IV SIMPÓSIO ABC
ARGENTINA-BRASIL-CUBA
Sistemas de Produção e Sustentabilidade Agrícola:
Experiências na Argentina, Brasil e Cuba
Realização
Apoio

# O NOCAUTE DO GENE *OsNRT1.3* INTERFERE DIRETAMENTE NA ABSORÇÃO E ASSIMILAÇÃO DE $NO_3^-$

## Knockout of the *OsNRT1.3* Gene Interferes Directly in The Absorption and Assimilation of $NO_3^-$

**Alice Firmino DONATO[1]; Erinaldo Gomes PEREIRA[2]; Erika da Costa FERNANDES[3]; Carlos Alberto BUCHER[4]; Cassia Pereira Coelho BUCHER[5]& Manlio Silvestre FERNANDES[6]**

[1]Estudante do Curso de Agronomia (UFRRJ). alicedonato@outlook.com
[2]Doutorando do Curso de Pós-graduação em Agronomia-Ciência do Solo (UFRRJ).
[3]Doutoranda do Curso de Pós-graduação em Fitotecnia (UFRRJ).
[4]Professor Adjunto do Departamento de Fitotecnia (UFRRJ).
[5]Estudante de Pós-doutorado do Curso de Pós-graduação em Agronomia-Ciência do Solo (UFRRJ).
[6]Professor Emérito do Departamento de Solos (UFRRJ).

**Resumo:** O nitrato e o amônio representam a maior fonte de nitrogênio para a maioria das plantas. Para os cereais, como o arroz, o $NO_3^-$ é a principal fonte de N, e devido à baixa disponibilidade natural desse nutriente no solo faz-se necessário o fornecimento, por meio de adubações, durante o ciclo da cultura. Objetivou-se, neste estudo, realizar a caracterização funcional do gene *OsNRT1.3*. Cinquenta sementes de cada linhagem foram separadas, desinfestadas com hipoclorito de sódio 2,5% por 30 minutos, e lavadas em seguida com água destilada. Em seguida, as sementes foram colocadas sobre gaze em vasos de 700 mL e colocadas para germinar em água destilada na casa de vegetação. Aos 10 DAG as plântulas passaram a ser cultivadas em uma solução nutritiva de YOSHIDA et al. (1976), com troca realizada a cada três dias durante 10 dias. Aos 23 DAG iniciaram-se os tratamentos: metade dos vasos permaneceram com 2 mM de $NO_3^-$ enquanto a outra metade passou a ser fornecida uma solução de 0,2 mM de $NO_3^-$, com troca de solução nutritiva realizada a cada 3 dias. Os resultados demonstraram que as proteínas codificadas pelo gene *OsNRT1.3* estão envolvidas diretamente na absorção de $NO_3^-$, além de atuarem possivelmente no transporte de N das raízes para a parte aérea.

**Palavras-chave:** nitrogênio, raízes, transporte.

**Abstract:** Nitrate and ammonium represent the largest source of nitrogen for most plants. For cereals, such as rice, $NO_3^-$ is the main source of N, and due to the low natural availability of this nutrient in the soil, it is necessary to supply through fertilizers during the crop cycle. The objective of this study was to perform the functional characterization of the *OsNRT1.3* gene. Fifty seeds of each strain were separated, disinfected with 2.5% sodium hypochlorite for 30 minutes, and then washed with distilled water. Then the seeds were placed on gauze in 700 mL pots and placed to germinate in distilled water in the greenhouse. At 10 DAG the seedlings were cultivated in a nutrient solution of YOSHIDA et al. (1976), with exchange performed every three days for 10 days. At 23 DAG the treatments were started: half of the vessels remained with 2 mM $NO_3^-$ while the other half was supplied with a 0.2 mM NO3 solution with nutrient solution change every 3 days. The results demonstrated that the proteins

encoded by the *OsNRT1.3* gene are directly involved in $NO_3^-$ absorption, and possibly acting on N transport from roots to shoots.

