

ALESSANDRA HARUMI URAKAWA

Envolvimento do óxido nítrico nas alterações de arquitetura radicular de *Arabidopsis thaliana* em resposta a diferentes fontes nitrogenadas

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO
2020

ALESSANDRA HARUMI URAKAWA

Envolvimento do óxido nítrico nas alterações de arquitetura radicular de *Arabidopsis thaliana* em resposta a diferentes fontes nitrogenadas

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. MARÍLIA GASPAR

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Urakawa, Alessandra Harumi

U72e Envolvimento do óxido nítrico nas alterações de arquitetura radicular de *Arabidopsis thaliana* em resposta a diferentes fontes nitrogenadas / Alessandra Harumi Urakawa - - São Paulo, 2020.
86p.; il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, 2020.
Bibliografia.

1. Arquitetura radicular. 2. Óxido nítrico. 3. GSNO redutase. I. Título.

CDU: 582.564

Dedico

Ao meu pai, Tomio Urakawa, pelos ensinamentos que me guiaram até aqui (in memoriam).

Ao Jefferson, por todo amor e companheirismo durante o tempo dedicado a este projeto.

“Um escravo no campo em uma noite,
corre através dele
Chega longe o suficiente para ser um
homem livre. E ele se sente tão forte!
É assim que as ações deveriam ser:
LIBERTADORAS”

- John Frusciante

AGRADECIMENTOS

Ao Programa da Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica, pela oportunidade de realizar o mestrado.

À minha orientadora, Dra. Marília Gaspar, que me aceitou como aluna e mesmo com todas as minhas complexidades, me ouviu e me apoiou. Sou muito grata pelos seus ensinamentos.

À minha colaboradora e também orientadora, Dra. Ione Salgado, que me orientou durante a Iniciação Científica e por todo o cuidado que teve comigo. Seus ensinamentos foram valiosos para mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Dr. Eduardo Purgatto, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela colaboração neste projeto, que permitiu a realização das análises de perfil metabólico.

Aos Dr. Luciano Freschi, do Departamento de Botânica da USP, por ter colocado à disposição reagentes e infraestrutura para dosagem do teor de SNOs por fluorimetria.

*Às Dras. Célia Leite Sant'Anna e Andrea Tucci pelo uso do microscópio para análises de NO *in situ*.*

À Dra. Amedea Barozzi Seabra e aos alunos Milena Pelegrino e Alessandro Lamarca, do Centro de Ciências Naturais e Humanas da UFABC, pela disposição do laboratório para análises de SNOs, nitrito e nitrato.

Ao Dr. André Luis Wendt Dos Santos (USP), Dra. Neidiquele Maria Silveira (IAC) e Dra. Catarina Carvahô Nievolá (IBt) pelas contribuições no Exame de Qualificação.

Ao Dr. Evandro Vieira por toda a ajuda com as análises do perfil metabólico e pelo apoio nos momentos difíceis.

Ao técnico Pedro pela ajuda nos apuros que aconteciam no laboratório, salvou meus experimentos muitas vezes.

À Victória de Carvalho que me ajudou muito nos momentos finais do trabalho e por compartilhar tanto conhecimento.

À Ingrid Catarino, que entrou nessa jornada comigo, e que foi muito parceira na reta final.

Aos colegas do Núcleo de Fisiologia e Bioquímica, Athos Poli, Simone Franco, Emanuela Joaquim, Karina Delmondes, Cynthia Murakami e Victória Alves pelo apoio, companheirismo e momentos maravilhosos no laboratório e também fora dele.

Aos colegas do Instituto de Botânica, Letícia Longuini, Deroila Marinho, Everton Fernandes, Lucas Cardinelli e Cleide Campos pelo apoio e conversas incentivadoras.

Aos pesquisadores do núcleo de Fisiologia e Bioquímica que compartilharam conhecimentos e filosofia de vida.

Aos meus amigos, Viviane Tonetto, Igor Oliveira e Jaqueline Araújo, com quem eu sei que posso contar sempre.

A todos os demais que participaram de alguma forma nessa etapa da minha vida!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da assimilação de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) em raízes e folhas.....	7
Figura 2 – Esquema das vias de síntese e degradação de óxido nítrico (NO).....	10
Figura 3 – Fenótipo radicular de <i>Arabidopsis</i> do genótipo selvagem (Col-0), aos sete dias de desenvolvimento em diferentes concentrações de NO_3^- (0,01, 0,05, 0,1 e 1 mM).....	27
Figura 4 – Fenótipo radicular de <i>Arabidopsis</i> do genótipo selvagem (Col-0), aos sete dias de desenvolvimento em diferentes concentrações de NH_4^+ (0,01, 0,05, 0,1 e 1 mM).....	28
Figura 5 – Fenótipo radicular de <i>Arabidopsis</i> , genótipos selvagem (Col-0) e mutantes com alta e baixa expressão da enzima GSNO (<i>gsnor</i> ⁺ e <i>gsnor</i> ⁻), aos quatro e sete dias de desenvolvimento em três fontes de N (1 mM NO_3^- , 1 mM NH_4NO_3 e 1 mM NH_4^+).....	31
Figura 6 – Fenótipo radicular de <i>Arabidopsis</i> genótipo selvagem (Col-0), aos quatro dias de desenvolvimento, crescido em 1 mM de NH_4^+ (controle) com adição de diferentes concentrações de GSNO ou GSH (0,1, 0,25, 0,5 e 0,75 mM).....	35
Figura 7 – Fenótipo radicular de <i>Arabidopsis</i> genótipo selvagem (Col-0), aos sete dias de desenvolvimento, crescido em 1 mM de NH_4^+ (controle) com adição de diferentes concentrações de GSNO ou GSH (0,1, 0,25, 0,5 e 0,75 mM).....	36
Figura 8 – Imagens de raízes de <i>Arabidopsis</i> do genótipo selvagem (Col-0) cultivadas sem N, com 1 mM de NH_4NO_3 , NO_3^- ou NH_4^+ , ou com 1 mM de NH_4^+ acrescido de 0,25 mM de GSNO ou GSH aos quatro e aos sete dias de desenvolvimento.....	37
Figura 9 – Fenótipo radicular de <i>Arabidopsis</i> dos genótipos selvagem (Col-0) e mutantes com alta e baixa expressão da enzima GSNO (<i>gsnor</i> ⁺ e <i>gsnor</i> ⁻) aos quatro dias de desenvolvimento em duas fontes de N (1 mM NO_3^- ou NH_4^+): efeito da adição de 0,25 mM de cPTIO, GSNO ou GSH.....	39
Figura 10 – Fenótipo radicular de <i>Arabidopsis</i> dos genótipos selvagem (Col-0) e mutantes com alta e baixa expressão da enzima GSNO (<i>gsnor</i> ⁺ e <i>gsnor</i> ⁻) aos sete dias de desenvolvimento em duas fontes de N (1 mM NO_3^- ou NH_4^+): efeito da adição de 0,25 mM de cPTIO, GSNO ou GSH.....	41
Figura 11 – Localização <i>in situ</i> da emissão de NO em raízes de <i>Arabidopsis</i> dos genótipos selvagem (Col-0) e mutantes com alta e baixa expressão da GSNO (<i>gsnor</i> ⁺ e <i>gsnor</i> ⁻) aos quatro dias de desenvolvimento, em duas fontes de N (1 mM NO_3^- ou NH_4^+): efeito da adição de 0,25 mM de cPTIO, GSNO ou GSH.....	45
Figura 12 – Amplificação e expressão do gene <i>GSNOR1</i> em raízes de <i>Arabidopsis</i> dos genótipos selvagem (Col-0) e mutantes com alta e baixa expressão da enzima GSNO (<i>gsnor</i> ⁺ e <i>gsnor</i> ⁻) aos 14 dias de desenvolvimento em 1 mM NO_3^-	46
Figura 13 – Atividade GSNO e teor de SNOs, NO_3^- e NO_2^- em raízes de <i>Arabidopsis</i> , genótipo selvagem (Col-0) e mutantes com alta e baixa expressão da enzima GSNO (<i>gsnor</i> ⁺ e <i>gsnor</i> ⁻) aos 14 dias de desenvolvimento em duas fontes de N (1 mM NO_3^- ou NH_4^+): efeito da adição de 0,25 mM de cPTIO, GSNO ou GSH.....	48

Figura 14 – Análise de expressão relativa dos genes <i>GSNOR1</i> , <i>NIA2</i> , <i>NPF6.3</i> e <i>NRT2.1</i> , em raízes de <i>Arabidopsis</i> do genótipo selvagem (Col-0) aos 14 dias de desenvolvimento em duas fontes de N (1 mM NO ₃ ⁻ ou NH ₄ ⁺): efeito da adição de 0,25 mM de GSNO ou GSH.....	51
Figura 15 – <i>Heatmap</i> dos metabólitos polares detectados por CG-EM em raízes de <i>Arabidopsis</i> genótipo selvagem (Col-0) aos 14 dias de desenvolvimento em duas fontes de N (1 mM NO ₃ ⁻ ou NH ₄ ⁺): efeito da adição de 0,25 mM de GSNO ou GSH.....	54
Figura 16 – Curvas de <i>melting</i> dos fragmentos amplificados, utilizando os pares de <i>primers</i> selecionados para os genes <i>GSNOR1</i> , <i>NIA2</i> , <i>NPF6.3</i> (<i>NRT1.1</i>), <i>NRT2.1</i>	70
Figura 17 – Fenótipo radicular de <i>Arabidopsis</i> genótipo selvagem (Col-0), aos quatro e aos sete dias de desenvolvimento, crescido em 1 mM de NH ₄ ⁺ (controle) com adição de diferentes concentrações de GSNO ou GSH (0,1, 0,25, 0,5 e 0,75 mM).....	71
Figura 18 – Concentração de NO ₃ ⁻ no meio de cultivo aos quatro, sete e 14 dias de desenvolvimento.....	72
Figura 19 – Análise de Componentes Principais (PCA) dos metabólitos de raízes de <i>Arabidopsis</i> genótipo selvagem (Col-0) aos 14 dias de desenvolvimento em duas fontes de N (1 mM NO ₃ ⁻ ou NH ₄ ⁺): efeito da adição de 0,25 mM de GSNO ou GSH.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pares de <i>primers</i> dos genes de interesse e normalizadores.....	24
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

