGCTTCTCAATGGCGGACT |
| OsGS1.3 | CGGTGCTCACACCAACTACA | TGCCAAGCTTCTTGATCGCT |
| OsGS 2 | AGGCGAAGGGAAAAGGCTAC | GAGGGTTGGCTCCCAAAGAA |
| OsFd-GOGAT | ATGCAGCTGAAGGGCTTGAT | GGCACAAGCTTCAGGAGAGT |
| OsNADP-GOGAT | TGCAGACGTGGACAATCACT | CCGAGGGGGTTATGTCCTCT |
| OsGDH1 | CATTGAGGCTGCAAACCACC | CGTCCCACATGAAACCCTGA |
| OsASN1 | CAACTGGATCGATGGCCTGA | GTTGTGCGGGTACACTTTGG |
| OsAST1 | AGTGGCTTTCATGAGGCAGG | AAGATGCGCAATGGTCCTCC |
| OsPPDK1 | ATCAGAGGGGAGTTGGGGAG | CGCAAAGAAAGCGACTGACA |
| OsCYT-MDH | TTGACCACAACAGGGCACTT | ATGAGTGGTTGCCCCAGATG |
| OsNADP-MDH | TAACGAGCGACCCGTCATTT | GACTGGCCTGGCACATGTAT |
| OsPK1 | TCCGATGCTTGCTGATCCTC | TTTCTGGCAGACAACAACGC |
| OsICDH1 | TTTGCTTGGACTCGTGGACT | CCTTGTTACCTTGGGGCCAT |
| OsPPC1 | TGTCCACAAGAATGCTTCCA | CTGCAAAAGCCAAATAAGTC |
| OsAAP1 | TTGGTGACATTGCCTTTGCA | CGCCTTCTTCATCACCTCGTT |
| OsAAP2 | CGGAGGCGTGGGAGAAC | TTGAGATTCCTCACAAGCTTCGT |
| OsAAP3 | TGGGCACTATGTTTCCTGAGAA | GGCCCAAGGGCTGAAGAG |
| OsAAP4 | GCTTGCGCGAACAATATCAG | CCAACCTCAACGCCAGTCA |
| OsAAP5 | GCGTCGCCGAGGTCTTC | TGGAGAGCCAGGAGATCTGATC |
| OsAAP6 | CAATGCTGGTTGGGTTCGT | CACCGTCTCTTCTCCACGACA |
| OsAAP8 | CAAACAGGATGGGTCGGCTAT | CCGTTCGCCCCATAAGG |
| OsAAP18 | AGACCAGGTCCTGATTCGACCT | AAGCTGCACCTCAGAGAGTCCA |
| OsCAT1 | TCGACGTGCTGCTCAACC | CGTTGGCGACCATGTAGAAGA |
| Act | CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA | CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA |
| *eEF1-α* | TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT | GACTTCCTTCACGATTTCATCGTAA |

### 3.13.4 Análise de metabólitos solúveis

Amostras de raízes, bainhas e folhas foram homogeneizadas em etanol (80%), e após partição com clorofórmio (FERNANDES, 1984) a fração solúvel em água foi utilizada para determinação dos teores de açúcares solúveis de acordo com YEMM & WILLIS (1954), e das frações nitrogenadas, N-$NO_3^-$ (MIRANDA et al., 2001), N-$NH_4^+$ (FELKER, 1977) e N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955).

### 3.13.5 Extração de proteína

As amostras de raízes e folhas foram maceradas em N-líquido e homogeneizadas em tampão de extração na proporção 3:1 (tampão: amostra). O tampão de extração foi composto por Tris-HCl (50 mM) pH 8,0; EDTA (1,0 mM), polivinilpolipirrolidona (PVPP) (1,5%), dithiothreitol (DTT) (10 mM), glicerol (30%) e phenilmethilsulfonil fluoridio (PMSF) (1 mM). O homogenato foi centrifugado a 14.000 x g. durante 30 min. e o sobrenadante (extrato proteico) armazenado no freezer - 80$^o$C para posterior uso. O conteúdo de proteína foi determinado como descrito por BRADFORD (1976), usando albumina de soro bovino como padrão.

### 3.13.6 Atividade da glutamina sintetase

A atividade da Glutamina Sintetase (GS) foi realizada como descrito por FARDEN e ROBERTSEN (1980). A atividade foi determinada em 500 µL de uma solução contendo Imidazol-HCl (50 mM) pH 7,5; hidroxilamina neutralizada com Tris (5 mM), $MgCl_2$ (20 mM), L-glutamato (25 mM), β-mercaptoetanol (5 mM) e ATP (5 mM). O controle da reação foi realizado sem a adição de ATP no meio de reação. A reação foi iniciada pela adição de 50 µg de proteína já inclusa nos 500 µL da reação e conduzida a 30°C durante 30 min. A reação foi paralizada pela adição de 350 µL de uma solução composta por ácido tricloroacético (4%) p/v e cloreto férrico anidro (3,2%) p/v preparada em 0,5 N de HCl. O produto da reação foi colorimetricamente determinado em λ=540 nm.

## 3.14 Condições Experimentais – Experimento 2

O experimento 2 foi realizado no intuito de verificar a expressão gênica de transportadores de aminoácidos, caracterização fenotípica e eficiência no uso de nitrogênio.

Para isso, sementes das linhagens 3 e 5, bem como da planta tipo selvagem (wild type), foram desinfestadas em hipoclorito de sódio (2,5%) por 60 minutos, germinadas em água destilada/deionizada por 5 dias e as plântulas com 10 dias após a germinação foram transferidas para vasos de 14,4 L, em casa de vegetação, preenchidos com 14 kg de PLANOSSOLO obtido na UFRRJ. Antes da implantação do experimento o solo foi analisado (Tabela 4), e os nutrientes que estavam em baixa concentração foram repostos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2+1 x 1 x 3 (linhagens + WT x dose de N-$NO_3^-$ x coletas) com 4 repetições, totalizando 36 vasos. Foi aplicado o equivalente 60 kg/ha de N ($KNO_3^-$). A adubação nitrogenada foi realizada aos 30 dias após a germinação das sementes.

Na coletada realizada no início da antese e aos 10 dias após a antese (DAA) as plantas foram pesadas para determinação da massa fresca e 0,25 g de folhas bandeira, folhas 2, outras folhas, colmos e panículas (grãos+ráquis), em etanol 80% para determinação das frações solúveis ($NO_3$-, $NH_4^+$, açúcares solúveis. Uma porção de material vegetal referente as partes descritas acima foi separada, congelada em N líquido e armazenada em ultrafreezer (-80 ºC), para posterior extração de RNA e determinação da expressão gênica. Após a retirada do material necessário para realização das análises descritas acima, o material foi seco em estufa de circulação forçada de ar à 65°C para determinação da massa seca. Esse material vegetal seco foi triturado, homogeinizado e 0,2 gramas foram separados para determinação do N-total.

No final do ciclo, as plantas foram seccionadas e pesadas, de acordo como foi dito anteriormente. Foram determinados os parâmetros fenotípicos (número de perfilhos, altura média dos perfilhos, número de panículas) e de produção (número e peso de grãos cheios, chochos e total, teor e conteúdo de proteína), assim como a eficiência de uso de N (EUN), de absorção (EAN), utilização (EUtN) e remobilização de N (ERN).

**Tabela 4.** Análise de rotina de fertilidade do solo

| Na | Ca | Mg | K | H+Al | Al | S | T | V | m | n | pH | Corg | P | K | $NO_3^-$ | $NH_4^+$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $cmol_c/dm^3$ | | | | | | % | | 1:2,5 | % | mg/L | | mg/kg | |
| 0,075 | 1,5 | 0,9 | 0,11 | 3,0 | 0 | 2,58 | 5,58 | 46 | 0 | 1 | 5,4 | 0,55 | 62 | 42 | 0,039 | 0,022 |
| 0,089 | 1,5 | 0,9 | 0,11 | 4,0 | 0 | 2,61 | 6,61 | 40 | 0 | 1 | 5,5 | 0,29 | 57 | 48 | 0,062 | 0,021 |

### 3.14.1 Caracterização fenotípica

Para a caracterização fenotípica das plantas mutantes e tipo silvestre em final de ciclo (plantas que não foram transformadas) foram analisados os seguintes parâmetros agronômicos: produção de massa seca, comprimento médio dos perfilhos, número de panículas, número e peso de grãos cheios, chochos e total.

### 3.14.2 Metabólitos solúveis

Os metabólitos solúveis ($N\text{-}NO_3^-$, $N\text{-}NH_4^+$, N-amino e açúcares solúveis) foram determinados de acordo com os procedimentos descritos no item 3.13.4.

### 3.14.3 Expressão gênica

Os procedimentos para determinação da expressão gênica encontram-se descritos nos itens 3.13.1, 3.13.2 e 3.13.3.

### 3.14.4 Fracionamento de proteína

A extração sequencial foi feita segundo DOLL e ANDERSON (1981) e TURLEY e CHING (1986a), com modificações de SOUZA, 1990. Amostras de 100 grãos descascados foram secas em estufa de circulação forçada de ar, e trituradas em moinho (Retsch, MM400). A farinha foi então passada em peneira de 60 mesh. A farinha obtida foi considerada farinha integral. Amostras de 30 mg de farinha foram colocadas em tubos de microcentrifuga.

Um mL de solução salina (2,9% NaCL+0,002% Na-EDTA) foi adicionado às amostras. Durante um período de 30 minutos, os tubos foram agitados a cada 10 minutos em agitador horizontal (Kasvi – k40-10208) à temperatura ambiente. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas à 12000 g/10 minutos a 10º C, em centrifuga de refrigeração automática (eppendorf, 5430R).

O sobrenadante foi separado e repetiu-se a operação mais uma vez, acrescentando-se mais 1 mL de solução salina ao resíduo. Os sobrenadantes foram misturados e armazenados para análises de albumina+globulina.

Ao resíduo da extração salina, acrescentou-se 1 mL de solução alcoólica (50% isopropanol, 41 mM ácido bórico, 0,6% mecaptoetanol). Durante um período de 45 minutos, os tubos foram agitados, a cada 10 minutos, no agitador horizontal, a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12000 g/10 minutos a 10ºC. O sobrenadante foi separado e a operação repetida mais uma vez. Os sobrenadantes foram homogeinizados e armazenados para análise de prolamina.

Ao resíduo da extração alcoólica, adicionou-se 1 mL de solução alcalina (0,48% ácido bórico+0,4% de NaOH). Durante um período de 30 minutos os tubos foram agitados a cada 10 minutos, à temperatura ambiente, como citado acima. As amostras foram então centrifugadas a 12000 g/10 minutos a 10ºC. O sobrenadante foi separado, e no resíduo repetiu-se a operação, com novos acréscimos de solução alcalina, por mais 3 vezes, com tempos de permanência à temperatura de 60 minutos. Os quatro sobrenadantes assim obtidos foram misturados e armazenados para determinação da glutelina. O resíduo final foi descartado.

Em cada sobrenadante armazenado (albumina+globulina, prolamina, glutelina) determinou-se o teor de proteína pelo método de BRADFORD (1976). Em alíquotas de 0,02

mL de extrato proteico acrescentou-se 1 mL de solução de Azul Brilhante de Coomassie G-250 (100 mg de Azul Brilhante de Coomassie G-250 + 50 mL de Etanol 50% + 100 mL de Ácido fosfórico 85%/Litro). O Azul Brilhante de Coomassie G-250 forma com proteínas um complexo azul. Após 10 minutos de incubação mediu-se a densidade ótica à 595 nm, contra padrão de albumina de soro bovino (10-100 ug/0,1 mL).

### 3.14.5 Determinação da eficiência de uso de n

A EUN foi determinada de acordo com Moll, et al. (1982).

$$\underset{\text{(EAN)}}{\frac{\text{N total da parte aérea}}{\text{N aplicado}}} \times \underset{\text{(EUtN)}}{\frac{\text{Peso de sementes}}{\text{N total na parte aérea}}} = \underset{\text{(EUN)}}{\frac{\text{Peso de sementes}}{\text{N aplicado}}}$$

A EUN foi calculada em função da eficiência de absorção de N (EUN) e da eficiência de utilização de N (EUtN). Para isso a parte aérea e os grãos foram secos em estufa de circulação forçada a 65 °C por 3 dias, em seguida foi determinada a massa seca e 0,2 g de cada amostra foi separada para determinação do N total (Tedesco,1983).

# 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1 Transformação de Plantas

Após o processo de transformação descrito nos itens 3.8 e 3.9 foi possível a obtenção de plantas transformadas, consideradas geração T1 (Figura 5 e 6). Cada planta foi regenerada a partir de um calo isolado. Na geração T1 foram obtidas 10 linhagens.

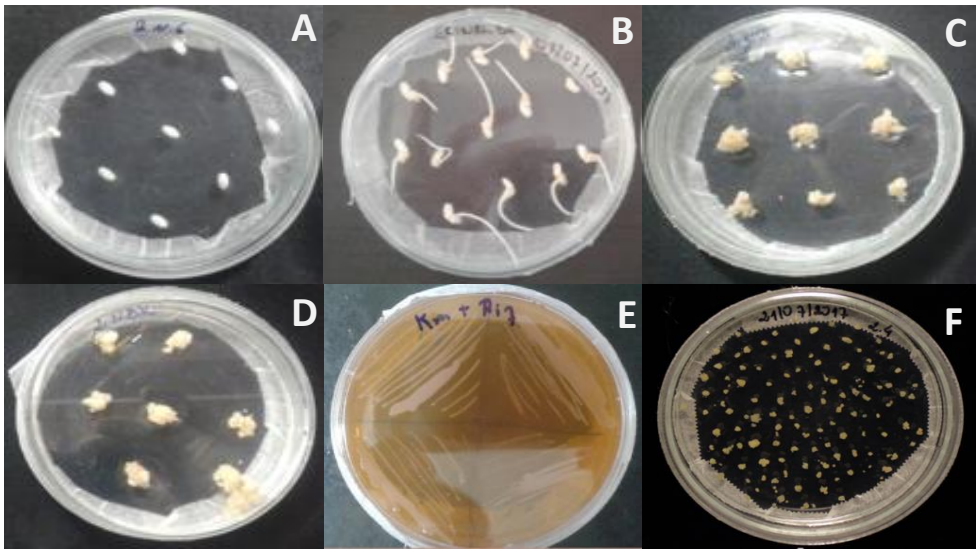



**Figura 5.** (a) Sementes de arroz da variedade Piauí em meio nutritivo (N6D) contendo auxina (2,4D a 2mg $L^{-1}$) como regulador para indução de calos embriogênicos. (b e c) Calos em estádio de desenvolvimento após 7 e 14 dias em meio nutritivo, respectivamente, sendo os mais friáveis utilizados para dar prosseguimento ao processo de transformação. (d) Calos transferidos para meio nutritivo (N6D) por mais três dias para aumentar o rendimento. (e) *Agrobacterium tumefaciens* transformadas crescendo em meio YEB sólido com rifamicina (100 ug/mL) e kanamicina (50 ug/mL). (f) calos em meio de regeneração de parte aérea, após o período de três dias de infecção com agrobacterium.

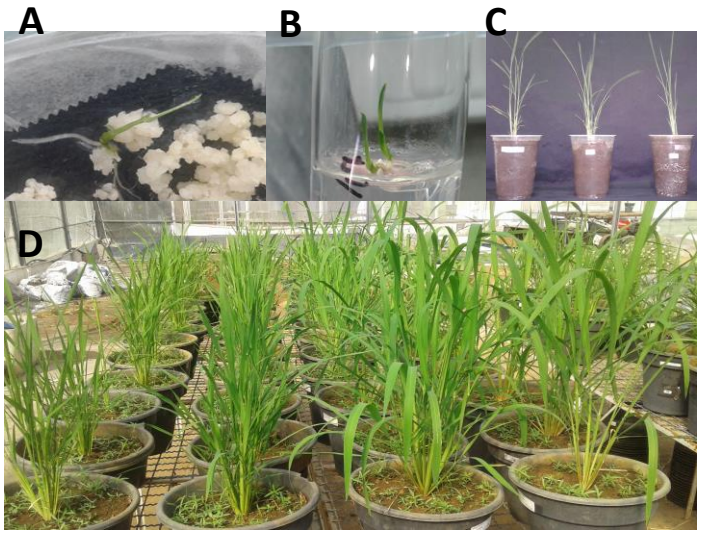



**Figura 6.** (a) Plântula após 2 semanas em meio de regeneração de parte aérea. (b) Linhagem transferida para o meio de formação de raízes após duas semanas. (c) linhagens em

vaso de 700 mL na câmara de crescimento (fitotron) por duas semanas. (d) Linhagens (T1) na casa de vegetação do Departamento de Solos para produção de sementes.

O DNA da parte aérea das seis linhagens mais uma planta selvagem foi extraído (item 3.9), amplificado e enviado à empresa Ludwig Biotecnologia para sequenciamento pelo método Sanger (item 3.10). O resultado do sequenciamento foi visualizado no programa DNA Baser (Figura 7). Das seis linhagens enviadas, duas estavam editadas (#3 e #5). Ambas linhagens editadas tiveram a inserção de uma adenina (A), indicada pelas setas amarelas na Figura 7 A (sem inserção), B e C (ambas com inserção de uma adenina, representada pelo pico verde no eletroferograma). As linhagens transformadas apresentaram-se heterozigotas para edição, uma vez que é possível perceber pelo eletroferograma que a região editada apresenta duplo pico, um pico do alelo editado (verde) e um pico do alelo não editado (vermelho) (WT).

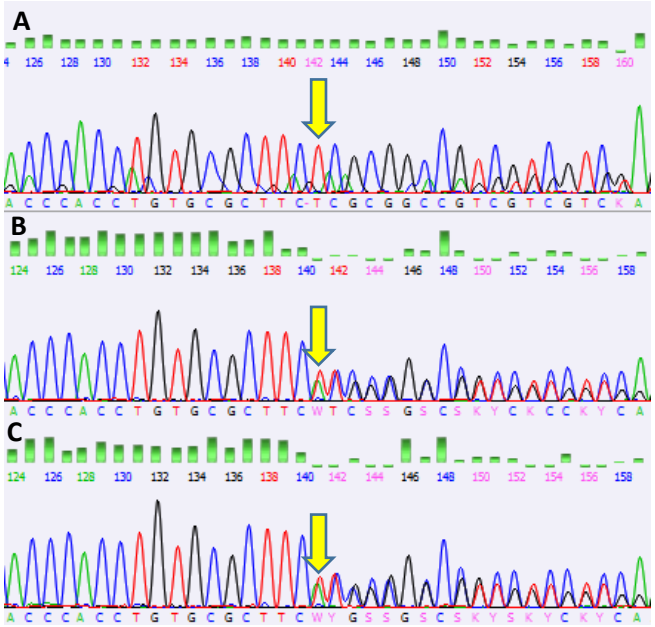



**Figura 7**. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do tipo Sanger da planta wild type (A), linhagem 3 (B) e linhagem 5 (C). Setas amarelas indicam o local editado pelo sistema CRISPR-Cas9.

Uma vez que para a execução dos experimentos eram necessárias pelo menos duas linhagens homozigotas para a edição gênica (nocaute), sementes das linhagens 3 e 5 (T2) foram germinadas em água destilada, e o DNA de oito plantas de cada linhagem, mais o DNA de duas plantas wild type, foi extraído e sequenciado. Os resultados foram visualizados no programa DNA Baser (Figura 8). Com o sequenciamento das linhagens da geração T2, foi possível identificar linhagens não editadas (Figura 8A), linhagens editadas heterozigotas (Figura 8B) e linhagens editadas homozigotas (8C) para a mutação. As linhagens homozigotas foram cultivadas até o final do ciclo, as não editadas e heterozigotas foram eliminadas.

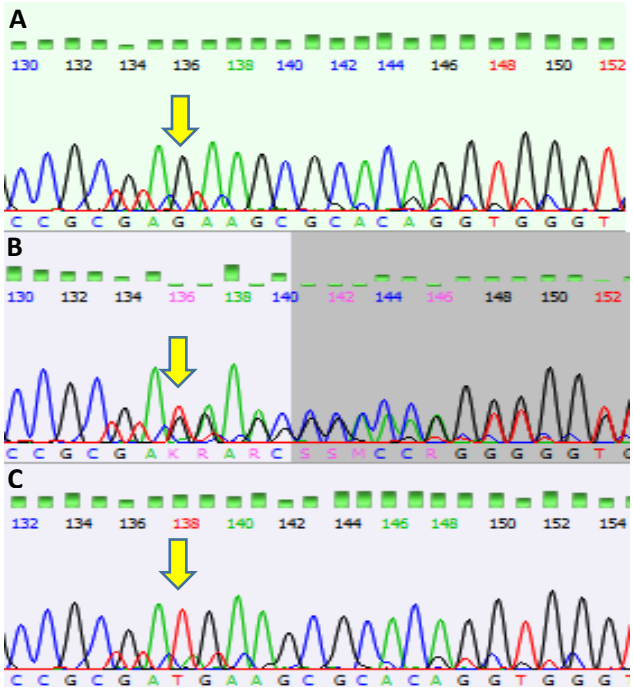



**Figura 8**. Eletroferograma gerado pelo sequenciamento do tipo Sanger da planta wild type (A), linhagem 3 (B) e linhagem 5 (C). Setas amarelas indicam o local editado pelo sistema CRISPR-Cas9.

Uma das grandes vantagens do sistema de edição CRISPR-Cas9 é a possibilidade de obtenção de linhagens puras, que são plantas transformadas geneticamente que não apresentam resíduos da construção gênica inserida por ocasião da transformação. Uma vez que a inserção da construção gênica é aleatória nos cromossomos, pode ser que o local inserido seja exatamente uma região que contenha somente éxons, ou pode ser uma região regulatória importante para o desenvolvimento das plantas. Caso isso ocorra, alguns resultados observados nas análises das linhagens, podem ser devido ao local de inserção e não a alteração ocasionada pelo gene em estudo. Como o sistema CRISPR realiza a edição no DNA genômico, alelos editados e sem os resíduos da construção gênica podem se combinar após algumas gerações, gerando as linhagens puras. Essa combinação de alelos deve-se ao processo de meiose, a qual propicia o surgimento de variadas combinações entre alelos, durante as divisões celulares.

Para seleção de linhagens puras, DNA das linhagens homozigotas (T2) foi extraído e foi realizada uma PCR para amplificar o gene de resistência à higromicina. É válido dizer que o vetor PRGEB31, utilizado para edição no sistema CRISPR-Cas9, possui uma região codificante para o gene da higromicina. Essa região faz parte do cassete de expressão, e durante o processo de transformação é transferido para as células dos calos, conferindo a planta transformada resistência ao antibiótico higromicina, adicionado ao meio de regeneração da parte aérea. Sendo assim, foi extraído o DNA de plantas identificadas como homozigotas para edição gênica na geração T2, em seguida foi realizada uma PCR para amplificar uma região específica do gene hpt (gene que confere resistência a higromicina) de 500 pares de bases. Os produtos dessa reação não resultaram em uma banda específica de 500pb em gel de agarose, confirmando dessa forma que as linhagens obtidas eram homozigotas para a edição e para a construção (Figura 9).

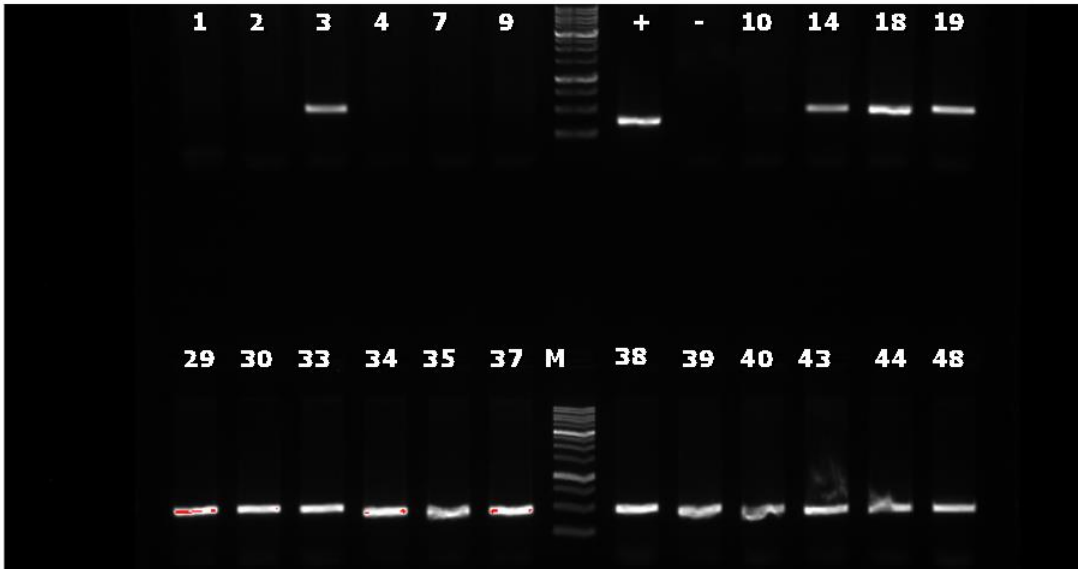



**Figura 9**. Resultado da PCR para o gene da higromicina, visualizado em gel de agarose a 1%. Representado com o símbolo "+" o controle positivo (vetor PRGEB31 puro) e com o símbolo "-" o controle negativo (água miliq) e com os números 1 e 2 (DNA de plantas WT) os controles negativos. No centro, representado com a letra "M", encontra-se o marcador de DNA de 1 kb (AVATI). Os números representam as diferentes linhagens.

Como pode ser visualizado na Figura 9, as amostras 3, "+", 14, 18, 19, 29, 30, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 43, 44 e 48 resultaram em bandas específicas para o gene da higromicina (aproximadamente 500 pares de bases), mostrando que, pelo menos um dos alelos carregam o cassete de expressão. A amostras 1, 2 e "-" (controles negativos), e 4, 7, 9 e 10 (linhagens homozigotas para o nocaute do gene *OsAAP1*), não retornaram em nenhuma banda, evidenciando portanto que duas plantas da linhagem 3 (4 e 7) e duas plantas da linhagem 5 (9 e 10), eram homozigotas para a edição gênica e para construção. Sementes dessas plantas foram utilizadas para realização dos experimentos 1 e 2 (itens 3.13 e 3.14).

## 4.2 Experimento 1 – Fitotron

### 4.2.1 Massa fresca, relação raiz/parte aérea

Houve diferenças significativas na massa fresca das raízes, bainhas e folhas, tanto em baixo N, 0,2 mM $NO_3^-$ (Figura 10A, 11A-B), quanto em alto N, 2mM-$NO_3^-$ (Figura 10C, 11C-D) entre as linhagens e a planta selvagem (WT). As linhagens apresentaram sempre menor massa em todas as partes das plantas, sendo que as maiores diferenças foram identificadas no tratamento com alto N. As raízes tiveram o desenvolvimento mais afetado, quando comparadas com as bainhas e folhas.

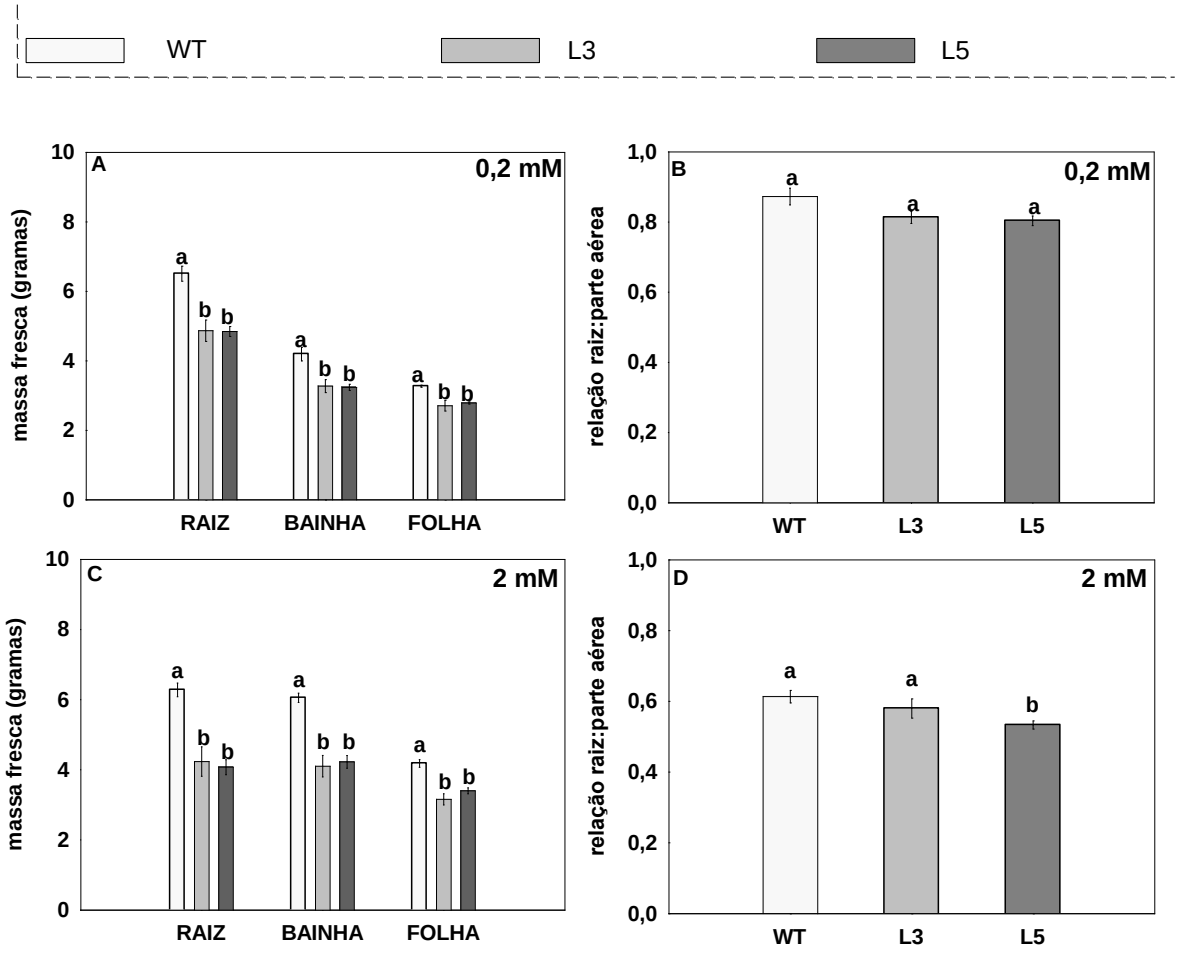



**Figura 10**. Massa fresca (A e C) e relação raiz/parte aérea (B e D) aos 40 dias após germinação (DAG) nas diferentes partes das plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene *OsAAP1*) submetidas a dois tratamentos: 0,2 mM constante N-$NO_3^-$ (A e B) e 2 mM constante de N-$NO_3^-$ (C e D). Letras minúsculas entre colunas diferem entre sí pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Pode-se perceber que as plantas da variedade Piauí, nocauteadas para o gene *OsAAP1*, quando cultivadas em alto N, possuem um desenvolvimento negativamente mais afetado. Em condições de baixo N também são afetadas, porém com menor intensidade, principalmente as raízes, que apresentaram maior massa fresca superior as plantas cultivadas com alto N, o que pode estar relacionado tanto ao nocaute gênico, quanto a uma estratégia de aumentar o sistema radicular em condições de baixo N, visando uma maior área radicular e por consequência uma maior captura de N.

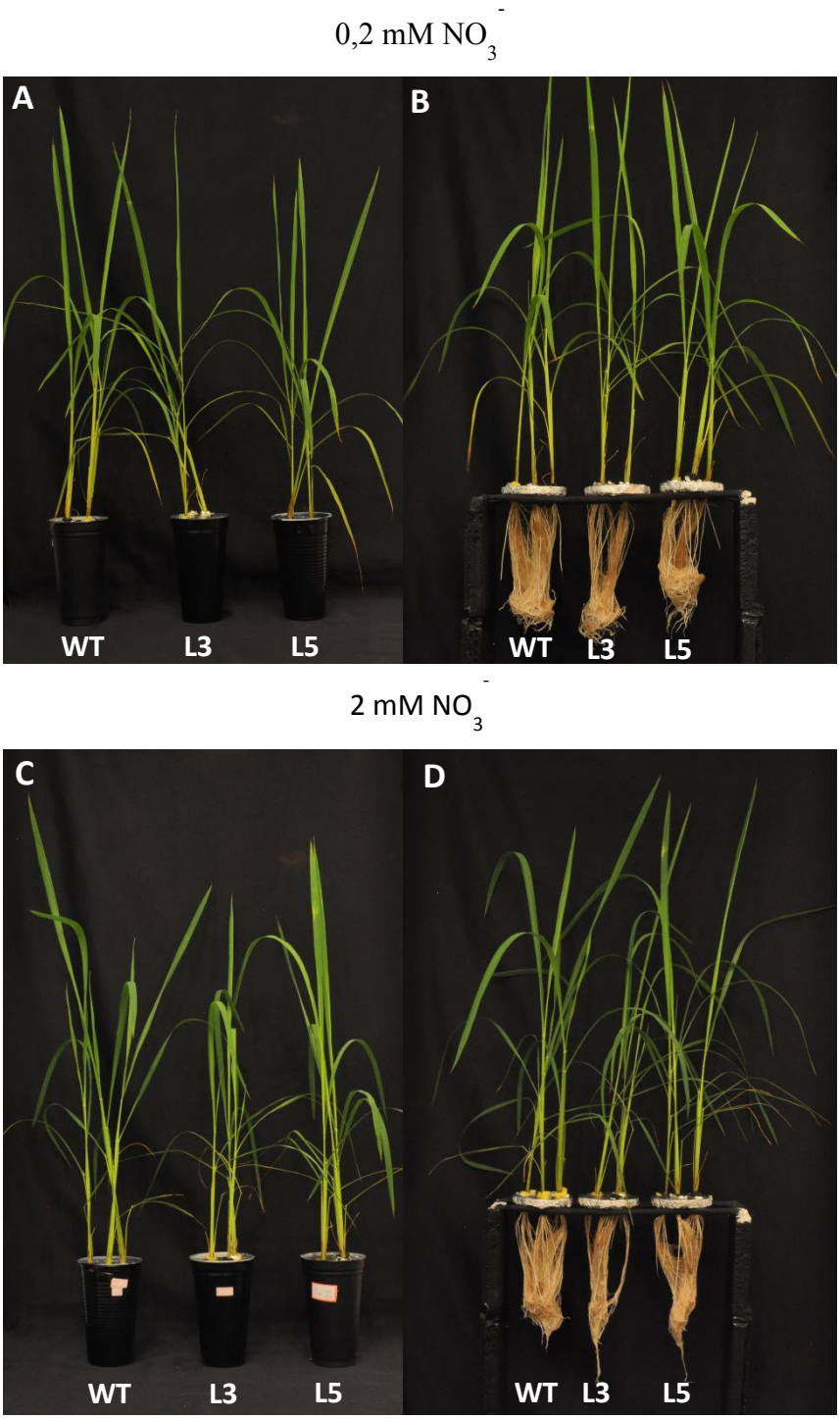



**Figura 11** – Plantas selvagens da variedade Piauí (WT), linhagens mutantes 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene *OsAAP1*) submetidas a dois tratamentos: 0,2 mM constante N-$NO_3^-$ (A e B) e 2 mM constante de N-$NO_3^-$ (C e D)

Estudos anteriores com plantas nocauteadas para o gene *AAP1*, como o realizado por LEE et al. (2012), que cultivaram plantas de arabidopsis em condições padrão (N inorgânico), nocauteadas para o gene *AAP1*, não verificaram alterações visíveis no crescimento e no tamanho das mutantes quando comparadas com plantas selvagens.

