

Superexpressão do transportador OsNPF4.11 (OsNRT1.2) afeta teor de nitrato, parâmetros radiculares e crescimento de arroz

Leilson Novaes Arruda¹, Carlos Alberto Bucher¹, Rafael Passos Rangel¹,
Andressa Fabiane Faria de Souza¹, Manlio Silvestre Fernandes¹, Sonia Regina de Souza²

¹ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ, Brasil. E-mail: arrudaln@hotmail.com (ORCID: 0000-0002-8504-8040); bucher.carlos@yahoo.com.br (ORCID: 0000-0002-2746-816X); rafaprangell@yahoo.com.br (ORCID: 0000-0002-5146-4601); affariasouza@gmail.com (ORCID: 0000-0002-5368-5221); manliosf@gmail.com (ORCID: 0000-0001-5329-6122)

² Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/Instituto de Ciências Exatas/Departamento de Química/Área de Bioquímica/Laboratório de Bioquímica de Plantas, Seropédica, RJ, Brasil. E-mail: sonia_ufrrij@yahoo.com.br (ORCID: 0000-0001-5206-1030)

RESUMO: Reduzir as quantidades de fertilizantes nitrogenados e encontrar cultivares com maior eficiência no uso de nitrogênio são os principais objetivos atualmente da nutrição de plantas, pois parte do nitrogênio (N) aplicado ao solo com o intuito de maximizar a produção, pode ser perdido por lixiviação para o lençol freático, lagos e rios ou para a atmosfera causando graves problemas ambientais e aumento no custo de produção. Dentre as estratégias para aumentar a eficiência de uso de N é proposto no presente trabalho superexpressar o transportador de nitrato OsNPF4.11 em arroz. As linhagem transformadas OsNPF4.11 foram cultivadas em solução nutritiva contendo 0,2 mM N-NO₃⁻. Foi observado que as plantas transgênicas apresentaram um maior acúmulo de NO₃⁻ na raiz o que afetou o crescimento das plantas, as quais apresentaram uma menor massa seca de parte aérea e um sistema radicular menos desenvolvido.

Palavras-chave: eficiência de uso; nitrogênio; *Oryza sativa* L.

Overexpression of nitrate transporter OsNPF4.11 (OsNRT1.2) affects growth in rice plants

ABSTRACT: Reduce the amounts of nitrogen fertilizers and finding varieties with a high nitrogen use efficiency are the main objectives of plant nutrition. A large part of the nitrogen (N) applied to the soil in order to maximize production is lost by leaching to the groundwater, lakes and rivers or to atmosphere by volatilization causing serious environmental impacts and high production costs. Among the strategies to increase NUE in the present work we propose to overexpression the nitrate transporter OsNPF4.11 in rice. Transformed OsNPF4.11 lines were grown in nutrient solution containing 0.2 mM N-NO₃⁻. It was observed that the transgenic plants had a greater NO₃⁻ accumulation in the root affecting the plants growth, which presented a lower shoot dry mass and a less developed root system.

Key words: use efficiency; nitrogen; *Oryza sativa* L.

Introdução

A absorção de N é o primeiro passo que pode ser manipulado visando o aumento da eficiência no uso de nitrogênio (EUN). Uso de cultivares melhoradas que são mais eficientes em capturar o N do solo, durante todo o ciclo da cultura, pode diminuir as perdas de N por lixiviação e desnitrificação (Xu et al., 2012).

A maioria das plantas cultivadas em ambientes tropicais e subtropicais absorve predominantemente N mineral, como nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+). A forma inorgânica em que o N se encontra no solo depende das condições ambientais. Em condições aeradas, o NO_3^- é a maior fonte de N, porém em sistema de arroz inundado a difusão de oxigênio pelas raízes, devido a tecidos especializados denominados aerênquimas que facilitam essa difusão, promove o processo de nitrificação em sua rizosfera e com isso ocorre a absorção de NO_3^- pelas plantas de arroz mesmo nestas condições, tendo um significativo efeito positivo no desenvolvimento do vegetal (Kirk & Kronzucker, 2005).

A absorção de NO_3^- pelas raízes é realizada por proteínas pertencentes à família multigênica NRT1 e NRT2, as quais podem ser constitutivas ou induzidas pela presença de seu substrato NO_3^- , e são classificadas em dois sistemas de transporte de acordo com a sua afinidade pelo substrato: sistema de transporte de alta afinidade (HATS – High Affinity Transport System) e sistema de transporte de baixa afinidade (LATS - Low Affinity Transport System). O LATS atua em concentrações externas superiores a 1mM de NO_3^- e o HATS em concentrações externas inferiores a 1mM (Cerezo et al., 2001).