(NH ₄) ₂ SO ₄)	Sulfato de amônio
μE	MicroEinstein
ANOVA	Análise de variância
ARBC de Arabidopsis	Arabidopsis Biological Research Center / Banco de germoplasma
BSA	Albumina de soro bovino
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de cálcio dihidratado
cDNA	DNA complementar
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
cPTIO	2-4-carboxifenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido
CuCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de cobre dihidratado
DAF-2DA	4,5 diaminofluoresceína-2 diacetato
DNase	Desoxirribonuclease
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GSH	Glutationa reduzida
GSNO	S-nitrosoglutationa
GSNO _r	S-nitrosoglutationa redutase
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
HCl	Ácido clorídrico
HgCl ₂	Cloreto de mercúrio
K ₂ SO ₄	Sulfato de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
KNO ₃	Nitrato de potássio
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado
MnCl ₂ .4H ₂ O	Cloreto de manganês (II) tetrahidratado
MSTFA	N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
N	Nitrogênio
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sódio dihidratado
NaClO	Hipoclorito de sódio
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida
NaOH	Hidróxido de sódio

NH_4^+	Amônio
NH_4NO_3	Nitrato de amônio
NO	Óxido nítrico
NO_2^-	Nitrito
NO_3^-	Nitrato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RNase	Ribonuclease
SNO	S-nitrosotióis
SNP	Nitroprussiato de sódio
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano - Ácido clorídrico
ZnCl_2	Cloreto de zinco

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Nitrogênio disponível para as plantas	3
1.2. Captação, transporte e assimilação de N	4
1.3. Fontes de N e desenvolvimento radicular	8
1.4. Óxido nítrico: biossíntese, degradação e função biológica	9
1.5. Efeito do NO no desenvolvimento radicular	12
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Material biológico e tratamentos	16
3.2. Análise morfológica das raízes.....	17
3.3. Localização <i>in situ</i> da produção de NO	17
3.4. Determinação do teor de NO ₂ ⁻ e NO ₃ ⁻ , SNOs e atividade da GSNOr	17
3.4.1. Extração	17
3.4.2. Quantificação de NO ₂ ⁻ e SNOs	18
3.4.3. quantificação de NO ₃ ⁻	18
3.4.4. Atividade GSNOr	18
3.5. Análise do perfil metabólico.....	19
3.5.1. Extração	19
3.5.2. Derivatização	20
3.5.3. Análise dos compostos	20
3.6. Análise da expressão gênica	20
3.6.1. Extração de RNA	21
3.6.2. Tratamento com DNase e Síntese de cDNA	21
3.6.3. PCR quantitativo em tempo real	22
3.6. Análise estatística.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. Efeito de diferentes concentrações de NO ₃ ⁻ e NH ₄ ⁺ no desenvolvimento radicular	25
4.2. Desenvolvimento radicular em diferentes fontes nitrogenadas: efeito do conteúdo endógeno de NO.....	28

4.3. Efeito do GSNO na ação inibitória do crescimento da raiz por NH_4^+	31
4.4. Efeito do GSNO no desenvolvimento radicular: comparação entre genótipos..	36
4.5. Localização <i>in situ</i> de NO nos diferentes tratamentos e mutantes	42
4.6. Expressão do gene <i>GSNOR1</i> nos diferentes genótipos	43
4.7. Atividade GSNO ^r e teor de SNO, NO_3^- e NO_2^-	44
4.8. Análise de expressão de genes do metabolismo de NO_3^- e de NO	48
4.9. Análise do perfil metabólico de metabólitos polares	50
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
7. ANEXOS	67

RESUMO

O nitrogênio (N) se encontra disponível para as plantas principalmente nas formas de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+). Em função da variação na disponibilidade de N, as plantas são capazes de modular seu metabolismo e a morfologia radicular, visando maximizar a captação de nutrientes. A enzima nitrito redutase (NR) reduz o NO_3^- a nitrito (NO_2^-) e participa na produção do óxido nítrico (NO) a partir da redução do NO_2^- . O NO participa de inúmeros processos de desenvolvimento em plantas, incluindo alterações de arquitetura radicular. O objetivo deste trabalho foi o de elucidar a interação entre sinalização de NO e metabolismo de N nas alterações radiculares. Plântulas de *Arabidopsis thaliana* selvagem e mutantes com baixo e alto teor endógeno de NO (*gsnor⁺* e *gsnor⁻*, respectivamente) foram cultivadas *in vitro* em NO_3^- , NH_4^+ , NH_4^+ com a adição do doador de NO, S-nitrosoglutationa (GSNO) ou de glutathione reduzida (GSH). Foram realizadas análises morfológicas das raízes e foram medidos os conteúdos de S-nitrosotióis (SNOs), NO_3^- e nitrito (NO_2^-). Também foram analisados a atividade da enzima S-nitrosoglutathione redutase (GSNOR), a expressão de genes do metabolismo de N e NO e o perfil metabólico. Nossos resultados mostraram que o NH_4^+ inibiu o crescimento da raiz e estimulou sua ramificação, efeito inverso ao observado com NO_3^- . Os mutantes se desenvolveram de forma similar ao selvagem, sugerindo que o teor endógeno de NO, nas condições de cultivo utilizadas, não influenciou as alterações de arquitetura radicular. A adição de GSNO ao NH_4^+ aumentou o teor endógeno de NO e reverteu parcialmente as modificações radiculares, sugerindo que os efeitos observados estão relacionados, em parte, ao NO produzido a partir do NO_3^- . No entanto, o GSNO não reverteu o perfil de expressão dos genes *GSNOR1*, *NIA2* e *NRT2.1*. Os tratamentos com as diferentes fontes nitrogenadas apresentam respostas distintas no perfil metabólico e na expressão de genes. O perfil metabólico de plantas tratadas com GSNO apresentou uma maior quantidade de açúcares, ácidos graxos, aminoácidos e ácidos orgânicos. É possível que esses ajustes metabólicos na presença de NO tenham minimizado o estresse induzido por NH_4^+ , permitindo o melhor desenvolvimento radicular e reversão parcial do fenótipo. A ausência de reversão dos perfis de expressão e de metabolismo indicam que o NO regula outras vias que levam à recuperação fenotípica da raiz e que precisam ser investigadas, como as vias hormonais, metabolismo antioxidante e a expressão de outros genes candidatos.

Palavras-chave: amônio; arquitetura radicular; nitrato; GSNO redutase; óxido nítrico

ABSTRACT

Nitrogen (N) is available for plants mainly as nitrate (NO_3^-) and ammonium (NH_4^+). Due to the variation in N availability, plants are able to modulate their metabolism and root morphology, aiming to maximize nutrient uptake. Nitrite reductase (NR) reduces NO_3^- to nitrite (NO_2^-) and participates in the synthesis of nitric oxide (NO) by the reduction of NO_2^- . NO is involved in various developmental processes, including modifications in root architecture. This work aimed to elucidate the interaction between NO signaling and N metabolism in root morphological modifications. Seedlings of wild-type *Arabidopsis thaliana* and mutants with low and high endogenous NO content (*gsnor*⁺ and *gsnor*⁻, respectively) were grown *in vitro* in NO_3^- , NH_4^+ , NH_4^+ with the addition of a NO donor, S-nitrosoglutathione (GSNO) or reduced glutathione (GSH). Root morphological analysis were conducted and the S-nitrosothiols (SNOs), NO_3^- and nitrite (NO_2^-) contents were measured. The activity of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR), the expression of genes from N and NO metabolism and metabolic profiles were also analyzed. Our results showed that NH_4^+ inhibited root growth and stimulated root branching, the opposite effect was observed with NO_3^- . The development of both mutants was similar to the wild-type, suggesting that the endogenous NO content, under the cultivation conditions employed, does not influence root architecture modifications. GSNO addition to NH_4^+ increased endogenous NO content and partially recovered root phenotype, suggesting that the observed effects are partially related to the NO produced from NO_3^- . However, *GSNOR1*, *NIA2* and *NRT2.1* gene expression profile was not reversed by GSNO. Treatments with different nitrogen sources induces different metabolic and gene expression profiles. Metabolic profile of GSNO treated plants showed an increase in sugar, fatty acids, amino acids and organic acids. Possibly, these metabolic adjustments under NO treatment mitigated NH_4^+ -induced stress, improving root development and partially recovering root phenotype. The non-reversion of gene expression and metabolic profile indicate that NO regulates other pathways that lead to phenotypic root recovery, which need to be investigated, such as hormonal pathways, antioxidant metabolism and the expression of other candidate genes.

Key words: ammonium; root architecture; nitrate; GSNO reductase; nitric oxide

1. INTRODUÇÃO

1.1. Nitrogênio disponível para as plantas

O nitrogênio (N) é um nutriente essencial para o desenvolvimento das plantas, exigido em grandes quantidades, sendo constituinte de ácidos nucléicos, aminoácidos, clorofila e fitoreguladores do crescimento vegetal, entre outras moléculas (Krouk *et al.*, 2010a; Xu *et al.*, 2011; Leghari *et al.*, 2016). Apesar do N em sua forma gasosa (N_2) corresponder a 78% da atmosfera terrestre, as plantas são incapazes de captar e assimilar o N atmosférico, devido à alta demanda energética para quebra da ligação entre as moléculas de N (Raven *et al.*, 2007). Para que o N possa ser utilizado pelas plantas, é necessário que passe por processos de fixação, podendo ser atmosférica, industrial ou biológica (Raven *et al.*, 2007; Leghari *et al.*, 2016; Stein & Klotz, 2016). Na fixação atmosférica, o N atmosférico reage com oxigênio formando óxidos de nitrogênio (NO_x), na presença de energia proveniente de relâmpagos, sendo precipitado pelas chuvas e liberando nitrato (NO_3^-) no solo. Na fixação industrial ocorre produção de amônia (NH_3) a partir do N atmosférico pelo processo Harber & Bosch. Os fertilizantes sintéticos muitas vezes são utilizados nas culturas agrícolas em quantidades muito acima das necessárias contaminando o meio ambiente. A fixação biológica é catalisada pela enzima nitrogenase, produzida por bactérias e arqueas encontradas no solo, liberando amônio (NH_4^+). Outras bactérias encontradas no solo são capazes de oxidar NH_4^+ produzindo nitrito (NO_2^-) e em seguida NO_3^- , em processo chamado de nitrificação (Raven *et al.*, 2007; Leghari *et al.*, 2016; Stein & Klotz, 2016).