O presente trabalho passa a ser o primeiro estudo a relatar, em arroz, o controle negativo na produção de biomassa ocasionado pela inativação de um gene que codifica para um transportador de aminoácidos, nesse caso o gene *OsAAP1*.

PERCHLIK et al. (2017), cultivando plantas de ervilhas, que apresentava a superexpressão do gene *AAP1* de arabidopsis, em baixo, médio e moderado N, relataram uma alteração na massa seca total entre as plantas, sendo que as plantas mutantes, independente dos níveis de N, sempre apresentaram maior produção de biomassa.

Resultado similiar foi obtido por ZHANG et al. (2015), que trabalhando com plantas de ervilha superexpressando o gene *AAP1* sob o controle do promotor do *AAP1* de arabidopsis verificaram um aumento considerável de biomassa de parte aérea, até 31% em base fresca e até 23 % em base seca. Esse aumento de biomassa relatado por esses autores, demonstra que esse gene está relacionado diretamente a processos de síntese de biomassa em plantas de diferentes gêneros.

Sendo assim, a diminuição na massa fresca verificada nas linhagens nocauteadas para o gene *OsAAP1* era esperada, uma vez que, como descrito pelos autores citados acima, esse gene tem um papel importante no transporte e alocação aminoácidos, e uma vez alterado esse processo, modificações na produção de metabólitos utilizados na síntese de proteínas, podem resultar em uma menor produção de biomassa.

Uma diminuição na relação raiz/parte aérea foi verificada nas linhagens (Figura 10b e 10d), porém só foi significativa para a linhagem 5 (Figura 10d), no tratamento com alto N. Essa alteração foi ocasionada principalmente pela redução da massa fresca de raízes e sugere que que as alterações metabólicas e fisiológicas, relatadas mais adiante, afetaram mais intensamente a raiz, gerando dessa forma alterações nas demais partes.

Uma vez observadas alterações na massa fresca, buscou-se no decorrer do trabalho, explicações para essas modificações, a partir de análises metabólicas, fisiológicas e gênicas.

### 4.2.2 Depleção de nitrato

Tanto para baixo (Figura 12A) quanto para alto N (Figura 13A) foi observada uma menor depleção de nitrato para as plantas mutantes (L3 e L5), sendo verificada a maior diferença nas plantas cultivadas com alto N. Essa diferença na depleção foi diretamente relacionada as variações de pH da solução nutritiva. Plantas cultivadas com baixo N apresentaram uma diminuição de pH na solução nutritiva (Figura 12B) e plantas com alto N, apresentaram um aumento (Figura 13B). Certamente, para iniciar a absorção de nitrato, a planta quando submetida a baixo N, realizou um esforço extra para gerar um gradiente de prótons que favorecesse a absorção do N presente em baixa concentração na solução nutritiva (Figura 12A), com isso houve uma acidificação do meio externo, propiciando nesse caso a absorção do nitrato em solução.

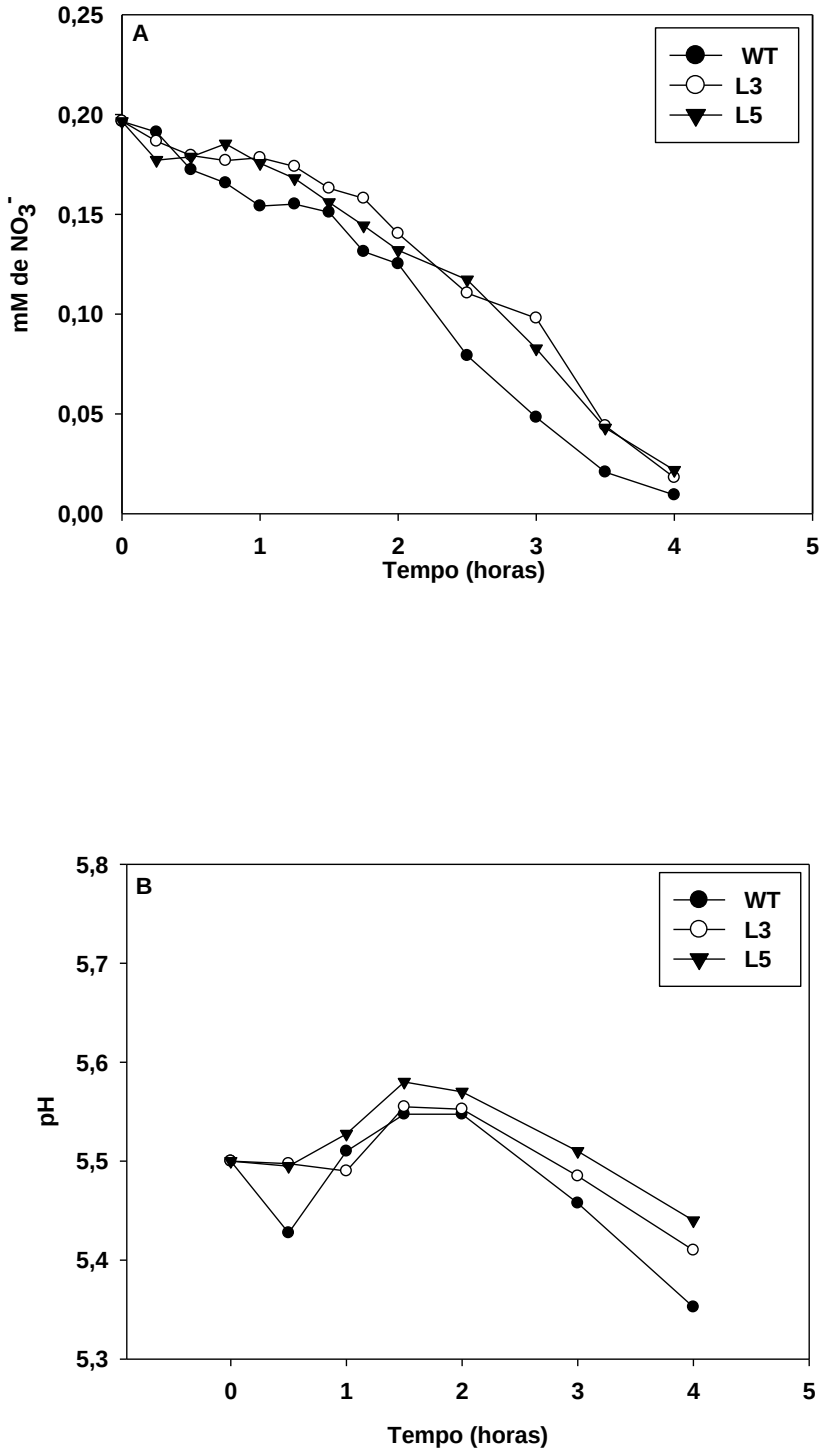



**Figura 12**. Depleção de nitrato e variação de pH em solução nutritiva aos 40 dias após germinação (DAG) de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a 0,2 mM constante de N-$NO_3^-$.

A diferença na depleção entre as linhagens e a planta selvagem (WT) passou a ser mais expressiva a partir de 2,0 horas do início do estudo, foi maior em 2,5 horas, tendendo ao

equilíbrio em 4 horas. Isso indica que sob baixo suprimento de N as linhagens foram afetadas, porém com menor intensidade, se comparado ao tratamento com alto N, pois na condição de baixo N elas absorvem o nitrato de forma semelhante a WT no início e tendem a igualar no final.

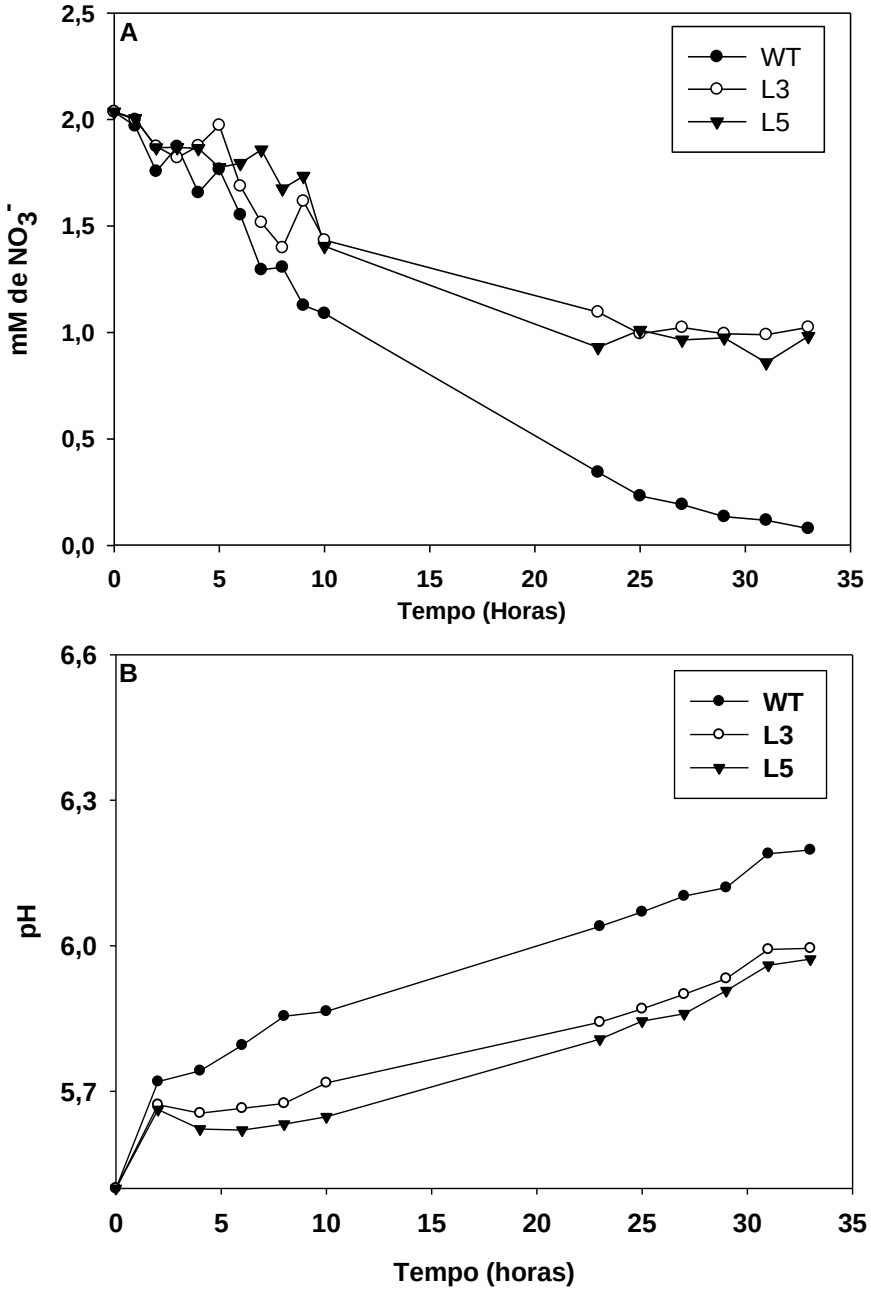



**Figura 13**. Depleção de nitrato e variação de pH em solução nutritiva aos 40 dias após germinação (DAG) de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a 2 mM constante de N-$NO_3^-$.

Por outro lado, o aumento do pH em solução nutritiva de plantas cultivadas com 2 mM de nitrato, ocorreu devido a característica do sistema de transporte de nitrato, cotransporte $NO_3^-/2H^+$ (FERNANDES et al., 2018), que leva a diminuição da acidez do meio de cultivo.

Em condições de alto N, a absorção foi semelhante até aproximadamente 7,5 horas, porém a partir desse ponto a planta WT absorveu de forma muito mais rápida do que as linhagens, as quais diminuíram drasticamente a absorção na 23ª hora, não voltando a absorver de forma efetiva até o último ponto (33ª hora). Um fato muito interessante que pode ser observado é que no experimento com alto N, quando a concentração de nitrato atingiu a faixa de 1 mM (na 23ª hora) as linhagens diminuíram drasticamente a absorção, chegando a zero em alguns intervalos.

Sabe-se que, de um modo geral, a concentração de 1mM de N é o limite abaixo do qual opera o sistema de alta afinidade (HATS) e acima do qual opera o sistema de alta afinidade (LATS) (FERNANDES et al., 2018).

A curva de depleção indica que as linhagens acionaram com maior dificuldade o sistema de alta afinidade, sobretudo devido ao acúmulo de metabólitos do ciclo do N e carbono, que gerou regulação nos transportadores de N (de formas inorgânicas e orgânicas). A velocidade de absorção do nitrato é, entre outros fatores, diretamente dependente da concentração interna desse nutriente, bem como dos metabólitos resultantes de sua assimilação (amônio, aminoácidos e proteínas) (FERNANDES et al., 2018). Em conjunto, a concentração do nitrato e dos metabólitos exercem um efeito regulatório na expressão de proteínas responsáveis pela absorção e movimentação na planta. O acúmulo de glutamina nos tecidos, por exemplo, regula negativamente a absorção de nitrato.

O comportamento das curvas de depleção sugere que o nocaute do gene *AAP1* em plantas de arroz influenciou diretamente a absorção de nitrato, principalmente sob condições de alto N.

### 4.2.3 Metabólitos solúveis, atividade da gs e proteína solúvel

#### 4.2.3.1 Nitrato

Houve acúmulo de nitrato em todas as partes das plantas mutantes (Figura 14A e 14B), exceto para as folhas da linhagem 5, submetidas ao tratamento com alto N (Figura 14B). O maior acumulo relativo aconteceu nas bainhas, principalmente sob baixo N, e foi possível verificar que a linhagem 3 acumulou relativamente mais nitrato nas raízes do que a linhagem 5, a qual apresentou maior acúmulo na parte aérea do que a linhagem 3. Ou seja, ambas possuem um acumulo maior do que a WT, porém com uma intensidade diferente nas raízes e nas folhas. Um padrão semelhante foi demonstrado para o tratamento com alto N, exceto para as folhas.

É importante salientar que apesar da curva de depleção ter indicado uma maior velocidade de absorção de nitrato pelas plantas WT, no final de três dias (que foi o intervalo de troca da solução nutritiva) a quantidade de nitrato absorvida pelas linhagens, provavelmente se igualou a quantidade absorvida pelas plantas selvagens, esse fato contribuiu ainda mais para o acúmulo de nitrato e metabólitos pelas linhagens, uma vez que o nitrato absorvido não foi assimilado de forma eficiente pelas linhagens.

Após absorvido o nitrato pode ter diferentes destinos, o que vai depender da espécie vegetal em questão e da demanda metabólica das mesmas: pode ser reduzido a nitrito no citosol das células radiculares, enviado para o vacúolo ou exportado para as folhas através do xilema por meio do fluxo transpiratório. O nitrato em excesso é retido no “pool de reserva”, não ativando o pool metabólico (FERNANDES, 1990).

Quando as concentrações citosólicas de nitrato (ou de produtos de sua assimilação, como os aminoácidos) são elevadas, este íon é armazenado no vacúolo, sendo exportado para o citosol quando torna limitante para o desenvolvimento das plantas, em consequência disso as concentrações encontradas nos vacúolos das folhas e raízes são mais elevadas que as concentrações no citosol. A formação de pools de armazenamento é uma estratégia efetiva para o controle de concentrações de N apoplásticas, influenciando a aquisição, o transporte e assimilação de N por meio de processos avançados de regulação por feedback (TEGEDER & MASCLAUX, 2017).

Pode-se postular que o acúmulo de nitrato das linhagens foi devido a deficiência na assimilação de N ocasionada pelo nocaute do *OsAAP1*, que apesar de ser um transportador de N-orgânico possui influência direta na absorção de N-inorgânico (Figuras 12-13).

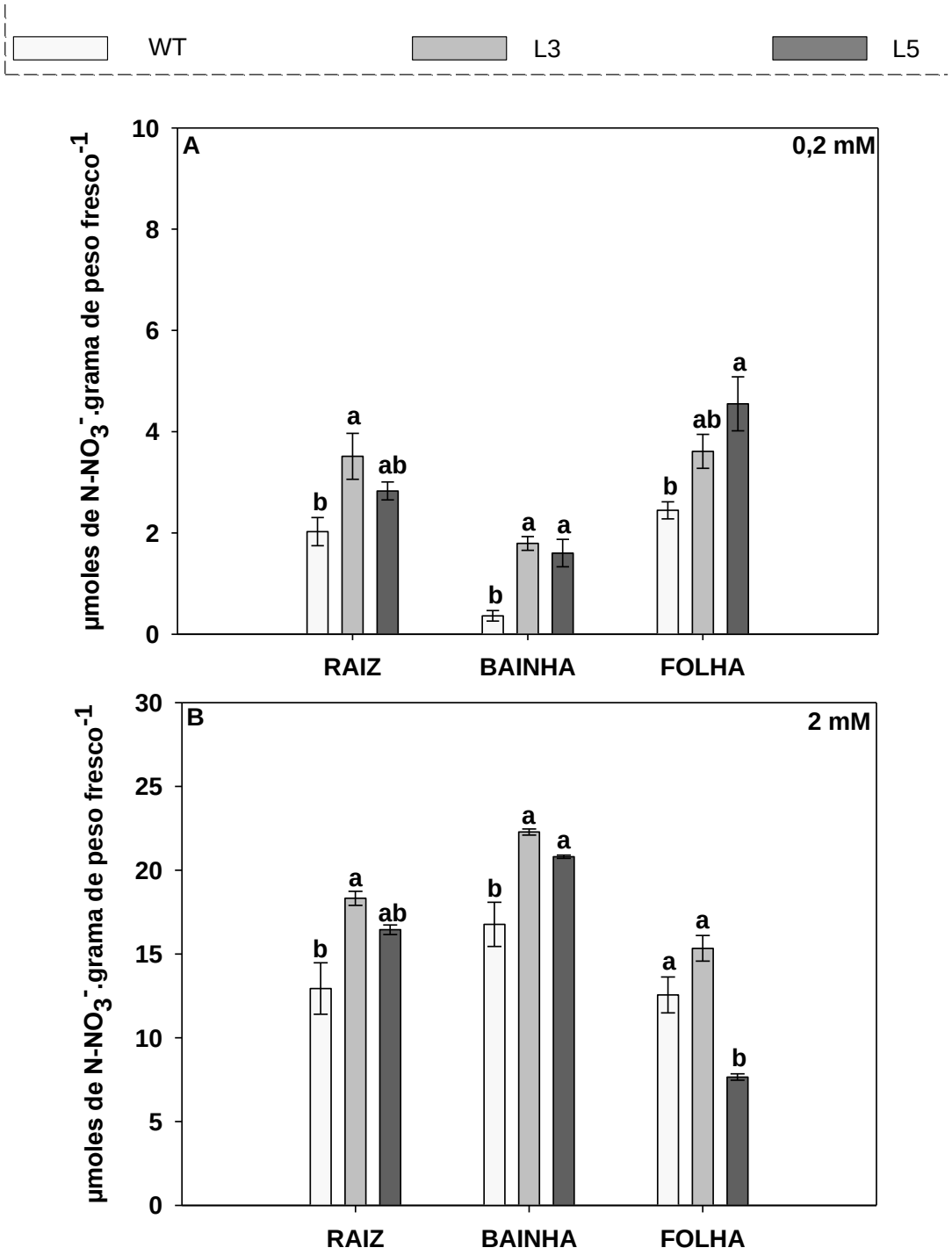



**Figura 14**. Teores de N-nitrato aos 40 dias após germinação (DAG) nas diferentes partes das plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a dois tratamentos: (A) 0,2 mM constante N-$NO_3^-$ e (B) 2 mM constante de N-$NO_3^-$. Letras minúsculas entre colunas diferem entre sí pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

#### 4.2.3.2 Amônio

As duas linhagens, quando submetidas a baixo N (Figura 15A), apresentaram um grande teor de amônio nas raízes, bainhas e folhas, sendo que a maior diferença relativa observada nas folhas, seguida das bainhas e das raízes. Ambas diferiram significativamente quando comparadas a WT.

No tratamento com alto N (Figura 15B), houve uma redução no teor de amônio nas bainhas, tanto para a L3 quanto para L5. Por outro lado, as raízes e as folhas da L3 apresentaram um aumento no teor, enquanto as raízes e as folhas da linhagem 5 apresentaram uma redução, sendo encontrada diferenças significativas apena para a L5.

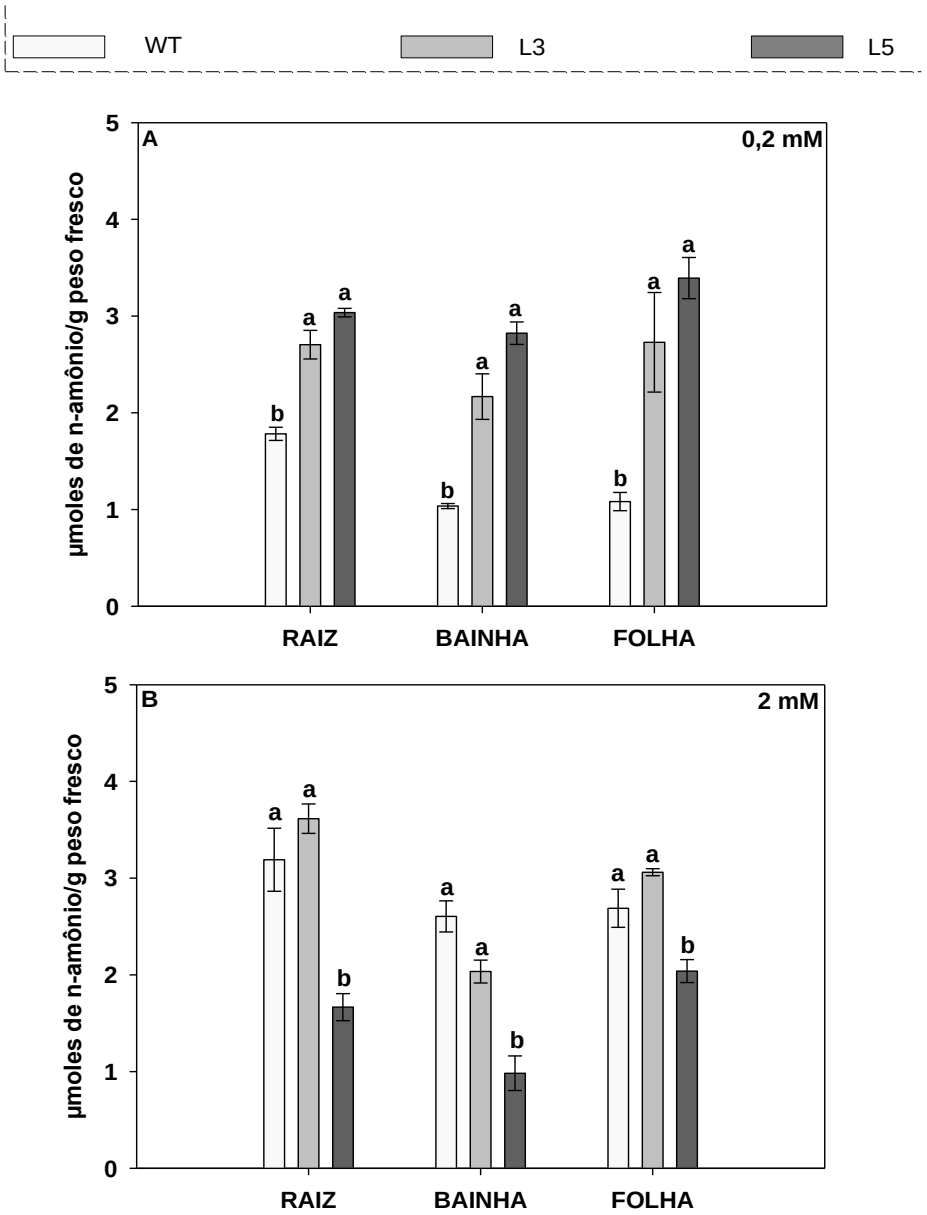



**Figura 15**. Teores de N-amônio aos 40 dias após germinação (DAG) nas diferentes partes das plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene *OsAAP1*) submetidas a dois tratamentos: (A) 0,2 mM constante N-$NO_3^-$ e (B) 2 mM constante de N-$NO_3^-$. Letras minúsculas entre colunas diferem entre sí pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Essa redução no teor de amônio apresentada pela L5 em condições de alto N, associada ao maior teor de nitrato e a maior expressão do transportador *OsNPF 7.2* nas raízes (Figura 22 F), indicou que grande parte do nitrato absorvido foi direcionado ao vacúolo ainda nas raízes, devido substancialmente ao acúmulo de metabólitos e consequentemente a problemas na assimilação desse íon.

Para evitar toxidez na célula, excesso de moléculas de amônio são aprisionadas no vacúolo (LOQUE et al., 2005), onde chegam a atingir até 1mM para manter concentrações citosólicas menores que 15 uM (ROBERTS & PANG, 1992) Apesar do aumento no ter de amônio apresentado pelas linhagens, certamente não houve toxidez, uma vez que os teores não excederam a 4 umoles/grama de peso fresco.

Esse maior teor de amônio apresentado pelas linhagens indica que apesar do acúmulo de nitrato nas diferentes partes das plantas mutantes, uma grande parte foi reduzida até amônio, evidenciando que o nocaute do *OsAAP1* além de afetar em certo grau a absorção de nitrato, demonstrado pela curva de depleção de nitrato, afetou ainda mais a assimilação do amônio, principalmente no tratamento com baixo N. O mesmo padrão de comportamento foi observado para as raízes e folhas da L3 sob alto N.

É interessante observar que as bainhas de ambas as linhagens apresentaram um menor teor de amônio nesse tratamento, demonstrando que o amônio produzido em condições de baixo e alto N é assimilado com diferente intensidade, sendo mais acumulado nas bainhas de plantas mutantes sob baixo N do que sob alto N.

#### 4.2.3.3 Aminoácidos

As linhagens mutantes cultivadas com baixo N acumularam mais aminoácidos totais nas raízes, bainhas e folhas, sendo significativo para as duas linhagens apenas nas folhas (Figura 16A). Sob condições de alto N o acúmulo só foi registrado nas folhas. As raízes e bainhas, diferentemente das folhas, tiveram uma redução nos teores (Figura 16B). Os maiores teores foram encontrados nas folhas, para ambos os tratamentos, evidenciando ser o órgão de maior assimilação de N nessas plantas, principalmente sob o fornecimento de alto N.

Estudo realizado por PERCHLIK et al. (2014), com mutantes de arabidopsis cultivadas com níveis tóxicos de aminoácidos, foi demonstrado que o gene *AtAAP1* tem a capacidade de transportar aminoácidos neutros (alanina, valina, triptofano, asparagina, glutamina, prolina) e glutamato, um aminoácido ácido.

COELHO (2015), em estudos de complementação em leveduras que receberam o cDNA do gene *OsAAP1*, demonstrou que esse gene possui a capacidade de transportar uma ampla gama de aminoácidos, e verificou que as leveduras que possuíam a sequência codificante para o gene *OsAAP1* apresentaram capacidade de crescimento em meio rico com arginina, aspartato, citrulina, glutamato e prolina.

LEE et al. (2007), em estudos de localização realizado em arabidopsis, relatou que AAP1 é uma proteína de membrana plasmática, que durante o desenvolvimento das plantas é expressa nas pontas das zonas em divisão celular, de alongamento, na epiderme de quase toda a extensão radicular, bem como no córtex e na endoderme da ponta da raiz, facilitando absorção e a transferência de aminoácidos para as zonas radiculares.

Segundo LJUNG et al. (2005), o AAP1 pode mediar o envio de aminoácidos para os vasos condutores e/ou direcioná-los para o meristema apical.

Uma hipótese é que em plantas de arroz o gene *OsAAP1* apresente uma localização e função semelhante a relatada em plantas de arabidopsis, porém uma localização tecidual deve ser feita para confirmação.

O acúmulo de aminoácidos nas raízes e nas folhas das plantas mutantes cultivadas com baixo N demonstrou dificuldades na assimilação dos aminoácidos sintetizados. Esse

acúmulo de aminoácidos nas raízes interferiu no funcionamento dos transportadores de nitrato.

PERCHLIK, et al. (2017), relataram um aumento nos teores de aminoácidos totais no xilema de plantas de ervilha superexpressando o gene *AAP1* de arabidopsis, e concluíram que esse gene está envolvido no carregamento de aminoácidos no xilema.

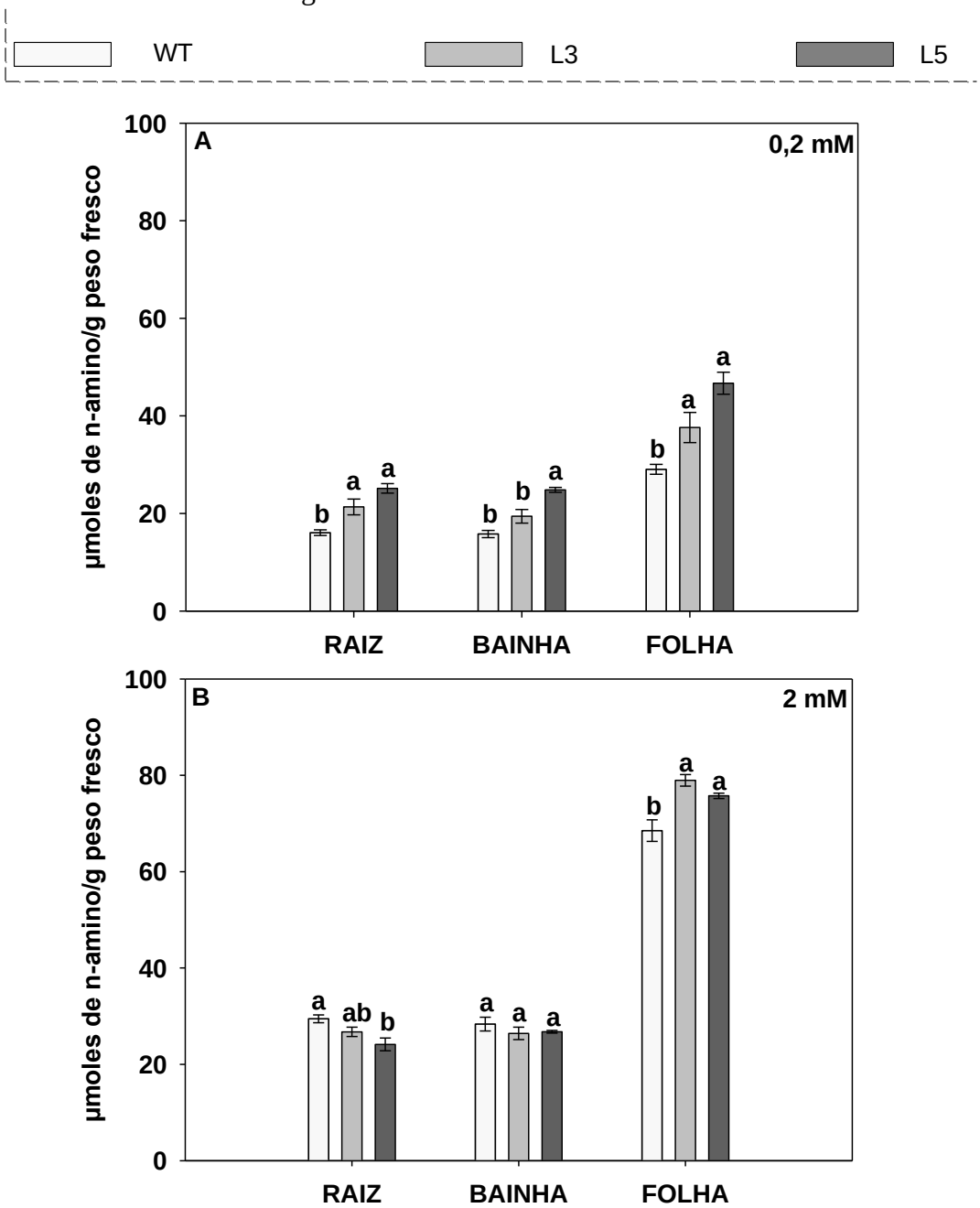



**Figura 16**. Teores de N-amino aos 40 dias após germinação (DAG) nas diferentes partes das plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a dois tratamentos: (A) 0,2 mM constante N-$NO_3^-$ e (B) 2 mM constante de N-$NO_3^-$. Letras minúsculas entre colunas diferem entre sí pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Apesar de não ter sido registrado um aumento no teor de aminoácidos totais nas raízes das plantas mutantes, cultivadas com alto N, pode ter ocorrido um acúmulo de formas específicas concomitantemente a uma diminuição na síntese de outras formas de aminoácidos, devido a uma possível mudança no perfil dos aminoácidos nas raízes, ocasionada pela perda funcional do transportador AAP1. A maior dose de N (2 mM) pode ter dificultado a observação no acúmulo total, já em baixo N (0,2 mM) o acúmulo foi mais visível.