Em *Arabidopsis*, o CHL1 (AtNRT1.1) e os demais membros da família NRT1 participam do sistema de baixa afinidade (LATS), e os membros da família NRT2 participam do sistema de alta afinidade, sendo os transportadores AtNRT2.1 e AtNRT2.2 induzidos pela presença de nitrato (iHATS) e os transportadores AtNRT2.3, AtNRT2.4, AtNRT2.5, AtNRT2.6 e AtNRT2.7 constitutivos (cHATS), ou seja, expressos independente da presença do NO_3^- (Figura 1) (Souza & Fernandes, 2006; Wang et al., 2012b)

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

Os transportadores de alta afinidade (HATS) tem papel fundamental na eficiência de absorção sob baixa disponibilidade de N (Kiba & Krapp, 2016). Porém, alguns

transportadores podem ser de dupla afinidade como, por exemplo, o NRT1.1 de *Arabidopsis* (NPF6.3.), atuando tanto em alta como em baixa afinidade. O OsNRT1.1 também está envolvido nos processos de sinalização os quais conduzem a mudanças no desenvolvimento das raízes, funciona como um sensor de nitrato para ativar a expressão de genes relacionados ao metabolismo do íon, mudança na germinação de sementes, facilita o transporte de auxina em uma via reprimida pelo nitrato e também reprime o crescimento de raízes laterais em baixa disponibilidade de nitrato (Dechorgnat et al., 2011).

Outro membro do sistema de baixa afinidade (LATS) com um distinto modelo de expressão é o NRT1.2, onde em *Arabidopsis* foi expresso especificamente nos pêlos radiculares e na epiderme das pontas e regiões maduras da raiz, apresentando um K_M para o NO_3^- em torno de 6 mM em ovócito (Huang et al., 1999). Ao contrário da expressão induzida pelo nitrato do NRT1.1, o RNA mensageiro do AtNRT1.2 acumula mesmo na ausência de nitrato, demonstrando ser um componente constitutivo do LATS (Dechorgnat et al., 2011). Porém em arroz, Bucher et al. (2014), analisando as cultivares Piauí e IAC 47 observaram um aumento na expressão do OsNRT1.2 (OsNPF4.11) quando cultivados sob baixa concentração de NO_3^- , o mesmo foi observado por Arruda (2014) analisando as cultivares Piauí, IAC 47, Manteiga e Caiapó, indicando que em arroz esse transportador pode atuar em faixas de concentrações inferiores a 1mM de N- NO_3^- . Também, plantas de arroz submetidas ao estresse salino apresentaram aumento de expressão do gene OsNRT1.2(OsNPF4.11) nas folhas velhas, indicando que esse gene pode estar envolvido na acumulação de NO_3^- nesse tecido (Wang et al., 2012a).

Esse trabalho teve por objetivo avaliar se a superexpressão do gene OsNPF4.11(OsNTR1.2) pode melhorar a habilidade das plantas em absorver N- NO_3^- em condições de baixo suprimento desse nutriente, contribuindo assim, para a maior eficiência de uso de N.

Material e Métodos

Construção gênica e obtenção das linhagens transformadas

As linhagens mutantes de arroz da cultivar nipponbare foram produzidas expressando OsNRT1.2 (NPF4.11) sob o controle do promotor Rcc3 do arroz, um promotor específico de raiz. Inicialmente o gene NPF4.11 foi amplificado do cDNA da cultivar Piauí, utilizando a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Life Technologies). Para clonagem desse gene nos vetores para superexpressão em arroz, foi utilizado o sistema de clonagem MultiSite Gateway (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), que se baseia em reações de recombinação sítios específica, gerando a construção Rcc3: NPF4.11: 3xHA.A construção foi então inserida em *Agrobacterium tumefaciens* cepa LB4404.

As plantas de arroz foram transformadas utilizando *A. tumefaciens* de acordo com o método descrito por Toki et al. (2006). As linhagens transformadas T1 foram confirmadas

por resistência à higrominina conferida pelo gene *hph* dirigido pelo promotor da ubiquitina 1 do milho.

Condições de cultivo das plantas

As linhagens transgênicas selecionadas foram cultivadas em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12h/12h (luz/escuro), fluxo de fótons fotossintéticos de 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, umidade relativa do ar de 70% e temperatura de 28°C/24°C (diurna/noturna). Foram utilizadas três linhagens superexpressando o transportador *OsNRT1.2* (L3, L4 e L8) e uma linhagem tipo selvagem (WT) como controle. As sementes foram germinadas na superfície de uma lâmina d'água de um vaso de 700 mL, sustentadas por gaze. No sexto dia após a germinação (DAG), as plantas foram submetidas a uma solução de Hoagland & Arnom (1950) com 1/2 de força iônica contendo 2mM de N-NO_3^- por seis dias. No 12° DAG as plantas foram submetidas a uma nova solução com 1/2 de força iônica contendo 0,2 mM de N-NO_3^- assim permanecendo até o 18° DAG. No 18° DAG, seis horas após a troca de solução, todas as plantas foram coletadas. Após coletadas as plantas foram pesadas e o peso fresco da parte aérea e raiz, assim como a relação raiz/parte aérea foram obtidos. Amostras de raízes foram coletadas e armazenadas a -80 °C para as análises de expressão gênica dos transportadores de nitrato. Amostra de raízes e parte aérea foram coletadas, armazenadas em etanol 80% para posterior extração da fração solúvel e determinação dos teores de metabólitos solúveis. Raízes intactas das plantas WT e das linhagens transformadas foram coletadas e escaneadas com uma resolução de 600 dpi. As imagens geradas foram analisadas utilizando o software WinRizo Arabdopsis (Regent Instruments, 2012) e os seguintes parâmetros radiculares obtidos: comprimento, área de superfície, diâmetro médio, volume radicular e número de pontas.