As formas inorgânicas de N, NO_3^- e NH_4^+ , são as principais formas de N disponíveis às plantas, sendo que em solos aeróbicos ocorre a predominância de NO_3^- em relação ao NH_4^+ , podendo variar de acordo com as mudanças no solo, como conteúdo de oxigênio, pH ou temperatura (Britto & Kronzucker, 2002; Fageria, 2009; Cameron *et al.*, 2013). A disponibilidade de N pode variar drasticamente devido a processos de lixiviação, desnitrificação, volatilização ou imobilização. Desta forma, as plantas têm o potencial de se

adaptar às flutuações na disponibilidade de N através da modulação na capacidade de absorção da forma de N disponível, com consequente alteração de seu metabolismo e morfologia (Fageria, 2009; Kant *et al.*, 2011; Cameron *et al.*, 2013).

1.2. Captação, transporte e assimilação de N

Para garantir a eficiência na captação e o melhor uso do N, as raízes detectam a forma de N disponível e ativam os sistemas de transporte apropriados (Reddy & Ulaganathan, 2015). A absorção de NO_3^- e NH_4^+ é mediada por transportadores específicos localizados nas raízes, divididos em dois sistemas: O sistema LATS (Low Affinity Transport System – Sistema de Transporte de Baixa Afinidade) que atua em concentrações maiores que 1 mM e o sistema HATS (High Affinity Transport System – Sistema de Transporte de Alta Afinidade) que atua em concentrações menores que 1 mM (Dechorgnat *et al.*, 2011; Krapp, 2015; Fan *et al.*, 2017). Os transportadores LATS para captação de NO_3^- são membros das famílias NRT1 e NPF. Para a captação de NH_4^+ foi identificado um membro da subfamília AMT, o AMT1.2. Os transportadores HATS de NO_3^- pertencem a família NRT2. Para a captação de NH_4^+ são conhecidos dois membros da subfamília AMT, sendo AMT1.1 e AMT1.3 (Gazzarrini *et al.*, 1999; Loqué *et al.*, 2006; Dechorgnat *et al.*, 2011; Krapp, 2015; Fan *et al.*, 2017, Li *et al.*, 2017).

Em *Arabidopsis*, já foram identificados 53 genes da família NRT1. Dos 16 membros caracterizados, pelo menos 6 transportadores estão envolvidos na absorção de NO_3^- pela raiz. O transportador NPF6.3 (anteriormente designado NRT1.1) é um transportador de dupla afinidade, atuando tanto em baixas quanto em altas concentrações; o NRT1.2 é ativo em altas concentrações de NO_3^- , enquanto NRT 2.1, 2.2, 2.4 e 2.5 são funcionais em condições de déficit de NO_3^- (Léran *et al.*, 2014; Tegeder & Masclaux-Daubresse, 2018).

Além de transportar NO_3^- , NPF6.3/NRT1.1 funciona como um sensor, capaz de induzir respostas fisiológicas relacionadas ao controle da arquitetura radicular e modular a expressão

de outros genes da via de sinalização por NO_3^- . A detecção de variações na concentração de NO_3^- se dá por fosforilação/defosforilação de um resíduo de treonina (T101) da cadeia protéica em baixas/altas concentrações de NO_3^- (Reddy & Ulaganathan, 2015; Noguerro & Lacombe, 2016). Já foi demonstrado que NPF6.3/NRT1.1 reprime o desenvolvimento de raízes laterais por sua função de transporte de auxina, quando na forma fosforilada (Krouk *et al.*, 2010a; Bouguyon *et al.*, 2015).

Em função de sua toxicidade quando em altas concentrações, a absorção e assimilação de NH_4^+ em plantas são altamente reguladas (Gazzarrini *et al.*, 1999). Transportadores de NH_4^+ de alta e baixa afinidade controlam seu transporte e homeostase em plantas. Seis transportadores do tipo AMT foram identificados em *Arabidopsis*, sendo que 5 deles são encontrados nas raízes. AMT1.1, 1.2 e 1.3 são responsáveis por aproximadamente 90% da absorção de NH_4^+ (Gazzarrini *et al.*, 1999; Reddy & Ulaganathan, 2015; Kiba & Krapp, 2016). A percepção do NH_4^+ se dá pelos transportadores AMT1.1 e AMT 1.3. AMT1.1 é fosforilado quando a concentração de NH_4^+ no solo é alta, fechando os canais de transporte de NH_4^+ . AMT1.3 está envolvido também no desenvolvimento de raízes laterais; em altos níveis de NH_4^+ foi observada uma oligomerização desse transportador que leva ao fechamento dos canais, contribuindo para evitar a toxicidade do NH_4^+ (Reddy & Ulaganathan, 2015). A baixa afinidade de AMT1.2 e sua localização na endoderme da região de produção de pelos radiculares sugere que este transportador atue na recuperação do NH_4^+ liberado do córtex e que entra na raiz por meio da via apoplástica (Daniel-Vedele *et al.*, 2010). O gradiente eletroquímico entre o vacúolo e o citoplasma pode levar à importação de NH_3 e liberação de NH_4^+ para fora do vacúolo. Já foi demonstrado que aquaporinas da família TIP transportam NH_3 para o interior do vacúolo (Loqué *et al.*, 2005).

Seguida de sua captação pelos transportadores, os íons absorvidos são assimilados (**Fig. 1**) e o N é incorporado em aminoácidos. O NO_3^- absorvido para dentro das células das raízes pode ser armazenado nos vacúolos ou assimilado, pode ainda ser translocado para as folhas,

podendo ser estocado ou assimilado. O *pool* de NO_3^- vacuolar se correlaciona positivamente com a concentração externa de NO_3^- e varia conforme o tipo celular, sendo sua concentração bastante variável, o que afeta suas taxas de remobilização. Já o *pool* de NO_3^- citosólico se mantém em níveis baixos e estáveis (3-4 mM) e independe das concentrações externas de NO_3^- (Daniel-Vedele *et al.*, 2010). O NO_3^- é reduzido a NO_2^- no citosol pela enzima nitrato redutase (NR). Existem duas classes de genes envolvidas na formação do heterodímero de NR, os genes *NIA* (*NIA1* e *NIA2*) e os genes *CNX*, envolvidos na síntese do cofator molibdênio (Pelsy & Caboche, 1992; Crawford & Arst, 1993). O gene *NIA2* é responsável por 90% da atividade total da NR em plântulas de *Arabidopsis*, enquanto *NIA1* é responsável pelos 10% restantes (Wilkinson & Crawford, 1991). O NO_2^- é rapidamente reduzido a NH_4^+ pela enzima nitrito redutase (NiR). Os genes *NII* que codificam a enzima NiR já foram isolados de diversas espécies e seu número varia de uma a duas cópias (Bittsánszky *et al.*, 2015).

O *pool* de NH_4^+ citoplasmático se origina da absorção desse íon através da membrana plasmática, mas também de sua redução a partir do NO_3^- e do catabolismo de aminoácidos durante a fotorrespiração e senescência. As concentrações citoplasmáticas de NH_4^+ variam entre 8 e 15 mM e no vacúolo as concentrações vão de 1 a 45 mM, sugerindo estocagem de NH_4^+ nesse compartimento (Daniel-Vedele *et al.*, 2010). Contudo, o NH_4^+ não pode ser estocado em grandes quantidades, podendo causar efeitos tóxicos (Esteban *et al.*, 2016). Por essa razão, ele é rapidamente assimilado pelas enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT). A GS fixa o NH_4^+ em uma molécula de glutamato, formando glutamina. Em seguida, essa glutamina reage com o 2-oxoglutarato para formar duas moléculas de glutamato, sendo este passo catalisado pela GOGAT. Existem duas classes de genes GS: a família de genes *GS1* codifica as isoformas citosólicas da GS, enquanto o gene cópia única *GS2* codifica a isoforma cloroplástica. Duas diferentes formas de GOGAT estão presentes nas plantas, a Fd-GOGAT e a NADH-GOGAT, que usam ferredoxina e NADH como doadores de elétrons, respectivamente. A Fd-GOGAT está localizada preferencialmente nos cloroplastos, enquanto a

NADH-GOGAT está localizada nos plastídios dos tecidos não fotossintetizantes (Yoneyama & Suzuki, 2019).