SANDERS et al. (2009), identificaram um acúmulo de até 2290 vezes nos teores de glutamina no embrião de sementes de arabidopsis que apresentava esse gene nocauteado. Fato parecido pode ter ocorrido nas raízes das plantas mutantes do experimento com alto e também com baixo N. Porém o aminoácido que possivelmente acumulou em maior quantidade não foi a glutamina e sim a asparagina, devido ao aumento na expressão da asparagina sintetase (dados mostrados em outra seção).

Plantas com excesso de nitrogênio podem aumentar a produção de aminoácidos de maior relação N:C, como a glutamina e a asparagina, otimizando dessa forma o uso de esqueletos de carbono. Isso contribui para o fornecimento de intermediários importantes para o ciclo do ácido cítrico, o qual é indispensável para o desenvolvimento adequada das plantas.

De acordo com FERNANDES et al. (2018), a asparagina é uma aminoácido de grande importância para o transporte de N, principalmente em condições de estresse, pois apresenta relação N:C de 2N:4C, maior do que a glutamina (2N:5C).

O acúmulo de aminoácidos nas folhas das plantas mutantes de ambos os tratamentos, e nas raízes e bainhas das plantas mutantes submetidas a baixo N, pode ser atribuído a diminuição na síntese proteica, uma vez que, o metabolismo de nitrogênio foi diminuído, fato evidenciado pela menor velocidade de absorção de nitrato, demonstrado pela depleção de N, e pela diminuição da expressão de genes responsáveis pela síntese de enzimas relacionadas a assimilação do N (Figuras 20, 21, 22 e 23).

#### 4.2.3.4 Glutamina sintetase

Uma redução significativa na atividade da glutamina sintetase (GS) foi observada nas raízes das plantas mutantes submetidas a baixo (Figura 17A) e alto N (Figura 17B), sendo que a maior redução ocorreu nas raízes das plantas cultivadas sob alto N. A atividade nas folhas de ambos os tratamentos não resultaram em diferença significativa, porém observa-se uma tendência de aumento na atividade da GS nas folhas das plantas mutantes.

A diminuição na atividade da GS observada nas raízes foi diretamente relacionada ao acúmulo de aminoácidos totais, e corroborou com a hipótese de acúmulo de aminoácidos específicos principalmente no tratamento com alto N, em que não foi possível visualizar um acúmulo de aminoácidos totais, porém foi o tratamento que apresentou uma maior redução na atividade da GS. De acordo com esses resultados, a síntese de glutamina provavelmente foi diminuída, como um mecanismo de regulação devido ao excesso de aminoácidos acumulado por causa da perda de função do gene *OsAAP1*, e o excesso de nitrogênio acumulado foi direcionado para a síntese da asparagina, um aminoácido com maior relação N:C, como já dito anteriormente.

A diminuição na atividade da GS nas raízes corrobora com o os maiores teores de nitrato e amônio obtido nas raízes das plantas mutantes de ambos os tratamentos, exceto para amônio nas raízes da linhagem 5 submetidas a alto N. Certamente o nocaute do *OsAAP1* gerou o acúmulo desses metabólitos (nitrato, amônio e amino), os quais influenciaram diretamente na diminuição da atividade dessa enzima, a qual é essencial para assimilação do nitrogênio dentro das células.

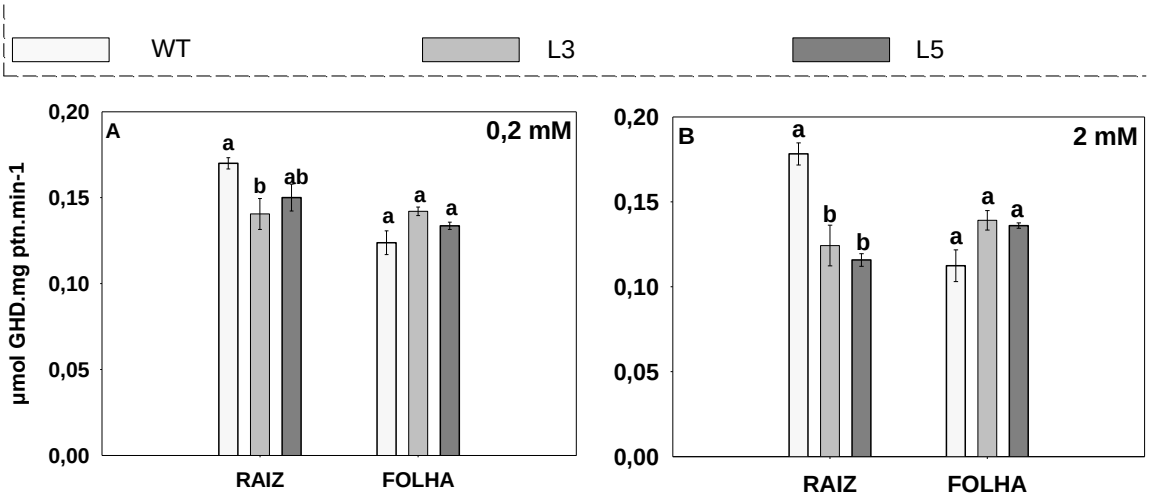



**Figura 17**.Atividade da glutamina sintetase (GS) aos 40 dias após germinação (DAG) nas raízes e folhas de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a dois tratamentos: (A) 0,2 mM constante N-$NO_3^-$ e (B) 2 mM constante de N-$NO_3^-$. Letras minúsculas entre colunas diferem entre sí pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Apesar de não significativa, houve uma tendência ao aumento na atividade da GS nas folhas de ambos os tratamentos, devido possivelmente ao grande teor de aminoácidos acumulados nesse órgão, deste modo a planta aumentou atividade de deaminação de aminoácidos com menor relação N:C, liberando amônio no citosol, como pode ser percebido na Figura 13. O amônio liberado foi utilizado em maior parte pela asparagina sintetase para a síntese de asparagina, e em menor parte pela GS para a produção de glutamina, aminoácidos com alta relação N:C.

O acúmulo de esqueletos de carbono (Figura 18A-B) corrobora com a hipótese apresentada. Esse acumulo ocorreu devido ao processo de deaminação que liberou esqueletos de carbono, ou devido ao excesso de esqueletos que foram produzidos porém pouco utilizados uma vez que de acordo com o que foi proposto anteriormente, plantas mutantes sintetizaram menos enzimas assimiladoras de N, as quais são responsáveis por reter grande parte dos esqueletos de carbono produzidos pelas plantas.

#### 4.2.3.5 Açúcares solúveis

As linhagens mutantes apresentaram um aumento significativo nos teores de açúcares solúveis nas folhas nos tratamentos de baixo (Figura 18A) e alto N (Figura 18B), sendo esse aumento mais significativo nas plantas cultivadas sob alto N. Ocorreu um pequeno acréscimo nos teores de açúcares solúveis nas bainhas das plantas sob alto N.

Os maiores teores de açúcares solúveis observados nas folhas das plantas mutantes e das plantas selvagens (WT) quando comparado aos teores nas bainhas e nas raízes deveu-se ao fato de que a folha é órgão responsável pela síntese de açúcares solúveis pelo processo fotossintético. Sabe-se que a concentração de carboidratos no citosol das folhas, especialmente a sacarose, depende diretamente do uso e da exportação desse carboidrato para outros tecidos para atender as demandas energéticas e a síntese de polissacarídeos (TAIZ e ZEIGER, 2017).

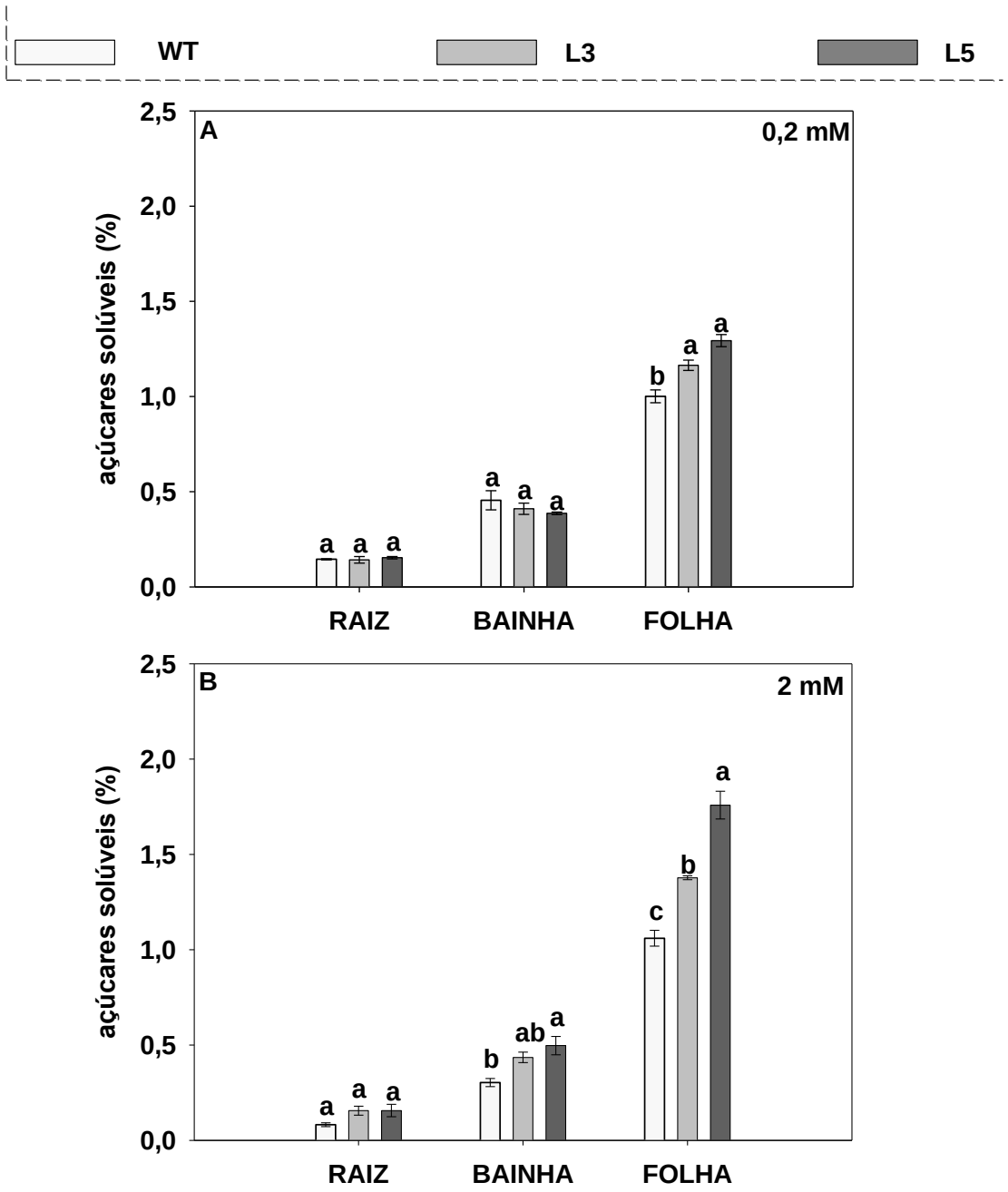



**Figura 18**. Teores de açúcares solúveis aos 40 dias após germinação (DAG) nas diferentes partes das plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a dois tratamentos: (A) 0,2 mM constante N-$NO_3^-$ e (B) 2 mM constante de N-$NO_3^-$. Letras minúsculas entre colunas diferem entre sí pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O acúmulo de açúcares solúveis nas folhas ocorreu possivelmente devido a menor necessidade de uso dos carboidratos para a síntese e para a atividade de enzimas assimiladoras de N, tanto nas folhas quanto nas raízes, levando a menor necessidade de uso e de exportação destes açúcares.

É importante salientar que cerca de 25 % da energia total produzida pelas plantas é direcionada para a assimilação do nitrato (RUBIO-ASENSIO et al., 2015). Nas plantas C3,

como é o caso do arroz, parte do processo de obtenção de energia está ligado a fotorrespiração, processo que leva a produção de NADH, utilizado para redução do nitrato a nitrito, por meio do envio do malato dos cloroplastos para o citosol (BLOOM, 2015). Uma outra parte do NADH é produzida durante o ciclo de Krebs. Uma visão mais ampla será mostrada na seção reservada para apresentação dos resultados de expressão de genes responsáveis pela "produção" de enzimas ligadas ao metabolismo de carbono.

O acúmulo de açúcares solúveis nas folhas das plantas mutantes em alto e baixo N foi acompanhado do aumento de nitrato, amônio, N-amino. Esse padrão de acúmulo de metabólitos nitrogenados, os quais utilizam dos açúcares solúveis, seja para o fornecimento de energia ou para fornecimento de esqueletos de carbono, não é observado em plantas selvagens cultivadas em condições padrões. Esse fato levou a conclusão que o nocaute gênico foi diretamente responsável pela alteração desse padrão.

O mais comum seria a assimilação do nitrato disponível (podendo ser estocada uma parte) em aminoácidos e proteínas, levando ao consumo de boa parte dos esqueletos de carbono. AZEVEDO et al. (2005), cultivando plantas de arroz selvagem da variedade Caiapó, em solução nutritiva com 2mM de nitrato, relataram correlações negativas entre nitrato e açúcares solúveis (-0,94 e -0,98 para raízes e folhas, respectivamente) e aminoácidos totais e açúcares solúveis (-0,94 para folhas), reforçando o padrão de comportamento referido acima.

#### 4.2.3.6 Proteínas solúveis

Um acúmulo significativo de proteínas solúvel foi observado apenas nas raízes e folhas das plantas sob baixo fornecimento de N (Figura 19A), sendo as folhas o órgão que apresentou o maior acúmulo. Para o experimento com alto N (Figura 19B) não houve diferenças.

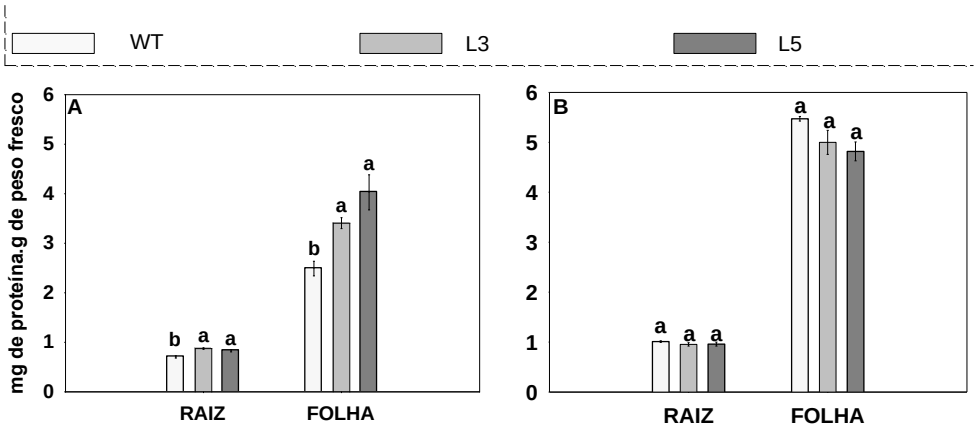



**Figura 19**.Teores de proteínas solúvel ($mg.g^{-1}$) aos 40 dias após germinação (DAG) nas raízes e folhas de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene OsAAP1) submetidas a dois tratamentos: (A) 0,2 mM constante $N\text{-}NO_3^-$ e (B) 2 mM constante de $N\text{-}NO_3^-$. Letras minúsculas entre colunas diferem entre sí pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Embora muitas vezes dedicadas ao metabolismo, muitas proteínas podem funcionar como uma forma temporária de armazenamento de N (TEGEDER & MASCLAUX, 2017). Frequentemente proteínas de armazenamento são relatadas principalmente em leguminosas, porém em condições de estresse podem existir e acumular em todas as espécies de plantas, resultando em um menor crescimento (AVICE et al., 1996).

As proteínas solúveis são compostas de proteínas enzimáticas e proteínas não enzimáticas. Uma parte dessas proteínas acumuladas são, possivelmente, proteínas não enzimáticas, uma vez que a demanda por enzimas para a assimilação do N primário (nitrato) foi diminuída, como já foi relatado anteriormente, o que levaria a menor necessidade de produção de certo grupo de enzimas. Sendo assim essas proteínas foram, possivelmente, utilizadas para o armazenamento do N acumulado em excesso dentro das células, em decorrência da ineficiência do envio desse N para a parte aérea, devido ao nocaute do gene *OsAAP1*.

Era esperado que as plantas mutantes acumulassem proteínas solúveis quando submetidas a alta dose de N, porém não ocorreu. Possivelmente devido a uma inibição ainda mais expressiva na produção de proteínas enzimáticas ligadas a assimilação primária do nitrato (nitrato redutase), o que explicaria os teores iguais de proteínas solúveis entre plantas mutantes e selvagens.

### 4.2.2 Expressão gênica

O nocaute do gene *OsAAP1* influenciou a expressão de genes associados ao metabolismo de nitrogênio e carbono. Primeiramente serão apresentados e discutidos a expressão de genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio, quando as plantas foram submetidas a baixo N e alto N, respectivamente. Posteriormente serão apresentados e discutidos os resultados da expressão gênica dos genes relacionados ao metabolismo de carbono. Encontra-se no anexo 8 uma visão geral das alterações ocorridas na expressão gênica das plantas mutantes submetidas a alto e baixo N.

Os genes foram selecionados para o estudo no intuito de fornecer um pequeno monitoramento do destino do nitrato fornecido as plantas, bem como determinar possíveis alterações no metabolismo de carbono e nitrogênio.

#### 4.2.2.1 Genes do metabolismo de n - 0,2 mM de $NO_3^-$

As plantas mutantes submetidas a baixo N apresentaram nas raízes uma redução na expressão dos genes *OsNRT 2.1*, *OsNRT 2.4*, *OsGS2*, *OsNADH-GOGAT*, *OsNPF 7.2* e *OsNPF 7.3* (Figura 20A, B, D, E, G H), quando comparada as plantas selvagens. Somente os genes *OsNIA 1* e *OsASN 1* tiveram uma expressão relativa aumentada (Figura 20 C E 20F).

De acordo com LEZHNEVA et al. (2014), o gene *NRT 2.4* está aparentemente envolvido na aquisição direta de nitrato do solo através da epiderme e do córtex nas zonas dos pelos radiculares, enquanto o *NRT2.1* direciona o nitrato presente no apoplasto para células do córtex e endoderme. Em raízes de arabidopsis o transportador NRT2.1 é o principal componente do sistema HATS induzido, a qual perde cerca de 75% da capacidade de absorver o nitrato quando esse gene é nocauteado (FERNANDES et al., 2018).

Sendo assim a menor expressão do *NRT 2.1* e *2.4* prejudicou a absorção e a movimentação interna do nitrato, o que pode ser evidenciado pela menor depleção do N presente em solução nutritiva e menor taxa de decaimento do pH (Figura 12). Sabe-se que a expressão desses genes está relacionada diretamente ao status de N das plantas, e um acúmulo dos produtos da assimilação do N, como a glutamina, gera uma repressão dos mesmos, o que explica o acúmulo de aminoácidos, bem como nitrato e amônio nas plantas mutante devido a deficiência no uso do N fornecido ocasionado pelo nocaute do gene *OsAAP1* o que levou a diminuição na expressão dos transportadores 2.1 e 2.4. Sendo assim, pode-se inferir que a atividade de transportadores de aminoácidos influencia os transportadores de N inorgânico e a absorção pelas plantas.

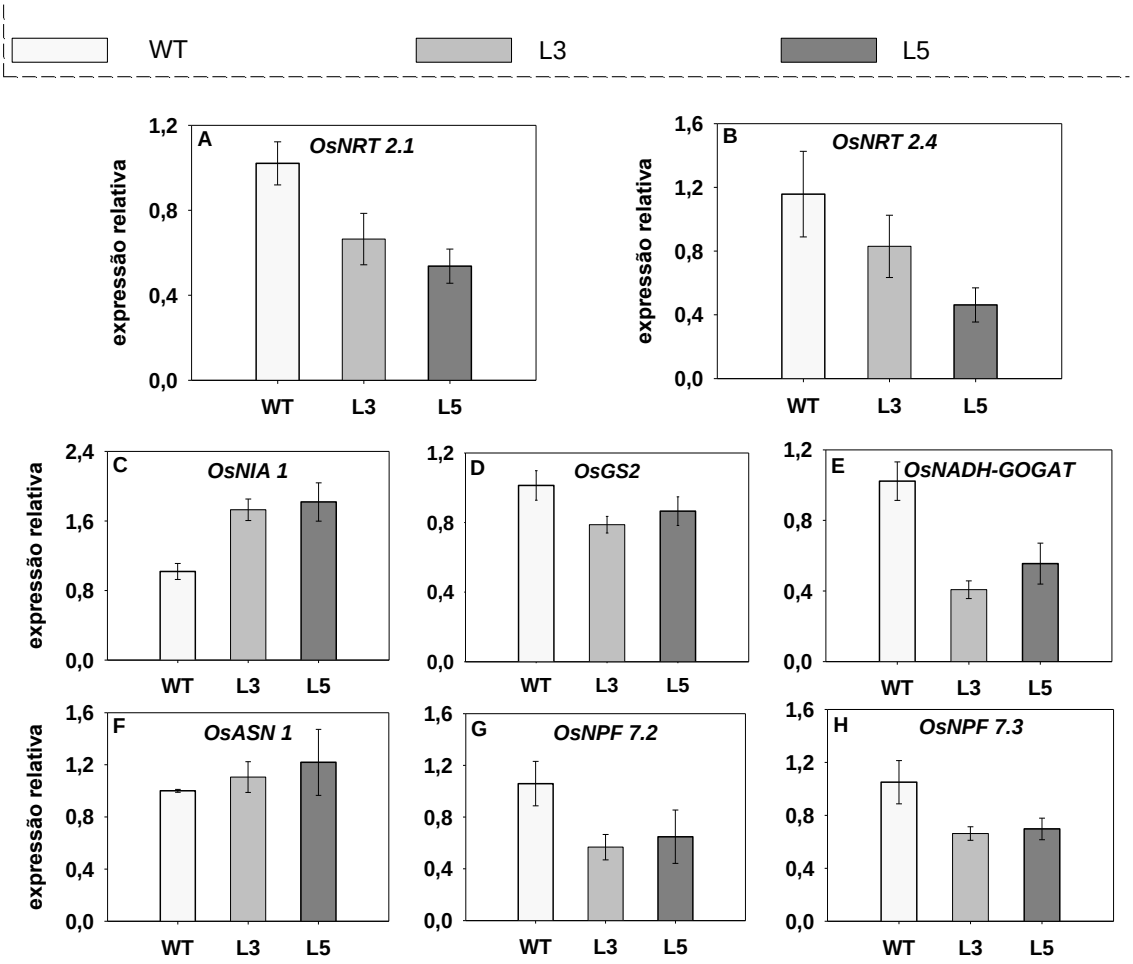



**Figura 20**. Expressão relativa dos genes OsNRT2.1 (transportador de nitrato 2.1), OsNRT2.4 (transportador de nitrato 2.4), OsNIA1 (nitrato redutase 1), OsGS2 (glutamina sintetase 2), OsNADH-GOGAT (glutamato sintase), OsASN 1 (asparagina sintetase 1), OsNPF7.2 (transportador de nitrato/peptídeos 7.2), OsNPF7.3 (transportador de nitrato/peptídeos 7.3), aos 40 dias após germinação (DAG) em raízes de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene *OsAAP1*) submetidas a 0,2 mM constante de N-$NO_3^-$

Apesar de ter absorvido de forma menos eficiente, as plantas mutantes apresentaram níveis internos de nitrato mais elevados. Esse nitrato aparentemente foi enviado para três destinos: uma pequena parte para o vacúolo, uma outra parte exportada para as folhas e bainhas e a outra parte assimilada nas raízes.

Os resultados da expressão gênica indicam que a maior parte do nitrato absorvido foi assimilado nas raízes, principalmente na forma de asparagina, isso porque houve um aumento na expressão do gene *OsNIA1* (enzima responsável pela redução do nitrato no citosol) (Figura 20C), indicando uma grande redução do nitrato absorvido, seguido do aumento na atividade da asparagina sintetase (enzima responsável pela síntese da asparagina por meio de transaminação do aspartato com a glutamina, ou pela aminação direta do aspartato com o amônio livre) (Figura 20F).

Os genes responsáveis por codificarem proteínas de envio do nitrato para o vacúolo (*OsNRT 7.2*) e para o xilema (*OsNRT 7.3*), tiveram uma expressão reduzida (Figuras 20G-20H). Assim como os genes *OsGS2* e *OsNADH-GOGAT*, os quais codificam as enzimas responsáveis pela síntese da glutamina e do glutamato, respectivamente (Figura 20D-20E).

Portanto invés de seguir o padrão de plantas de arroz cultivadas com baixo N, ser assimilado pela via GS-GOGAT ou ser exportado para parte aérea, grande parte foi assimilado na forma de asparagina nas raízes, possivelmente, como um mecanismo de destinar o N presente no citosol. Uma outra parte do N absorvido foi enviado para a parte aérea, visto os teores de nitrato, amônio e N-amino presentes nesse órgão.

A expressão dos genes *OsGS2*, *OsFd-GOGAT*, *OsNPF 7.2*, *OsAST1*, *OsASN1* (Figura 21 B-F), seguiram um padrão semelhante na parte aérea, exceto o *OsNIA1* (Figura 21A).

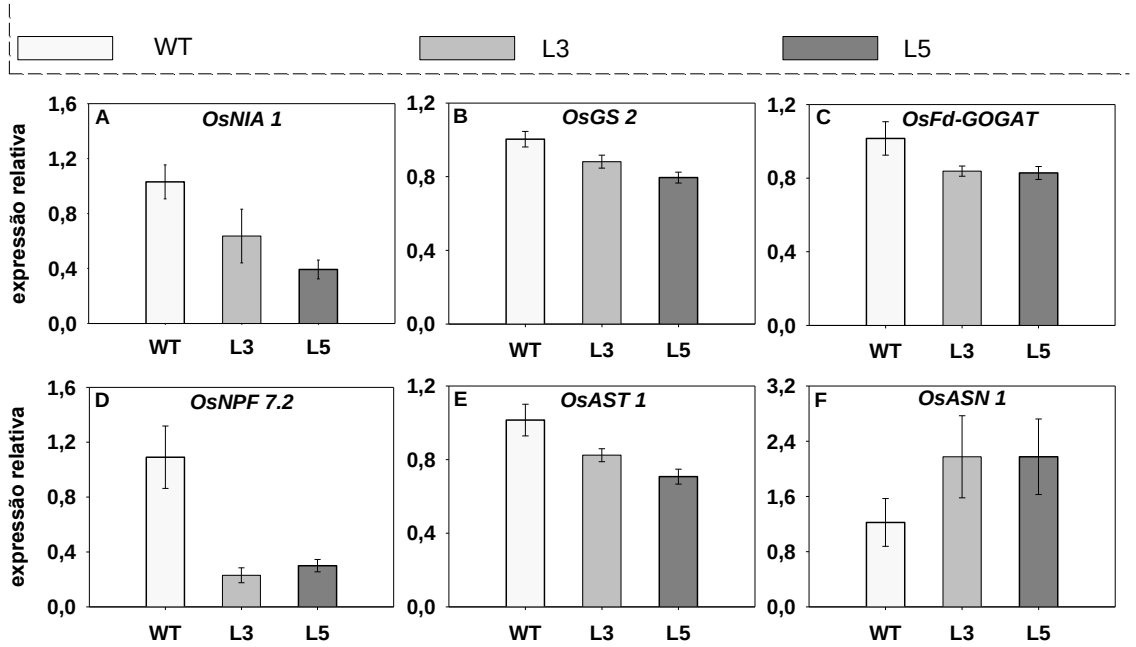



**Figura 21**. Expressão relativa dos genes *OsNIA 1*(nitrato redutase 1), *OsGS 2* (glutamina sintetase 1), *OsFd-GOGAT* glutamato sintase), *OsNPF 7.2* (transportador de nitrato/peptídeos 7.2), *OsAST 1* (aspartato aminotransferase) e *OsASN 1*(asparagina sintetase 1), aos 40 dias após germinação (DAG) em folhas de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene *OsAAP1*) submetidas a 0,2 mM constante de N-$NO_3^-$.

Analisando este cenário foi proposto que o nitrato enviado ao xilema foi em grande parte direcionado para as bainhas, como pode ser visualizado na Figura 14 A-B, por ser um órgão de maior armazenamento desse íon. Outra parte do nitrato foi enviado para as folhas das plantas mutantes. Nas folhas somente uma pequena parte desse íon foi destinado aos vacúolos e maior parte utilizado para a síntese de asparagina, uma vez que houve uma baixa expressão do gene *OsNPF 7.2* (Figura 21 D) e maior expressão do gene *OsASN1* (Figura 21 F), respectivamente. Após o nitrato ser assimilado pela via GS-GOGAT, a glutamina e o glutamato produzidos foram utilizados para produção de asparagina, que nas folhas assim como nas raízes parece ser o destino preferencial do N absorvido pelas plantas mutantes.

Interessante notar que, provavelmente, a maior parte do aspartato utilizado para a produção da asparagina teve origem nas raízes, uma vez que nesse órgão houve uma maior redução do nitrato e possivelmente uma maior produção de aspartato, e quando comparada a expressão da asparagina sintetase nas raízes e nas folhas percebe-se que foi maior nas folhas, o que indicou a maior produção de asparagina nas folhas.

A produção de asparagina necessita tanto de glutamina (ou amônio) quanto de aspartato, sintetizado pela ação da aspartato aminotransferase (AST). Porém a expressão do

gene *OsAST 1* foi menor nas folhas, portanto para manter a alta taxa de produção de asparagina que possivelmente ocorreu nas folhas grande parte do aspartato foi importado das raízes. Vale lembrar que o gene *OsAAP1* não têm o aspartato como substrato fisiológico, não afetando então o envio desse aminoácido para as folhas, tornando esse processo totalmente possível e viável.

Outro aspecto relevante observado foi que a produção de glutamina foi diminuída tanto nas raízes quanto nas folhas das plantas mutantes, porém a demanda pelo grupamento-amino foi aumentada nesses dois órgãos, desse modo grande parte foi obtido diretamente do amônio oriundo da redução do nitrato das raízes.

De acordo com GAUFICHON et al. (2010), as enzimas asparagina sintetase produzidas pelas plantas podem usar tanto amônio quanto glutamina, sendo a glutamina a doadora preferencial. DUFF et al. (2011), observou que apesar da asparagina sintetase preferir a glutamina como doadora do grupamento amida, o amônio presente nas raízes de milho, também foi usado como doador de N. Com isso, nas condições experimentais do presente estudo, grande parte do grupamento amida utilizado pela AS certamente teve origem no amônio livre nas células, ainda mais porque os níveis de amônio foram maiores nas três partes das plantas mutantes (raiz, bainha e folha).

#### 4.2.2.2 Genes do metabolismo de N - 2 mM de $NO_3^-$

A expressão relativa do gene *OsAAP1* nas plantas mutantes foi próxima de zero, o que caracterizou um nocaute gênico eficiente (Figura 22A). A pequena quantidade de transcritos, mesmo que sejam traduzidos vão gerar proteínas não funcionais, uma vez que pelo alinhamento da sequência desse gene, após edição pelo sistema CRISPR-Cas 9 foi possível encontrado regiões com stop códon em grande parte do corpo do gene, gerando assim uma proteína não funcional.

As plantas mutantes submetidas a alto N apresentaram nas raízes uma menor expressão relativa dos genes *OsNRT1.1* (Figura 22B), *OsNIA 1*(Figura 22C), *OsNADH-GOGAT* (Figura 22E) e *OsGS2* (Figura 22f). Houve o aumento na expressão relativa dos genes *OsNPF 7.2* (Figura 22D), *OsNPF7.3* (Figura 22G) e *OsASN* (Figura 22H)

Importante observar que as plantas mutantes sob alto N, quando comparadas as plantas com baixo N, apresentaram diferentes estratégias para metabolizar o nitrato absorvido. Em ambas as concentrações houve uma redução na absorção de nitrato. Essa redução de absorção no tratamento de 2 mM foi evidenciada pela menor expressão do gene *OsNRT1.1*, indicando que a absorção de N inorgânico (nitrato) foi diretamente afetada pelo nocaute gênico, independente da concentração de nitrato fornecida.