**Keywords:** nitrogen, roots, transport.

## Introdução

O nitrogênio (N) é essencial para o crescimento vegetal, participando na composição de ácido nucleicos, proteínas, aminoácidos e outros importantes constituintes celulares, incluindo membranas e diversos hormônios vegetais. O nitrogênio está presente na atmosfera na forma de N2, no entanto essa forma não pode ser absorvida e assimilada pelas plantas, devido à alta estabilidade dessa molécula.

No solo, o N é encontrado em formas inorgânicas, como nitrato ($NO_3^-$) e amônio ($NH_4^+$), e formas orgânicas, como aminoácidos, peptídeos e formas mais complexas e insolúveis (WILLIAMS e MILLER, 2001).

O nitrato e o amônio representam a maior fonte de N para a maioria das plantas, principalmente nos países situados em regiões tropicais. Para os cereais, como o arroz, o $NO_3^-$ é a principal fonte de N, e devido à baixa disponibilidade natural desse nutriente no solo faz-se necessário o fornecimento, por meio de adubações, durante o ciclo da cultura.

Uma parcela do N aplicado no solo é perdida devido a inúmeros fatores ambientais, e a outra parcela é absorvida pelas raízes das plantas.

A absorção de nitrogênio é realizada por transportadores (proteínas) localizados nas membranas plasmáticas das células radiculares. Os transportadores são classificados como de alta afinidade (HATS) ou de baixa afinidade (LATS).

O gene *OsNRT1.3*, renomeado recentemente como NPF 6.4 (*Nitrate transporter 1/Peptide transporter Family*) por Léran et al. (2014), codifica para proteínas transportadoras de baixa afinidade, que absorvem $NO_3^-$ quando as concentrações externas estiverem situadas acima de 1 milimolar. Apesar das informações iniciais desse gene serem conhecidas, até o momento, nenhum estudo havia relatado de fato o papel desse transportador em plantas de arroz.

Sendo assim, o objetivo desse estudo foi realizar a caracterização funcional do transportador *OsNRT1.3*.

## Material e Métodos

### Produção de Linhagens Mutantes com o Uso do Sistema CRISPR-Cas9

Os gRNAs foram obtidos na plataforma CRISPR-PLANT. O plasmídeo utilizado no processo de transformação genética foi sintetizado de acordo com XIE e YANG (2013).

### Transformação de arroz

O plasmídeo pRGEB31-gRNA foi introduzido em células de *Agrobacterium tumefaciens* estirpe EHA105 e foi realizada a transformação de calos embriogênicos de arroz mediada por Agrobacterium. Para transformação de plantas de arroz foi utilizado o método de transformação de Toki et al. (2006) com adaptações. As linhagens obtidas foram selecionadas e cultivadas em casa de vegetação para obtenção de sementes que foram utilizadas para os estudos sobre a função do gene *OsNRT1.3* e seu papel na remobilização de N em plantas de arroz.

**Condições Experimentais**

O experimento foi implantado e conduzido em casa de vegetação localizado no Departamento de Solos da UFRRJ. Inicialmente foi realizado um screening das linhagens obtidas durante o processo de transformação genética. Para isso as plantas foram cultivadas em solução nutritiva acrescida de higromicina (antibiótico de seleção). As linhagens resistentes foram selecionadas (L1, L5 e L9) e utilizadas para realização do experimento.

Foram separadas 50 sementes de cada linhagem e desinfestadas com hipoclorito de sódio 2,5% por 30 minutos, e lavadas em seguida com água destilada 5 vezes. Em seguida, as sementes foram colocadas sobre gaze em vasos de 700 mL e colocadas para germinar em água destilada na casa de vegetação. Dez dias após a germinação (DAG), as plântulas passaram a ser cultivadas em uma solução nutritiva de Yoshida et al. (1976) com 1 FI de 2 mM de $NO_3^-$, com troca realizada a cada três dias durante 10 dias. Aos 23 DAG iniciaram-se os tratamentos: metade dos vasos permaneceram com 2 mM de $NO_3^-$ enquanto a outra metade passou a ser fornecida uma solução de 0,2 mM de $NO_3^-$ com troca de solução nutritiva realizada a cada 3 dias.