Reações de PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real para análise da expressão diferencial do gene *OsNRT1.2* foi realizada usando o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. Os primer para os genes estudados foram desenhados utilizando-se o programa Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) (Tabela 1). A especificidade do primer foi analisada usando a ferramenta primer BLAST do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), assim como por meio da curva de *melting* no final da reação de PCR.

Os genes da Actina2 e Ubiquitina5 (Jain et al, 2006) foram utilizados como de referência para normalização

da expressão gênica. A expressão gênica diferencial foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Como controle foi utilizada a linhagem tipo selvagem, a qual recebeu o valor de expressão igual a 1.

Análises das frações nitrogenadas e açúcares solúveis

Amostras de 1g de raiz e parte aérea foram coletadas e homogeneizadas em etanol 80%. Após partição com clorofórmio (Fernandes, 1984) a fração solúvel obtida foi utilizada para a determinação dos teores de N-amino livre (Yemm & Cocking, 1955), N-NO_3^- (Miranda et al., 2001), N-NH_4^+ (Felker, 1977) e açúcares solúveis (Yemm & Willis, 1957).

Análise estatística

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

Resultados e Discussão

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

A RT-qPCR foi realizada para analisar o padrão de expressão do gene *OsNPF4.11* nas raízes das plantas WT e das linhagens transformadas cultivadas com 0,2 mM de NO_3^- por seis dias. Houve um aumento significativo de expressão de até aproximadamente 35 vezes nas linhagens mutantes em comparação com as plantas WT, demonstrando que o *OsNPF4.11* foi superexpresso nas raízes das linhagens transformadas (Figura 1).

Superexpressão do *OsNPF4.11* significativamente aumenta o acúmulo de NO_3^- nas raízes

As linhagens transformadas apresentaram maiores teores de NO_3^- na raiz em comparação com as plantas WT (Figura 2A), uma diferença de até aproximadamente 13 vezes. Na bainha apenas a L8 apresentou diferença significativa em comparação com a WT (Figura 2C). Na folha não foram observadas diferenças significativas. (Figura 2E).

Os teores de NH_4^+ das linhagens transformadas foram inferiores as plantas WT nas raízes (Figura 2B). Porém teores de NH_4^+ mais elevados foram observados nas bainhas das linhagens transformadas em relação as plantas WT (Figura 2D). Na folha não houve diferenças significativas (Figura 2F).

Na raiz, a L4 apresentou um pequeno incremento (aproximadamente 1,3x) nos teores de N-amino, diferindo

Tabela 1. Sequências dos primers (iniciadores) forward e reverse usados nas reações de PCR em tempo real para o gene do transportador de nitrato *OsNPF4.11* e os genes de referência Actina (*OsAct2*) e Ubiquitina 5 (*UBQ5*) de arroz e números de acesso no banco de dados do NCBI.

Gene	Nº acesso	Primer forward	Primer reverse
<i>OsNPF4.11</i>	NM_001064472.1	5'-CAATCTGTAATGCAGGGTTAACTGTT -3'	5'-AGCATCTCAAGACCACCAAAA-3'
<i>OsACT2</i>	NM_001057621.1	5'-CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA -3'	5'-CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA -3'
<i>OsUBC5</i>	AK061988	5'-ACCACTTCGACCGCCACTACT-3'	5'-ACGCCTAAGCCTGCTGGTT-3'

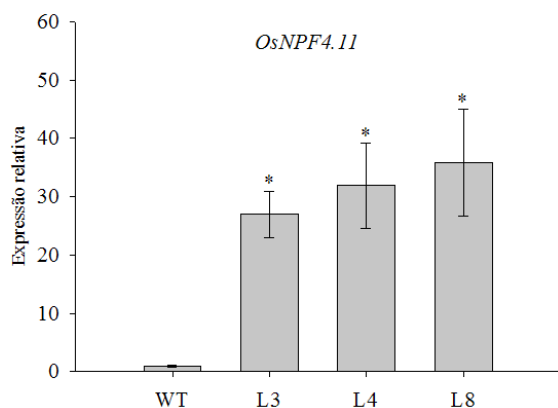


Figura 1. Expressão gênica relativa do transportador de nitrato *OSNPF4.11* em raízes das plantas WT e das linhagens transformadas L3, L4 e L8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. Asterisco indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média.

significativamente da WT (Figura 3A), porém o mesmo não foi observado nas linhagens L3 e L8. Na bainha todas as linhagens apresentaram maiores teores comparadas com a WT (Figura 3C). A linhagem L4 também apresentou uma pequena redução na porcentagem de açúcar solúvel nas raízes (Figura 3B). Na bainha um pequeno aumento foi observado nas linhagens L4 e L8 em comparação com as plantas WT (Figura 3D).