Vale lembrar que o transportador *OsNRT1.1* além de estar envolvido na absorção de nitrato do solo atua também como um transceptor, sinalizando para as plantas as concentrações desse íon no meio externo (solo ou solução nutritiva), dessa forma a redução na expressão desse gene nas raízes das plantas mutantes indica possivelmente problemas na sinalização, levando assim a uma menor absorção do íon nitrato (TEGEDER & MAUSCLAUX, 2017).

Certamente a menor expressão desse gene está relacionada também a elevada concentração de nitrato e de aminoácidos no interior das células, que nessa condição de alto N foram, respectivamente, até 42% e 56% maior do que a concentração relatada nas raízes das plantas selvagens.

O amônio e os aminoácidos são outros sinais de regulação para os transportadores de nitrato que inibem absorção direta de nitrato por mecanismo de feedback (LIU & VON WIRÉN, 2017).

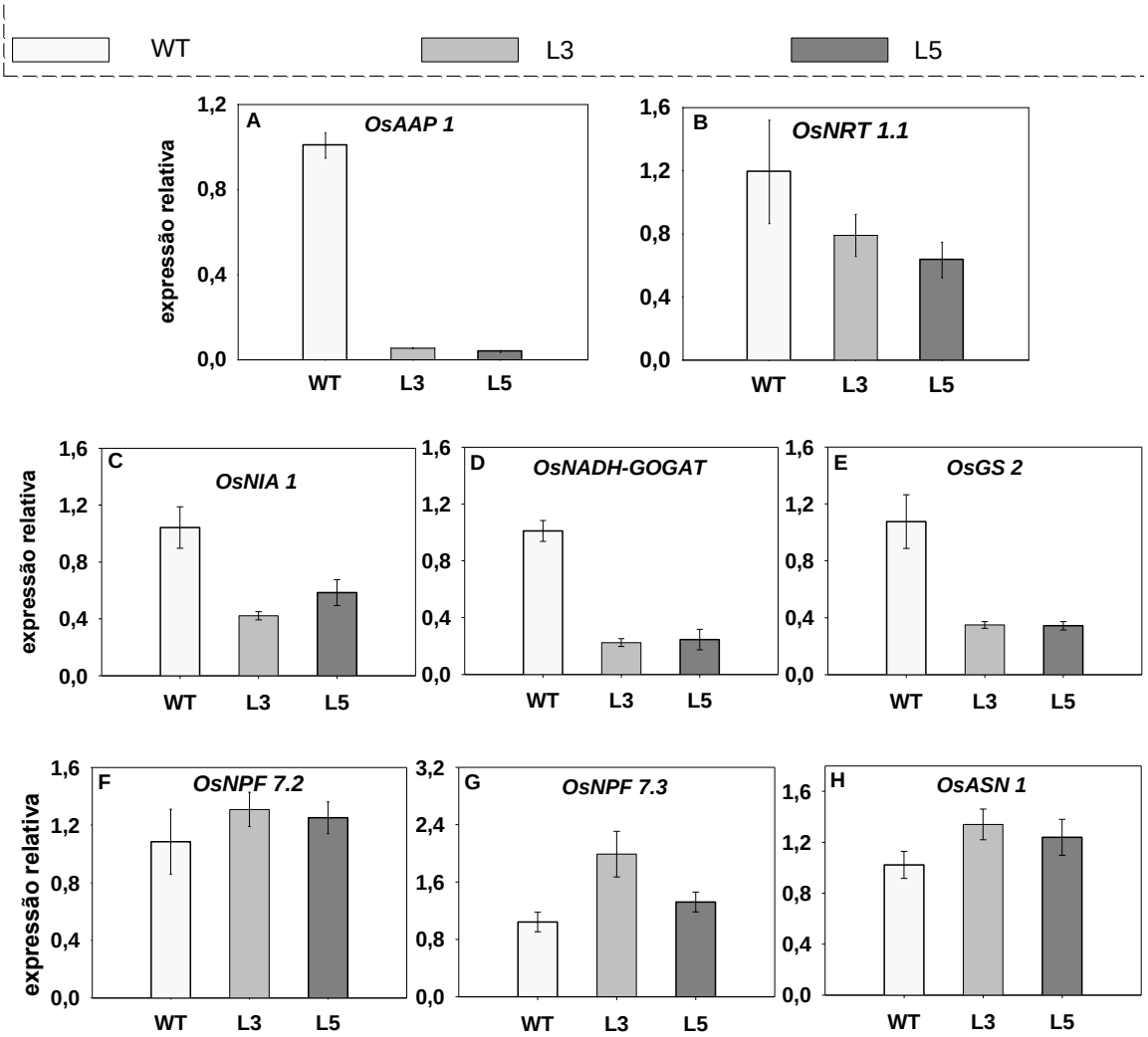



**Figura 22**. Expressão relativa dos genes *OsAAP1*(aminoácido permeasse 1), *OsNRT1.1* (transportador de nitrato/peptídeos 8.9), e *OsNIA 1* (nitrato redutase 1), , *OsNADH-GOGAT* (glutamato sintase), *OsGS 2* (glutamina sintetase 2), *OsNPF7.2* (transportador de nitrato/peptídeos 7.2), *OsNPF 7.3* (transportador de nitrato/peptídeos 7.3) e *OsASN 1* (asparagina sintetase 1), aos 40 dias após germinação (DAG) em raízes de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene *OsAAP1*) submetidas a 2 mM constante de N-$NO_3^-$.

Diferentemente das plantas mutantes sob baixo N, quando em condições de alto N a expressão do gene *OsNIA 1* apresentou uma redução de até 60 % em relação a WT. Os genes *OsGS2* e *OsNADH-GOGAT* obedeceram um padrão de redução, porém com maior intensidade, sendo cerca de 68% e 78% menos expresso quando comparado a WT. Essa diminuição de expressão indica que em condições de alto N a assimilação desse nutriente em plantas nocauteadas para o gene *OsAAP1* reduz significativamente, certamente devido aos elevados níveis interno dos metabolitos presente no citosol das células radiculares, o que levou a uma regulação negativa.

O aumento na expressão dos genes *OsASN1*, *OsNPF7.2* e *OsNPF7.3*, sugere que as plantas mutantes estão usando três estratégias diferentes para direcionar o alto teor interno de nitrato. Assim como as plantas cultivadas em baixo N, a maior expressão da *OsASN1* sugere que a asparagina, por apresentar uma maior relação N:C comparada aos demais aminoácidos, foi utilizada mais intensamente para metabolizar o N absorvido, até mesmo como uma forma

de diminuir a quantidade de glutamina no citosol e permitir o uso de N. Porém, à alta concentração do nitrato no meio interno, a maior expressão do *OsNPF7.2* e *OsNPF7.3*, transportadores que enviam o nitrato para o vacúolo e para a parte aérea, respectivamente, sugeriu que uma grande parte do N também foi destinado ao vacúolo das células radiculares e a outra parte direcionada ao xilema.

A menor assimilação do nitrato e o acúmulo também pode ser evidenciado pelos maiores teores de metabólitos encontrados nesse órgão, principalmente nitrato e amônio. De acordo com HU et al. (2016), em arroz o transportador NPF 7.2 foi localizado no tonoplastos grandes e em pequenos vacúolos, com isso o nocaute do gene *OsNPF 7.2* pode gerar um crescimento retardado em plantas submetidas a alto teor de nitrato. A menor produção de massa fresca das plantas mutantes pode ser associada a menor expressão desse gene, que devido ao nocaute do *OsAAP1* foi regulado positivamente em plantas mutantes.

O nitrato importado pelas células foliares das plantas mutantes, assim como o nitrato presente nas células radiculares, foram menos assimilados pela nitrato redutase e pela via GS-GOGAT quando comparada as plantas WT. Fato esse evidenciado pela menor expressão relativa dos genes *OsNIA 1*(Figura 23 A), *OsGS2* (Figura 23 B) e *OsFd-GOGAT* (Figura 23 C), mostrando que em condições de alto N interno as plantas mutantes optaram por diminuir a expressão de enzimas responsáveis pela assimilação primária do nitrato, uma vez que os metabólitos produzidos por essas enzimas estavam em excesso no citosol das células.

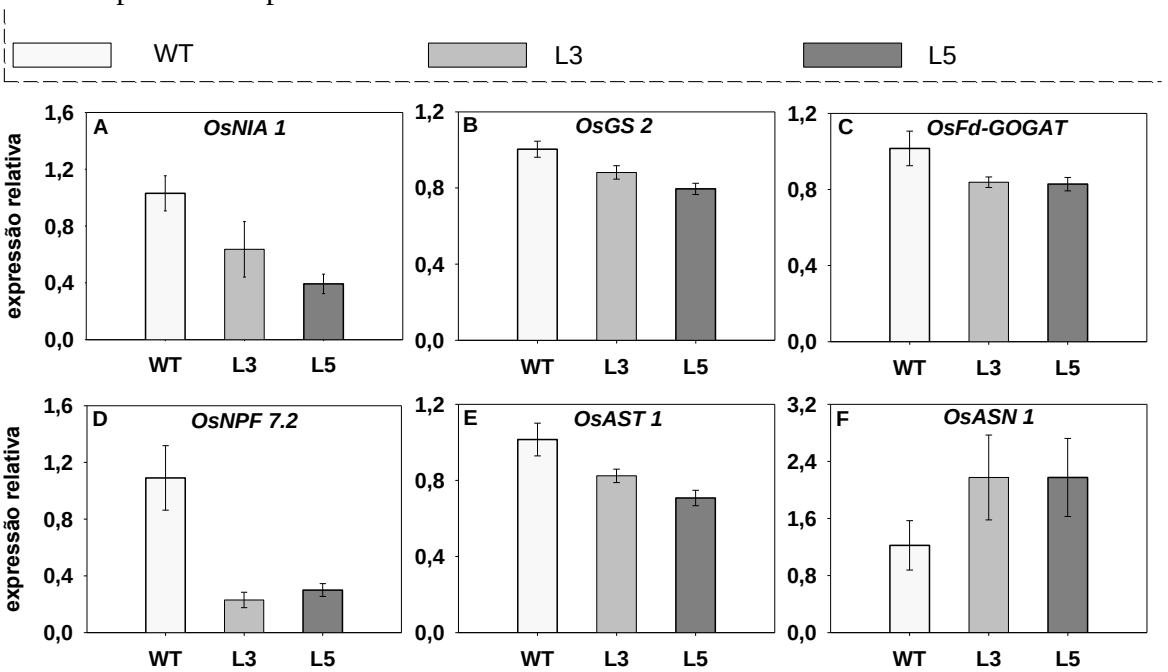



**Figura 23**. Expressão relativa dos genes *OsNIA 1*, *OsGS 2*, *OsFd-GOGAT*, *OsNPF 7.2*, *OsAST 1* e *OsASN 1*, aos 40 dias após germinação (DAG) em folhas de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene *OsAAP1*) submetidas a 2 mM constante de N-$NO_3^-$.

O excesso de nitrato foi estocado nos vacúolos e/ou assimilados em aminoácidos com maior relação N:C. Esse mecanismo pode ser evidenciado pela maior expressão do gene *OsNPF7.2* (Figura 23D), *OsAST 1* (Figura 23E) e *OsASN1* (Figura 23F), sendo esses dois últimos genes mais expressos na linhagem 5. Se comparada as duas linhagens em estudo (L3 e L5) é possível observar que a L5 apresentou menor teor de nitrato e amônio, indicando que

essa linhagem optou mais pela assimilação do N em moléculas de asparagina do que pelo estoque nos vacúolos.

Fato é que as plantas mutantes apresentaram padrões semelhantes de assimilação do nitrato nas raízes e na parte aérea, sendo esse padrão diferente entre linhagens e plantas mutantes. Essa maior expressão da ASN, que certamente resultou em maior produção asparagina, contribui substancialmente para os maiores teores de aminoácidos totais registrados na parte aérea dessas plantas.

De maneira geral, pode-se afirmar que o nocaute do gene *OsAAP1* resultou em alterações nos níveis de expressão das enzimas responsáveis pela metabolização do nitrato. Plantas sob alto N apresentaram, aparentemente, uma menor taxa de redução do nitrato e um armazenamento mais intenso do N em sua forma iônica (nitrato), seja nos vacúolos das células radiculares ou nos vacúolos das células foliares. Porém quando submetidas a baixo N apresentaram uma menor exportação do nitrato para os vacúolos.

De forma semelhante, plantas de arroz com o gene *OsAAP1* nocauteado, quando cultivadas em alto ou baixo nitrato, apresentaram uma maior expressão do gene *OsASN 1*, sendo que em baixo N esse gene foi mais expresso nas raízes e em alto N foi mais expresso nas folhas.

O produto final dessa maior expressão relativa do *ASN 1* foi a asparagina, um aminoácido importante para as plantas, principalmente em condições de estresse. Essa maior produção de asparagina poderá ser relatada de fato quando for realizada a análise do perfil dos aminoácidos dessas plantas. Porém dados presentes na literatura (SANDERS et al., 2009, PERCHLIK et al., 2017) reforçaram a hipótese apresentada nesse trabalho, de acumulo da asparagina em plantas mutantes para o gene *AAP1*.

#### 4.2.2.3 Genes do metabolismo de carbono – 0,2 mM $NO_3^-$

O metabolismo de nitrogênio e de carbono estão diretamente ligados. Carboidratos são fornecidos ao ciclo do N, seja para assimilação direta do N (2-oxoglutarato, oxaloacetato, piruvato e fosfoenolpiruvato) ou para a síntese de poder redutor (sacarose, amido e trioses fosfato). Dessa forma alterações no metabolismo de N podem gerar modificações no metabolismo de carbono. Essas modificações são complexas e envolvem um grande número de metabólitos, porém existem pontos chaves de regulação que permitem um monitoramento, mesmo que superficial, de parte das reações. Sendo assim, foi determinada a expressão relativa de seis genes que codificam enzimas que catalisam reações na glicólise e no ciclo de Krebs.

As plantas mutantes quando submetidas a baixo N apresentaram uma regulação negativa (downregulation) para todos os genes analisados (Figura 24A - 24F). Os genes *OsPPK1*, *OsPK1*, *OsPPC1* e *OsCYT-MDH* codificam enzimas envolvidas na glicólise, em ordem: fosfofrutokinase, que realiza a conversão da frutose 6-fosfato em frutose 1-6 bifosfato (Figura 24A); piruvato quinase, que realiza a conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato (Figura 24B); fosfoenolpiruvato carboxilase, que realiza a conversão do fosfoenolpiruvato em oxaloacetato (Figura 24C); malato desidrogenase citosólica, que realiza a conversão do oxaloacetato em malato (Figura 24D). Os genes *OsICDH 1* e *OsNADP-MDH* codificam duas enzimas do ciclo e Krebs, em ordem: isocitrato desidrogenase, que realiza a conversão do isocitrato em 2-oxoglutarato (Figura 24E); malato desidrogenase, que realiza a conversão do malato a oxaloacetato (Figura 24F).

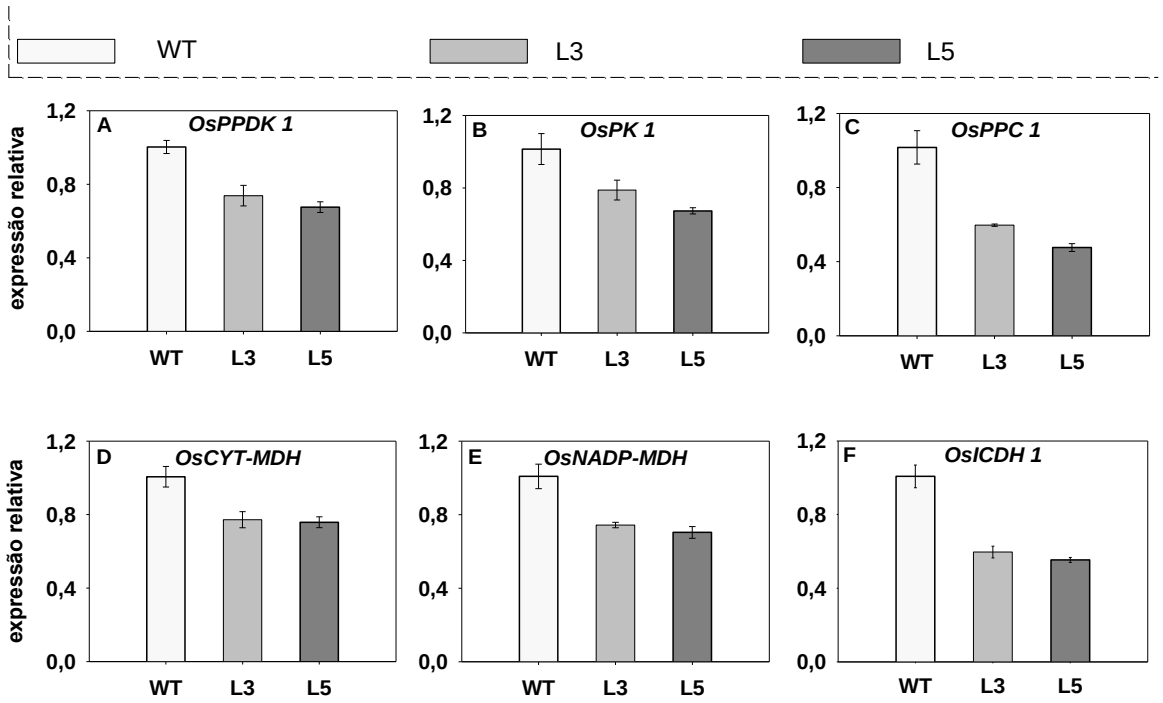



**Figura 24**. Expressão relativa dos genes *OsPPDK1* (fosfato diquinase 1), *OsPK1* (piruvato quinase), *OsPPC1* (fosfoenolpiruvato carboxilase), *OsCYT-MDH* (malato desidrogenase citosólica), *OsNADP-MDH* (malato desidrogenase) e *OsICDH1*(isocitrato desidrogenase), aos 40 dias após germinação (DAG) em folhas de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene *OsAAP1*) submetidas a 0,2 mM constante de $N\text{-}NO_3^-$.

A glicólise vegetal é regulada principalmente pelos seus produtos, sendo a concentração citósolica de fosfoenolpiruvato um importante regulador. Porém metabólitos como o ATP e o AMP também podem exercer efeito regulatório (TAIZ & ZEIGER, 2017).

Como pode ser visualizado nos gráficos de frações solúveis, de depleção de N e de expressão gênica, o nocaute do gene *OsAAP1* levou a uma diminuição na quantidade de nitrato assimilado, o que resultou em acúmulo de metabólitos e levou a regulação na expressão relativa de genes que codificam para enzimas responsáveis pela assimilação de N.

Essa menor assimilação de N certamente ocasionou um menor uso e posteriormente menor produção de poder redutor e de esqueletos de carbono. Com isso, parte dos açúcares solúveis produzidos durante o ciclo do carbono acumularam, o que pode ser evidenciado pelos teores de açúcares solúveis. Esse acúmulo gerou, em plantas mutantes, uma regulação negativa na expressão dos genes analisados, e consequentemente na glicólise e no ciclo de Krebs.

A menor atividade de assimilação do amônio pela via GS-GOGAT, certamente gerou um acúmulo de ATP e NADH, e uma forte queda na demanda energética, pois como já foi dito anteriormente, as plantas destinam cerca de 25% de sua energia para a assimilação de nitrato.

Os produtos do ciclo de Krebs utilizados diretamente pelo ciclo do N (oxaloacetato e 2-oxaglutarato) também foram subutilizados, uma vez que menos nitrato foi assimilado nas folhas das plantas mutantes, o que gerou uma regulação negativa na expressão dos genes (*OsICDH 1* e *OsNADP-MDH*) responsáveis pela codificação de enzimas que catalisam reações para produção desses metabólitos.

Dessa forma, quando as plantas mutantes foram submetidas a 0,2 mM de nitrato, houve alterações no ciclo do N, ocasionadas pelo nocaute do OsAAP1, gerando um controle negativo no metabolismo de carbono.

Como pode ser visto adiante, em plantas cultivadas com alto N, as alterações no ciclo de carbono foram completamente diferentes.

#### 4.2.2.4 Genes do metabolismo de carbono – 2mM $NO_3^-$

A expressão relativa dos genes relacionados ao metabolismo de carbono, apresentaram um padrão inverso nas células foliares das plantas mutantes submetidas a alto N quando comparado as plantas submetidas a baixo N, exceto para o gene *OsPPK1* (Figura 25 A) nas duas linhagens e o gene *OsNADP-MDH* (Figura 25 E) para a linhagem 5, os quais apresentaram o mesmo padrão de queda observado para as plantas em baixo N. Os demais genes analisados apresentaram uma expressão relativa aumentada (Figuras 25 B, C, D, F).

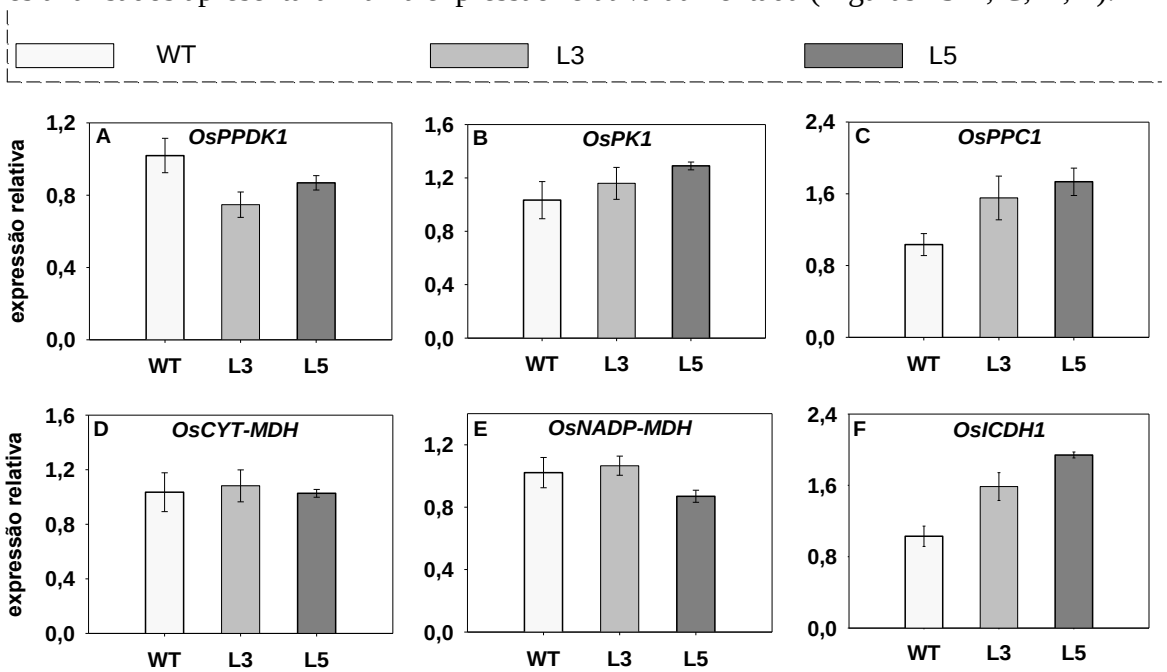



**Figura 25.** Expressão relativa dos genes *OsPPDK1* (fosfato diquinase 1), *OsPK1* (piruvato quinase), *OsPPC1* (fosfoenolpiruvato carboxilase), *OsCYT-MDH* (malato desidrogenase citosólica), *OsNADP-MDH* (malato desidrogenase) e *OsICDH1*(isocitrato desidrogenase), aos 40 dias após germinação (DAG) em folhas de plantas da variedade Piauí (WT) e das linhagens 3 e 5 (L3 e L5 – plantas da variedade Piauí mutantes por nocaute para o gene *OsAAP1*) submetidas a 2 mM constante de N-$NO_3^-$.

O aumento na concentração externa de nitrato gerou um aumento na necessidade de assimilação do nitrato absorvido. Porém, com o gene *OsAAP1* nocauteado e o envio de aminoácidos comprometido, os teores de nitrato e os demais metabólitos oriundos da assimilação do mesmo aumentaram, e aparentemente um dos metabólitos mais acumulado foi a asparagina. Ao comparar a expressão da ASN nas raízes e principalmente nas folhas das plantas mutantes cultivadas em condições de alto N foi possível perceber um pequeno aumento na expressão desse gene nas raízes e um grande aumento nas folhas, de 160 % e 300% para as linhagens 3 e 5, respectivamente.

Sabendo que para a produção da asparagina é necessário aspartato e glutamato (ou amônio) além de ATP, era esperado que as plantas modificassem o seu metabolismo de forma a suprir adequadamente as demandas internas. Apesar do menor gasto energético e de esqueletos de carbono com a assimilação do nitrato pela nitrato redutase e posteriormente pela via GS-GOGAT, devido a expressão dos genes envolvidos nesse processo (o que resultaria em uma regulação negativa no metabolismo de carbono de forma semelhante ao observado em condições de baixo N), foi proposto que a planta direcionou parte do excedente em esqueletos de carbono e de energia para a produção da asparagina, principalmente nas folhas, que mesmo com o uso de parte da energia e de esqueletos de carbono subutilizados nos processos assimilatórios anteriores, regulou positivamente os genes envolvidos na síntese de carboidratos e energia na forma de ATP, tornando possível a assimilação do N acumulado.

Como dito anteriormente a baixa concentração de fosfoenolpiruvato e ATP regulam positivamente a glicólise. Essa regulação possivelmente ocorreu nas plantas mutantes cultivadas sob alto N, uma vez que a expressão dos genes *OsPK1*, *OsCYT-MDH* (L3*)* e *OsPPC1* foi elevada. O aumento na expressão desses genes está relacionado a uma maior produção de piruvato (direcionado ao ciclo de Krebs para a síntese de esqueletos de carbono essenciais ao ciclo do N, entre eles o 2-oxoglutarato e oxaloacetato), de malato (também direcionada ao ciclo de Krebs para a produção dos esqueletos de carbono descritos anteriormente) e de oxaloacetato (que pode ser direcionado ao ciclo de Krebs ou ser prontamente utilizado para a produção do aspartato), respectivamente.

Dois pontos foram extremamente interessantes quanto a expressão desses genes. O primeiro ponto foi que para atender a maior demanda por esqueletos de carbono requeridos para a síntese da asparagina, a planta aumentou de forma mais significativa a expressão do gene *OsPPC1*, levando a maior produção do oxaloacetato, sem precisar passar pelas reações do ciclo de Krebs. Com isso a planta certamente adquiriu de forma mais rápida o oxaloacetato, o qual foi direcionado para a síntese de aspartato e finalmente para a síntese de asparagina, possibilitando a maior produção de asparagina.

Logicamente que a produção de oxaloacetato por meio do piruvato enviado ao ciclo de Krebs tem um saldo neutro no gasto de ATP, uma vez que o gasto inicial de uma molécula é pago posteriormente, durante a síntese de succinato, e além de tudo gera NADH e $FADH_2$. Mas estando em uma condição de estresse, prescisando metabolizar o N que está sendo acumulado, o uso do oxaloacetato produzido por meio da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase, parece uma alternativa totalmente viável.

O outro ponto interessante foi a regulação negativa da expressão do gene *OsPK1*. Levando em conta que esse gene codifica a fosfofrutoquinase dependente de ATP, a qual catalisa a conversão da frutose 6-fosfato em frutose 1-6 bifosfato, que alimenta a via da glicolitica, era de se esperar um aumento na expressão desse gene, uma vez que a expressão dos demais genes aumentou, o que indicava maior necessidade de esqueletos de carbono, entre eles a frutose 1-6 bifosfato, fato que não ocorreu. No entanto ao analisar as vias metabólicas que fornecem produtos a glicólise foi possível perceber que existe um caminho alternativo de fornecimento de carboidratos que independe da atividade da fosfofrutoquinase, que aparentemente gera um gasto energético bem menor, extremamente interessante para plantas que precisam de usar mais intensamente moléculas de ATP para outras reações, nesse caso na síntese de asparagina.

Esse caminho alternativo vem da entrada direta da di-hidroxiacetona 3-fosfato na glicólise. Esse intermediário é produzido nos cloroplastos durante o ciclo de Calvin-Benson, e enviada ao citosol. A entrada desse metabólito significa energeticamente a economia de dois ATPs, que seriam necessários para conversão da glicose a glicose 6-fosfato pela enzima hexoquinase, e a para reação da fosfofrutoquinase dependente de ATP descrita anteriormente.

Além de tudo esse processo propicia a produção mais rápida dos esqueletos de carbono necessários para as reações do ciclo do N, uma vez que reações anteriores são evitadas.

Importante ressaltar que para produzir os metabólitos necessários os cloroplastos atingem taxas apropriadas de transformações bioquímicas por meio de alterações nos níveis de enzimas e atividade catalítica ( $\mu$ moles de enzima/cloroplastos) e atividade catalítica ( $\mu$ moles de substrato convertido/minuto/ $\mu$ mol de enzima) (TAIZ & ZEIGER, 2017), portanto era de se esperar que alterações na expressão relativa de genes que codificam para enzimas ligadas a esses processos metabólicos ocorressem, em reposta a um aumento na demanda energética e de carboidratos para assimilação do N acumulado, o que realmente foi verificado nas plantas mutantes.

Portanto, as plantas com o gene *AAP1* nocauteado, quando submetidas a condições de alto N alteraram o metabolismo de carbono, mediante a regulação de reações em pontos chaves, utilizando ainda diferentes estratégias para otimizar o fornecimento de energia e de esqueletos de carbono aos processos metabólicos.

## 4.3 Experimento 2 (Casa de vegetação)

Durante o período vegetativo as plantas usam parte dos nutrientes absorvidos para o seu desenvolvimento, outra parte é estocado em pools de reserva, que podem ser utilizados ainda durante o período de desenvolvimento vegetativo e/ou durante o período reprodutivo. A produção de grãos em plantas de arroz, assim como em outros cereais, é diretamente dependente da eficiência da planta em realizar esse processo. Dessa forma, alterações que modifiquem a capacidade de absorção e metabolização de determinado nutriente podem prejudicar substancialmente a produção final de grãos.

Portanto, buscou-se determinar as alterações em parâmetros metabólicos, fenotípicos e na EUN causadas pelo nocaute do gene *OsAAP1* em plantas de arroz cultivadas em solo, com uma adubação basal de 60 Kg/ha de N ($KNO_3^-$). Para isso três épocas de coletas foram estabelecidas: antese, 10 dias após antese (10 DDA) e final do ciclo. No experimento 2 foram utilizadas as mesmas sementes do experimento 1.

A seguir, encontram-se os resultados das análises realizadas nessas plantas durante essas coletas. No anexo 9 e 10 é apresentada uma visão geral das alterações ocorridas na expressão gênica, no metabolismo e nas características fenotípicas das plantas mutantes.

### 4.3.1 Metabolitos solúveis e n-total

#### 4.3.1.1 Nitrato

Devido ao fato da adubação nitrogenada ter sido realizada somente aos 30 dias após germinação, cerca de 60 dias antes da primeira coleta, os teores de nitrato encontrados em todas as partes das plantas foram baixos, tanto na antese quanto aos 10 DDA (Figura 26). Nessa condição a maior parte do nitrato absorvido já tinha sido metabolizado, e apenas uma pequena parte encontrava-se estocado nos pools de reserva.

Mesmo com os baixos teores de nitrato determinado, diferenças entre as plantas WT e mutantes foram encontradas. As plantas mutantes apresentaram maiores teores de nitrato com diferenças significativas para as folhas bandeira, colmo e panícula (Figura 26 A). Aos 10 DDA os teores nesses órgãos apresentaram uma tendência de se igualarem, exceto para a F2 da linhagem 5, que apresentou uma queda (Figura 26B).