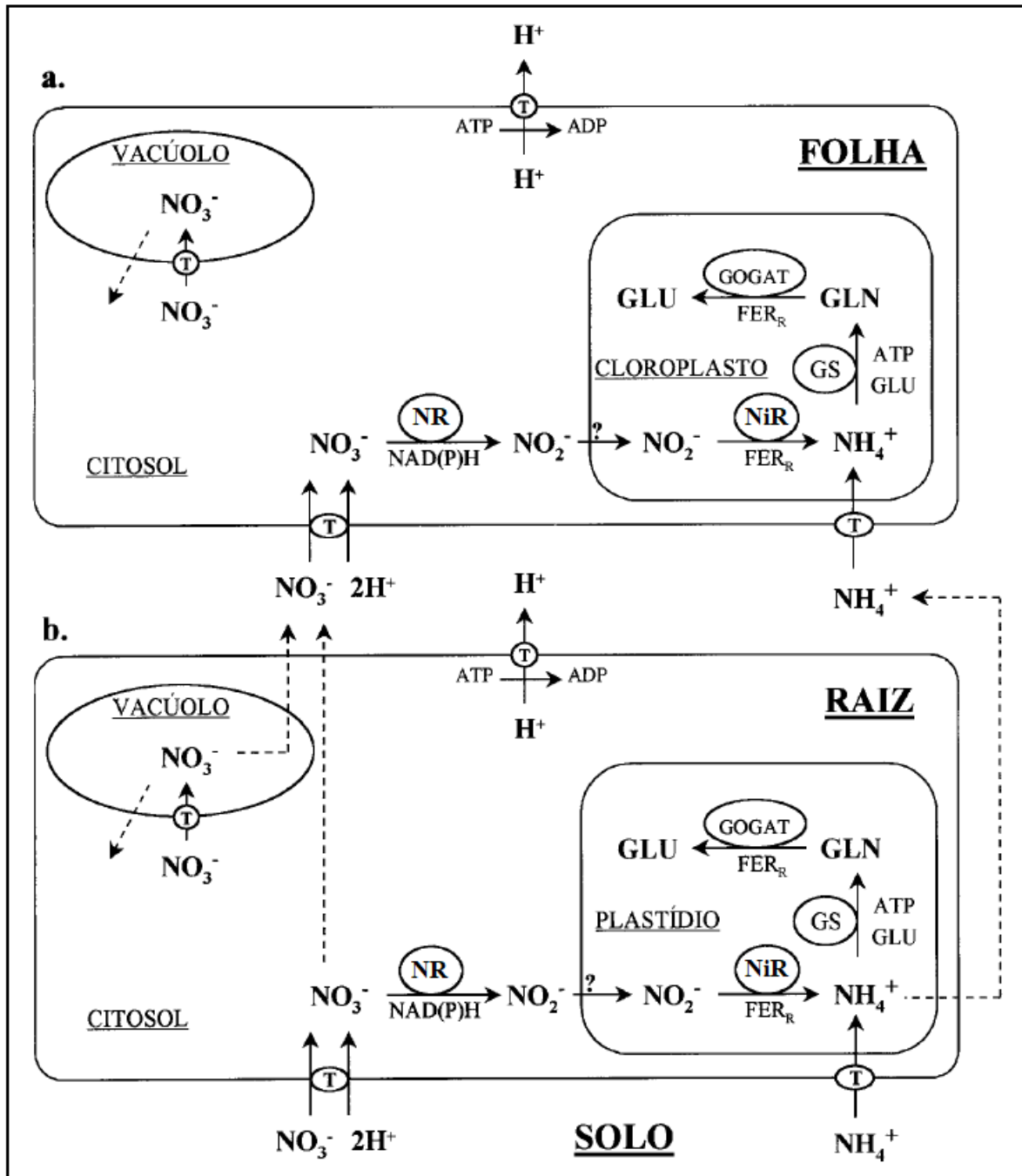


Figura 1 – Representação esquemática da assimilação de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) em raízes e folhas. NO_2^- : nitrito; NR: nitrato redutase; NiR: nitrito redutase; GS: glutamina sintetase; GOGAT: glutamato sintase; GLN: glutamina; GLU: glutamato; T: transportadores. Adaptado de Bredemeier & Mundstock (2000).

1.3. Fontes de N e desenvolvimento radicular

O N é um nutriente capaz de alterar a morfologia das raízes em função da forma em que é absorvido, assim como de sua concentração (Giehl & von Wirén, 2014).

Com relação ao NO_3^- , os efeitos observados no desenvolvimento de raízes laterais são bastante consistentes. Altas concentrações localizadas de NO_3^- promovem o alongamento das raízes laterais em *Arabidopsis* enquanto altas concentrações de NO_3^- aplicadas na totalidade da raiz inibem o desenvolvimento de raízes laterais. No entanto, mesmo concentrações extremamente baixas de NO_3^- , quando aplicadas de forma restrita em uma porção da raiz, afetam o desenvolvimento de raízes laterais. Zhang *et al.* (1999) demonstraram que 0,05 mM de NO_3^- são suficientes para induzir um aumento de 50% no comprimento das raízes laterais, sendo que concentrações mais elevadas (0,1 a 1 mM) resultam em aumento da ordem de 300%. Por outro lado, 50 mM de NO_3^- inibiram em 50% o comprimento das raízes laterais. Diversos mecanismos já foram descritos como responsáveis pela inibição do desenvolvimento de raízes laterais em altas concentrações de NO_3^- , incluindo a repressão da iniciação pela alta razão carbono/nitrogênio (C/N) e a inibição da ativação do meristema por efeito osmótico e regulação da via de sinalização por ácido abscísico (ABA) (Zhang *et al.*, 2007).

Com relação ao alongamento da raiz principal, resultados contraditórios já foram reportados. A aplicação de NO_3^- na totalidade da raiz em altas concentrações (50 mM) levou a uma inibição do crescimento da raiz principal de *Arabidopsis*, mas essa inibição não foi observada em concentrações mais baixas (0,1 a 10 mM) (Signora *et al.*, 2001). Com a mesma espécie, Linkohr *et al.* (2006) mostraram inibição do alongamento da raiz principal com o aumento da concentração de NO_3^- , sendo essa inibição observada mesmo em baixas concentrações (0,01 mM). Em ambos os trabalhos, os resultados diferem dos reportados por Zhang & Forde (2000), que não mostraram diferenças no tamanho da raiz principal em concentrações de NO_3^- que variaram de 0,01 a 100 mM.

O NH_4^+ também modifica a arquitetura do sistema radicular, inibindo o alongamento da raiz principal, estimulando a ramificação das raízes laterais e o aumento dos pelos radiculares. Em altas concentrações de NH_4^+ , os pelos radiculares se mostraram significativamente mais longos em comparação com altas concentrações de NO_3^- . Essas alterações são frequentemente associadas a toxicidade, principalmente quando o NH_4^+ é fornecido como única fonte de N (Brito & Kronzucker, 2002; Li *et al.*, 2010). O NH_4^+ inibe o desenvolvimento da raiz principal por repressão da proliferação celular no meristema apical e por redução do tamanho longitudinal das células (Liu *et al.*, 2013). Os efeitos tóxicos do NH_4^+ não são observados em espécies que tem preferência por essa fonte nitrogenada, como é o caso do arroz (Britto & Kronzucker, 2013). Alguns trabalhos sugerem que plantas crescidas sob disponibilidade de NH_4^+ apresentam menor conteúdo de auxina, e consequentemente, raízes menos desenvolvidas (Esteban *et al.*, 2016).

1.4. Óxido nítrico: biossíntese, degradação e função biológica

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso que está envolvido em um grande número de processos de desenvolvimento nos diferentes organismos. Nas plantas existem vias enzimáticas e não enzimáticas para a produção de NO (Yamasaki *et al.*, 1999; Gotte *et al.*, 2002; Frungillo *et al.*, 2016) (**Fig.2**). As vias redutoras conhecidas por levar à produção de NO dependem do NO_2^- como substrato e podem ser catalisadas por diversas enzimas, que incluem a NR e as NOFNiRs (nitric oxide forming nitrite reductases). Alternativamente, as plantas podem usar a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria como agente redutor (Modolo *et al.*, 2005). Dentre essas vias, a NR prevalece em condições normais com altos níveis de NO_2^- e baixo NO_3^- ou sob condições de pH reduzido. A via mitocondrial se torna mais relevante em condições anaeróbicas (hipóxia), como forma de preservar a respiração usando o NO_2^- como aceptor de elétrons. A importância da NR na liberação de NO *in vivo* foi demonstrada em estudos com o duplo mutante de *Arabidopsis* deficiente para esta enzima (*nia1nia2*), que

apresenta produção de NO_2^- e NO reduzida (Modolo *et al.*, 2005; Gupta, *et al.*, 2011). Adicionalmente, linhagens deficientes na enzima NiR apresentaram aumento de 10 e 100 vezes nas concentrações de NO_2^- e NO, respectivamente, em relação às plantas controle (Morot-Gaudry-Talarmain *et al.*, 2002). Além de ser produzido dentro da célula, o NO pode ser produzido no apoplasto por via não enzimática em condições ácidas (Bethke *et al.*, 2004).

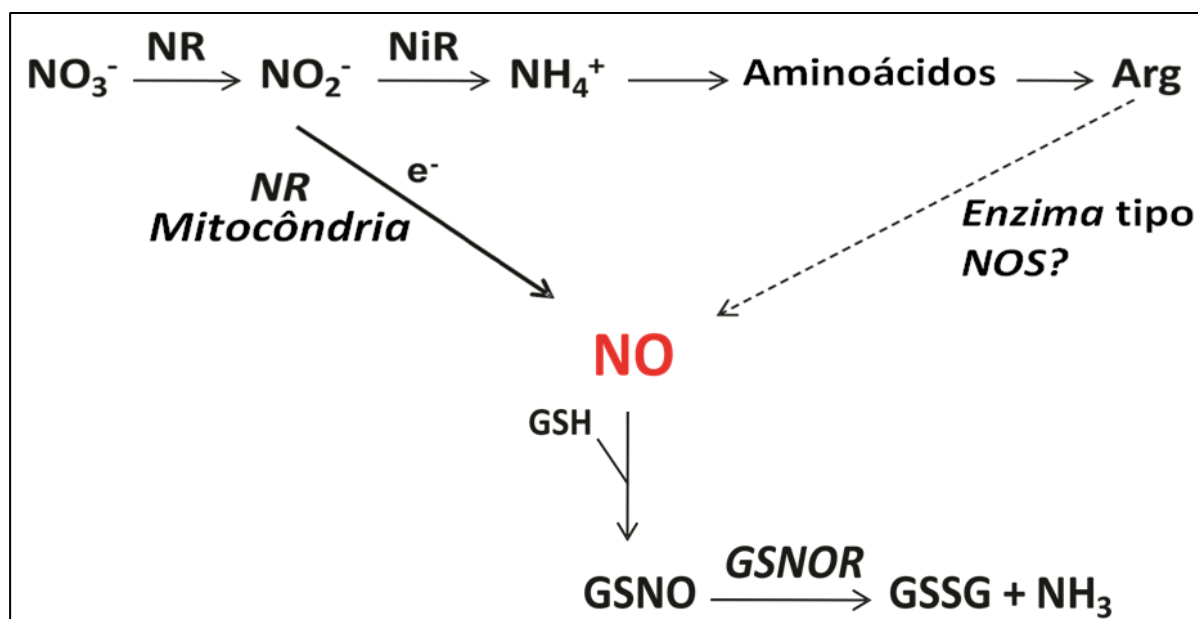


Figura 2 – Esquema das vias de síntese e degradação de óxido nítrico (NO). NO_3^- : nitrato; NR: nitrato redutase; NO_2^- : nitrito; NiR: nitrito redutase; NH_4^+ : amônio; Arg: Arginina; NOS: NO sintase; GSNO: S-nitrosoglutationa; GSNOR: S-nitrosoglutationa redutase; GSH: glutationa reduzida; GSSG: glutationa oxidada; NH_3 : amônia. Adaptado de Salgado *et al.* (2017).

Alguns autores sugerem que a oxidação de arginina a citrulina levaria à produção de NO em plantas, por meio da atividade NO sintase (NOS), como observado em animais (del Rio *et al.*, 2004; Corpas & Barroso, 2014). No entanto, o gene que codifica a enzima NOS ainda não foi identificado em plantas, mesmo com todos os genomas já sequenciados de espécies modelo e cultivadas. Uma busca sistemática por sequências similares a NOS em mais de mil espécies de plantas e algas concluiu que as plantas terrestres não expressam NOS (Jeandroz *et al.*, 2016). A produção de NO pela via de oxidação de poliaminas também já foi sugerida, mas os mecanismos que regulam a relação entre NO e poliaminas ainda não foram elucidados. Não

está claro se as poliaminas agem como substrato, cofatores ou sinais que levam à produção de NO (Freschi, 2013). Adicionalmente, alguns trabalhos reportam efeitos antagônicos do NO na produção de poliaminas. Em plantas de girassol submetidas a estresse salino, a aplicação de NO induziu um acúmulo de poliaminas (Tailor *et al.*, 2019), enquanto plantas transgênicas de cevada com níveis reduzidos de NO e maior tolerância à seca, apresentaram elevados teores de poliaminas (Montilla-Bascón *et al.*, 2017).