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

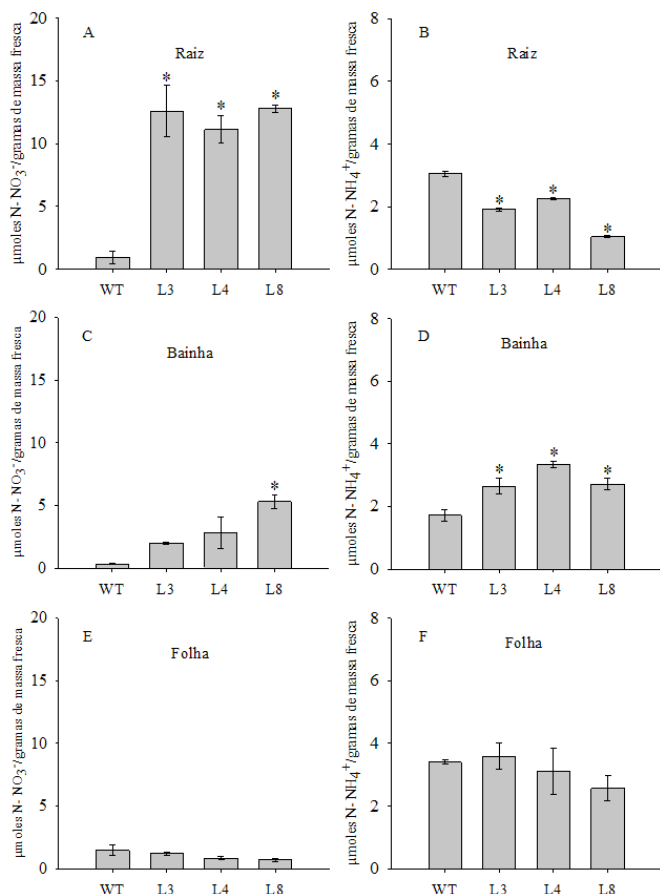


Figura 2. Teores de nitrato ($N-NO_3^-$) e amônio ($N-NH_4^+$) na folhas, bainhas e raízes das plantas WT e das linhagens transformadas L3, L4 e L8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. Asterisco indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média.

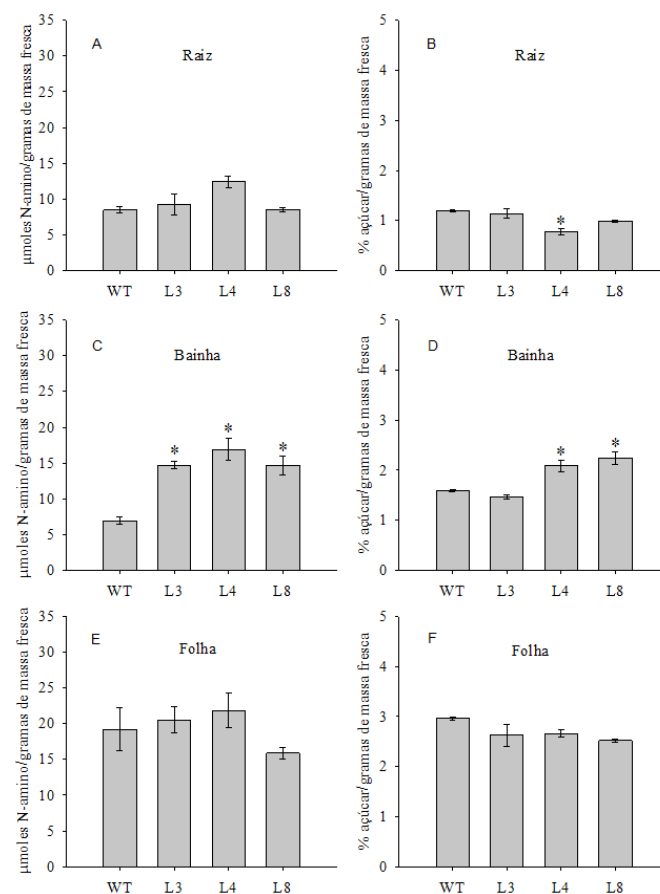


Figura 3. Teores de N-amino e porcentagem de açúcares solúveis na folhas, bainhas e raízes das plantas WT e das linhagens transformadas L3, L4 e L8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. Asterisco indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média.

Superexpressão do OsNPF4.11 significativamente reduz o crescimento e altera a arquitetura radicular

Houve diferença significativa entre as plantas WT e as linhagens transformadas no peso fresco da parte aérea e raiz (Figura 4A; Figura 4B), nas linhagens transformadas houve uma redução de até 85% no peso fresco de raiz e de até 83% no peso fresco de parte aérea.