Aos 28 DAG, no momento da troca de solução, alíquotas de 1 mL de solução nutritiva foram coletadas nos tratamentos 1 (durante 28 horas) e tratamento 2 (durante 50 horas) para determinação da depleção de N-$NO_3^-$, de acordo com seguinte esquema: Tratamento 1 (0,2 mM de N-$NO_3^-$) – amostras coletadas em intervalos de 60 minutos, do ponto zero até o nono ponto de coleta, seguido de um intervalo de 16 horas, e retomada da coleta, em intervalos de 60 minutos, até a vigésima oitava hora. Tratamento 2 (2 mM de N-$NO_3^-$) - amostras coletadas em intervalos de 120 minutos, do ponto zero até o décimo ponto de coleta, seguido de um intervalo de 15 horas, e retomada da coleta, em intervalos de 120 minutos, até a quinquagésima hora.

Aos 31 DAG foi realizada a última troca de solução nutritiva, para ambos os tratamentos, e a coleta do experimento foi realizada três horas após essa troca. As plantas foram particionadas em raízes e folhas, e utilizadas para determinação da atividade da enzima nitrato redutase de acordo com Jaworski (1971).

**Resultados e Discussão**

Ao analisar a atividade da enzima nitrato redutase (NR), foi observada que nas plantas cultivadas com baixa concentração de N, isto é, 0,2 mmol de $NO_3^-$, houve um aumento na atividade da NR nas raízes das plantas mutantes, enquanto na parte aérea, houve uma queda em relação à wild type (WT), demonstrando que todas as plantas absorveram o nitrato fornecido, entretanto, o N não foi transportado de forma eficiente para a parte aérea (Figura 1A e 1B).

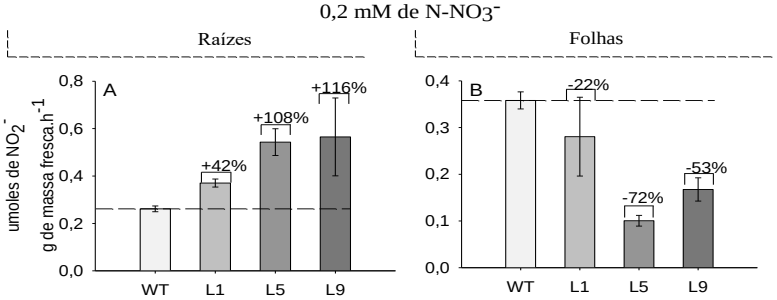


**Figura 1.** Atividade da enzima nitrato redutase nas raízes (A) e nas folhas (B) de três linhagens de arroz (var. Nippombare) mutantes por nocaute para o gene *OsNRT1.3* (L1, L5 e L9) e um controle (WT – Wild type).

Já nas plantas que receberam tratamento com alto N, isto é, 2 mM de nitrato, todas as linhagens apresentaram aumento da atividade da NR, embora a L9 tenha sofrido um aumento mais brando (Figura 2A e 2B). Houve uma queda na atividade da NR nas folhas, assim como nas plantas cultivadas em baixo N, indicando uma desregulação no envio de $NO_3^-$para a parte aérea.

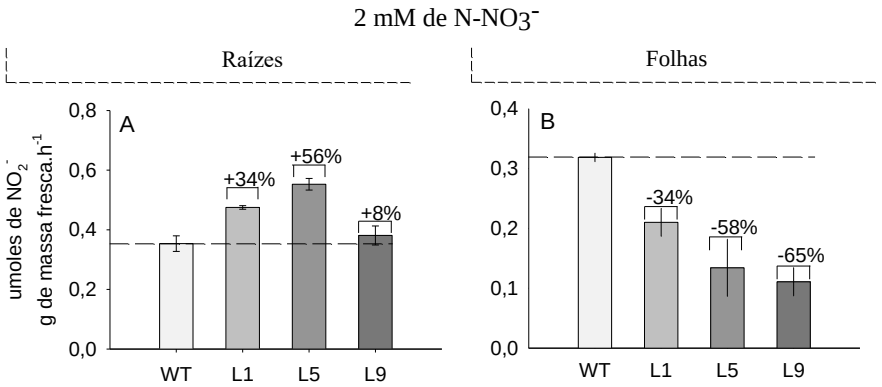


**Figura 2.** Atividade da enzima nitrato redutase nas raízes (A) e nas folhas (B) de três linhagens de arroz (var. Nippombare) mutantes por nocaute para o gene *OsNRT1.3* (L1, L5 e L9) e um controle (WT – Wild type).