A homeostase do NO depende de um balanço entre síntese e degradação ou sequestro desse composto. O NO pode reagir com a glutathiona reduzida (GSH) produzindo S-nitrosoglutationa (GSNO), um S-nitrosotiol (SNO) de baixo peso molecular e considerado um reservatório estável de NO nas plantas (Bergara-Morales *et al.*, 2016; Salgado *et al.*, 2017). Os níveis de GSNO são controlados pela enzima GSNO redutase (GSNOr), que catalisa a degradação do GSNO produzindo GSH e NH_3 , em um processo dependente de NADH (Liu *et al.*, 2001). O NO pode também ser liberado da molécula de GSNO na presença de luz e em função de mudanças de temperatura e/ou estado redox e na presença de metais (Bergara-Morales *et al.*, 2018). Evidências experimentais demonstraram que o NO derivado da assimilação de NO_3^- inibe a atividade da GSNOr, prevenindo assim a degradação de GSNO (Feechan *et al.*, 2005; Frungillo *et al.*, 2014).

O NO pode interagir diretamente com proteínas provocando modificações pós-traducionais que podem alterar a atividade, localização subcelular, função, estrutura ou estabilidade dessas proteínas (Bergara-Morales *et al.*, 2016; León & Costa-Broseta, 2019). A nitração de resíduos de tirosina é mediada por peroxinitrito (ONOO^-) e é considerada um indicador de estresse nitrosativo (Radi, 2004, 2013; Lozano-Juste *et al.*, 2011). A S-nitrosação (ou S-nitrosilação) é uma alteração reversível que consiste na ligação do NO à porção tiol de resíduos de cisteína (Astier & Lindermayr, 2012). A Me-nitrosação se dá em proteínas específicas, as metaloproteínas (Friebe & Koesling, 2009). A S-nitrosação está relacionada à defesa contra estresses bióticos e abióticos e com a sinalização hormonal, como na síntese de

etileno e a sinalização da auxina (Astier & Lindermayr, 2012; Freschi, 2013). Análises proteômicas tem demonstrado uma grande variedade de proteínas como potencial alvo para S-nitrosação (Lindermayr *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2015). Quando fatores de transcrição são alvos de nitrosação, alterações transcricionais são desencadeadas. Estudo recente do efeito do doador de NO S-nitrosocisteína no transcritoma de *Arabidopsis* indicou 673 fatores de transcrição responsivos ao NO envolvidos nos mais distintos processos biológicos, dentre os quais crescimento e desenvolvimento, degradação de proteínas e resposta a estresses bióticos e abióticos (Imran *et al.*, 2018).

Vários estudos já demonstraram que o NO influencia o crescimento e desenvolvimento da planta. Em folhas, o NO controla a abertura e fechamento estomático, com consequências diretas na assimilação de CO₂ e manutenção do *status* hídrico em situação de estresse abiótico (García-Mata & Lamattina, 2001; Silveira *et al.*, 2017). O amarelecimento das folhas e o acúmulo de antocianinas são duas estratégias independentes em resposta à limitação de N em *Arabidopsis* (Diaz *et al.*, 2006). Já foi demonstrado que o NO atua na manutenção dos níveis de clorofila durante a senescência foliar por meio da inibição da via de degradação desse pigmento, sendo que o mutante de *Arabidopsis nos1/noa1*, deficiente na produção de NO, apresenta um fenótipo de senescência foliar precoce (Liu & Guo, 2013). O NO aumenta a proteção de folhas de *Arabidopsis* contra os raios UV por indução da expressão de genes da via dos fenilpropanóides, que atuam na síntese de flavonóides e antocianinas (Tossi *et al.*, 2011).

1.5. Efeito do NO no desenvolvimento radicular

Já foi demonstrado, por meio da aplicação exógena de NO ou pelo estudo de mutantes com teores endógenos de NO alterados, que esta molécula regula o desenvolvimento de raízes principal e laterais, e a formação de pelos radiculares (FPR) (Gouvêa *et al.*, 1997; Correa-Aragunde *et al.*, 2004; Lombardo *et al.*, 2006; Lombardo & Lamattina, 2012; Moro *et al.*, 2017). A aplicação do doador de NO nitroprussiato de sódio (SNP) em plântulas de tomate

induziu a emergência e o alongamento de raízes laterais e inibiu o crescimento da raiz primária. Por outro lado, a aplicação do sequestrador de NO 2-4-carboxifenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (cPTIO) inibiu completamente o desenvolvimento das raízes laterais e aumentou em 40% o comprimento da raiz principal (Correa-Aragunde *et al.*, 2004).

Lombardo *et al.* (2006) observaram uma diminuição no comprimento, mas não no número de pelos radiculares de *Arabidopsis* após o tratamento com cPTIO. Corroborando esses resultados, o mesmo grupo mostrou que o mutante G'4-3, deficiente na produção de NO, apresenta pelos radiculares mais curtos em relação ao ecótipo selvagem (Lombardo & Lamattina, 2012).

Trabalho recente de nosso grupo aprofundou o conhecimento sobre o envolvimento do NO na formação de pelos radiculares (FPR), ao mostrar que o mutante *rhb6* de *Arabidopsis*, deficiente na FPR, é também deficiente na produção de NO e que a aplicação de GSNO é capaz de restaurar a FPR neste mutante. Os resultados indicaram ainda que a expressão dos genes necessários à FPR no mutante *rhb6*, além de ser regulada por auxina, é também dependente da via de sinalização do NO, sendo que este induziu alterações mais significativas no perfil global de transcritos em comparação à auxina (Moro *et al.*, 2017).

Além de seu papel individual nas modificações do desenvolvimento radicular, tem sido proposto que o NO está envolvido na regulação das alterações da raiz primária dependentes de NO_3^- . A inibição do crescimento em altas concentrações de NO_3^- foi suprimida em raízes de milho tratadas com o doador de NO, SNP, e o teor endógeno de NO foi maior em raízes cultivadas em altas concentrações de NO_3^- (Zhao *et al.*, 2007).

Um trabalho recente demonstrou que o NO é capaz de regular o transporte e a assimilação de NO_3^- em raízes de *Arabidopsis* (Frunghillo *et al.*, 2014). A análise de RNAseq em *Arabidopsis* identificou diversos genes candidatos cuja expressão foi fortemente afetada pelo tratamento com GSNO, sendo que o gene *NRT2.1* apresentou sua expressão reduzida em 11,7 vezes no

mutante *rhd6* tratado com GSNO, enquanto *NRT1.1* teve sua expressão aumentada 2,8 vezes. Por outro lado, a expressão dos transportadores de NH_4^+ *AMT1.3* e *AMT1.1* foi reprimida e o fator de transcrição da família MADS box, *ANR1*, teve sua expressão aumentada 5,6 vezes por NO (Moro *et al.*, 2017).

Abordagens metabolômicas são importantes, pois permitem identificar a variedade e a quantidade de moléculas sintetizadas em diferentes condições de cultivo e oferecem uma análise detalhada do estado metabólico das plantas (Dinakar & Bartels 2013). Estudos que relacionem NO e alterações metabólicas são escassos na literatura, embora sua participação na alteração de expressão gênica e mudança na atividade de proteínas e enzimas seja amplamente discutida. O NO participa de inúmeros processos bioquímicos e moleculares, alterando produtos finais do metabolismo (León *et al.*, 2016; Jain *et al.*, 2018; Gupta *et al.*, 2020). León e colaboradores (2016) realizaram uma análise global de metabólitos de *Arabidopsis thaliana*, expostas a altas concentrações de NO por um período de 6h e foi identificado aumento de lipídeos, carboidratos e aminoácidos. Essa condição foi restaurada após 24h, sugerindo uma reprogramação rápida do metabolismo para aliviar a toxicidade e danos celulares.

A espécie objeto deste estudo, *Arabidopsis thaliana* foi escolhida em função de seu crescimento rápido, da disponibilidade de mutantes do metabolismo de N e de NO e de dados genômicos em bancos públicos, que facilitam a realização de análises de expressão gênica. Além disso, estudos iniciais neste tema já estão em andamento pelo grupo, vindo esse projeto a complementar os dados já obtidos.

Tendo em vista que o NO_3^- é substrato para a produção de NO, via atividade NR, e que o desenvolvimento e crescimento de raízes é regulado por este sinalizador, torna-se de interesse investigar o papel deste no desenvolvimento radicular quando plantas são cultivadas com NH_4^+ como única fonte de N. Assim, a hipótese desse estudo está baseada na premissa de que plantas tratadas com NO_3^- exibem um desenvolvimento de arquitetura radicular dependente da sinalização do NO, enquanto plantas tratadas com NH_4^+ exibem uma resposta antagônica de

desenvolvimento e arquitetura radicular devido à falta desse sinalizador. Além disso, a adição de NO induziria uma resposta reversa no desenvolvimento da arquitetura radicular em plantas tratadas com NH_4^+ .

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo elucidar os mecanismos de interação entre a sinalização do NO e o metabolismo de N. Para tal, foi avaliado o mecanismo de ação do NO no desenvolvimento de raízes de *Arabidopsis*, combinando aplicações de NO exógeno e o uso de mutantes com alto e baixo teor endógeno de NO e realizando análises de alterações morfológicas, metabólicas e moleculares das raízes cultivadas em diferentes fontes de N. Esta abordagem se deu visando atingir os seguintes objetivos específicos:

- Determinar se diferentes fontes de N, a saber NO_3^- e NH_4^+ , modulam diferencialmente o desenvolvimento radicular em genótipos de *Arabidopsis* com alto e baixo nível endógenos de NO;
- Analisar se as alterações na arquitetura de raiz induzidas por NO_3^- são relacionadas à produção de NO;
- Verificar se o GSNO, uma molécula doadora de NO, pode reverter as alterações fenotípicas das plantas tratadas com NH_4^+ , quando comparadas àquelas tratadas com NO_3^- ;
- Investigar se plantas tratadas com NO_3^- tem maior teor de NO e/ou SNOs em comparação às plantas tratadas com NH_4^+ ;
- Determinar se a capacidade de recuperação fenotípica estaria relacionada à expressão de genes relacionados ao transporte e assimilação de NO_3^- e ao metabolismo de NO;
- Investigar se a recuperação fenotípica estaria relacionada a ajustes no perfil de metabólitos primários.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico e tratamentos

Os experimentos foram realizados com sementes de mutantes de *Arabidopsis thaliana* com alta e baixa expressão do gene que codifica a enzima GSNO (gsnor⁺ e gsnor⁻, respectivamente) (Achkor *et al.*, 2003) e do ecótipo selvagem Columbia (Col-0), obtidas do banco de germoplasma de Arabidopsis (ARBC) e multiplicadas no Instituto de Botânica de São Paulo (IBt).