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

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

Houve redução significativa nas linhagens transformadas em relação às plantas WT e em quase todos os parâmetros

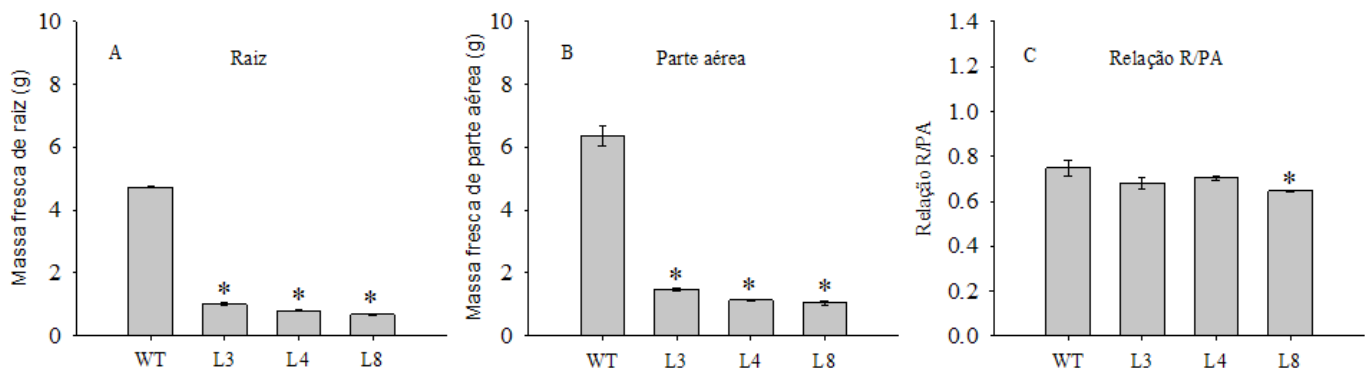


Figura 4. Peso fresco de raiz e parte aérea, e relação raiz/parte aérea das plantas WT e das linhagens transformadas L3, L4 e L8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de N-NO_3^- por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. Asterisco indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média.

morfológicos, exceto diâmetro médio (Figura 5). Diferenças significativas também não foram observadas quanto ao número de pontas por milímetro (mm) de raiz (Figura 5F), indicando que apesar de uma redução no sistema radicular,

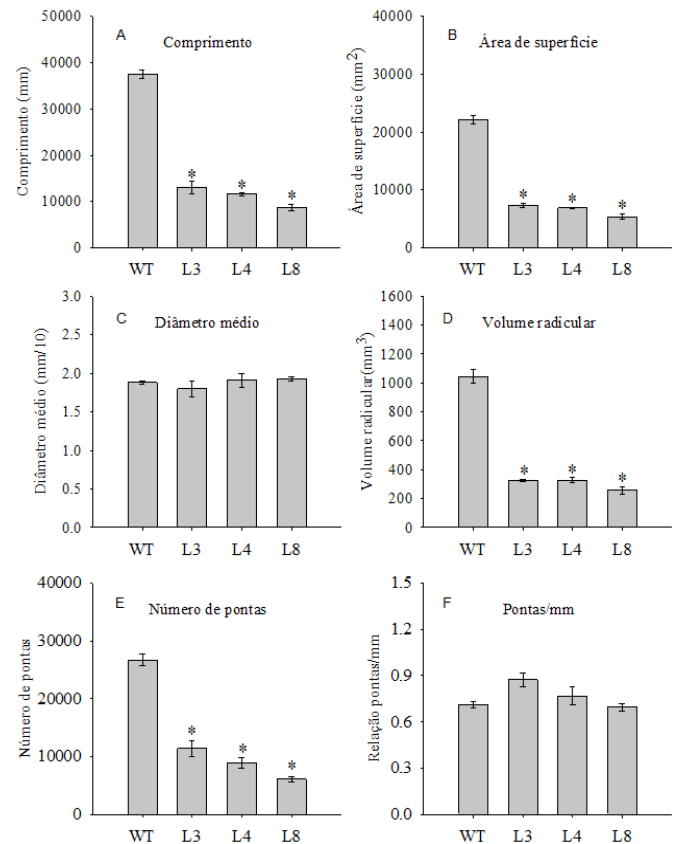


Figura 5. Parâmetros radiculares: comprimento, área de superfície, diâmetro médio, volume radicular, número de pontas e pontas por milímetro de raiz obtidos de raízes intactas, utilizando o software WinRizo Arabdopsis, das plantas WT e das linhagens transformadas L3, L4 e L8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de N-NO_3^- por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. Asterisco indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média.

a densidade de raízes laterais por milímetro e o diâmetro médio permaneceram inalterados.

Os parâmetros radiculares comprimento, área de superfície, volume radicular e número de pontas dentro das seguintes classes de diâmetro: de 0 a 1,50 mm, 1,50 a 3,50 mm e maior que 3,50 mm apresentaram um uma redução (de até mais de 50%) nas linhagens transformadas em relação as plantas WT (Figura 6).