Tanto as plantas mutantes, quanto as plantas WT, cultivadas com 0,2 mM de $NO_3^-$, apresentaram uma queda semelhante na concentração de $NO_3^-$ em solução nutritiva, esgotando todo N após 8 horas de estudo (Figura 3A).

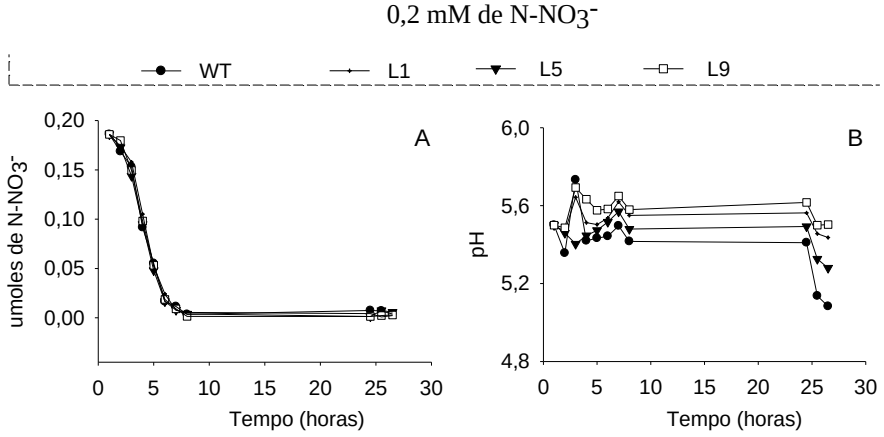


**Figura 3**. (A) Depleção de N-$NO_3^-$ e (B) variação de pH em solução nutritiva utilizada no cultivo de três linhagens de arroz mutantes por nocaute para o gene OsNRT1.3 (L1, L5 e L9) e um controle (WT – Wild type).

O pH da solução de todas as plantas cultivadas com 0,2 mM de N-$NO_3^-$apresentou uma pequena queda, sendo mais expressiva nas plantas WT (Figura 3B). Apesar de terem absorvido o N numa velocidade semelhante, as plantas WT apresentaram uma queda mais acentuada do pH (Figura 3B). A absorção de $NO_3^-$, por ser realizada por um sistema do tipo simporte (entrada de uma molécula de $NO_3^-$ junto com duas moléculas $H^+$, geralmente resulta em um aumento no pH da solução do solo. Porém, já foi observado por Pereira (2019) tendência de acidificação do meio quando o $NO_3^-$ é fornecido em baixas concentrações (dados

não publicados), possivelmente devido a um esforço extra da planta em aumentar a quantidade de H+ na solução externa e potencializar a absorção do $NO_3^-$ quando presente em baixas concentrações.

As plantas mutantes, cultivadas com 2,0 mM de $NO_3^-$, apresentaram um claro retardo na absorção de N se comparadas as plantas WT (Figura 4A). Aproximadamente 25 horas após o estudo as plantas WT já tinham absorvido praticamente todo o N fornecido em solução, enquanto nesse mesmo período a linhagem 5, que apresentou a maior velocidade de absorção em ter as linhagens em estudo, ainda restava absorver cerca de 25% do $NO_3^-$. As linhagens 1 e 9 demonstraram um atraso ainda mais severo na absorção do N, restando nesse mesmo período cerca de 40 e 60% de todo o N fornecido, respectivamente. Apesar dessa diferença de depleção relatada, passadas 50 horas do início do estudo todas as plantas conseguiram absorver todo o N fornecido.