As sementes foram hidratadas em água deionizada estéril durante 15 min, em seguida foi adicionado hipoclorito de sódio (NaClO) comercial a 0,3% durante 8 min para desinfestação das sementes. Para a remoção do NaClO as sementes foram lavadas 8 vezes com água deionizada estéril e armazenadas em 2 mL de água a 4 °C durante 24 h para quebra de dormência.

Após a quebra da dormência, 10 sementes por placa foram distribuídas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio sólido de Hoagland & Arnon (1950) composto por macro- (0,5 mM KH₂PO₄; 1 mM K₂SO₄; 1 mM MgSO₄.7H₂O; 1 mM CaCl₂.2H₂O) e micro- (46,25 µM H₃BO₃; 9 µM MnCl₂.4H₂O; 0,75 µM ZnCl₂; 0,28 µM Na₂MoO₄.2H₂O; 0,33 µM CuCl₂.2H₂O) nutrientes, sacarose 1%, Phytigel 0,4 % e pH ajustado para 6,3. Para os tratamentos foram utilizadas duas fontes de N, (KNO₃ e (NH₄)₂SO₄) para equilibrar a quantidade de potássio foi adicionado KCl ao tratamento contendo (NH₄)₂SO₄. Para testar o efeito da adição de NO exógeno, ao tratamento contendo NH₄⁺ foi adicionado o doador de NO, GSNO e como controle do GSNO foi utilizada a GSH. As concentrações de N, do GSNO e de GSH foram definidas por meio de experimentos dose-resposta apresentados nos resultados. Para testar o efeito do sequestro de NO ao tratamento contendo NO₃⁻ foi adicionado cPTIO.

As placas foram colocadas em câmara de crescimento em posição vertical no início do período luminoso, com fotoperíodo de 12 h à 23°C a uma intensidade de luz de 57 µmol.m².s⁻¹ (µE), sendo mantidas nessas condições por até 14 dias.

3.2. Análise morfológica das raízes

Para as análises morfológicas, foram avaliadas 10 raízes mais representativas dentro três repetições (10 raízes por placa) para cada tratamento, aos quatro e sete dias de desenvolvimento, com o auxílio de uma régua sob um estereomicroscópio (Discovery.V8, Zeiss). Aos quatro dias foi medido o comprimento da raiz principal e o número de pelos radiculares. Foram amostrados todos os pelos radiculares da raiz principal, da zona de intersecção hipocótilo/raiz até o ápice radicular. Aos sete dias foi medido o comprimento da raiz principal e o número de raízes laterais. Para os cálculos de densidade, o número de pelos radiculares e raízes laterais foi dividido pelo comprimento da raiz principal. Aos quatro dias de desenvolvimento, as raízes não apresentavam desenvolvimento de raízes laterais e aos sete dias de o número de pelos radiculares não foi amostrado em função da grande quantidade.

3.3. Localização *in situ* da produção de NO

A localização da produção de NO *in situ* foi avaliada conforme descrito por Seligman *et al.* (2008), utilizando o reagente DAF-2DA (4,5 diaminofluoresceína-2 diacetato, Sigma).

As raízes foram retiradas do meio sólido, lavadas com água destilada e incubadas com 10 μ M DAF-2DA em tampão fosfato de sódio (25 mM, pH 7,2 a 25°C) e mantidas em agitação constante durante 30 min no escuro. Em seguida, as raízes foram lavadas com a mesma solução tampão e montadas em lâminas não permanentes utilizando 25 μ L de intensificador de fluorescência (Vectashield, Vector). Para o controle negativo, utilizou-se a solução tampão em substituição ao DAF-2DA. Foram amostradas 4 raízes por lâmina e analisadas utilizando um microscópio de epifluorescência (Axioplan2, Zeiss) acoplado a uma câmera de captura (AxioCam MRc, Zeiss).

3.4. Determinação do teor de NO_2^- e NO_3^- , SNOs e atividade GSNOr

3.4.1. Extração

Todas as análises foram realizadas utilizando o mesmo extrato. A extração foi realizada com 50 mg de raízes inteiras frescas (NO_3^- ~ 20 raízes; NH_4^+ ~ 50 raízes; NH_4^+ + GSNO ~ 30 raízes; NH_4^+ + GSH ~ 60 raízes), coletadas ao final do período luminoso, que foram trituradas em 1 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 a 4 °C em penumbra. Em seguida o extrato foi centrifugado a 12.000g a 4 °C por 15 min. O sobrenadante foi recolhido e foram separadas alíquotas para cada análise realizada.

3.4.2. Quantificação de NO_2^- e SNOs

Os teores de NO_2^- e SNOs foram quantificados utilizando o método de Saville (1958). Para a análise foram utilizadas alíquotas de 50 μL de extrato em duas reações realizadas em penumbra: Reação 1) ao extrato foi adicionado 50 μL de sulfanilamida 1% em 0,5 M HCl. Reação 2) foi adicionado ao extrato 50 μL de sulfanilamida 1% em 0,5 M HCl com adição de cloreto de mercúrio (HgCl_2) 0,2%. Todas as amostras foram incubadas por 7 min em temperatura ambiente na ausência de luz. Após o período de incubação, foi adicionado 100 μL de reagente de Griess (N-(1-Naftil)etilenodiamina dihidroclorido) 0,02% em água deionizada e nova incubação por 7 min foi realizada nas mesmas condições. A leitura foi realizada em espectrofotômetro para placa de 96 poços (PowerWave, Bio-Tek) no comprimento de onda de 540 nm. A leitura da Reação 1 indica o conteúdo de NO_2^- e a diferença de leitura entre as reações 1 e 2 indica o conteúdo de SNOs no extrato. Para a análise de NO_2^- , foi utilizada uma curva padrão de NO_2^- e para SNOs foi utilizado GSNO como padrão.

3.4.3. Quantificação de NO_3^-

O conteúdo de NO_3^- endógeno foi determinado pela nitração do ácido salicílico utilizando o método de Cataldo *et al.* (1975). Para esta análise, às alíquotas de 20 μL foram adicionados 40 μL de solução de ácido salicílico 5% em ácido sulfúrico (H_2SO_4) e a mistura foi homogeneizada em agitador e incubada por 20 min em temperatura ambiente. Em seguida, foi

adicionado 950 μL de NaOH 2M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (UV-1280, Shimadzu) no comprimento de onda de 410 nm. Como padrão foi utilizada uma curva padrão de NO_3^- .

3.4.4. Atividade GSNO_r

A atividade da enzima S-nitrosoglutationa redutase (GSNO_r) foi determinada espectrofotometricamente pela taxa de oxidação de NADH na presença de GSNO, conforme descrito por Feechan *et al.* (2005). A mistura de reação foi composta 15 mM Tris-HCl, 0,2 mM NADH e 0,4 mM GSNO. Para a reação foram utilizados 950 μL da mistura e 50 μL de extrato e a reação foi realizada em penumbra. O monitoramento do consumo de NADH foi realizado a 340 nm durante 120 s com intervalo de 15 s. Os resultados foram normalizados pelo conteúdo de proteína, determinado pelo método Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A atividade da GSNO_r foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e expressa em $\mu\text{mol de NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína.

3.5. Análise do perfil metabólico

O perfil metabólico foi analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), seguindo método descrito previamente por Lisec *et al.* (2006). Após 14 dias de desenvolvimento o material vegetal foi coletado em nitrogênio líquido, triturado e cada 50 mg de material (descrito no item 3.4.1) que foi armazenado em tubos de 1,5 mL a -80°C .

3.5.1. Extração

Ao material congelado foram adicionados 700 μL de metanol 100% pré-resfriado a -20°C e a mistura foi agitada em vórtex por 10 s. Em seguida foi adicionado 30 μL do padrão interno (Ribitol, 0,2 mg/mL) e realizada nova agitação em vórtex por 10 s. Os tubos foram incubados em termomixer durante 10 min a 70°C e 950 rpm e centrifugados a 11.000g durante 10 min em temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para tubos de vidro de 5 mL com tampa de rosca. Ao extrato foram adicionados 375 μL de clorofórmio a -20°C .

°C e 750 µL de água deionizada. O material foi agitado em vórtex por 10 s e, em seguida, centrifugado a 2.200g durante 15 min. Após a centrifugação, 150 µL do sobrenadante da fase polar foram transferidos para tubos Eppendorf de 1,5 mL e a suspensão foi seca a vácuo à temperatura ambiente. O material seco foi armazenado a -80 °C até a derivatização.

3.5.2. Derivatização

As amostras mantidas a -80 °C foram secas novamente e foram adicionados 40 µL de reagente de metoxiaminação (20 mg/mL de metoxiamina em piridina), seguido de agitação em vórtex durante 10 s. Os tubos foram mantidos em termomixer durante 2 h a 37 °C e 1.000 rpm. Em seguida, o material foi centrifugado a 11.000g por 10 min. A cada tubo foram adicionados 70 µL de MSTFA (N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida) e, em seguida, os tubos foram agitados em vórtex por 10 s e mantidos sob agitação durante 30 min a 37 °C e 1.000 rpm. O material foi centrifugado a 11.000g por 10 min. Alíquotas de 50 µL de extrato foram transferidas para *vials* (com *inserts*) e analisadas em CG-EM (CG 7890, Agilent; EM 5977, Agilent) utilizando uma coluna HP5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O hélio foi utilizado como gás de arraste com uma vazão de entrada (modo constante) de 2 mL.min⁻¹. Ao todo, 1 µL de derivados de TMS (trimetilsilil metoxiamina) foi injetado em um injetor com temperatura de 230 °C no modo sem divisão. A rampa de temperatura foi a seguinte: temperatura inicial de 80 °C, mantida por 2 min; depois aquecimento de 15 °C.min⁻¹ a 330 °C, mantido por 6 min. O espectrômetro de massa de ionização por impacto de elétrons foi operado da seguinte forma: tensão de ionização, 70 eV; temperatura da fonte de íons, 250 °C; temperatura da porta de injeção, 250 °C; modo de digitalização, faixa de massa de 70 a 600 m/z a 20 digitalizações.s⁻¹.