O status interno de N pode alterar a arquitetura do sistema radicular, Zhang & Forde (1998) demonstram que o crescimento da raiz lateral é inibido por elevadas concentrações internas de N, do mesmo modo Scheible et al. (1997) encontraram correlação inversa altamente significativa entre o os níveis de NO_3^- na parte aérea e o crescimento radicular. Nas Figuras 5 e 6 pode-se observar que um aumento nos teores internos de NO_3^- na raiz em

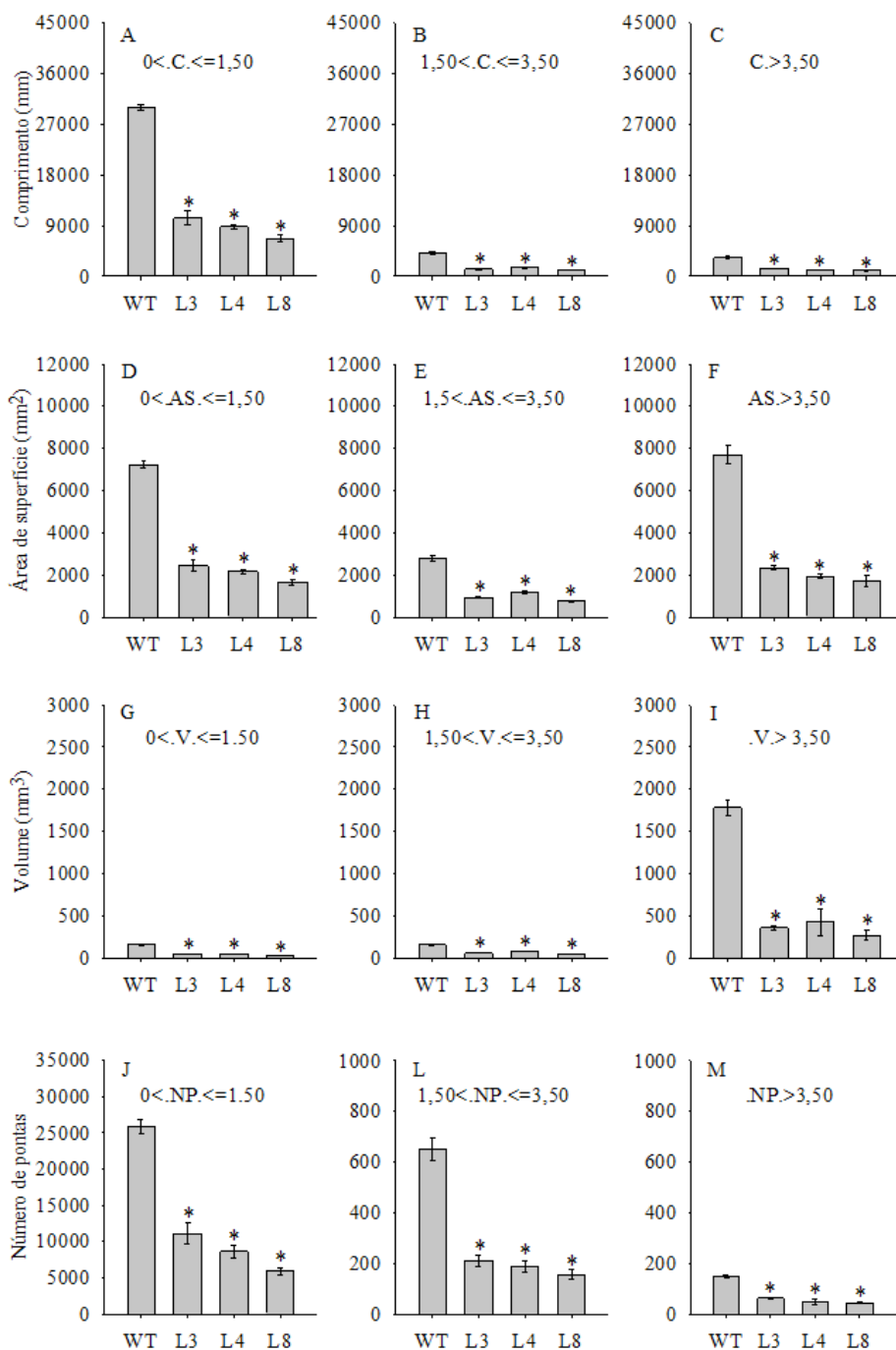


Figura 6. Parâmetros radiculares: comprimento, área de superfície, volume radicular e número de pontas dentro das classes de diâmetro: de 0 a 1,50 mm, 1,50 a 3,50 mm e maior que 3,50 mm, obtidos de raízes intactas, utilizando o software WinRizo Arabdopsis, das plantas WT e das linhagens transformadas L3, L4 e L8, cultivadas sob suprimento constante com 0,2 mM de N-NO₃⁻ por seis dias como única fonte de N, coletadas no 18^o DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. Asterisco indica diferença significativa entre a linhagem e a WT pelo teste de Dunnet (p < 0,05). As barras indicam o erro padrão da média.

função do aumento na expressão do OsNPF4.11 pode ter influenciado na arquitetura do sistema radicular, uma provável hipótese é que, como mencionado anteriormente, pelo fato de o NO_3^- ter sido preferencialmente acumulado nos vacúolos das plantas transformadas, o mesmo não foi assimilado, comprometendo de um modo geral no crescimento das plantas, como já foi observado por Wang et al. (2004) em que plantas de *Arabidopsis* com uma deleção no principal gene da NR (NiA2), tiveram seu crescimento totalmente comprometido quando crescidas em meio com NO_3^- como única fonte de N.