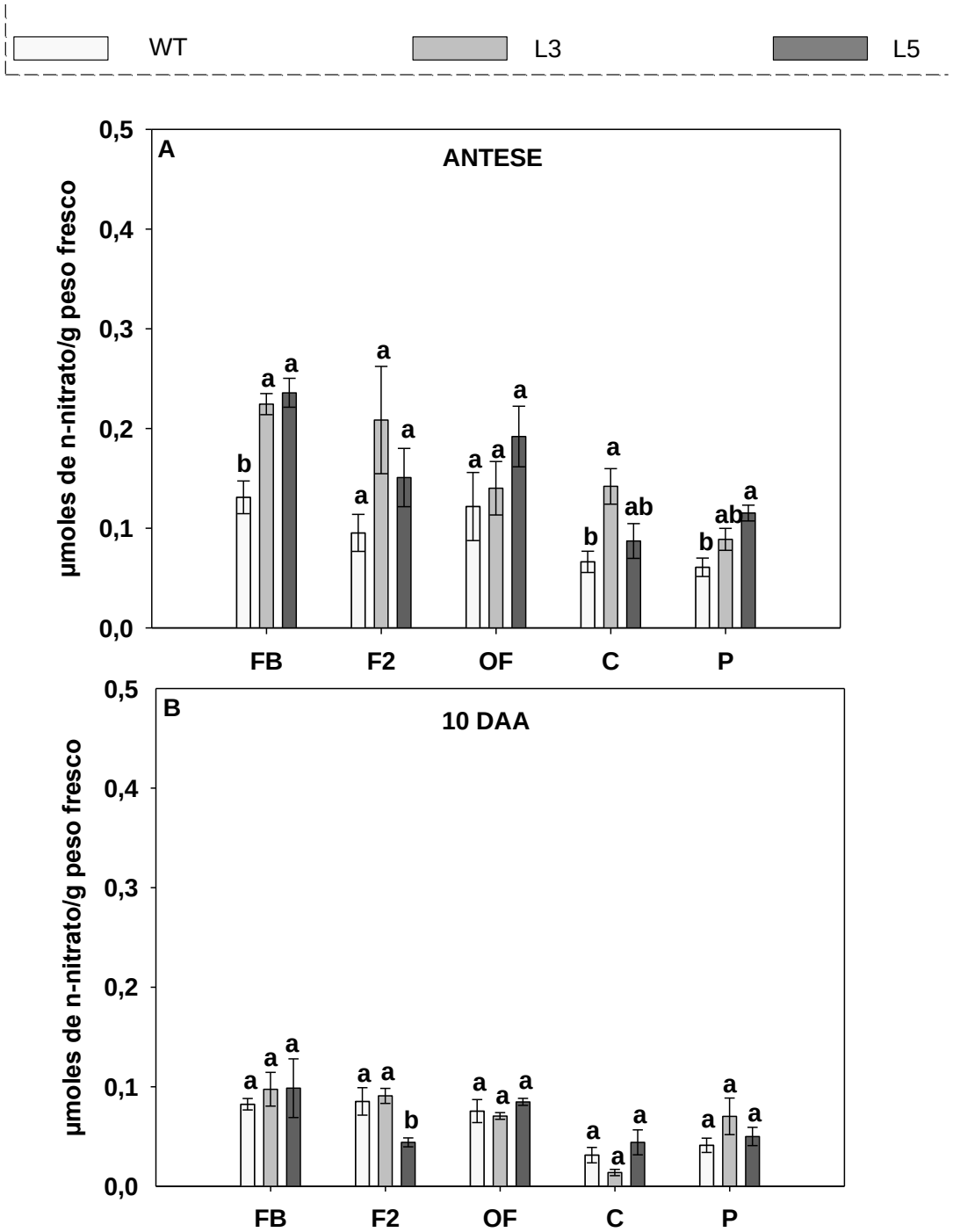



**Figura 26**. Teores de N-nitrato durante a antese (A) e 10 dias após a antese (B) nas folhas bandeira (FB), folhas 2 (F2), outras folhas (OF), colmos (C) e panículas (P) de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene *OsAAP1*. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Duas hipóteses podem explicar o maior teor de nitrato nas plantas mutantes no início da antese. A primeira é que devido ao maior teor de metabólitos acumulados nas linhagens, em decorrência do nocaute do gene *OsAAP1*, o nitrato foi menos utilizado nas reações de redução pela enzima nitrato redutase, sendo assim enviado para os vacúolos. A outra hipótese, a que pareceu mais plausível, foi que as plantas WT iniciaram a remobilização de nitrato mais

cedo, enquanto as linhagens foram um pouco mais tardias, o que gerou um acúmulo inicial nessas linhagens e uma estabilização logo após dez dias.

Ao que parece, o período de dez dias foi suficiente para que as linhagens conseguissem exportar ou metabolizar grande parte do nitrato presente nesses órgãos, se aproximando aos teores das plantas WT. Esse comportamento das plantas mutantes, em relação ao uso de nitrato, ocasionado pela perda de função do transportador AAP1, sugere que esse transportador está diretamente relacionado ao início da remobilização em plantas de arroz.

Os resultados aos 10 DDA sugerem que as plantas mutantes utilizaram de mecanismos para amenizar os danos ocasionadas pela mutação, o que poderá ser melhor visualizado nos resultados de expressão gênica dos transportadores de aminoácidos e de enzimas relacionadas ao ciclo do N.

#### 4.3.1.2 Amônio

As diferenças nos teores de amônio só foram verificadas aos 10 DDA, sendo significativa apenas para as panículas da linhagem 3 (Figuras 27 B). Apesar de não terem sido registradas diferenças no início da antese não significa necessariamente que alterações nos processos que resultam na produção e no uso desse íon não tenham ocorrido. Pode ser que um diferente perfil de aminoácidos esteja sendo sintetizado pelas plantas mutantes, e esses aminoácidos presentes nesse perfil utilizaram o amônio que deveria ter acumulado, não resultando assim em diferenças significativas nos teores durante o início da antese.

Ao serem importados pelas panículas (grãos), alguns compostos nitrogenados são enviados para o embrião ou endosperma. Outros compostos passam por novos processos de assimilação sendo convertidos em proteínas de estoque (processo mais detalhado nos resultados de fracionamento de proteínas e expressão gênica nos grãos), entre outros compostos.

O nocaute do AAP1 possivelmente levou a um menor envio dos aminoácidos presentes nos grãos para o embrião e endosperma, e como poderá ser visto posteriormente (Figura 29B), um maior acúmulo de aminoácidos. Com isso uma menor quantidade de amônio foi destinada para a produção de aminoácidos e proteínas (em grande parte enzimas), o que gerou um acúmulo desse nutriente nas panículas da linhagem 3. SANDERS et al. (2009) relataram um acúmulo de até 2290% de glutamina no endosperma/casca de semente plantas de arabidopsis que apresentavam o gene *AtAAP1* nocauteado.

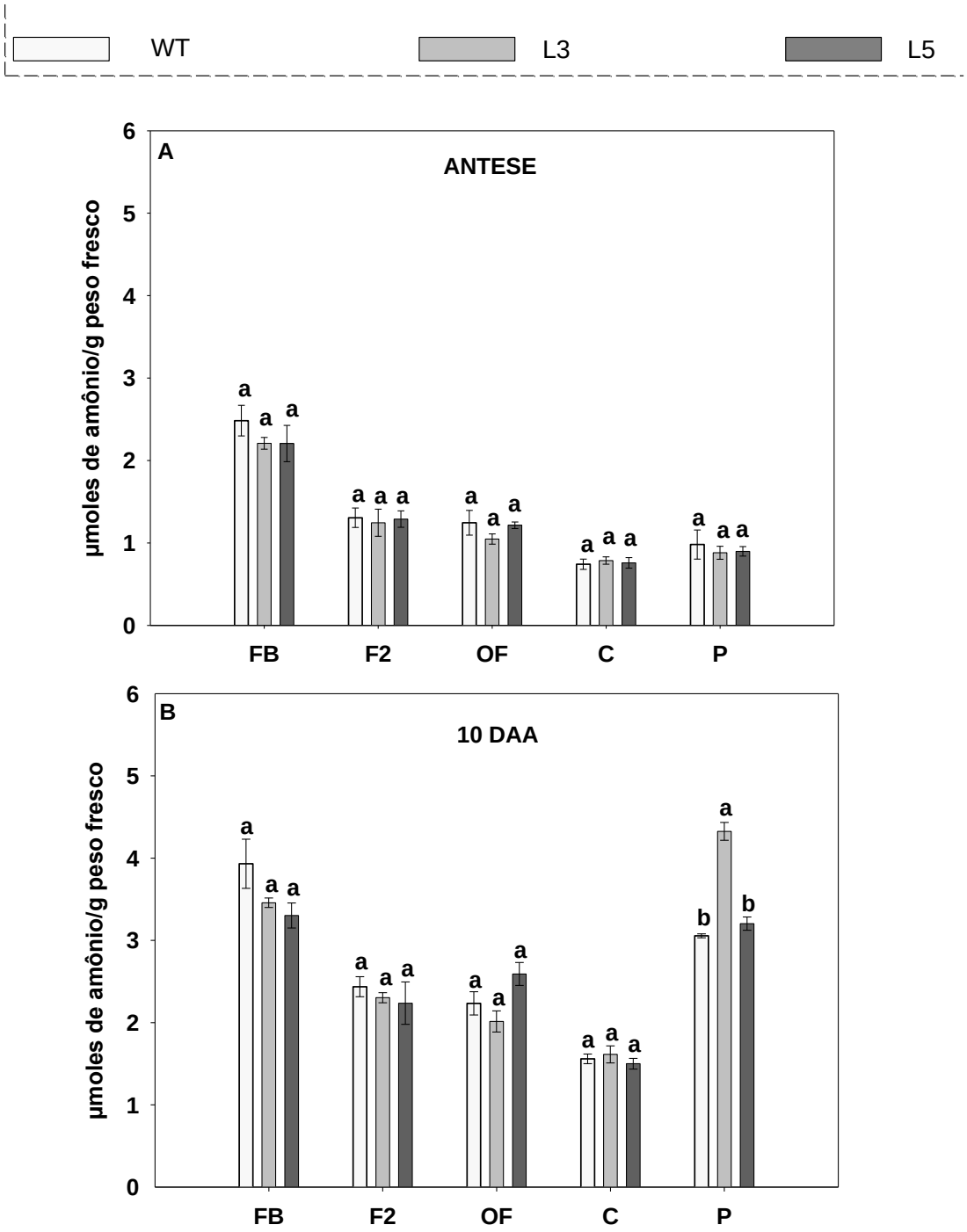



**Figura 27.** Teores de amônio durante a antese (A) e 10 dias após a antese (B) nas folhas bandeira (FB), folhas 2 (F2), outras folhas (OF), colmos (C) e panículas (P) de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene *OsAAP1*. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade.

#### 4.3.1.3 Açúcares solúveis

Os teores de açucares solúveis nas linhagens mutantes apresentaram um padrão de comportamento apenas nos colmos, durante a antese (Figura 28 A) e nos colmos e panículas (Figura 28 B) aos 10 DDA. Nas demais partes, as linhagens 3 e 5 não seguiram um padrão, quando uma linhagem apresentava acúmulo a outra apresentava uma redução, e vice versa, não permitindo maior entendimento das alterações ocorridas.

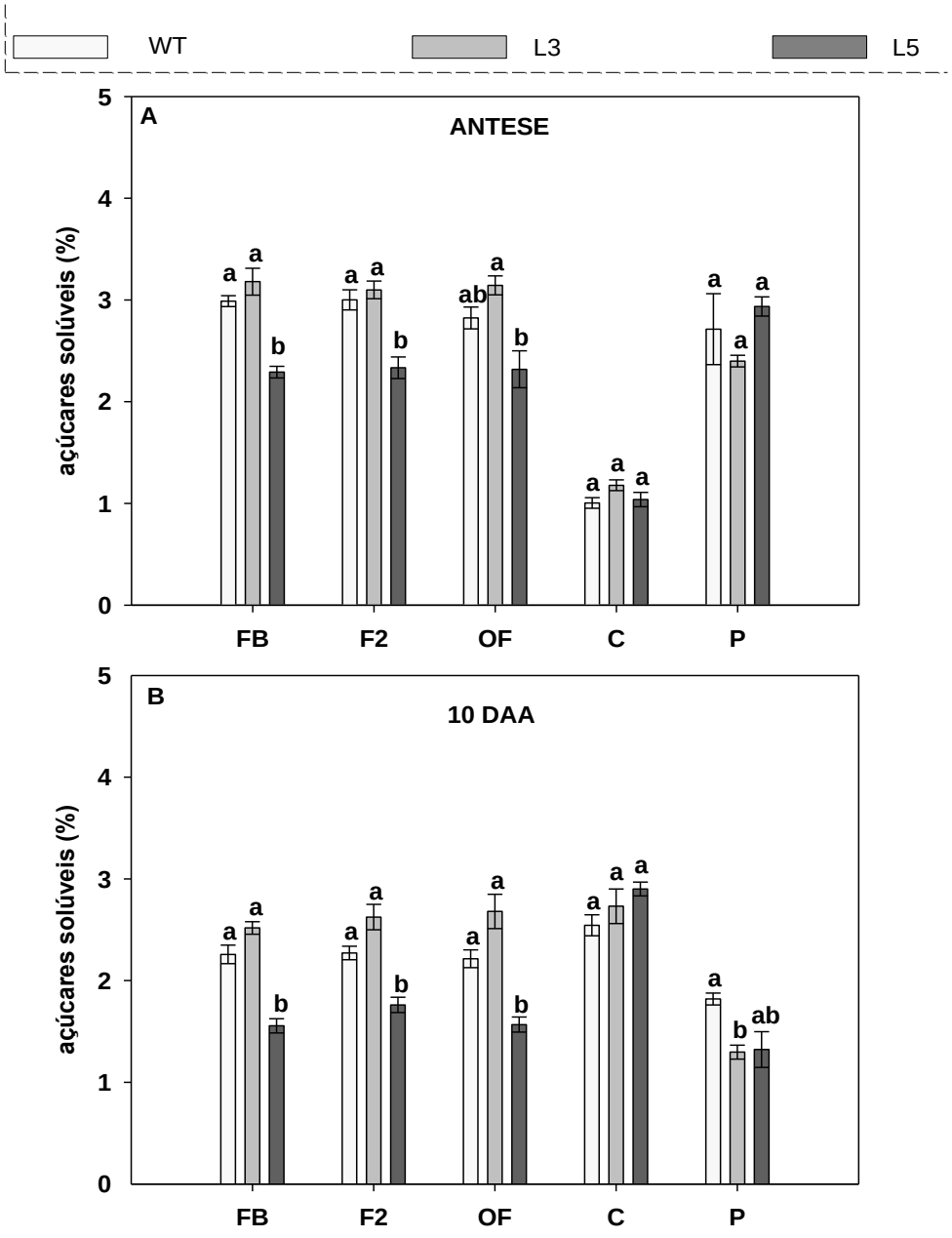



**Figura 28**. Teores de açúcares solúvel durante a antese (A) e 10 dias após a antese (B) nas folhas bandeira (FB), folhas 2 (F2), outras folhas (OF), colmos (C) e panículas (P) de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene *OsAAP1*. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Menor teor de açúcares solúveis foi observado nas panículas aos 10 DDA (Figura 28B), e três processos podem ter contribuído, individualmente ou em conjunto, para esse resultado. Primeiramente, as folhas em decorrência do acúmulo de aminoácidos durante a remobilização podem ter exportado menos açúcares para as panículas em formação. Outra possibilidade foi que em decorrência da diminuição da atividade da GDH (devido a menor expressão do gene *OsGDH 1*, apresentado mais adiante) nas folhas bandeira (somente aos 10 DDA) e folhas 2, menos esqueletos de carbono foram liberados durante o processo de deaminação, justificando os menores teores presentes nas panículas. A terceira possibilidade foi que as plantas mutantes utilizaram boa parte dos esqueletos de carbono importados nas panículas para produção de asparagina (evidenciado pela maior expressão do gene *OsASN1* na panículas das plantas mutantes – Figura 38B), que nesse caso pode ter ocorrido não somente para economizar carboidratos pelo aumento da relação N:C, mas também para armazenar o N acumulado (amônio e aminoácidos) devido à perda de atividade do transportador AAP1, responsável pela envio de aminoácidos para o embrião como observado em plantas de arabidopsis (SANDERS et al., 2009).

#### 4.3.1.4 Aminoácidos livres

A maior parte do nitrogênio é exportado das folhas como aminoácidos, durante a senescência as folhas se tornam uma grande fonte de aminoácidos (WHITE et al., 2016). A remobilização eficiente e o subsequente uso de N pelos drenos (panículas) são importantes para a elevada produção de sementes (BARNEIX, 2007). Sendo assim um acúmulo de aminoácidos pode prejudicar substancialmente a produtividade.

As plantas mutantes coletadas durante a antese apresentaram maiores teores de aminoácidos totais nas folhas bandeira (apenas para a linhagem 3) e folhas dois. De forma distinta menores teores foram registrados nos colmos e panículas (Figura 29 A).

Esse acúmulo de aminoácidos nas folhas, e os menores teores nos colmos e panículas no início da antese, corrobora com a hipótese de retardo na senescência das plantas mutantes, em que as plantas selvagens, remobilizaram mais rapidamente os aminoácidos das folhas (grande fonte) até as panículas (forte dreno). As diferenças encontradas nas plantas mutantes estão de acordo com o acúmulo esperado devido à perda de função do transportador AAP1, envio de aminoácidos para os vasos condutores, sugerido por PERCHLICK et al. (2017), que por meio da superexpressão do transportador AAP1 em plantas de arabidopsis relataram diferenças (acúmulo) de aminoácidos totais no xilema e em exsudados extraídos dessas plantas, cultivadas em baixo, moderado ou alto N.

Na coletada realizada aos 10 DDA foi verificado um acúmulo de aminoácidos nas folhas bandeira e nas panículas (Figura 29 B) das plantas mutantes. O acúmulo observado nas folhas bandeira na antese manteve-se mesmo após dez dias, diferente do observado para o nitrato, o qual tendeu a igualar aos teores das plantas mutantes. Esse acúmulo foi devido a menor capacidade dessas linhagens em remobilizar essa fonte de N. Porém, boa parte dos aminoácidos remobilizados para os grãos, acumularam (principalmente na L3), indicando que o envio e importação de aminoácidos aconteceu, porém como poderá ser visto mais adiante, esse envio e importação nas plantas mutantes alteraram a expressão de outros transportadores de aminoácidos, no intuito de suprir o papel do AAP1, com isso alterações podem ter ocorrido no perfil de aminoácidos importados pelos grãos.

Como relatado anteriormente, o transportador AAP1 foi caracterizado em arabidopsis como responsável pelo efluxo de aminoácidos para o embrião. Portanto, esse maior teor de aminoácidos, que não refletiu em maior teor de proteína bruta (dado apresentado em outra seção – Figura 32), foi possivelmente acumulado em outros compartimentos (possivelmente no apoplasto das sementes).

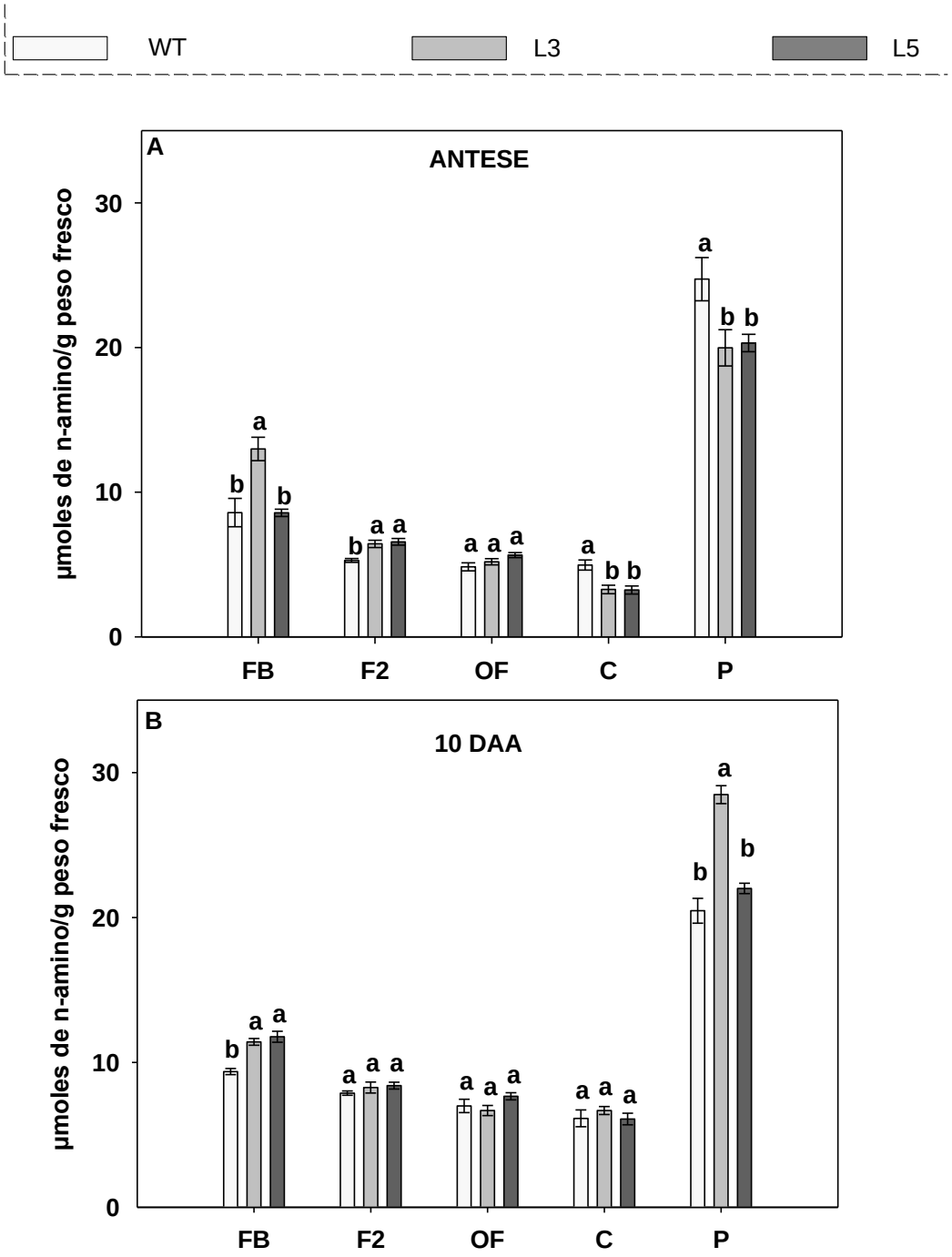



**Figura 29**. Teores de N-amino durante a antese (A) e 10 dias após a antese (B) nas folhas bandeira (FB), folhas 2 (F2), outras folhas (OF), colmos (C) e panículas (P) de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene *OsAAP1*. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Como poderá ser visto nos dados de expressão gênica, asparagina possivelmente foi responsável por grande parte dos aminoácidos acumulados nas folhas 2 durante a antese e nos grãos aos DDA, visto o aumento na expressão do gene que codifica para a asparagina

sintetase (*OsASN 1*) e diminuição na expressão da glutamina sintetase, indicando alterações no perfil de aminoácidos nas plantas mutantes.

Esse maior teor de aminoácidos nas panículas foi acompanhado da redução dos teores de açúcares solúveis (Figura 28 B), indicando que a planta utilizou esses esqueletos de carbono para armazenar boa parte do N importado nas sementes, como já foi proposto anteriormente.

### 4.3.2 Teor e conteúdo de n-total

A determinação do teor e do conteúdo de N-total permite um registro em conjunto dos metabólitos nitrogenados solúveis (nitrato, amônio e aminoácidos) bem como do N armazenado nos tecidos em formas proteicas (proteínas solúveis, enzimas, proteínas estruturais), sendo muito útil para o presente estudo, pois permitiu a observação da distribuição do N entre as diferentes partes das plantas no início da antese e no final do ciclo.

Na antese maiores teores de N-total foram encontrados nas folhas 2 (F2) e outras folhas (OF) e menores teores nos colmos e nos grãos das linhagens (Figura 30A). Comportamento semelhante foi observado no conteúdo de N-total (Figura 31A). Esses resultados reforçaram a hipótese apresentada anteriormente, de alteração (atraso) no início da remobilização dos compostos nitrogenados pelas plantas mutantes. Os maiores teores e conteúdo de N nas folhas 2 e menores nas panículas associado aos maiores teores de aminoácidos livres, o que reforçou a participação desse metabólito no teor de N durante essa fase.

No final do ciclo, foi verificado acúmulo de N nas F2, nos colmos (C) e nas cascas (palea+lema) das plantas mutantes (Figura 30 B), indicando novamente alterações na capacidade de remobilização das plantas mutantes e o papel do AAP1 nesse processo. Além do exercer o papel de regulação na absorção de N e no metabolismo, alguns transportadores de aminoácidos influenciam no carregamento do floema, como o AAP1 em arabidopsis, afetando a quantidade de N remobilizado das fontes para os drenos, alterando dessa forma o desenvolvimento dos drenos (TAN et al., 2010; SANTIAGO & TEGEDER, 2016).

Os grãos não apresentaram alteração no teor de N total, porém nesse caso deve-se considerar que o perfil dos aminoácidos foi o parâmetro que possivelmente sofreu alterações, e não o N-total. O que pode ser proposto devido ao aumento na expressão de outros transportadores de aminoácidos (os quais possuem afinidade por diferentes substratos) e pelo acúmulo de aminoácidos que certamente ocorreu em diferentes compartimentos das sementes. Interessante notar que um dos locais de acúmulo pode ter sido as cascas, uma vez que o acúmulo de N foi observado. Isso sugere um papel do transportador AAP1 também na importação de N das cascas para o interior das sementes, sem o qual o processo fica comprometido, uma vez que mesmo com o aumento na expressão de outros transportadores (como será mostrado posteriormente), o N permaneceu acumulado.

Um maior conteúdo de N-total foi registrado nas F2 e nos colmos das plantas mutantes ao final do ciclo. Em contrapartida, os grãos tiveram um menor conteúdo, sendo que apenas a linhagem 3 teve uma diferença significativa quando comparada a WT. Essa menor concentração foi sobretudo influenciada pela produção de grãos dessas linhagens, que foi reduzida principalmente nas plantas da linhagem 3.

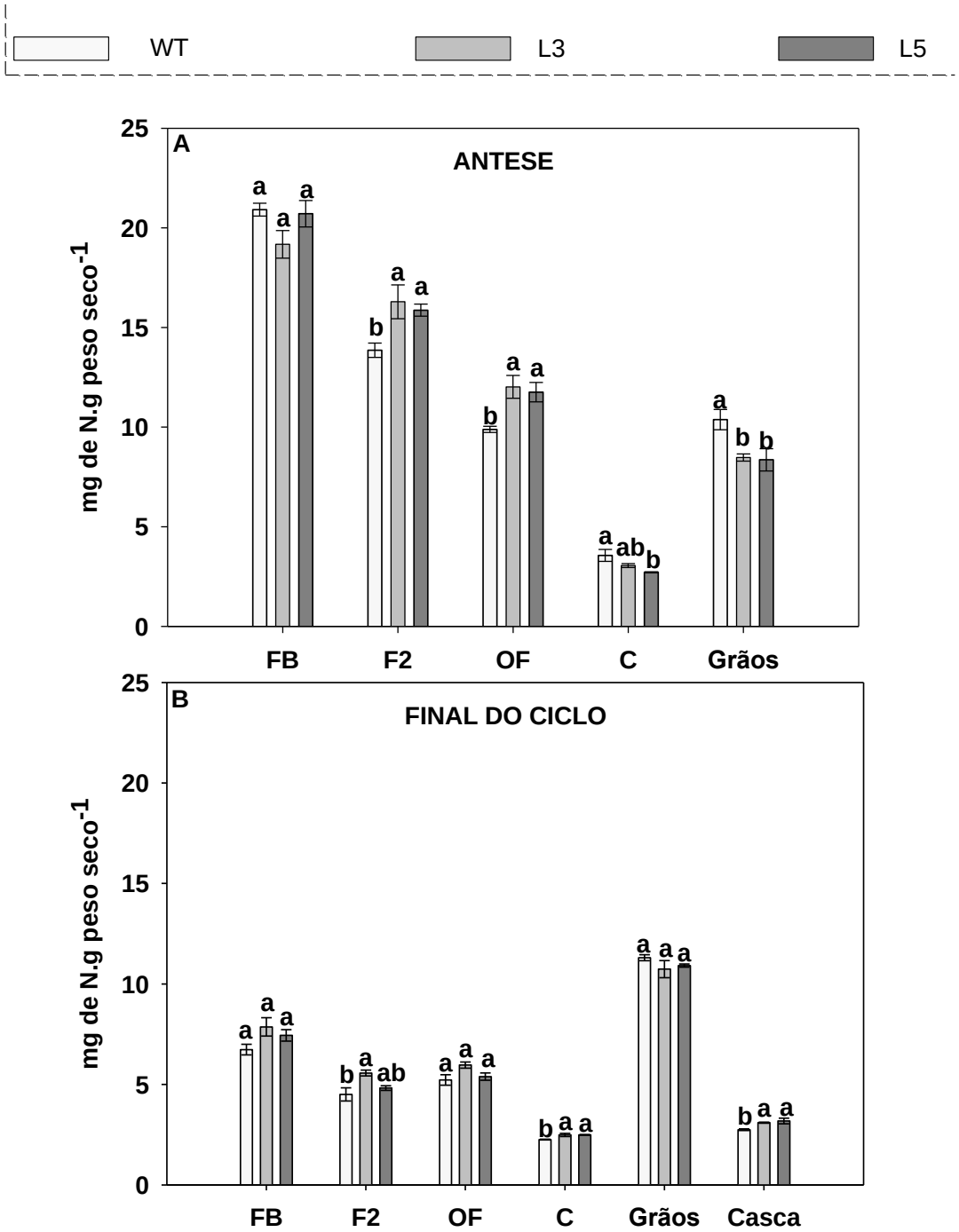



**Figura 30.** (A) Teores de N-total durante a antese e (B) final do ciclo nas folhas bandeira (FB), folhas 2 (F2), outras folhas (OF), colmos (C), Grãos e casca de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene *OsAAP1*. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade.

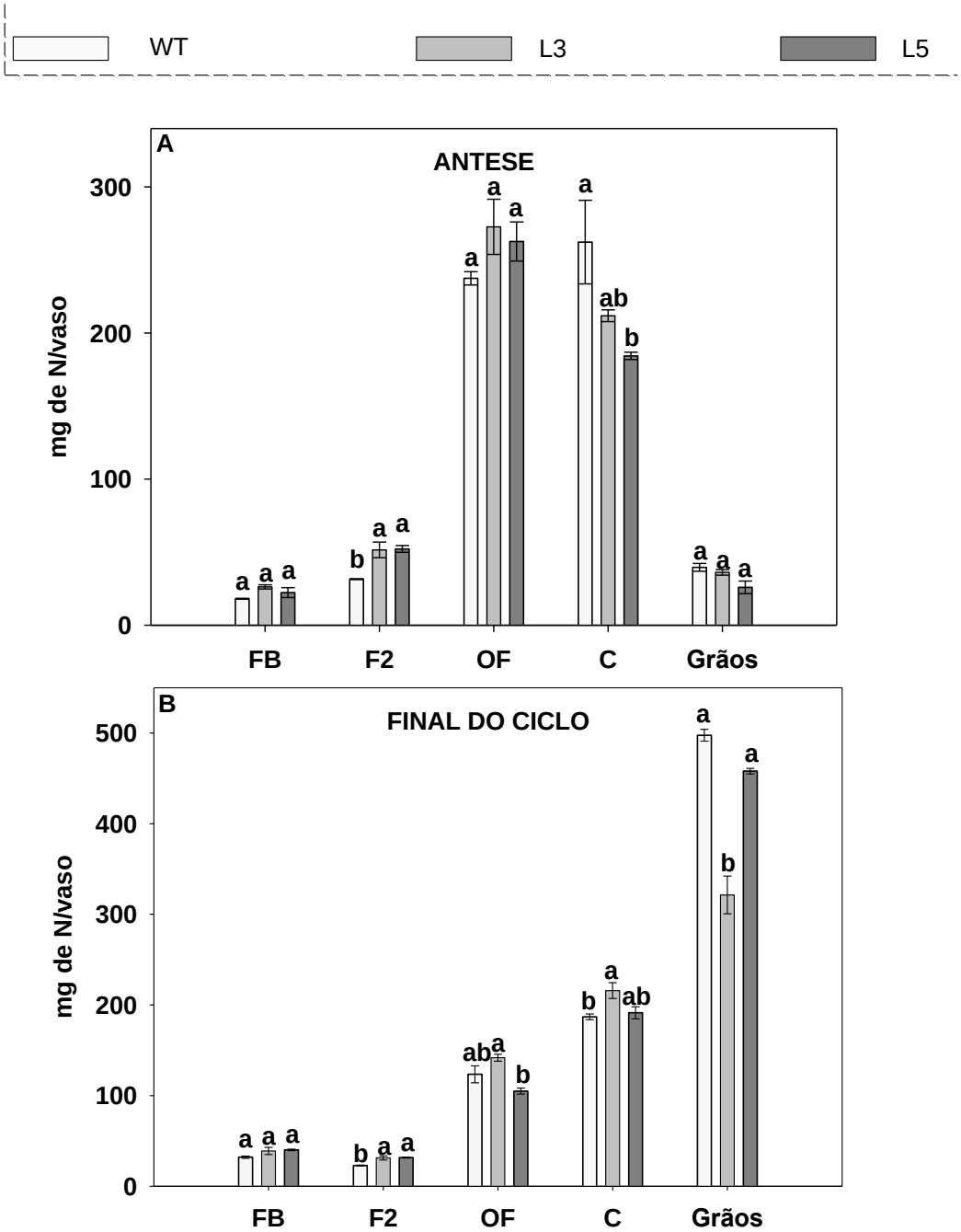



**Figura 31.** (A) Conteúdo de N-total durante a antese e (B) final do ciclo nas folhas bandeira (FB), folhas 2 (F2), outras folhas (OF), colmos (C), Grãos e casca de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene *OsAAP1*. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### 4.3.3 Proteína bruta e frações proteicas

Não houve alterações significativas no teor de proteína bruta para os grãos em final de ciclo (Figura 32). Como esse parâmetro foi obtido pela multiplicação do teor de N-total nos grãos em final de ciclo pela constante 5,95, realmente não eram esperadas diferenças, uma vez

que o teor de N-total nos grãos das plantas mutantes no final de ciclo também não foram significativos.