3.5.3. Análise dos compostos

Os compostos foram analisados pelo programa Mass Hunter (Agilent) utilizando a biblioteca NIST11.L para a identificação dos compostos. Após a identificação, os compostos foram analisados na plataforma MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

3.6. Análise da expressão gênica

Para análise da expressão gênica foram coletadas plântulas com 14 dias de desenvolvimento, o material fresco foi congelado imediatamente e triturado em N₂ líquido.

3.6.1. Extração do RNA

Para a extração do RNA total foi utilizado o Kit Invitrap Spin Plant RNA, seguindo as instruções do fabricante (Stratec). Para cada 50 mg de material vegetal foram adicionados 900 µL da solução de lise RP, os tubos foram homogeneizados em vórtex e em seguida agitados em termomixer por 30 min a 750 rpm em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado por 1 min a 11.000g, o sobrenadante foi transferido para um pré-filtro e centrifugado novamente por 1 min a 11.000g. O filtrado foi coletado em tubo de 1,5 mL e o pré-filtro foi descartado em seguida. Ao filtrado foram adicionados 500 µL de etanol absoluto e a solução foi agitada levemente, transferida para um novo pré-filtro e centrifugada por 1 min a 11.000g. O filtrado foi descartado e aos ácidos nucléicos aderidos ao pré-filtro foram adicionados 500 µL de tampão de lavagem R1. A mistura foi então centrifugada por 1 min a 11.000g, descartando-se o tampão de lavagem. Em seguida foi realizada a segunda lavagem com 700 µL do tampão R2, seguida de centrifugação a 11.000g por 1 min, sendo o processo de lavagem com o tampão R2 repetido mais uma vez. Para a remoção do excesso de etanol foi realizada uma nova centrifugação a 11.000g por 4 min. O pré-filtro foi transferido para tubo livre de RNAase e 30 µL de tampão de eluição foram adicionados à membrana do pré-filtro. Após incubação de 2 min o tubo foi centrifugado por 1 min a 11.000g, descartando-se o pré-filtro.

O RNA extraído foi quantificado em nanofotômetro (Pearl, IMPLEN) e a integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X corado com Gel Red. A visualização do gel foi realizada em fotodocumentador (L-PIX, Locus).

3.6.2. Tratamento com DNase e Síntese de cDNA

Para a remoção do DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNase I e RNase-free (Thermo Scientific). A cada 1 µg de RNA foi adicionado 1 µL de tampão de reação com

MgCl₂ 10X, 1 µL de DNase e água ultrapura livre de RNase até completar 10 µL. A mistura de incubação foi mantida a 37 °C durante 30 min e, em seguida, acrescido 1 µL de EDTA 50 mM. Após incubação a 65 °C durante 10 min, o RNA tratado com DNase foi armazenado a -20 °C.

Para a síntese de cDNA, foi utilizado o Kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific). Uma alíquota de 1 µL de *primer* oligo (dT)₁₈ foi adicionado ao RNA tratado com DNase e, em seguida, incubado a 65 °C por 5 min. Na sequência, o RNA foi colocado sobre o gelo e foram adicionados os seguintes reagentes na ordem: 4 µL de tampão de reação 5X, 1 uL de inibidor de RNase Ribolock, 2 µL de dNTP 10 mM e 1 µL de transcriptase reversa. A solução foi gentilmente misturada, centrifugada e incubada a 42 °C por 1 h e, em seguida, a 70 °C durante 5 min. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20 °C.

Após a síntese de cDNA foram efetuados testes de eficiência e especificidade dos *primers* (**Tabela 1**) utilizando uma mistura equimolar dos cDNAs recém-sintetizados por reação de PCR composta por 2 µL de cDNA, 4 µL de primers F+R (5 µM), 10 µL de água ultrapura livre de DNase/RNase (Invitrogen) e 4 µL de 5X FIREPol® Master Mix (Solis BioDyne), composto por DNA polimerase, tampão de reação, 1 mM dNTP e 12,5 mM MgCl₂. Em seguida as amostras foram incubadas no termociclador de acordo com o seguinte programa: etapa 1 (1 ciclo: 95 °C – 1 min), etapa 2 (5 ciclos: 95 °C – 1 min, 65 °C – 30 s, 72 °C – 1 min), etapa 3 (30 ciclos: 95 °C – 30 s, 60 °C – 30 s, 72 °C – 1 min), etapa 4 (1 ciclo: 72 °C – 10 min). A avaliação da reação de PCR foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE, com corrente contínua a 100V durante 30 min, usando padrão de peso molecular de 100 pb.

3.6.3. PCR quantitativo em tempo real

A análise da expressão gênica foi realizada pelo método de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), utilizando o kit EXPRESS SYBR GreenER qPCR SuperMix (Life Technologies) em um termociclador Mastercycler® ep realplex 2S (Eppendorff), de acordo com as instruções do fabricante. O programa utilizado foi: 2 min a 50 °C, 2 min a 95 °C, seguido

de 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C. Para gerar a curva de *melting*, a temperatura foi aumentada gradativamente de 60 a 95 °C por 20 min.

Para as análises foram utilizadas três amostras biológicas em duplicatas técnicas. Após a realização das curvas de diluição, foi selecionada a diluição de 1/100 do cDNA para a reação de qRT-PCR. As amostras referentes a cada tratamento foram processadas na mesma corrida, sendo amplificadas em paralelo com o gene de interesse e os genes normalizadores.

A especificidade dos *primers* foi avaliada por meio das curvas de *melting*, sendo utilizados somente *primers* cujos produtos de amplificação mostraram um único pico, claro e bem definido (Anexo 1). Os *primers* dos genes normalizadores foram selecionados em função do trabalho prévio de Moro *et al.* (2017) e os *primers* dos genes de interesse foram os utilizados no trabalho prévio de Frungillo *et al.* (2014) (**Tabela 1**). O software Realplex 2.2 (Eppendorf) foi utilizado para gerar a curva padrão de cada produto de amplificação, as curvas de *melting* e suas análises. Os valores de expressão relativa foram determinados segundo Pfaffl (2001).

Tabela 1 – Pares de *primers* dos genes de interesse e normalizadores

Primer	Tamanho do fragmento (pb)	TM °C	Sequência	Eficiência (%)
PP2AF	61	55.8	TAACGTGGCCAAAATGATGC	104
PP2AR		60.1	GTTCTCCACAACCGCTTGGT	
SANDF	61	59.9	AACTCTATGCAGCATTTGATCCACT	94
SANDR		57.1	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC	
GSNOR1F	125	50	GGTCTCTTTCCTTGATTCTAG	91
GSNOR1R		56.9	GCATTACGACACTCAGCTTG	
NIA2F	100	52	CTCAGTACCTAGACTCTTTGC	100
NIA2R		55	ACCGTGAACCGTGAACTAC	
NPF6.3F (NRT1.1F)	94	57.8	ACACGCTCATGGTCCAACAG	100
NPF6.3R (NRT1.1R)		57.2	AGATTAAACGCTTCGCCGATACC	
NRT2.1F	191	58.8	GCTTGCACGTTACCTGTGACC	92
NRT2.1R		60.4	GCGTCCACCCTCTGACTTGG	

3.7. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Sisvar 5.6. Análises de variância (ANOVA) foram realizadas, seguidas pelo teste de *Tukey* ou ainda teste *t*, dependendo do dado analisado. A análise estatística utilizada é indicada em cada resultado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito de diferentes concentrações de NO_3^- e NH_4^+ no desenvolvimento radicular

Com o objetivo de analisar os efeitos de NO_3^- e NH_4^+ na arquitetura radicular, plantas de *Arabidopsis thaliana* do genótipo selvagem (Col-0) foram crescidas em diferentes concentrações de NO_3^- ou NH_4^+ , a saber, 0,01, 0,05, 0,1 e 1 mM, além de um tratamento sem fonte de nitrogênio (0 N), que foi utilizado como controle.

Após 7 dias de desenvolvimento das plantas sob diferentes concentrações de NO_3^- (**Fig. 3**), o comprimento das raízes não sofreu grande alteração em relação ao tratamento sem N, embora tenha sido observado aumento significativo nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM de NO_3^- , em relação aos outros tratamentos (**Fig. 3A**). Por sua vez, o número de raízes laterais foi menor com a adição de NO_3^- em relação ao controle sem N, sendo que a maior inibição ocorreu com a maior concentração de NO_3^- (1 mM) (**Fig. 3B**). Consequentemente, a densidade de raízes laterais também diminuiu significativamente com a adição de NO_3^- , com o maior efeito observado na concentração de 1 mM (**Fig. 3C**). Já o comprimento das raízes laterais apresentou valores significativamente menores nas plantas cultivadas sob 0,05 e 0,1 mM de NO_3^- (**Fig. 3D**).