Conclusões

A superexpressão do transportador OsNR1.2 acarretou em um aumento nos teores de NO_3^- na raiz, o qual provavelmente prejudicou o crescimento das plantas, acarretando em uma redução na massa fresca de raiz, parte aérea, bem como uma diminuição dos parâmetros radiculares das plantas transformadas.

Agradecimentos

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo (CPGA-CS) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Literatura Citada

Arruda L.N. Metilação diferencial do DNA e metabolismo do nitrogênio em variedades de arroz submetidas a alto e baixo suprimento de nitrato. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2014. 67p. Dissertação Mestrado.

Bucher, C. A.; Santos, L. A.; Nogueira, E. M.; Rangel, R. P.; Souza, S. R.; Fernandes, M. S. The transcription of nitrate transporters in upland rice varieties with contrasting nitrate uptake kinetics. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, v. 177, n. 3, p. 395-403, 2014. <https://doi.org/10.1002/jpln.201300086>.

Cerezo, M.; Tillard, P.; Filleur, S.; Munos, S.; Daniel - Vedele, F.; Gojon, A. Major alterations of the regulation of root NO_3^- uptake are associated with mutation of NRT2.1 and NRT2.2 genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 127, n. 1, p. 262-271, 2001. <https://doi.org/10.1104/pp.127.1.262>.

Dechorgnat, J.; Nguyen, C. T.; Armengaud, P.; Jossier, M.; Diatloff, E.; Filleur, S.; Daniel-Vedele, F. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *Journal of experimental botany*, v. 62, n. 4, p. 1349-1359, 2011. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq409>.

Felker, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts with the salicylate-dichloroisocyanurate color reaction. *Analytical Chemistry*, v. 49, n. 7, p. 1080-1080, 1977. <https://doi.org/10.1021/ac50015a053>.

Fernandes, M. S. N carriers, light and temperature influences on the free amino acid pool composition of rice plants. *Turrialba*, v.33, n.3, p.297-301, 1984.

Fuentes S. I.; Allen D. J.; Ortiz Lopez A.; Hernández, G. Over-expression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. *Journal of Experimental Botany*, v. 52, n. 358, p. 1071-1081, 2001. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.358.1071>.

Habash D. Z., Massiah A. J., Rong H. L., Wallsgrave R. M., Leigh, R. The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. *Annals of Applied Biology*, v. 138, n. 1, p. 83-89, 2001. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2001.tb00087.x>.

Han, Y. L.; Song, H. X.; Liao, Q.; Yu, Y.; Jian, S. F.; Lepo, J. E.; Liu, Q.; Rong, X. M.; Tian, C.; Zeng, J.; Guan, C. Y.; Ismail, A. M.; Zhang, Z. H. Nitrogen use efficiency is mediated by vacuolar nitrate sequestration capacity in roots of *Brassica napus*. *Plant Physiology*, v.170, n.3, p. 1684-1698, 2016. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01377>.

Hoagland, D. R.; Arnon, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32p. (California Agricultural Experiment Station. Circular, 347). <https://archive.org/details/watercultureme3450hoag>. 17 Feb. 2017.

Huang, N. C.; Liu, K. H.; Lo, H. J.; Tsay, Y. F. Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *The Plant Cell Online*, v. 11, n. 8, p. 1381-1392, 1999. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.8.1381>.

Jain, M; Nijhawan, A; Tyagi, A.k.; Khurana, J.P. 2006. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 345, n. 2, p. 646-651, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.140>.

Kiba, T.; Krapp, A. Plant nitrogen acquisition under low availability: regulation of uptake and root architecture. *Plant and Cell Physiology*, v. 57, n. 4, p. 707-714, 2016. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw052>.

Kirk, G. J. D.; Kronzucker, H. J. The potential for nitrification and nitrate uptake in the rhizosphere of wetland plants: Modeling study. *Annals of Botany*, v. 96, n. 4, p. 639-646, 2005. <https://doi.org/10.1093/aob/mci216>.

Kusano, M.; Tabuchi, M.; Fukushima, A.; Funayama, K.; Diaz, C.; Kobayashi, M.; Hayashi, M.; Tsuchiya, Y.N.; Takahashi, H.; Kamata, A.; Yamaya, T.; Saito, K. Metabolomics data reveal a crucial role of cytosolic glutamine synthetase 1;1 in coordinating metabolic balance in rice. *Plant Journal*, v. 66, n. 3, p. 456-466, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04506.x>.