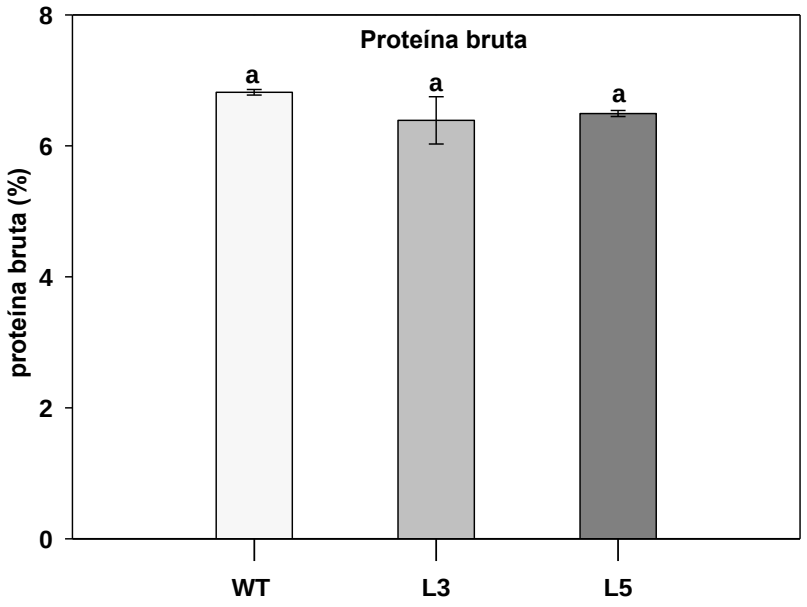



**Figura 32.** Teor de proteína bruta em grãos de arroz no final do ciclo de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade modificadas por nocaute para o gene *OsAAP1*. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Possivelmente, quando se trabalha com plantas mutantes para transportadores de aminoácidos, esse parâmetro não seja um indicador preciso. Por exemplo, o transportador AAP1 em arabidopsis, além de participar no envio de aminoácidos para os vasos condutores (PERCHLIK, 2017), foi caracterizado como responsável pelo envio de aminoácidos para o embrião em formação (SANDERS et al., 2015). Sendo assim, o nocaute desse gene pode ter resultado em um acúmulo de N não proteico nos grãos das plantas mutantes, como pode ser visto nos teores de aminoácidos livres aos 10 DDA. Quando determinado o teor de proteína bruta, usando o teor de N-total, boa parte dessa proteína pode ter sido na verdade apenas aminoácidos livres acumulados nesses grãos.

No entanto, outras abordagens presentes na literatura, foram eficientes para quantificar o teor proteico em sementes de plantas mutantes. SANDERS et al. (2015), relataram uma redução de até 22% no conteúdo de proteína solúvel em linhagens de arabidopsis que apresentava o nocaute do gene *AtAAP1*. Determinação realizada com kit específico para quantificação de proteínas. Outra técnica utilizada pelo mesmo autor foi a SDS-PAGE que permitiu claramente a visualização na redução de globulina e albumina em plantas mutantes.

Buscando uma determinação mais precisa dos teores proteicos, foi realizado o fracionamento de proteínas, de acordo com SOUZA (1990).

As plantas mutantes apresentaram maiores teores de glutelina e albumina+globulina, não sendo significativo para a prolamina (Figura 33 A). Este teor pode ter sido fortemente influenciado pelo peso dos grãos, que como poderá ser visto adiante, diferiu significativamente entre plantas mutantes e WT, o que levou a um efeito de concentração dessas proteínas nesses grãos.

Com isso, também foi analisado as concentrações (mg/grão) dessas proteínas (Figura 33B). Interessantemente os valores de glutelina e albumina+globulina não diferiram das plantas WT, porém a concentração de prolamina foi menor nas linhagens.

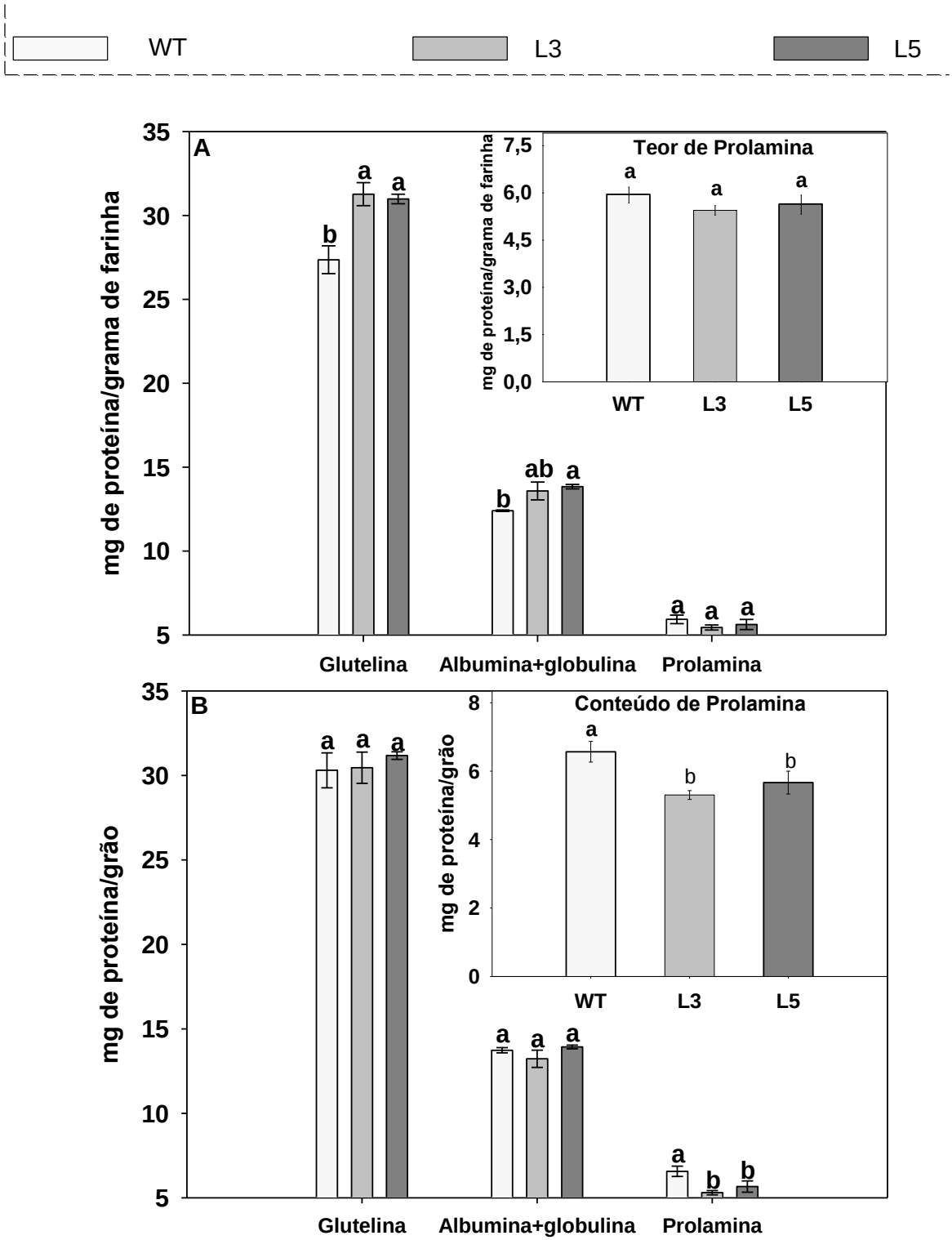



**Figura 33.** (A) Teor e (B) conteúdo de proteína em grãos de arroz no final do ciclo de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene *OsAAP1*. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No intuito de determinar o motivo da diminuição da concentração de prolamina, buscou-se na literatura os aminoácidos que compõe essa fração proteica. WOO & THOMAS. (1988), trabalhando com clones de DNA codificante para prolamina em arroz, dividiu esses clones em duas classes de homologia e determinou o conteúdo de aminoácidos nessas duas classes. A glutamina foi o aminoácido mais abundante para ambos os clones (20,1 e 23,7 %).

Em levantamento das sequências codificantes no banco de dados de arroz (Rice Genome Annotation Project) pode-se determinar os teores de glutamato, glutamina, aspartato e asparagina nas proteínas de armazenamento anteriormente citadas (Tabela 5).

**Tabela 5**. Porcentagem de aminoácidos por proteína de reserva (dados obtidos na plataforma Rice Genome Annotation Project)

| | Aminoácidos (%) | | | |
|---|---|---|---|---|
| Proteína | Asparagina | Aspartato | Glutamato | Glutamina |
| Globulina | 3,30 | 4,00 | 7,24 | 2,49 |
| Albumina | 3,03 | 2,66 | 2,85 | 8,83 |
| Prolamina | 4,11 | 2,35 | 1,18 | 15,79 |
| Glutelina | 6,63 | 3,12 | 5,74 | 9,53 |

Entre as proteínas de reserva a prolamina foi a que apresentou a maior percentagem de glutamina (15,79 %), e a glutelina a maior percentagem de asparagina (6,63 %). Dentre os quatro aminoácidos analisados a glutamina foi a mais abundante na prolamina, corroborando com os resultados de WOO & THOMAS, (1988).

Diante dessas informações, pode-se chegar nas seguintes conclusões: considerando que a glutamina e a asparagina são aminoácidos transportados pelo transportador AAP1, o nocaute desse gene ocasionou uma deficiência na exportação de aminoácidos das folhas (evidenciado pelo acúmulo de aminoácidos nas folhas bandeira) e/ou importação pelo embrião (evidenciado pelo acúmulo de aminoácidos nos grãos). A deficiência no envio de aminoácidos para o embrião gerou um acúmulo provavelmente no apoplasto das sementes, o que desencadeou um aumento na síntese de asparagina e diminuição na síntese de glutamina (evidenciado pelo aumento na expressão da asparagina sintetase e diminuição na expressão da glutamina sintetase, mostrada a seguir). Com isso, a produção (concentração) de prolamina, mais dependente de glutamina do que as demais proteínas de armazenamento, foi afetada negativamente, corroborando assim com as menores concentrações de prolamina.

Por outro lado, a maior síntese de asparagina, não foi revertida em glutelina, indicando um acúmulo desse aminoácido.

Com base nos resultados do fracionamento proteico, pode-se concluir que o nocaute do gene *AAP1* influencia também a produção de prolamina, sem afetar as demais frações proteicas.

De um ponto de vista nutricional, a diminuição na concentração de prolamina em grãos de arroz é um aspecto positivo, uma vez que essa proteína possui um baixo valor nutricional, sendo menos relevante para alimentação. Porém, mais interessante seria se, juntamente com a diminuição de prolamina fosse registrado um aumento na concentração de glutelina, por ser uma proteína de alto valor nutricional.

### 4.3.4 Expressão gênica

#### 4.3.4.1 Genes do metabolismo de n

Diferentes padrões na expressão gênica foram observados entre folhas 2 e folhas bandeira no início da antese. Nas folhas 2, com exceção do gene *OsASN 1*, que foi mais expresso nas plantas mutantes (Figura 34 A), os demais genes, *OsAST1*, *OsFd-GOGAT*, *OsGDH1*, *OsGS1.1* e *OsGS2* apresentaram menor expressão relativa (Figura 34 B-34F).

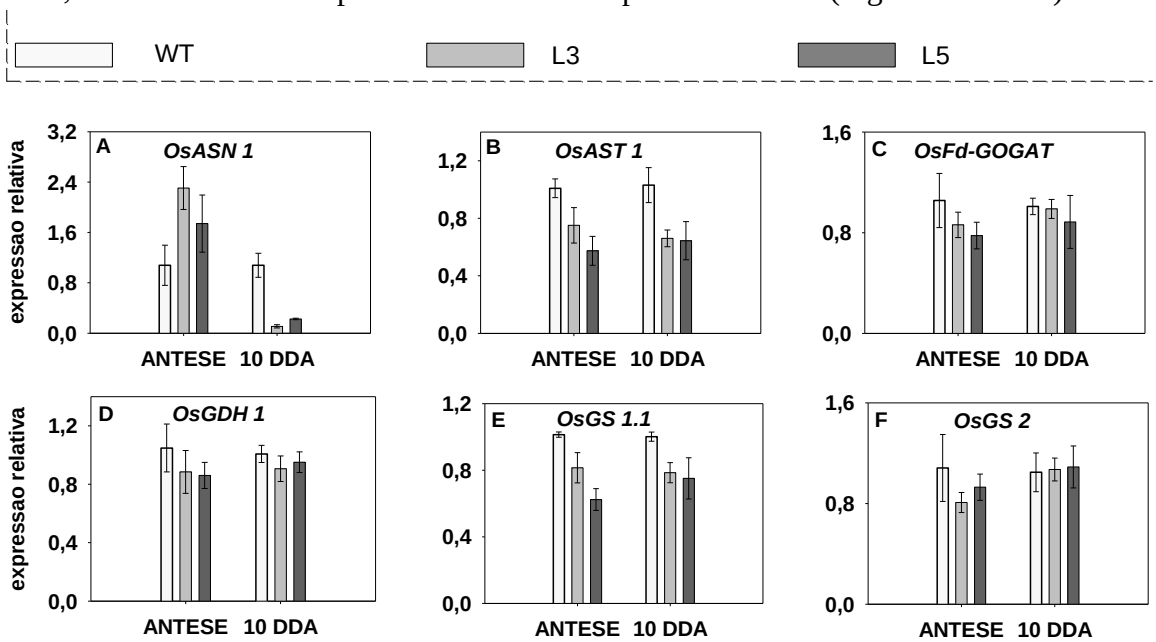



**Figura 34.** Expressão relativa durante a antese e dez dias após a antese (10 DAA) dos genes *OsASN 1* (asparagina sintetase 1), *OsAST 1* (aspartato aminotransferase), *OsFed-GOGAT* (ferredoxina-glutamato sintase) *OsGDH 1* (glutamato desidrogenase 1), *OsGS 1.1* (glutamina sintetase 1) e *OsGS 2* (glutamato sintase 2) em folhas 2 de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene *OsAAP1*. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Nas folhas bandeira, somente os genes *OsASN1* e *OsAST 1* tiveram expressão relativa reduzida (Figura 35 A e 35 B), enquanto *OsFd-GOGAT*, *OsGDH 1*, *OsGS 1.1* e *OsGS2* (Figura 35 C-F) foram relativamente mais expressos.

Essa diferença ocorreu, possivelmente, porque as folhas 2 estavam menos esverdeadas do que as folhas bandeira já no início da antese, indicando um processo de senescência mais intenso. Segundo FERNANDES (2018) proteínas dos cloroplastos são degradadas já no início da senescência, e liberam aminoácidos para regiões reprodutivas o que explica a menor expressão relativa nas folhas 2 das plantas mutantes, uma vez que o processo de senescência ainda não estava avançado.

Uma maior expressão dos genes *OsGS 2* e *OsGOGAT* nas folhas bandeira indicou que nessas folhas o processo de senescência ainda não tinha sido iniciado ou estava iniciando evidenciado pela maior expressão da *GDH 1* e *GS 1.1*, enzimas que normalmente tem uma atividade e expressão aumentada com o avançar da senescência.

Outro ponto a ser levantado é que, se o processo tinha iniciado, ele estava menos intenso do que as plantas WT, uma vez que, por estarem localizadas nos cloroplastos, essas

enzimas deveriam apresentar uma redução na expressão durante a senescência, uma vez que são as primeiras enzimas do ciclo do N a serem afetadas pela senescência, o que não ocorreu. A maior expressão da GS 2 corrobora com essa hipótese, pois de acordo com CORUZZI et al. (2015), a GS2 plastidial é a isoforma de glutamina sintetase predominte nas folhas, podendo atuar na assimilação primária do amônio e na reassimilação do amônio fotorrespiratório. Levando em consideração que os níveis internos de nitrato estavam baixos, o amônio assimilado em grande parte foi provavelmente oriundo da fotorrespiração e não da redução do nitrato, indicando que o metabolismo de carbono continuou bem ativo, sem maiores danos, diferentemente das plantas WT.

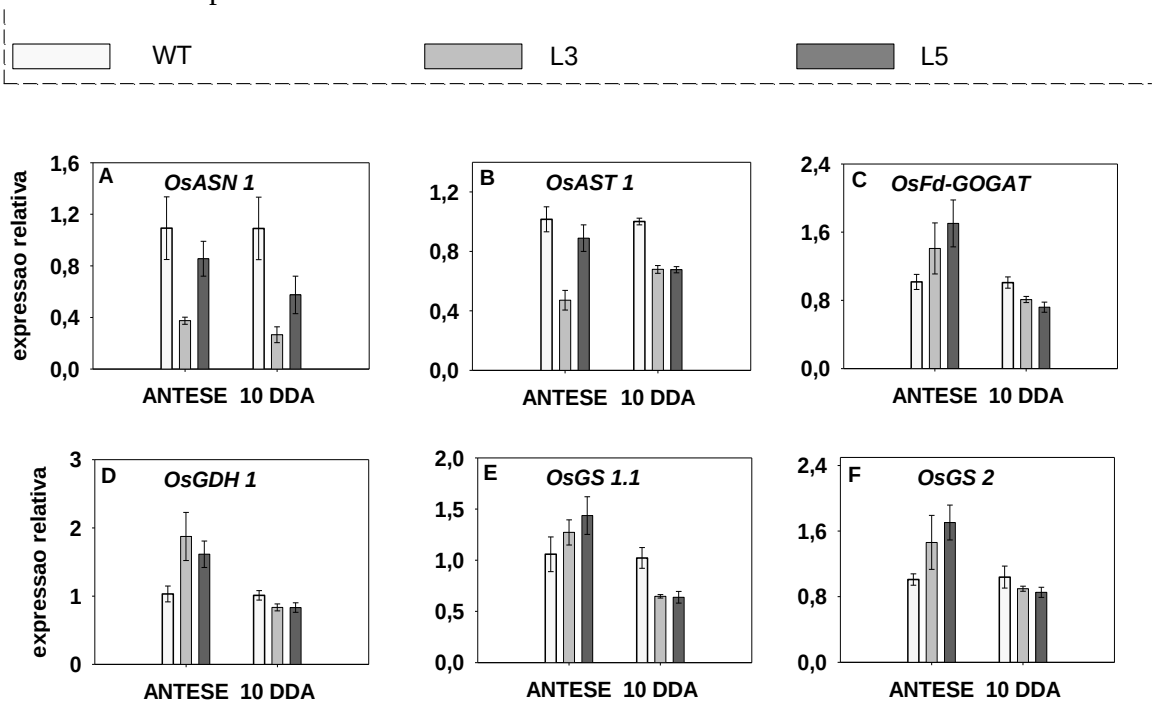



**Figura 35.** Expressão relativa durante a antese e dez dias após a antese (10 DAA) dos genes *OsASN 1* (asparagina sintetase 1), *OsAST 1* (aspartato aminotransferase), *OsFed-GOGAT* (ferredoxina-glutamato sintase) *OsGDH 1* (glutamato desidrogenase 1), *OsGS 1.1* (glutamina sintetase 1) e *OsGS 2* (glutamato sintase 2) em folhas bandeira de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene *OsAAP1*. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados indicaram que o nocaute do AAP1 causou um atraso no início da senescência nas folhas bandeira, uma vez que transcritos de enzimas cloroplásticas ainda estavam sendo sintetizadas nessa fase de desenvolvimento.

No entanto, no início da antese, as folhas 2 já estavam todas em processo de senescência, e as plantas mutantes aparentemente, apresentaram uma degradação mais deficiente de suas reservas, uma vez que todas os genes envolvidos nesse processo foram menos expressos. Essa menor expressão pode ter sido ocasionada por deficiência no processo de exportação de aminoácidos para órgãos drenos, o que levou uma repressão nos genes *OsGDH 1* e *OsGS1.1*, que codificam transportadores responsáveis pela deaminação de aminoácidos (glutamato) e formação de glutamina no citosol das células durante o período reprodutivo. Segundo FERNANDES et al. (2018), durante o período reprodutivo, tanto a expressão como a atividade das enzimas GS1 e GDH 1 aumentam, o que sugere a participação dessas enzimas na remobilização de N.

As plantas mutantes durante a antese apresentaram uma maior expressão relativa da asparagina sintetase (Figura 34 A) nas folhas 2, enquanto as plantas selvagens apresentaram maior expressão da glutamina sintetase (Figura 34 E). As amidas asparagina e glutamina predominam em relação ao aspartato e glutamato em condições de senescência (FERNANDES et al., 2018), sendo que a glutamina contribui com 42% do total de aminoácidos no floema de arroz e é a principal forma de aminoácidos translocado durante a senescência (HAYASHI e CHINO, 1990).

Em arabidopsis o transportador AAP1 possui a asparagina e a glutamina como substratos, dessa forma acredita-se que plantas de arroz também possuam afinidade por esses aminoácidos. No presente estudo, levando em conta que tanto a asparagina quanto a glutamina são transportados pelo AAP1 de arroz, a perda na função desse transportador teve um efeito, aparentemente, mais danoso na síntese de glutamina, o que pode ter sido uma estratégia das plantas mutantes para favorecer o envio de N por outro transportador que tinha um papel mais efetivo no transporte de asparagina do que glutamina. Um desses transportadores pode ter sido o AAP18, que dentre os transportadores de aminoácidos analisados nesse estudo foi o único que durante o início da antese, nas folhas 2, teve uma expressão aumentada (Figura 36)

Esse mesmo comportamento não foi observado nas folhas bandeira, nessa mesma fase, possivelmente pelo fato de não estar em senescência ainda ou estar com uma senescência menos intensa, como relatado anteriormente. Porém o padrão de expressão do AAP18 relatado nas folhas 2 manteve-se nas folhas bandeira, o que levou a concluir que este transportador talvez apresente afinidade também para outros aminoácidos sintetizados durante esse período.

Com o avanço do processo de senescência, aos 10 DDA, um padrão semelhante de expressão foi obtido para as folhas 2 e folhas bandeira (Figuras 34 e 35). As plantas WT tiveram uma expressão sempre superior as plantas mutantes, exceto para o gene *OsGS2*, que foi igual nas folhas 2 (Figura 34F). Esse resultado corroborou com a hipótese de atraso na senescência nas folhas bandeira, pois com 10 DDA um padrão de comportamento de expressão foi estabelecido para todos os genes em estudo, o que tinha sido registrado apenas para *OsASN1* e *OsAST1* no início da antese.

A menor expressão nas plantas mutantes e o acúmulo significativo de aminoácidos nas folhas bandeira, indicam que o acúmulo ocasionado pelo nocaute AAP1 levou a uma senescência um pouco mais branda, devido sobretudo a regulação negativa de enzimas envolvidas nesse processo.

#### 4.3.4.2 Genes do metabolismo de n –transportadores de aminoácidos (FB e F2)

A maior parte do nitrogênio é transportado como aminoácidos durante a senescência de folhas fonte, (TEGEDER & MASCLAUX, 2017), os quais são obtidos de proteínas (enzimáticas ou não) que passam por degradação por proteases, liberando aminoácidos para o citosol (HAVÉ, et al., 2016). Uma parte dos aminoácidos passam por reações de transaminação para a síntese principalmente de glutamina e asparagina, que são exportadas através do floema, até as sementes. Esse processo envolve um grande número de transportadores de aminoácidos, que apresentam características próprias como o período de expressão, substrato e cinética.

Os transportadores em estudo apresentaram diferentes padrões de expressão em resposta ao nocaute do gene *OsAAP1*.

Menor expressão relativa foi obtida para os genes *OsAAP3*, *OsAAP5*, *OsAAP8* e *OsCAT1* em folhas 2 (Figura 36 B, C, D, F) e folhas bandeira (Figuras 37 C, D, F) durante a

antese, exceto para o gene *OsAAP3* nas folhas bandeira (Figura 37 B), que teve um aumento de expressão na linhagem 5.

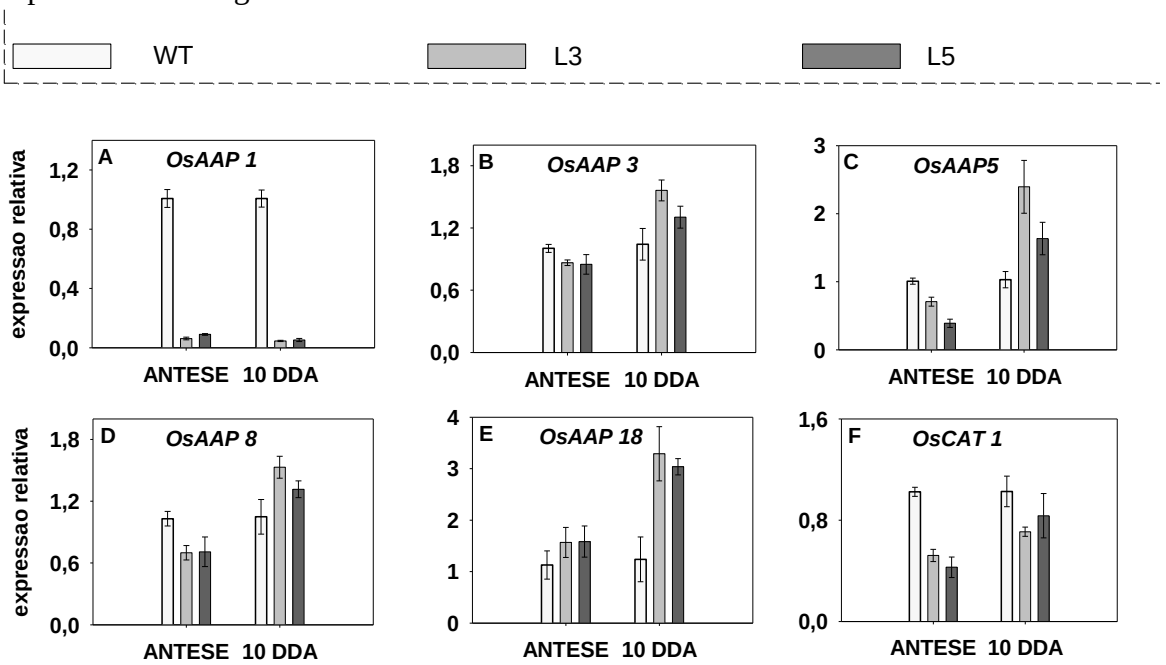



**Figura 36.** Expressão relativa durante a antese e dez dias após a antese (10 DAA) dos genes *OsAAP1* (aminoácido permease 1), *OsAAP3* (aminoácido permease 3), *OsAAP5* (aminoácido permease 5) *OsAAP8* (aminoácido permease 8), *OsAAP 18* (aminoácido permease 18) e *OsCAT 1* (transportador de aminoácidos catiônicos) em folhas 2 de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene *OsAAP1*. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Essa menor expressão no início da antese resultou no acúmulo de aminoácidos totais nas folhas bandeira (linhagem 3) e folhas 2, e menor teor nas panículas, como relatado anteriormente.

O gene *OsAAP18* teve um aumento de expressão em ambas as folhas, sendo que na folha bandeira foi registrado um aumento de 8 vezes para a linhagem 5 (Figura 37E).

Dentre os genes analisados, durante o início da antese, apenas o gene *OsAAP18* apresentou como uma alternativa para suprir o papel do nocaute do *OsAAP1*. Essa redundância funcional não pode ser confirmada, uma vez que esse gene ainda não foi totalmente caracterizado em plantas de arroz. De acordo com COELHO, (2015) o gene *AAP18* de arroz está envolvido na remobilização de aminoácidos para os grãos, e a perda de função desse gene leva ao abortamento de aproximadamente 86% dos grãos.

Aos 10 DDA as folhas bandeira mantiveram o mesmo padrão de expressão descrito acima (maior expressão apenas do *OsAAP18*).

No entanto, as folhas 2 aos 10 DDA, teve uma maior expressão relativa dos genes *OsAAP3*, *OsAAP5*, *OsAAP8* e *OsAAP18* (Figura 36 B-E). Sendo assim, o aumento na intensidade do processo de remobilização, gerou a necessidade de produzir proteínas que pudessem transportar os aminoácidos que estavam sendo acumulados em decorrência da ausência funcional do transportador AAP1, o que aparentemente foi efetivo, uma vez que aos 10 DDA o acúmulo de aminoácidos totais não foi mais registrado nas folhas 2.

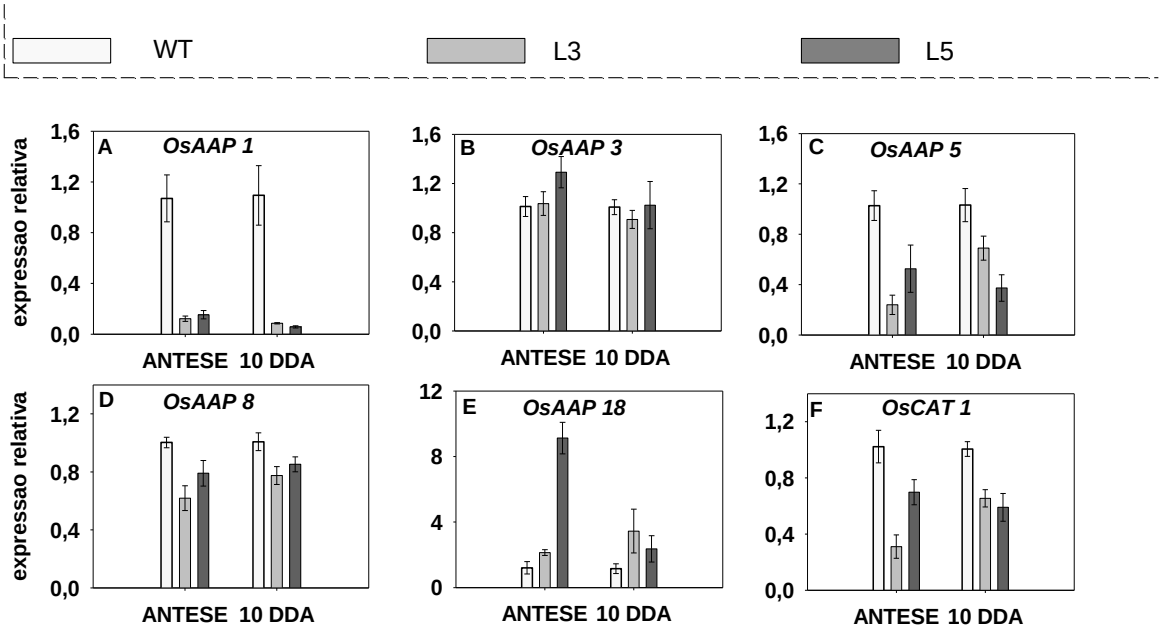



**Figura 37.** Expressão relativa durante a antese e dez dias após a antese (10 DAA) dos genes *OsAAP1* (aminoácido permease 1), *OsAAP3* (aminoácido permease 3), *OsAAP5* (aminoácido permease 5) *OsAAP8* (aminoácido permease 8), *OsAAP18* (aminoácido permease 18) e *OsCAT1*(transportador de aminoácidos catiônicos) em folhas bandeira de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene *OsAAP1*. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Uma hipótese também é que pode ter ocorrido uma mudança no perfil de aminoácidos e essa mudança tenha favorecido a atuação dos outros transportadores, descartando a possibilidade de redundância funcional.

O transportador AAP3 de arabidopsis está envolvido no transporte fonte/dreno a longa distância (OKUMOTO et al., 2004), assim como o AAP1. Já o transportador AAP5, assim como o AAP1, estão envolvidos na absorção direta de aminoácidos nas raízes, na redistribuição de aminoácidos em células do mesófilo foliar (HIRNER et al., 2006), no transporte de aminoácidos para síntese de proteínas de reserva (SANDERS et al., 2009) e no carregamento de aminoácidos no floema em folhas maduras (FISCHER, et al., 1995).

Em plantas de Arabidopsis, o transportador AAP8 está presente na membrana plasmática em células de folhas, sendo importante para o carregamento do floema (SANTIAGO & TEGEDER, 2016).

Desse modo, todos os genes que tiveram um aumento de expressão relativa codificam para transportadores que, assim com o gene AAP1, possuem como função principal a redistribuição de aminoácidos. As alterações relatadas na expressão desses genes indicam uma tentativa da planta mutante em amenizar os efeitos da mutação e garantir um processo eficiente de remobilização de suas reservas.

O fato de não ter sido registrado um aumento de expressão semelhante nas folhas bandeira pode estar relacionado a menor intensidade de remobilização de aminoácidos, mesmo aos 10 DDA.

Possivelmente, uma coleta em um estágio de desenvolvimento mais avançado resultaria em um aumento na expressão desses genes, assim como ocorreu para as folhas 2, que nas duas coletas (antese e 10 DDA) estavam menos esverdeadas comparadas as folhas

bandeira, demonstrando que as plantas possuem mecanismos regulatórios diferentes dentre os mesmos órgãos (folhas).

#### 4.3.4.3 Genes do metabolismo de n - transportadores de aminoácidos nos grãos

Como o embrião da semente não é conectado de forma simplástica aos tecidos maternais que a reveste, transportadores são necessários para o envio de aminoácidos do apoplasto para o embrião ou para o endosperma.

Em ambos os pontos de coleta houve diferenças de expressão gênica nos grãos. Na antese as plantas mutantes apresentaram menor expressão relativa dos genes *OsASN1*, *OsCAT1*, *OsAAP2*, *OsAAP4*, *OsAAP6*, *OsAAP18* (Figura 38 C, D, E, G, H, I). Os genes *OsGS1.3* e *OsAAP3* foram mais expressos apenas na linhagem 3.