Todas as plantas cultivadas com 2 mM de $NO_3^-$ apresentaram um aumento no pH na solução nutritiva (Figura 4B). De acordo com Souza e Fernandes (2018), as plantas ao absorverem nitrato, aumentam o pH da solução nutritiva devido à absorção diferenciada de cátions e ânions. Dessa forma, o aumento na absorção de nitrato pode ter sido responsável pelo aumento do pH, a fim de manter um equilíbrio de cargas nas células. O aumento do pH foi proporcional até 35 horas de estudo, e partir desse ponto plantas WT apresentaram uma tendência de estabilização enquanto o pH da solução em que foram cultivadas as linhagens mutantes continuou a aumentar. Esse comportamento diferencial entre as plantas pode-se ser explicado pela presença de N na solução das plantas mutantes mesmo após 35 horas após início do estudo, enquanto as plantas mutantes já tinham esgotado todo N nesse período.

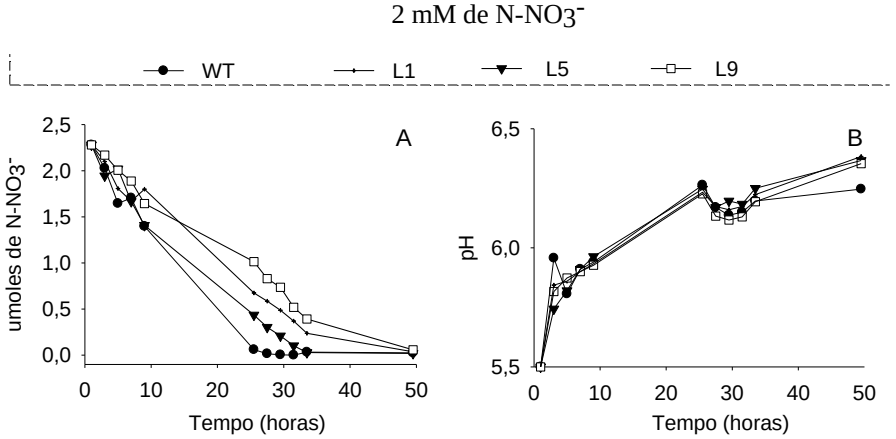


**Figura 4.** (A) Depleção de $N\text{-}NO_3^-$ e (B) variação de pH em solução nutritiva utilizada no cultivo de três linhagens de arroz mutantes por nocaute para o gene *OsNRT1.3* (L1, L5 e L9) e um controle (WT – Wild type).

## Conclusões

De acordo com as condições experimentais, pode-se concluir que a proteína codificada pelo gene *OsNRT1.3* é responsável pela absorção de $NO_3^-$ em ambientes com altas concentrações desse nutriente.

A menor atividade da Nitrato Redutase na parte aérea, tanto em condições de alto quanto de baixo N, sugere uma participação do OsNRT1.3 no direcionamento de $NO_3^-$ para a parte aérea das plantas.

Estudos de localização dessa proteína ainda é necessário para a completa caracterização funcional.

## Referências Bibliográficas

JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 43, p. 1274-1279, 1971.

LÉRAN, S. et al. A unified nomenclature of Nitrate Transporter 1/Peptide Transporter family members in plants. **Trends in Plant Science**, v. 19, p. 5-9, 2013.

SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M.S; SOUZA, S. R; SANTOS, L. A. (Org.) **Nutrição Mineral de Plantas.** Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 2, p. 309-376, 2018.

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.

WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual review of plant biology**, v. 52, n. 1, p. 659-688, 2001.

XIE, K. & YANG, Y. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR–Cas system. **Molecular Plant**, v. 6, p. 1975-1983, 2013.

YOSHIDA, S.; FORNO, D. A.; COCK, J. H.; GOMEZ, K. A. Laboratory manual for physiological studies of rice. **International Rice Research Institutes**, 3rd ed. Manila, Philippines, 83 p., 1976.

PEREIRA, E. G. **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.