Léran, S.; Varala, K.; Boyer, J. C.; Chiurazzi, M.; Crawford, N.; Daniel-Vedele, F.; David, L.; Dickstein, R.; Fernandez, E.; Forde, B.; Gassmann, W.; Geiger, D.; Gojon, A.; Gong, J. M.; Halkier, B. A.; Harris, J. M.; Hedrich, R.; Limami, A. M.; Rentsch, D.; Seo, M.; Tsay, T. Y.; Zhang, M.; Coruzzi, G.; Lacombe, B. A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends in Plant Science*, v. 19, n. 1, p. 5-9, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.08.008>.

- Li, Y.; Ouyang, J.; Wang, Y. Y.; Hu, R.; Xia, K.; Duan, J.; Wang Y.; Tsay Y. F.; Zhang, M. Disruption of the rice nitrate transporter OsNPF2. 2 hinders root-to-shoot nitrate transport and vascular development. *Scientific Reports*, v. 5, Article number: 9635, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep09635>.
- Lin, S. H.; Kuo, H. F.; Canivenc, G.; Lin, C. S.; Lepetit, M.; Hsu, P. K.; Tillard, P.; Lin, H. L.; Wang, Y. Y.; Tsai, B. C.; Gojon, A.; Tsay, Y. F. Mutation of the Arabidopsis NRT1. 5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *The Plant Cell*, v. 20, n. 9, p. 2514-2528, 2008. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060244>.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. Migge A.; Carrayol E.; Hirel B.; Becker T. W. Leaf-specific overexpression of plastidic glutamine synthetase stimulates the growth of transgenic tobacco seedlings. *Planta*, v. 210, n. 2, p. 252-260, 2000. <https://doi.org/10.1007/PL00008132>.
- 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, n. 1, p. 62-71, 2001. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0319>.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2011. <http://www.R-project.org>. 10 Feb. 2017.
- Regent Instruments. WinRizo Arabidopsis. Quebec: Regent Instruments, 2012.
- Scheible, W. R.; Lauerer, M.; Schulze, E. D.; Caboche, M.; Stitt, M. Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *The Plant Journal*, v. 11, n. 4, p. 671-691, 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11040671.x>.
- Souza, S. R.; Fernandes, M. S. Nitrogênio. In: Fernandes, M. S. (Ed.). *Nutrição mineral de plantas*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 15-26.
- Tang, Z.; Fan, X.; Li, Q.; Feng, H.; Miller, A. J.; Shen, Q.; Xu, G. Knockdown of a rice stelar nitrate transporter alters long-distance translocation but not root influx. *Plant Physiology*, v. 160, n. 4, p. 2052-2063, 2012. <https://doi.org/10.1104/pp.112.204461>.
- 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, n. 6, p. 969-976, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02836.x>.
- von Wittgenstein, N. J.; Le, C. H.; Hawkins, B. J.; Ehling, J. Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. *BMC Evolutionary Biology*, v. 14, n. 1, p. 11, 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-11>.
- Wang, H.; Wu, Z.; Han, J.; Zheng, W.; Yang, C. Comparison of ion balance and nitrogen metabolism in old and young leaves of alkali-stressed rice plants. *PloS One*, v. 7, n. 5, p. e37817, 2012a. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037817>.
- Wang, R.; Tischner, R.; Gutiérrez, R. A.; Hoffman, M.; Xing, X.; Chen, M.; Coruzzi, G.; Crawford, N. M. Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of Arabidopsis. *Plant Physiology*, v. 136, n. 1, p. 2512-2522, 2004. <https://doi.org/10.1104/pp.104.044610>.
- Wang, Y. Y.; Hsu, P. K.; Tsay, Y. F. Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends in Plant Science*, v. 17, n. 8, p. 458-467, 2012b. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.006>.
- Xu, G.; Fan, X.; Miller, A. J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, v. 63, p. 153-182, 2012. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105532>.
- Yemm, E. W.; Cocking, E. C. The determination of amino-acid with ninhydrin. *Analyst*, v. 80, n. 948, p. 209-214, 1955. <https://doi.org/10.1039/AN9558000209>.
- Yemm, E. W.; Willis, A. I. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*, v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954. <https://doi.org/10.1042/bj0570508>.
- Zhang, H.; Forde, B. G. An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*, v. 279, n. 5349, p. 407-409, 1998. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.407>.
- Zhang, Z. H.; Huang, H. T.; Song, H. X.; Liu, Q.; Rong, X. M.; Peng, J. W.; Xie, G.X.; Zhang, Y.P.; Guan, C. Y. Research advances on nitrate nitrogen reutilization by proton pump of tonoplast and its relation to nitrogen use efficiency. *Australian Journal of Crop Science*, v. 6, n. 9, p. 1377-1382, 2012. http://www.cropj.com/zhang_6_9_2012_1377_1382.pdf. 22 Jan. 2017.