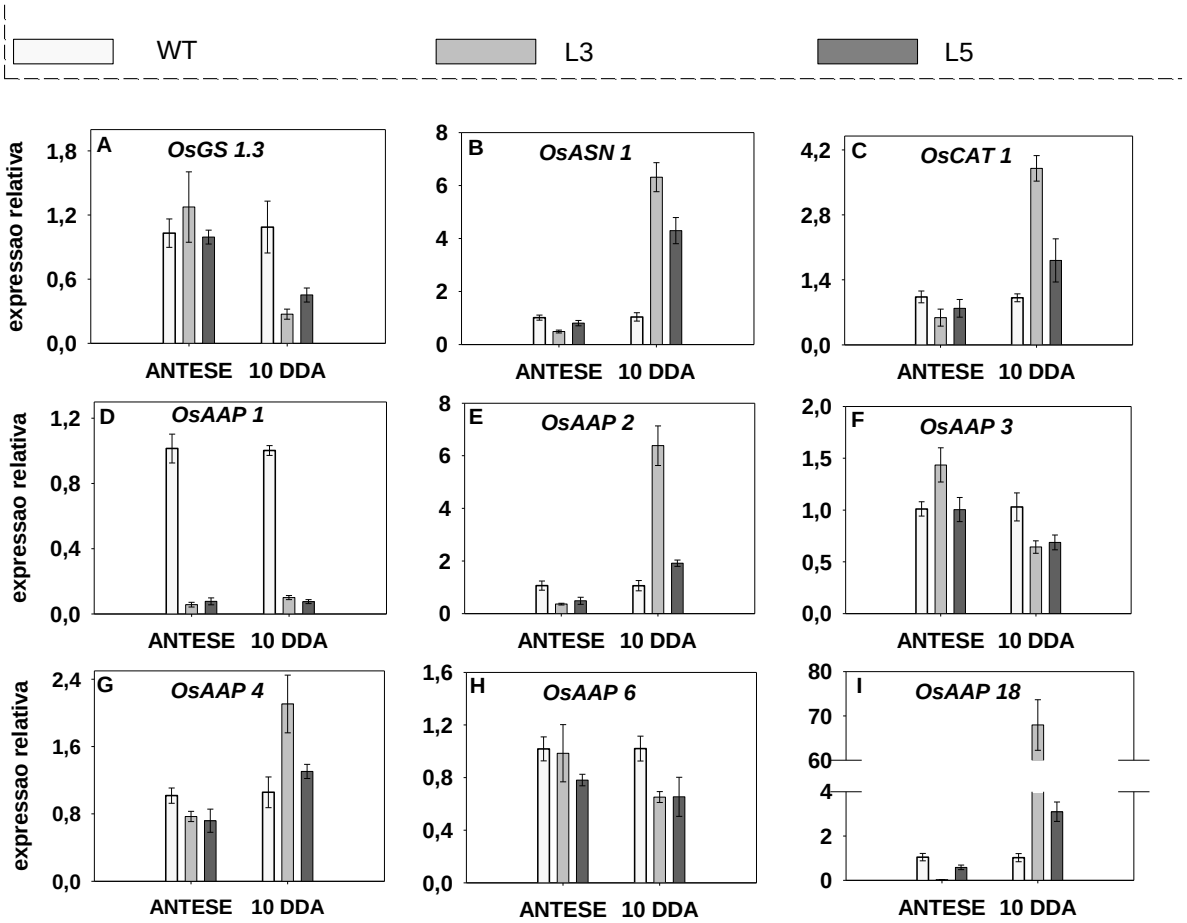



**Figura 38.** Expressão relativa durante a antese e dez dias após a antese (10 DAA) dos genes *OsGS 1.3* (glutamina sintetase 1.3), *OsASN 1* (asparagina sintetase 1), *OsCAT 1* (transportador de aminoácidos catiônicos), OsAAP1 (aminoácido permease 1), *OsAAP 2* (aminoácido permease 2), *OsAAP 3* (aminoácido permease 3), *OsAAP 4* (aminoácido permease 4), *OsAAP6* (aminoácido permease 6) e *OsAAP 18* (aminoácido permease 18) grãos de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene *OsAAP1*. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A menor expressão dos transportadores de aminoácidos, analisados nos grãos durante essa fase de desenvolvimento reprodutivo, associada aos menores valores de expressão

relativa dos transportadores de aminoácidos nas folhas bandeira e folhas 2, bem como ao acúmulo de aminoácidos totais são indícios da menor taxa de senescência apresentada pelas plantas mutantes no início da antese.

Até o momento os transportadores AAP1 e AAP8 em arabidopsis foram os únicos genes caracterizados como sendo responsável pela importação de aminoácidos no embrião, além ter sido relacionado ao acúmulo de proteínas nas sementes (SANDERS et al, 2009; SANTIAGO & TEGEDER, 2016).

No arroz, o transportador AAP6 foi caracterizado por PENG et al. (2014), como um importante regulador no conteúdo de proteínas nos grãos.

Desse modo, os menores teores de prolamina apresentados nos grãos, além de terem sido ocasionados diretamente pelo nocaute do gene AAP1, devido à provável influencia desse gene na produção de proteínas em plantas de arroz, também pode ter ocorrido devido a menor expressão do gene *OsAAP6* (Figura 38 H).

O transportador *AtAAP2* foi caracterizado como um dos responsáveis pelo transporte a longa distância de aminoácidos de fontes para drenos (ZHANG et al., 2010). Porém dentre os genes caracterizados em arabidopsis até o momento, o transportado AAP2 em conjunto com o AAP1 foram os mais expressos em silículas em desenvolvimento. Desse modo, a menor expressão desse gene, verificada no início da antese, indica um menor abastecimento de aminoácidos nas sementes das plantas mutantes (Figura 38 E).

Os transportadores de aminoácidos presentes em sementes parecem controlar a quantidade de N importada pelo embrião (TAN et al., 2010), indicando que uma redução na expressão dos genes que codificam para esses transportadores, pode afetar o desenvolvimento adequado das sementes.

Aos 10 DDA os padrões de expressão relativa foram modificados. Um aumento na expressão relativa foi observado para os genes *OsASN1*, *OsCAT1*, *OsAAP2*, *OsAAP4*, *OsAAP18* em plantas mutantes (Figura 38 C, D, E, G, I). Os genes OsGS1.3, OsAAP3 e OsAAP6 tiveram uma diminuição de expressão em relação as plantas WT.

Os maiores valores de expressão relativa indicaram uma tentativa das plantas mutantes em substituir funcionalmente o transportador AAP1 nas sementes em desenvolvimento. Aumentos consideráveis foram observados, sendo o maior aumento relatado para o gene *OsAAP18* na linhagem 3 (aumento de 67 vezes) (Figura 38 I). O gene *OsAAP2* teve um aumento de até seis vezes (Figura 38 E). Porém, a maior expressão relativa do gene *OsASN 1*, o maior teor de aminoácidos livres (significativo apenas para a linhagem 3) e a menor concentração de prolamina, indicou que maior parte dos aminoácidos enviados as sementes foram convertidas em asparagina, a qual foi em grande parte acumulada, não refletindo em maior concentração de proteínas.

Essa mudança no padrão de expressão apresentado pelas plantas mutantes levou possivelmente a uma mudança no perfil de aminoácidos, uma vez que cada transportador possui características próprias de transporte.

Os resultados obtidos corroboram com SANDERS et al. (2009) que relataram que o nocaute do gene *AAP1* ocasionou uma mudança na expressão de transportadores de aminoácidos específicos, acúmulo de aminoácidos livres nas sementes e uma diminuição no conteúdo de proteínas nos grãos. Ainda de acordo com o autor, o acúmulo de aminoácidos foi acompanhado por uma mudança no perfil dos aminoácidos quantificados, o que reforça a hipótese levantada para o perfil dos aminoácidos nos grãos de arroz das plantas mutantes.

Aumento na expressão do gene *OsCAT 6* foi descrito por PERCHLIK et al. (2017), em plantas de arabidopsis superexpressando o gene AAP1, indicando a interdependência entre os transportadores de aminoácidos, uma vez que alteração no padrão de expressão em um dos genes leva a alteração em parte dos demais genes.

Portanto, o nocaute do AAP1 em plantas de arroz levou a uma mudança na expressão dos transportadores analisados, e certamente no tipo de aminoácidos enviados para as sementes, assim como nos aminoácidos sintetizados nas sementes em formação.

### 4.3.5 Caracterização fenotípica

As plantas mutantes não apresentaram diferenças significativas na massa seca total e no comprimento médio de perfilhos (Figura 39 A-B). Em relação ao número de perfilhos e panículas somente a linhagem 5 teve um aumento nesses parâmetros (Figura 39 C), refletindo na produção total de grãos (como poderá ser visto adiante).

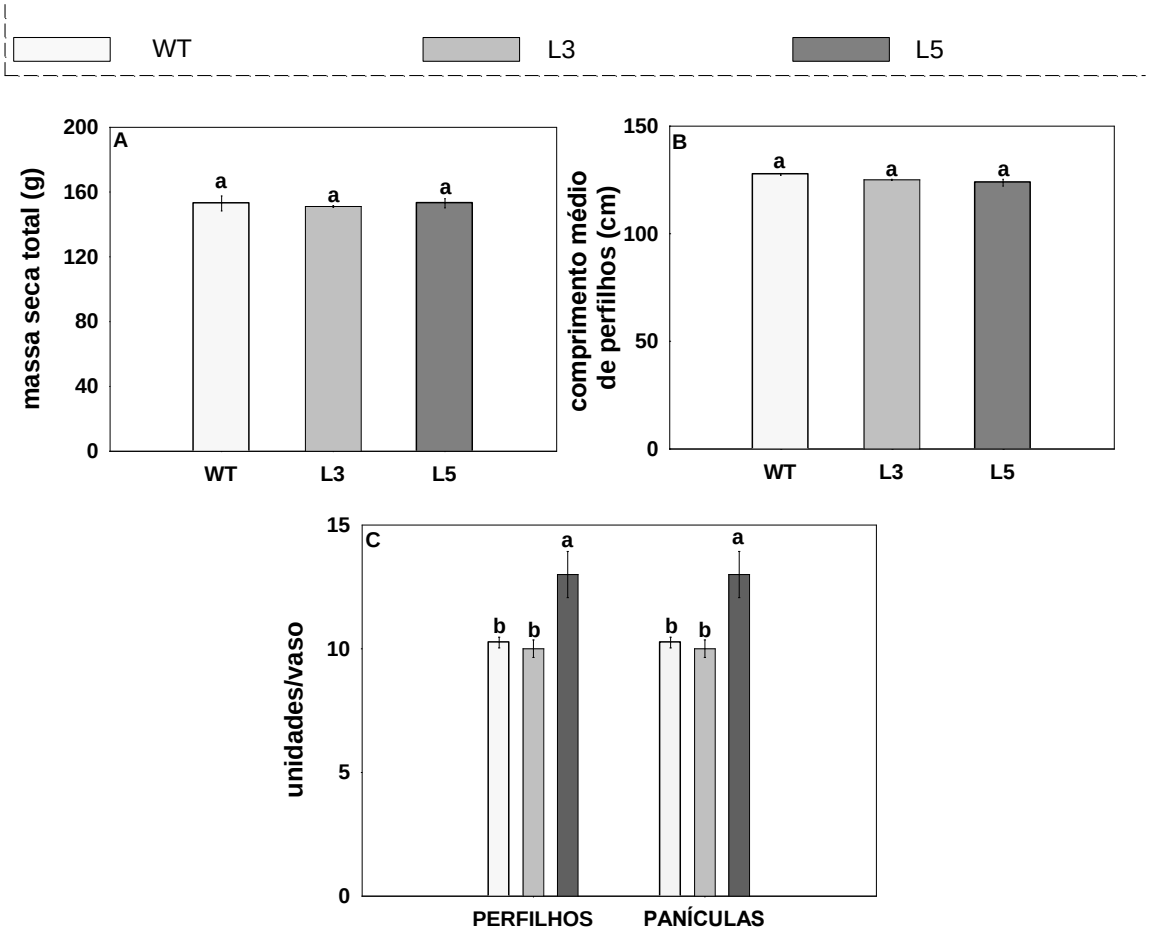



**Figura 39.** (A) Massa seca total (g vaso$^{-1}$, (B) comprimento de perfilhos, (C) número de perfilhos e de panículas por vaso no final do ciclo de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene *OsAAP1*. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade.

LEE et al. (2006), ao cultivar, plantas de arabidopsis mutantes por tDNA para o gene *AAP1*, em condições padrões, também não observaram diferenças fenotípicas significativas (massa total e altura das plantas), o que corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho.

A ausência de diferenças significativas foi ocasionada, possivelmente, pelo fato da adubação nitrogenada ter sido realizada em uma época distante do ponto de coleta, e mesmo

que um efeito negativo tenha ocorrido no início do desenvolvimento das plantas (como foi registrado para as plantas aos 40 dias após a germinação), este efeito foi diminuído ao longo do ciclo. O que pode ser reforçado pelas curvas de depleção, onde apesar das plantas mutantes absorverem de forma mais lenta o N em solução, se o tempo final de cinética tivesse sido estendido, por exemplo até 5 dias, todo o N fornecido teria sido absorvido pelas plantas mutantes, assim como pelas WT. Porém não seria assimilado de forma semelhante.

Apesar da produção de biomassa total não ter sido alterada, a produção de grãos foi diretamente afetada. A massa total de grãos e massa de grãos cheios foi diminuída, enquanto a massa de grãos chochos aumentou (Figura 40 A). O peso de 100 grãos também foi reduzido para ambas as linhagens (Figura 40 B).

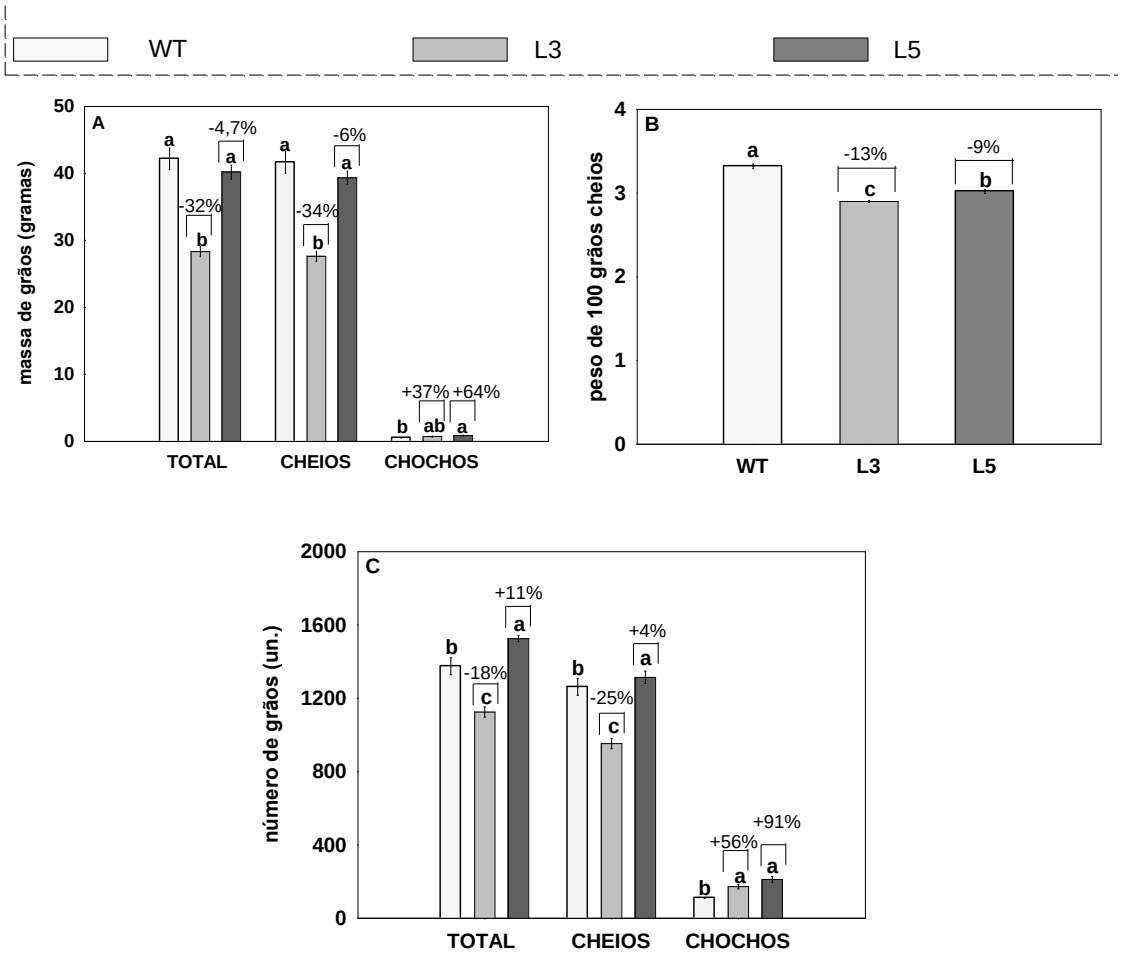



**Figura 40. (A)** Número de grãos (total, cheios e chochos), (B) peso de 100 grãos cheios, (C) número de grãos cheios (total, cheios e chochos) por vaso no final do ciclo de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene *OsAAP1*. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação ao número total de grãos foi possível observar uma diminuição na produção total de grãos e produção de grãos cheios pela linhagem 3, enquanto a linhagem 5 teve um aumento nesses parâmetros (Figura 40 C). Grande aumento na produção de grãos chochos foi registrado nas plantas mutantes (+55,7% e +91%) quando comparado ao número de grãos chochos das plantas WT (Figura 40 C).

De acordo com o exposto pode-se inferir que o nocaute do gene AAP1 influenciou diretamente a produção, e que o aumento na expressão de alguns transportadores de aminoácidos não foi suficiente para substituí-lo funcionalmente de forma eficiente.

O grande aumento na massa e no número de grãos chochos, bem como a diminuição no peso de 100 grãos cheios, indica que uma das alterações resultantes foi a diminuição na força dos drenos (grãos), devido provavelmente ao menor carregamento do floema com aminoácidos durante a remobilização (senescência).

A diminuição na produção de prolamina relatado anteriormente está diretamente relacionada a diminuição no peso de 100 grãos. Essa diminuição no peso dos grãos certamente foi ocasionada pelo acúmulo de aminoácidos no apoplasto das sementes, uma vez que o AAP1 desempenha um papel no envio de aminoácidos para o embrião em desenvolvimento (SANDERS et al., 2009) e provavelmente para o endosperma. Com o acúmulo de aminoácidos um menor conteúdo de proteína de armazenamento foi produzido.

A redução no peso de grãos de arroz obtida na linhagem 3 (12,7%) e na linhagem 5 (9%) foi semelhante a redução de 10% obtida por SANDERS et al. (2009). A redução na produção total de grãos da linhagem 3 (32,8%) corroborou com a redução de 35% na produção total de sementes de arabidopsis relatada por SANDERS et al. (2009). Não foi verificada diminuição na produção de panículas relatado por esse autor, mas de modo contrário, a linhagem 5 teve uma maior produção de panículas (26,8%), o que não resultou em uma maior produção de grãos cheios, somente em um aumento de grãos chochos.

Apesar da linhagem 5 apresentar uma produção de grãos cheios 4,2 % maior do que as plantas WT, o peso total desses grãos foi menor, uma vez que esses grãos foram 9 % mais leves do que a os grãos da WT.

Ao superexpressar o gene AAP1 em arabidopsis, PERCHLIK et al. (2017) verificaram que as plantas mutantes aumentaram o número de sementes, de perfilhos e produção de sementes, ressaltando a importância desse gene também no período reprodutivo.

### 4.3.6 Parâmetros associados a eficiência no uso de n

Todas alterações demonstradas anteriormente (metabólica, gênica e fenotípica) influenciaram a EUN, bem como aos demais parâmetros associados (Figura 41 A-E).

A eficiência de uso de nitrogênio (EUN) foi menor para as linhagens 3 e 5 (-32 % e 4,6%), não sendo significativa para a linhagem 5. Uma vez que a EUN é determinada pela divisão do peso total de grãos pelo conteúdo de N aplicado no solo, era esperado uma menor EUN uma vez que uma menor produção de grãos foi relatada nas plantas mutantes.

Levando em consideração todo o processo realizado pelas plantas para chegar no produto final (grãos), qualquer alteração durante todo esse processo pode ocasionar mudanças na produção. Assim, os mecanismos de absorção, metabolização ou estoque, e remobilização, são igualmente importantes.

A eficiência de absorção de N (EAN) foi menor para as plantas mutantes, indicando que apesar dessas plantas terem absorvido o N de forma semelhante à WT, o que seria possibilitado pelo longo ciclo das plantas de arroz e pela adubação nitrogenada ainda no início do ciclo, a distribuição do N absorvido das raízes para a parte aérea ou da parte aérea para os grãos foram deficientes. Uma vez que a EAN é determinada pela razão entre N-total na parte aérea pelo N fornecido em adubação, a menor EAN no presente estudo foi devido exclusivamente a quantidade de N que as plantas conseguiram exportar para a parte aérea ($NO_3^-$, $NH_4^+$ ou N-amino). Menor exportação de nitrato e aminoácidos para a parte aérea pode ter ocorrido, de forma semelhante àquela observada no tratamento com baixo N (0,2 mM) realizado em fitotron (Figuras 14 A e 16 A), devido uma regulação negativa na expressão de transportadores de nitrato e de aminoácidos, respectivamente. O nocaute do gene *AAP1*,

certamente levou a uma menor exportação de compostos nitrogenados e a menor expressão dos transportadores de nitrato nas plantas mutantes, e consequentemente uma menor EAN.

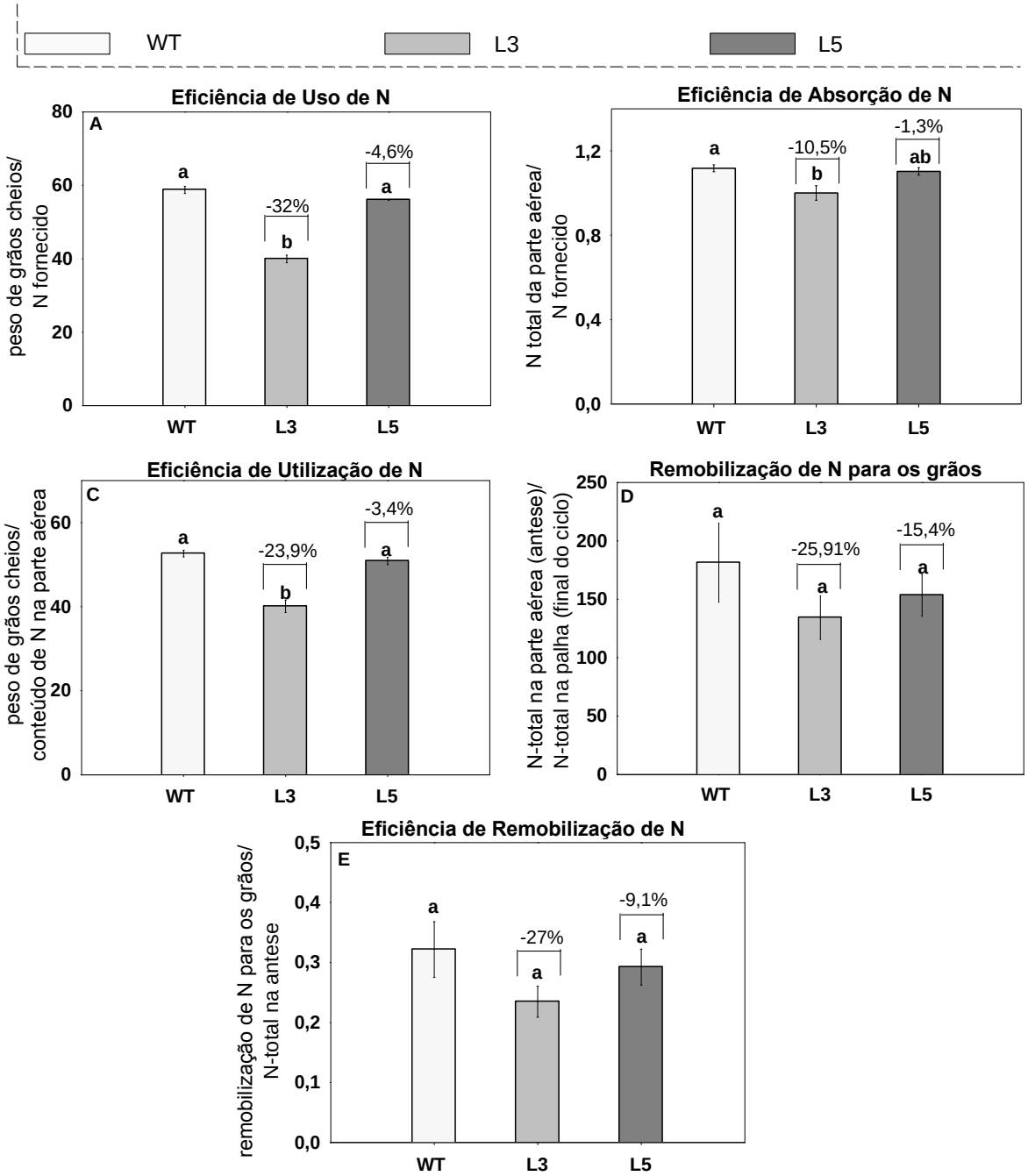



**Figura 41**. (A) Eficiência de Absorção de N (EAN), (B) Eficiência de Utilização de N (EUtN), (C) Eficiência de Uso de N (EUN), (D) Remobilização de N para os grãos e (E) Eficiência de Remobilização de N (ERN) de plantas selvagens da variedade Piauí (WT) e plantas da mesma variedade (L3 e L5) modificadas por nocaute para o gene *OsAAP1*. Letras minúsculas diferentes entre colunas diferem pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Uma vez que toda a fonte de N fornecida foi nítrica e os teores de matéria orgânica e nitrogênio do solo utilizado são baixos, foi descartada a possibilidade das diferenças nos

resultados ter sido ocasionada pela deficiência na absorção direta de N-orgânico do solo, garantindo assim os efeitos relacionados a movimentação interna de N.

Considerando também que o ciclo do arroz foi de aproximadamente 114 dias, mesmo que um problema na absorção de nitrato tenha ocorrido no começo do desenvolvimento das plantas, até o final do ciclo deve ter sido amenizado e talvez eliminado.

Em relação a eficiência de utilização de N (EUtN), as linhagens 3 e 5 apresentaram uma redução de -23, 9% e -3,4%, respectivamente, sendo significativa apenas apara a linhagem 3 (Figura 41B). Esse resultado teve influência direta do conteúdo de N na parte aérea e nos grãos apresentados anteriormente, refletindo diretamente na EUtN, pois em algumas partes (F2, OF e C) houve acúmulo de N e em outra parte (grãos) houve uma diminuição.

Apesar de não ter sido relatadas diferenças significativas, a remobilização de N e a eficiência de remobilização (ERN) foi bem menor nas plantas mutantes, -25,91 % e -27 % para a linhagem 3, e -15,14% e -9,1 % para a linhagem 5 (Figura 41 D-E).

Um aumento na EAN, EUtN e EUN foi relatado por PERCHLIK et al. (2017), ao superexpressar o AAP1 em arabidopsis. Essa melhoria foi atribuída ao aumento no carregamento de aminoácidos nos vasos condutores, que ocorreu em condições de baixo, médio e moderado N. Levando a conclusão de que independente da concentração de N fornecida no meio de cultivo, o transportador AAP1 teve um papel igualmente importante no transporte interno de aminoácidos.

Portanto o transportador AAP1, além das funções anteriormente atribuídas a ele em plantas de arroz, pode-se afirmar que possui um papel essencial para o uso mais eficiente do N absorvido no solo.

# 5 CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos demonstram que o transportador AAP1 está diretamente relacionado ao desenvolvimento de plantas de arroz, pois o nocaute desse gene resultou em uma menor produção de massa total, em alto e baixo N.
- OsAAP1 interfere na atividade de transportadores de nitrato de alta e baixa afinidade, na atividade de transportadores de aminoácidos e consequentemente no metabolismo de N.
- O transportador influencia diretamente a expressão de genes relacionados ao metabolismo de carbono, regulando dessa forma o status energético de plantas de arroz (variedade Piauí) e a assimilação de N.
- O gene influencia a produção de grãos, uma vez que o nocaute resultou em uma menor produção de grãos cheios e uma maior produção de grãos chochos.
- Os menores valores de EUN, EAN e EUtN indica a importância do *OsAAP1* na distribuição de N durante o ciclo de desenvolvimento das plantas de arroz.
- Dado os resultados obtidos, o *AAP1* é um gene chave do metabolismo de N, uma vez que o nocaute levou a alterações no metabolismo de N e C.

# 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROLINK.Disponívelem:https:www.agrolink.com.br/culturas/arroz/informacoes/importancia_361560.html. Acessado em 29/11/2018. **AGROLINK**, 2016.

ANCIELO, A. G., TOESCHER, C. F.; KOPP L. M.; COLLETO, L. S. Produtividade das cultivares de arroz desenvolvidas para Terras Altas e das desenvolvidas para inundação, quando irrigadas por aspersão, em Uruguaiana, RS. In: **Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado**, Santa Maria. Anais, Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. p.340-341, 2005.

ASENSIO, J. S. R.; RACHMILEVITCH, S.; BLOOM, A. J. Responses of Arabidopsis and wheat to rising CO2 depend on nitrogen source and nighttime CO2 levels. **Plant physiology**, v. 168, n. 1, p. 156-163, 2015.

AVICE, J. C., OURRY, A., VOLENEC, J. J., LEMAIRE, G., BOUCAUD, J. Defoliation-induced changes in abundance and immuno-localization of vegetative storage proteins in taproots of Medicago sativa. **Plant Physiology and Biochemistry,** 34: 561–570, 1996.

BARNEIX, A. J. Physiology and biochemistry of source-regulated protein accumulation in the wheat grain. **Journal of Plant Physiology**, 164: 581–590, 2007.

BLOMM, A. J. The increasing importance of distinguishing among plant nitrogen sources. **Current Opinion in Plant Biology** 25: 10–16, 2015.

BLOOM, A. J. Photorespiration and nitrate assimilation: a major intersection between plant carbon and nitrogen. **Photosynthesis research**, v. 123, n. 2, p. 117-128, 2015.

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.

BRUGIERE, N.; DUBOIS, F.; MASCLAUX, C.; SANGWAN, R. S.; HIREL, B. Immunolocalization of glutamine synthetase in senescing tobacco (Nicotiana tabacum L.) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively shifted to the mesophyll cytosol. **Planta** 211: 519–527, 2000.

CARGINALE, V.; MARIA, G.; CAPASSO, C.; IONATA, E.; CARA, F. L.; PASTORE, M.; BERTACCINI, A.; CAPASSO, A. Identification of genes expressed in response to phytoplasma infection in leaves of Prunus armeniaca by messenger RNA differential display. **Gene** 332:29–34, 2004.

CHEN, J., ZHANG, Y.; TAN, Y., ZHANG, M.; ZHU, L.; XU, G.; FAN, X. Agronomic nitrogen-use efficiency of rice can be increased by driving OsNRT2.1 expression with the OsNAR2.1 promoter. **Plant Biotechnol**. J. 14:1705–15, 2016.

CLELAND, E. E.; HARPOLE, W. S: Nitrogen enrichment and plant communities. **Ann NY Acad Sci,** 1195:46–61, 2010.

COELHO, C. P. Remobilização de nitrogênio em variedades de arroz com e sem suplementação nitrogenada. [Dissertação]. Seropédica. **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,** 2011.

COELHO, C. P. Influência dos transportadores de aminoácidos OsAAP1 e OsAAP18 na remobilização de nitrogênio e acúmulo de proteínas nos grãos de arroz. [Tese]. Seropédica. **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,** 2015.

COELHO, C. P.; SANTOS, L. A.; RANGEL, R. P.; SPERANDIO, M. V. L.; BUCHER, C. A.; Souza, S. R., Fernandes, M. S. Rice Varieties Exhibit Different Mechanisms for Nitrogen Use Efficiency (NUE) [online]. **Australian Journal of Crop Science**, vol. 10, n ° 3, mar de 2016: 342-352.

CONAB, Companhia nacional de Abastecimento. Disponível em: https://www.conab.gov.br/... arroz/.../15943_144fbd688fe784933ba25908839d24bf. Acessado em 29/11/18. **CONAB**, 2018.

CONG, L.; RAN, F. A.; COX, D.; LIN, S.; BARRETTO, R.; HABIB, N.; HSU, P. D.; Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. 2013. Febrero 15; 339(6121): p. 819-823. **SCIENCE**, 2010.

CORUZZI, G. LAST, R., AMRHEIN, N. Amino acids. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, editors. **Biochemistery and molecular biology of plants**. 2ª ed. Rockeville: American Society of Plant Physiologists, Jhon Wiley & Sons. P. 289-336, 2015.

DUFF, S. M., QI, Q., REICH, T., WU, X., BROWN, T., CROWLEY, J. H., FABBRI, B. A kinetic comparison of asparagine synthetase isozymes from higher plants. **Plant Physiology and Biochemistry,** 49(3), 251-256, 2011.

EMBRAPA, Empresa brasileira de pesquisa agropecuária. Agência Embrapa de Informação Tecnológica - Mercado, comercialização e consumo Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fok5vmke02wyiv80bhgp5prthhjx4.html. Acessado em 29/11/2018. **EMBRAPA**, 2018.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa testa variedades de arroz de sequeiro no RS. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/arroz/index.htm>. Acessado em 29/11/2018. **EMBRAPA**, 2018.

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

FAN, X.; TANG, Z.; TAN, Y.; ZHANG, Y.; LUO, B.; YANG, M.; LIAN, X.; SHEN, Q.; JOHN, M.; XU, G. Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields. **PNAS** 113:7118–23, 2016.

FAO, Food and Agriculture e Organization Rice Market Monitor, 2018. Disponível em: http://www.fao.org/economic/est/publications/rice-publications/rice-market-monitor-rmm/en/. Acessado em 12/11/2018. **FAO**, 2018.

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

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

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

FERNANDES, M. S., SOUZA, S. R., SANTOS, L. A. Nutrição Mineral de Plantas, 2ª edição. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo,** 2018.

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

FERREIRA, C. M., PINHEIRO B. S., SOUSA I. S. F. & MORAIS O. P. Qualidade do arroz no Brasil: Evolução e padronização. Goiânia, **Embrapa Arroz e Feijão**. 61p, 2005.

FISHER, W. N., KWART, M., HUMMEL, S., FROMMER, W. B. Substrate specificity and expression profile of amino acid transports (AAPs) in Arabidopsis. **J Biol Chem**.http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.27.16315.Pmid:7608199, 1995.

FROMMER, W. B.; HUMMEL, S.; RIESMEIER, J. W. Expression cloning in yeast of a cDNA encoding a broad specificity amino acid permease from Arabidopsis thaliana. **Proc Natl Acad Sci** USA 90:5944–5948, 1993.

GAJ, Thomas; GERSBACH, Charles A.; BARBAS III, Carlos F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in biotechnology**, v. 31, n. 7, p. 397-405, 2013.

GAUFICHON, L., REISDORF-CREN, M., ROTHSTEIN, S. J., CHARDON, F., SUZUKI, A. Biological functions of asparagine synthetase in plants. **Plant Science**, v. 179, n. 3, p. 141-153, 2010.

GUAN, P. Z.; RIPOLL, J. J.; WANG, R. H.; VUONG, L.; BAILEY-STEINITZ, L. J.; YE, D. N.; CRAWFORD, N. M. Interacting TCP and NLP transcription factors control plant responses to nitrate availability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA 114: 2419–2424, 2017.

GUO, M. G. Molecular and genomic analysis of nitrogen regulation of amino acid permease I (AAP1) in Arabidopsis. PhD dissertation, **University of Illinois at Urbana-Champaign**, Urbana, IL, 2004.

HAEFELE, S. M., WOPEREIS, M. C. S., NDIAYE, M. K., BARRO, S. E., ISSELMOU, M. O. Internal nutrient efficiencies, fertilizer recovery rates and indigenous nutrient supply of irrigated lowland rice in Sahelian West Africa. **Field Crop**. Res. 80, 19–32, 2003.

HAMMES, U. Z.; NIELSEN, E.; HONAAS, L. A.; TAYLOR, C. G.; SHACHTMAN, D. P. AtCAT6, a sink-tissue-localized transporter for essential amino acids in Arabidopsis. **Plant J** 48:414–426, 2006.

HAQUE, Effi., TANIGUCHI, HIROAKI., HASSAN, M. D. MAHMUDUL, BHOWMIL, PANKAJ., KARIM, M. REZAUL., SMIECH, MAGDALENA., ZHAO, KAIJUN, RAHMAN, MAHFUZUR., ISLAM, TOFAZZAL. Application of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technology for the Improvement of Crops Cultivated in Tropical Climates: Recent Progress, Prospects, and Challenges. **Frontiers in plant science**, v. 9, 2018.

HAVÉ, M., MARMAGNE, A., CHARDON, F., MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Nitrogen remobilisation during leaf senescence: lessons from Arabidopsis to crops. **Journal of Experimental Botany**, 68: 2513–2529, 2016.

HAYASHI, H., CHINO, M. Chemical composition of phloem sap from the uppermost internode of the rice plant. **Plant Cell Physiol**. 31/247-51. http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.ao77899, 1990.

HIRNER, A., LADWIG, F., STRANSKY, H., OKUMOTO, S., KEINATH, M., HARMS, A., FROMMER, W. B., KOCH, W. Arabidopsis LHT1 is a high-affinity transporter for cellular amino acid uptake in both root epidermis and leaf mesophyll. **Plant Cell,** 18: 1931–1946, 2006.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural of Experimental Station Bull**, v.347, p.1-32, 1950.

HU, R., QIU, D. Y., CHEN, Y., MILLER, A. J., FAN, X. R., PAN, X. P., ZHANG, M. Y. Knockdown of a tonoplast localized low-affinity nitrate transporter OsNPF7.2 affects rice growth under high nitrate supply. **Frontiers in Plant Science**, 7: 1–13, 2016.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agenciadenoticias/noticias/17172-soja-milho-e-arroz-representam-mais-de-90-da-safra-2017. Acessado em 12/11/2018. **IBGE**, 2018.

ISHINO. Y.; SHINAGAWA, H.; MAKINO K.; AMEMURA, M.; NAKATA A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. **Journal of Bacteriology**; 169(12), December, 1987.

ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; TABUCHI, M.; YAMAHA, T.; TAKAHASHI, H. Biochemical background and compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots. **Plant and Cell Physiology**. v.45, n.11, p.1640-1647, 2004.

JACKSON, M. T. Conservation of rice genetic resources: the role of the International Rice Genebank at IRRI. **Plant molecular biology**, v. 35, n. 1-2, p. 61-67, 1997.

JIN, J. Changes in the efficiency of fertiliser use in China. **J. Sci. Food Agric**. 92, 1006–1009, 2012.

JULIANO, B.O. (Ed.). Rice: chemistry and technology. Minnesota, USA: **American Association of Cereal Chemists**. Cap.2, p.17-57, 1985.

KANT, S. Understanding nitrate uptake, signaling and remobilization for improving plant nitrogen use efficiency. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2017.

KIM, D.; KIM, J.; HUR, J. K.; BEEN, K. W.; YOON, S. H.; KIM, J. S. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. **Nature Biotechnol**. doi: 10.1038/nbt.3609, 2016.

KIM, W. T.; OKITA, T. W. Structure, expression, and heterogeneity of the rice seed prolamines. **Plant physiology**, v. 88, n. 3, p. 649-655, 1988.

LALONDE, S.; WIPF, D.; FROMMER, W. B. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. **Annu Rev Plant Biol** 55:341–372, 2004.

LARA, W.A.R.; TRIVELIN, P.C.O. Eficiência de um coletor semi-aberto estático na quantificação de N-NH3 volatilizado da uréia aplicada ao solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.14, n.3, p.345-352, 1990.

LEE, Y. H.; COLLIER, R.; TRETHEWY, A.; GOULD, G.; SIEKER, R.; TEGEDER, M. AAP1 transports uncharged amino acids into roots of Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 50, n. 2, p. 305-319, 2007.

LÉRAN, S.; VARALA, K; BOYER, J. C; CHIURAZZI, M.; CRAWFORD, N.; VEDELE, F. D.; DAVID, L.; DICKSTEIN, R.; FERNANDEZ, E.; FORDE, B. GASSMANN, W.; GEIGER, D.; GOJON, A.; GONG, J. M.; HALKIER B. A.; HARRIS, M. J.; HEDRICH, R.; LIMAMI, A. M. A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 1, p. 5-9, 2014.

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

LIANG, P.; XU, YANWEN.; ZHANG, X.; DING, C.; HUANG, R.; ZHANG, Z.; LV, J.; XIE., X.; CHEN, Y.; LI, Y.; SUN, Y.; BAI, Y.; SONYANG, Z.; MA, W.; ZHOU, C.; HUANG, J.CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. **Protein Cell**. 6, 363-372, 2015.

LIU, G.; JI, Y.; BHUIYAN, N. H.; PILOT, G.; SELVARAJ, G.; ZOU, J.; WEI, Y. Amino acid homeostasis modulates salicylic acid-associated redox status and defense responses in Arabidopsis. **Plant Cell** 22:3845–3863, 2010.

LIU, Y., NICOLAUS, V. W. 2017. Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. **Journal of Experimental Botany**, 68: 2581– 2592, 2017.

LOQUE, D., LUDEWIG, U., YUAN. L. X., VON, W. N. Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH3 transport into the vacuole. **Plant Physiology,** 137: 671–680, 2005.
LU, Y.; SONG, M.; LU, K.; LIAN, X.; CAI, H. Molecular characterization, expression and functional analysis of the amino acid transporter gene family (OsAATs) in rice. **Acta physiologiae plantarum**, v. 34, n. 5, p. 1943-1962, 2012.

MARTINEZ M. F.; DIEZ-VILLASEÑOR C, GARCIA-MARTINEZ J.; SORIA, E. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. **Molecular Evolution**. Febrero; 60(2), 2005.

MARY, B.; RECOUS, S; DARWIS, D.; ROBIN, D. Interactions between decomposition of plant residues and nitrogen cycling in soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.181, n.1, p.71-82, 1996.

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

MCMANUS, M.T.; SHARP, P.A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. Nat. Rev. Genet. 3, 737–747 Wyman, C. and Kanaar, R. (2006) DNA double-strand break repair: all's well that ends well. **Annu. Rev. Genet**. 40, 363–383, 2002.

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.

MOLL, R. H., KAMPRATH, E. J., JACKSON, W. A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization 1. **Agronomy Journal**, 74(3), 562-564, 1982.

NOVARROZ. Disponível em:http://www.novarroz.pt/pt/mundo-do-arroz/arroz-no-mundo/14-tipos-e-variedades-de-arroz. Acessado em 29/11/2018. **NOVARROZ**, 2018.

ODIPIO, J.; ALIEAI, T., INGELBRECHT, I.; NUSINOW, D. A.; BART, R., TAYLOR, N. J. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing of phyteone desaturase in cassava. **Front. Plant Sci.** 8:1780. doi: 10.3389/fpls.2017.01780, 2017.

OKUMOTO, S., KOCH, W., TEGEDER, M., FISCHER, W. N., BIEHL, A., LEISTER, D., STIERHOF, Y. D., FROMMER, W. B. Root phloem-specific expression of the plasma membrane amino acid proton co-transporter AAP3. **Journal of Experimental Botany,** 55: 2155–2168, 2004.

PENG, B., KONG, H. L., LI, Y. B., Wang, L. Q., ZHONG, M., SUN, L., GAO, G. J., ZHANG, Q. L., LUO, L. J., WANG, G. W. OsAAP6 functions as an important regulator of grain protein content and nutritional quality in rice. **Nature communications,** 5: 4847, 2014.

PERCHLIK, M., FOSTER, J., TEGEDER, M. Different and overlapping functions of Arabidopsis LHT6 and AAP1 transporters in root amino acid uptake. **Journal of Experimental Botany,** 65: 5193–5204, 2014.

PERCHLIK, M., TEGEDER, M. Improving plant nitrogen use efficiency through alteration of amino acid transport processes**. Plant Physiology,** 175: 235–247, 2017.

PEREIRA, J. A. Cultura do arroz no Brasil: subsídios para a sua história. Teresina: **Embrapa Meio-Norte,** 2002.

PINHEIRO B. S., CASTRO E. S & GUIMARÃES C. M. Sustainability and profitability of aerobic rice production in Brazil. **Field Crops Research**, 97:34–42, 2006.

RAN, F. A.; CONG, L.; YAN, W. X.; SCOTT, D. A., GOOTENBERG, J. S.; KRIZ, A. J., ZETSCHE, B., SHALEM, O., Wu, X., MAKAROVA, K. S.; KOONIN,E. V.; SHARP, P. A.; ZHANG, F. Beyond CRISPR: A guide to the many other ways to edit a genome. **Nature**. Aug 8;536(7615):136-7. doi: 10.1038/536136b, 2016.

ROBERTS, J., PANG, M. Estimation of ammonium ion distribution between cytoplasm and vacuole using nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Plant Physiology,** 100: 1571–1574, 1992.

RODRÍGUEZ-LEAL, D.; LEMMON, Z. H.; MAN, J.; BARTLETT, M. E., LIPPMAN, Z. B. Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. **Cell** 171, 470–480.e8. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.030, 2017.

SANDERS, A.; COLLIER, R.; TRETHEWY, A.; GOULD, G.; SIEKER, R.; TEGEDER, M. AAP1 regulates import of amino acids into developing Arabidopsis embryos. **The Plant Journal**, v. 59, n. 4, p. 540-552, 2009.

SANTIAGO, J. P., TEGEDER, M. Implications of nitrogen phloem loading for carbon metabolism and transport during Arabidopsis development. **Journal of Integrative Plant Biology**, 59: 409–421, 2016.

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

SOUZA, S. R. Teor e qualidade das proteínas do arroz com a aplicação foliar e no solo de URAN. [dissertação]. Seropédica: **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, 1990.

SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. NITROGÊNIO. In: FERNANDES, M.S. (Org.) Nutrição Mineral de Plantas. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. 2006.

SPERANDIO, M. V. L.; SANTOS, L. A.; ARAUJO, O. J. L.; BRAGA, R. P.; COELHO, C. P.; MATOS, N., E.; FERNANDES, M. S. e SOUZA, S. R. Resposta dos transportadores de nitrato e da expressão de PM H + -ATPase ao ressuprimento de nitrogênio em duas variedades de arroz de terras altas, contrastando com a cinética de captação de nitrato [online]. **Australian Journal of Crop Science**, vol. 8, n ° 4, abril de 2014: 568-576.

SU, Y. H.; FROMMER, W. B.; LUDEWIG, U. Molecular and functional characterization of a family of amino acid transporters from Arabidopsis. **Plant Physiol** 136:3104–3131, 2004.

TAIZ, L., ZEIGER, E., MOLLER, I. M., MURPHY, A. Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal. 6ª edição. **Artmed**, 2017.

TAN, Q. M., ZHANG, L. Z., GRANT, J., COOPER, P., TEGEDER, M. Increased phloem transport of S-methylmethionine positively affects sulfur and nitrogen metabolism and seed development in pea plants. **Plant Physiology**, 154: 1886– 1896, 2010.

TEGEDER, M., MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. **New Phytologist**, v. 217, n. 1, p. 35-53, 2017.

TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment**. v.23, p.1005-1024, 2000.

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.

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

URRIOLA, J., RATHORE, K. S. Overexpression of a glutamine synthetase gene affects growth and development in sorghum. **Transgenic Res**. 24:397–407, 2015.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, 2008.

WANG, F., WANG, C., LIU, P., LEI, C., HAO, W., GAO, Y., LIU, YAO-GUANG., ZHAO, KAJUN. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922. **PLoS ONE.** 11:0154027. doi: 10.1371/journal.pone.0154027, 2016.

WANG, W.; PAN, Q.; HE, F.; AKHUNOYA, A.; CHAO, S.; TRICK, H., AKHUNOV, EDUARDl. Transgenerational CRISPR-Cas9 activity facilitates multiplex gene editing in allopolyploid wheat. **CRISPR J**. 1, 65–74. doi: 10.1089/crispr.2017.0010, 2018.

WANG, Y. Y.; CHENG, Y. H; CHEN, K. E; TASY, Y. F. Nitrate transport, signaling, and use efficiency. **Annual review of plant biology**, v. 69, p. 85-122, 2018.

WHITE, A. C., ROGERS, A., REES, M., OSBORNE, C. P. How can we make plants grow faster? A source–sink perspective on growth rate. **Journal of Experimental Botany** 67: 31–45, 2016.

XIE, K.; MINKENBERG, B.; YANG, Y. Targeted gene mutation in rice using a CRISPR-Cas9 system. **Bio Protocol**, v. 4, p. e1225, 2014.

XU, R.; YANG, Y.; QIN, R.; LI, H.; QIU, C.; LI, LI., WEI, PENCHENG., YANG, JIANBO (2016). Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. **J. Genet. Genomics** 43, 529–532. doi: 10.1016/j.jgg, 2016.

YEMM, E.W. & COCKING, E. C. The determination of amino-acid with ninhydrin. **Analytical Biochemistry**, v.80, p.209-213, 1955.

ZHANG, L. Z., TAN, Q. M., LEE, R., TRETHEWY, A., LEE, Y. H., TEGEDER, M. Altered xylem-phloem transfer of amino acids affects metabolism and leads to increased seed yield and oil content in Arabidopsis. **Plant Cell**, 22: 3603–3620, 2010.

ZHANG, L.Z., GARNEAU, M.G., MAJUMDAR, R., GRANT, J., TEGEDER, M. Improvement of pea biomass and seed productivity by simultaneous increase of phloem and embryo loading with amino acids. **Plant Journal,** 81: 134–146, 2015.

ZHAO, H.; MA, H.; YU, L.; WANG, X.; ZHAO, J. Genome-wide survey and expression analysis of amino acid transporter gene family in rice (Oryza sativa L.). **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49210, 2012.

ZHAO, Z.; ZHANG, H.; LI, C.; ZHAO, Q.; CAO, L. Quantifying nitrogen loading from a paddy field in Shanghai, China with modified DNDC model. **Agr. Ecosyst. Environ**. 197, 212–221, 2014.

# 7 ANEXOS

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

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

- 50 mL N6 Macro (10X)
- 5 mL N6 Micro (100X)
- 10 mL Fe-EDTA (100X)
- 5mL de N6-vitaminas (100X)
- 0,050 g Mio-inositol
- 10 mL de 2,4D a 100 mg $L^{-1}$
- 0,15 g Casaminoácidos
- 1,439 g Prolina
- 15 g Sacarose
- Ajustar pH para 5,8 com KOH 1M
- Avolumar para 500 mL com $H_2O$ destilada
- 2 g de gelrite
- Autoclavar a 121 $^oC$ por 15min

**Obs.:** A estocagem pode ser feita a 25 $^oC$ no escuro, por não mais que 5 dias.

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

- 50 mL N6 Macro (10X)
- 5 mL N6 Micro (100X)
- 5 mL Fe-EDTA (100X)
- 5 mL de N6-vitaminas (100X)
- 0,050 g Mio-inositol
- 10 mL de 2,4D a 100 mg $L^{-1}$
- 0,15 g Casaminoácidos
- 15 g Sacarose
- 5 g Glicose
- Ajustar pH para 5,2 com KOH 1M
- Avolumar para 500 mL com $H_2O$ destilada
- 2 g de gelrite
- Autoclavar a 121 $^oC$ por 15 minutos

Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 $^oC$ e adicionar 0,5 mL de acetoseringona a 19,2 mg $mL^{-1}$ (conc. final de 19,2 mg $L^{-1}$).

**Obs.:** A estocagem pode ser feita a 25 $^oC$ no escuro, por não mais que 5 dias.

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

- 1 g Glicose
- 3 g Bacto-Agar
- 10 mL de Sais AB (20X)
- 10 mL de Tampão AB (20X)

- Avolumar para 200 mL com $H_2O$ destilada
- Autoclavar a 121 $^oC$ por 15 min

Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 $^oC$ e adicionar os antibióticos referentes à construção gênica e verter 40 mL de meio por placa.

**Obs.**: As placas poderão ser armazenadas na geladeira a 4 $^oC$ por não mais que 5 dias.

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

- 10 mL AA Macro (20X)
- 2 mL Fe-EDTA - Sigma (100X)
- 2 mL B5 Micro (100X)
- B5-vitaminas (100X)
- 20 mL de AA aminoácidos (10X)
- 0,1 g Casaminoácidos
- 13,7 g Sacarose
- 7,2 g Glicose
- Ajustar pH para 5,2 com KOH 1M
- Avolumar para 200 mL com $H_2O$ destilada
- Autoclavar a 121 $^oC$ por 15 min

Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 $^oC$ e adicionar 0,2 mL de acetoseringona a 19,2 mg $mL^{-1}$ (conc. final de 19,2 mg $L^{-1}$).

**5-Meio de Seleção dos Calos - N6D- 500 mL**

- 50 mL N6 Macro (10X)
- 5 mL N6 Micro (100X)
- 5 mL Fe-EDTA (100X)
- 5 mL de N6-vitaminas (100X)
- 0,050 g Mio-inositol
- 10 mL de 2,4D a 100 mg $L^{-1}$
- 0,15 g Casaminoácidos
- 1,439 g Prolina
- 15 g Sacarose
- Ajustar pH para 5,8 com KOH 1M
- Avolumar para 500 mL com $H_2O$ destilada
- 2 g de gelrite
- Autoclavar a 121 $^oC$ por 15min

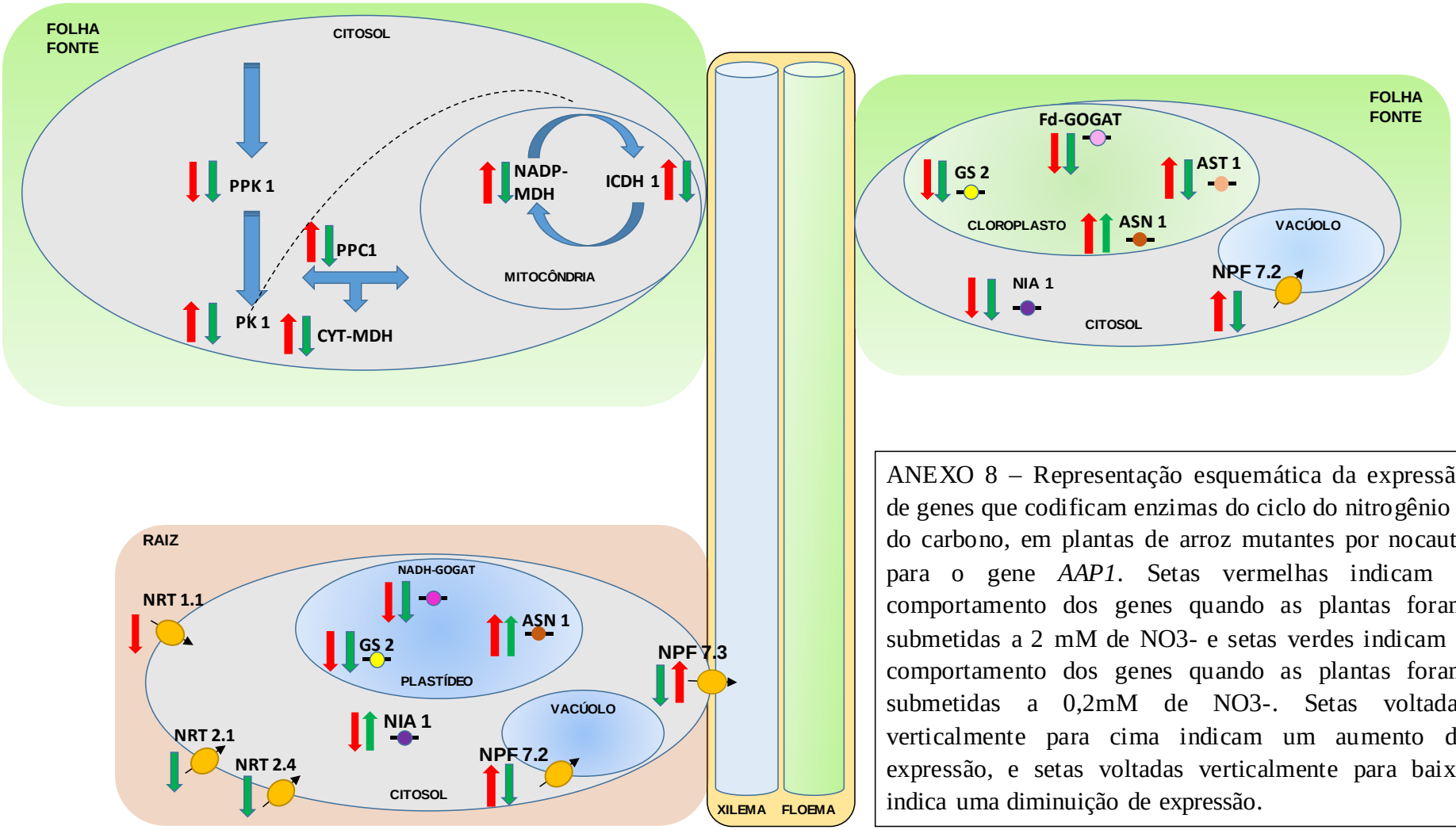
Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 $^oC$ e adicionar 0,5 mL de Higromicina 1000X (conc. final de 50 mg $L^{-1}$), 1mL de timentim (conc. final 150 mg $L^{-1}$).
**Obs.:** A estocagem pode ser feira a 25 $^oC$ no escuro, por não mais que 5 dias.

**6 - Meio de Regeneração de Parte Aérea (N6RH50) – 1000 mL**

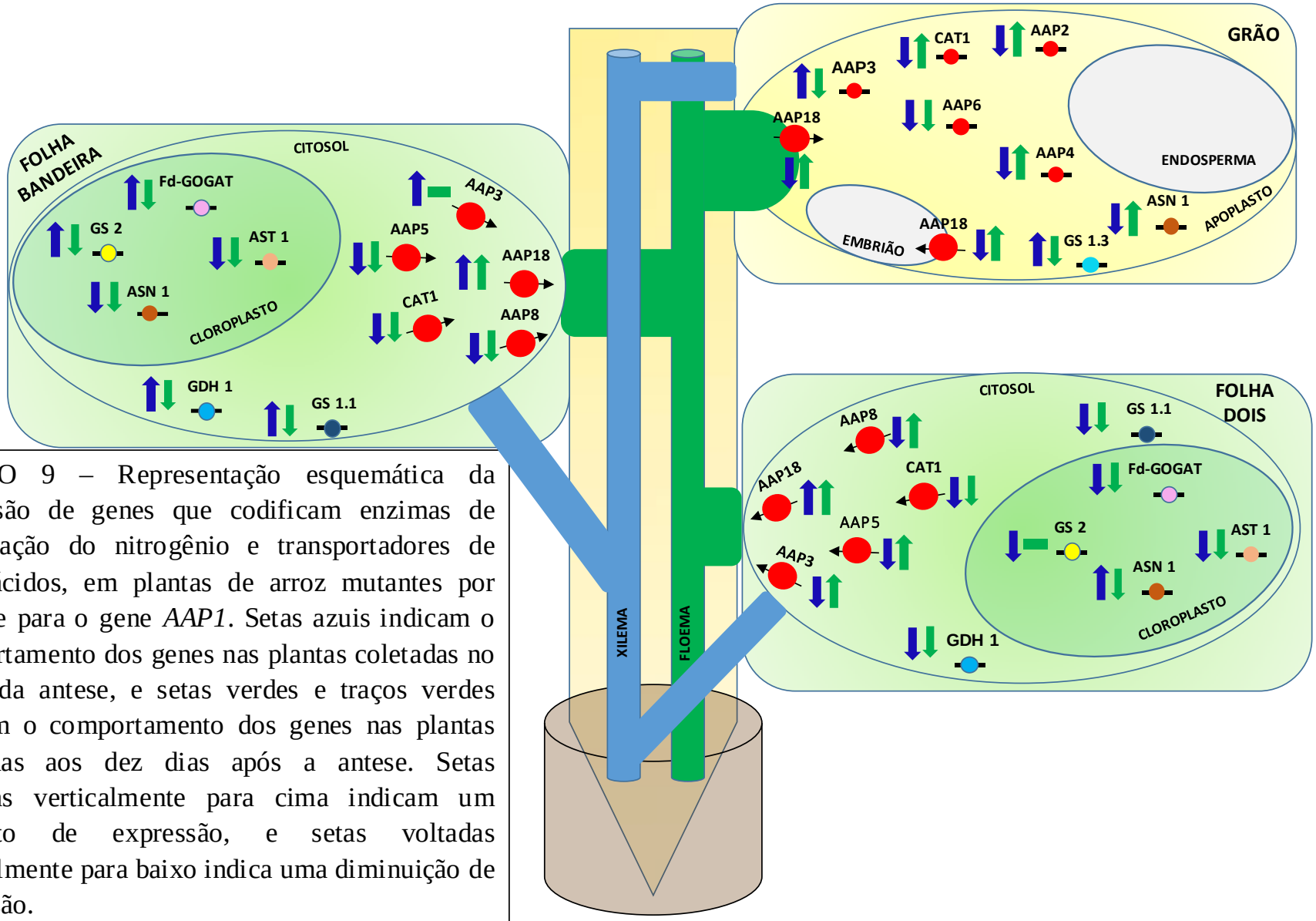
- 50 mL de N6 macro (10X)
- 10 mL Fe-EDTA (100X)
- 10 mL N6 Micro (100X)
- 10 mL de N6 vitaminas (100X)
- 10 mL de kinetin (100 $mg.L^{-1}$)
- Dissolve 20 g de sacarose
- Dissolve 30 g de sorbitol
- 1 g casaminoácidos
- Ajustar pH para 5,8 com KOH
- Avolumar para 900 mL com $H_2O$ destilada
- 4 g gelrite
- Autoclavar 121 $^oC$ por 15 min
- Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 $^oC$ e adicionar 100 mL de AA aminoácidos, 1 mL de $50g.L^{-1}$ de higromicina B (concentração final de 50 $mg.l^{-1}$). **Obs.:** A estocagem pode ser feira a 25 $^oC$ no escuro, por não mais que 5 dias.

**7-Meio de Regeneração de Raiz (N6FH50) – 1000 mL**

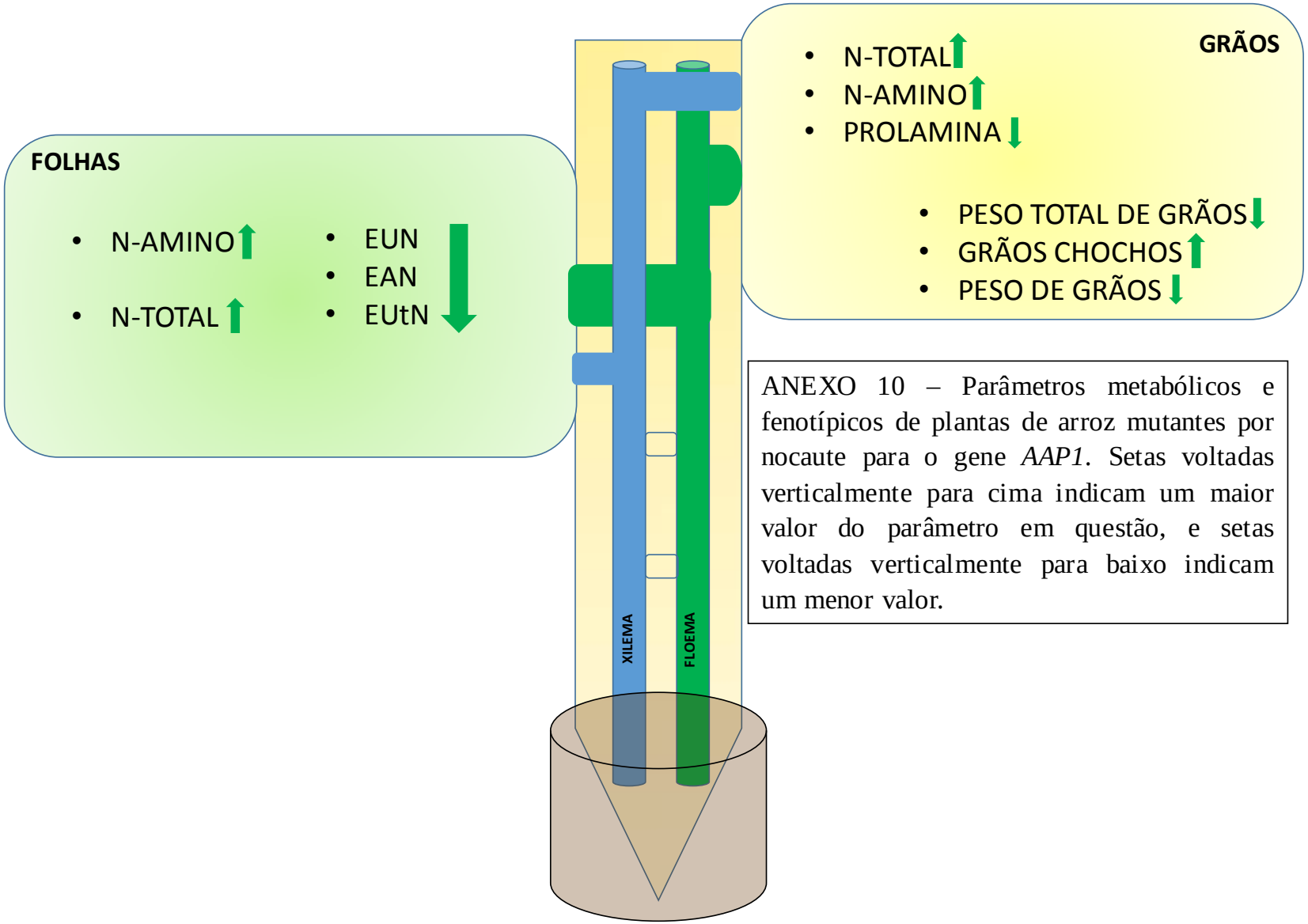
- 50 mL de N6 Macro (10X)
- 10 mL de FeEDTA (100X)
- 10 mL de N6 micro (100X)
- 10 mL de N6 vitaminas (100X)
- Dissolver 15 g de sacarose
- 30 g de sorbitol
- 1 g de casaminoácidos
- Ajusta pH para 5,8
- Adicionar 3 g de gelrite
- Autoclavar a 121 ºC para 15 min
- 1 mL de 50 $g.l^{-1}$ de higromicina B (concentração final de 50 $mgl^{-1}$)
- Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 $^oC$ e adicionar 100 mL de AA aminoácidos, 1 mL de $50g.L^{-1}$ de higromicina B (concentração final de 50 $mg.l^{-1}$. **Obs.:** A estocagem pode ser feira a 25 $^oC$ no escuro, por não mais que 5 dias.




ANEXO 8 – Representação esquemática da expressão de genes que codificam enzimas do ciclo do nitrogênio e do carbono, em plantas de arroz mutantes por nocaute para o gene *AAP1*. Setas vermelhas indicam o comportamento dos genes quando as plantas foram submetidas a 2 mM de NO3- e setas verdes indicam o comportamento dos genes quando as plantas foram submetidas a 0,2mM de NO3-. Setas voltadas verticalmente para cima indicam um aumento de expressão, e setas voltadas verticalmente para baixo indica uma diminuição de expressão.




ANEXO 9 – Representação esquemática da expressão de genes que codificam enzimas de assimilação do nitrogênio e transportadores de aminoácidos, em plantas de arroz mutantes por nocaute para o gene *AAP1*. Setas azuis indicam o comportamento dos genes nas plantas coletadas no início da antese, e setas verdes e traços verdes indicam o comportamento dos genes nas plantas coletadas aos dez dias após a antese. Setas voltadas verticalmente para cima indicam um aumento de expressão, e setas voltadas verticalmente para baixo indica uma diminuição de expressão.




ANEXO 10 – Parâmetros metabólicos e fenotípicos de plantas de arroz mutantes por nocaute para o gene *AAP1*. Setas voltadas verticalmente para cima indicam um maior valor do parâmetro em questão, e setas voltadas verticalmente para baixo indicam um menor valor.