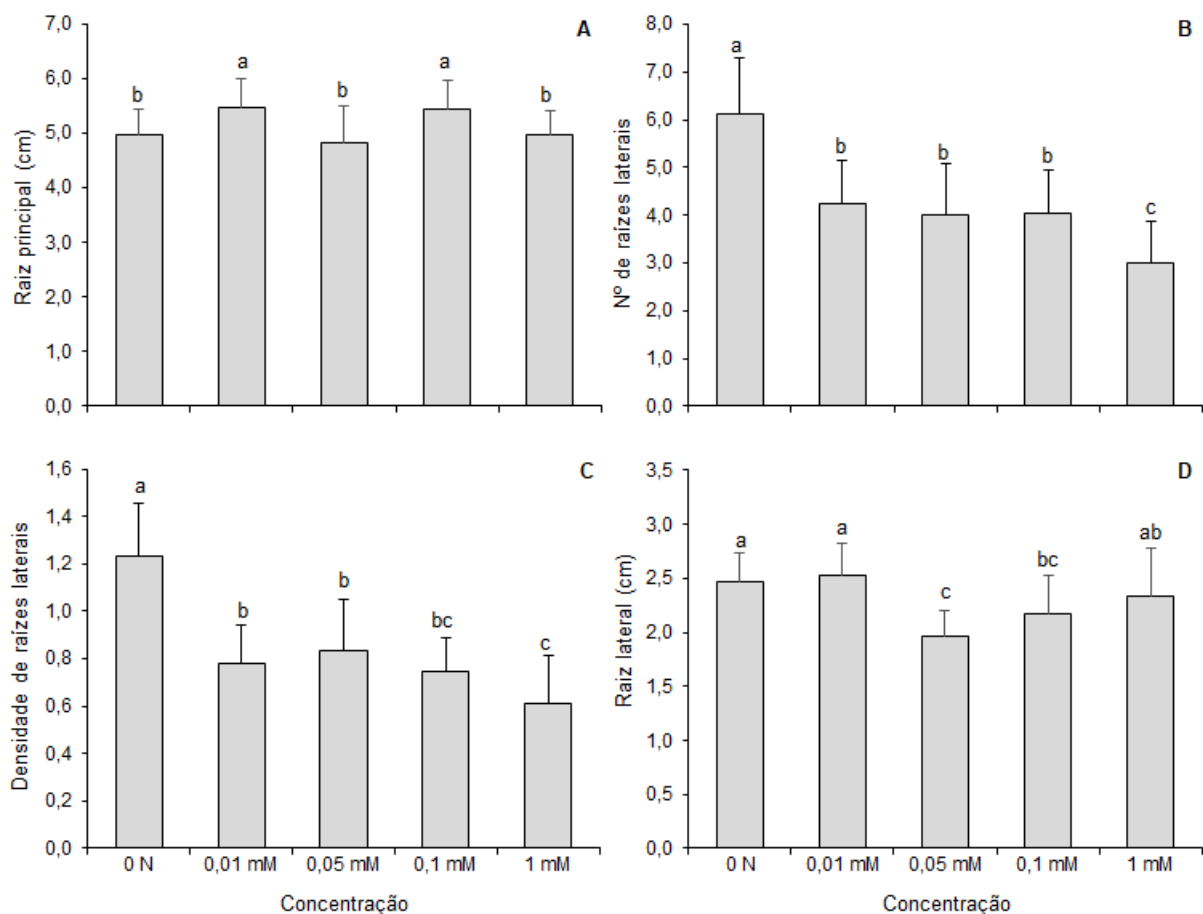


Figura 3 – Fenótipo radicular de *Arabidopsis* do genótipo selvagem (Col-0), aos sete dias de desenvolvimento em diferentes concentrações de NO_3^- (0,01, 0,05, 0,1 e 1 mM). A) Comprimento da raiz principal, B) Número de raízes laterais, C) Densidade de raízes laterais e D) Comprimento da raiz lateral. ANOVA *one-way*, seguida de teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Média e desvio padrão, n=10.

Após 7 dias de desenvolvimento das plantas sob diferentes concentrações de NH_4^+ (**Fig. 4**), foi observado que o comprimento da raiz principal cultivada sob 0,01 mM de NH_4^+ não diferiu estatisticamente do controle sem N; já nas demais concentrações, observou-se uma inibição, sendo mais acentuada na concentração de 1 mM (**Fig. 4A**). Um aumento significativo de raízes laterais foi observado em todos os tratamentos em relação ao controle (**Fig. 4B**). Consequentemente, a densidade das raízes laterais aumentou significativamente com o aumento da concentração de NH_4^+ (**Fig. 4C**). O comprimento de raízes laterais, por sua vez, apresentou uma inibição significativa apenas sob a concentração de 1 mM de NH_4^+ (**Fig. 4D**).

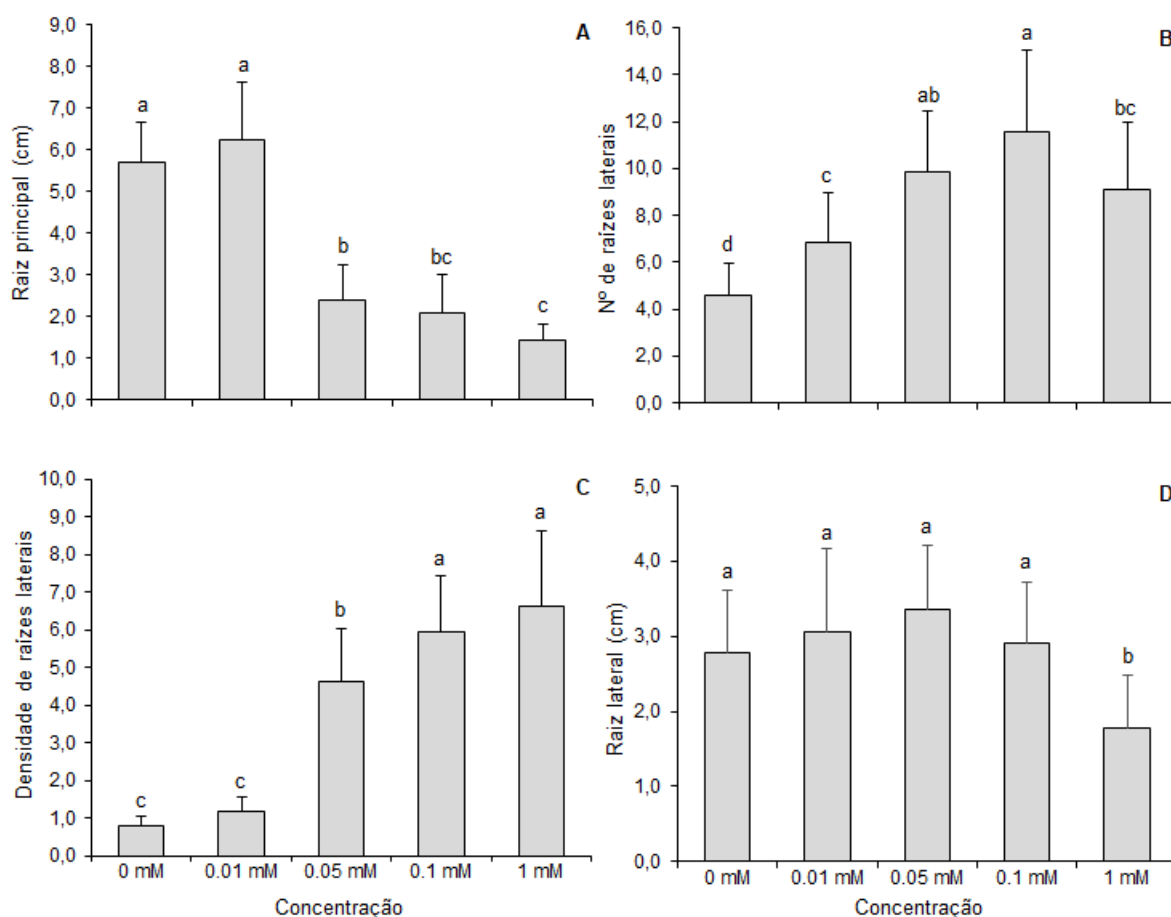


Figura 4 – Fenótipo radicular de *Arabidopsis* do genótipo selvagem (Col-0), aos sete dias de desenvolvimento em diferentes concentrações de NH_4^+ (0,01, 0,05, 0,1 e 1 mM). A) Comprimento da raiz principal, B) Número de raízes laterais, C) Densidade de raízes laterais e D) Comprimento da raiz lateral. ANOVA, seguida de teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Média e desvio padrão, $n=10$.

Em resumo, os resultados mostraram que quando as plantas são cultivadas com NO_3^- como única fonte de N (**Fig. 3**), os comprimentos da raiz principal, bem como das raízes laterais, nas diferentes concentrações de NO_3^- , não apresentaram diferenças importantes em relação ao tratamento sem adição de NO_3^- . Já o número de raízes laterais foi inibido com o aumento da concentração de NO_3^- e, conseqüentemente, houve uma diminuição na densidade das raízes laterais. Diferentemente, o NH_4^+ inibiu o crescimento da raiz principal e promoveu a formação de raízes laterais e, como consequência, provocou aumento na densidade das raízes laterais (**Fig. 4**). A comparação dos resultados mostra que o NO_3^- do meio de cultura não parece ser essencial para o desenvolvimento do sistema radicular na primeira semana de cultivo das plantas. Por outro lado, quando o NH_4^+ é utilizado como única fonte de N, este provoca uma

forte inibição no crescimento da raiz principal mesmo em baixas concentrações, ao passo que a inibição do crescimento das raízes laterais só ocorre na maior concentração de NH_4^+ . Em relação ao número de raízes laterais, as respostas foram opostas, com inibição na presença de NO_3^- e estímulo em NH_4^+ . Como consequência, a densidade de raízes laterais diminuiu com NO_3^- e aumentou com NH_4^+ .

É importante salientar que, embora a arquitetura da raiz não tenha sido muito afetada pelo NO_3^- (na faixa de 0,1 a 1 mM), o crescimento da parte aérea foi afetado negativamente no cultivo com NH_4^+ e também pela ausência de N (ver **Fig. 8**).

O fenótipo observado nas raízes das plantas cultivadas com NH_4^+ está de acordo com o descrito para a grande maioria de espécies de plantas submetidas a esta fonte de N (Britto & Kronzucker, 2002). Estas alterações incluem a formação de raízes menores que ocorre devido a uma inibição da elongação celular (Li *et al.*, 2010). Já está bem demonstrado que os níveis de auxina regulam a elongação da raiz principal bem como das raízes laterais durante o desenvolvimento (Péret *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011) e que o NO_3^- é essencial para a captação de auxina pelas células da raiz e para a sinalização da auxina (Krouk *et al.*, 2010b). Também já foi demonstrado que no cultivo com NH_4^+ como única fonte de N o comprimento das raízes é alterado devido à ausência da sinalização da auxina dependente de NO_3^- (Krouk *et al.*, 2010b). Outras hipóteses já foram propostas para explicar a inibição do crescimento radicular mediada por NH_4^+ , como estabelecimento de uma parede celular mais rígida, que limitaria a expansão das células, acidificação da rizosfera, alteração da homeostase redox, entre outras (Podgórska *et al.*, 2017). Apesar do grande número de estudos sobre o tema, as razões dos sintomas de toxicidade induzidos por NH_4^+ ainda não foram totalmente elucidadas.

A partir dos resultados obtidos com as duas curvas de concentração, optou-se por utilizar a concentração de 1 mM de NH_4^+ e NO_3^- para realização dos experimentos seguintes, já que as diferenças mais contrastantes entre os dois tratamentos na arquitetura radicular foram observadas nesta concentração.

4.2. Desenvolvimento radicular em diferentes fontes nitrogenadas: efeito do conteúdo endógeno de NO

Definida a concentração de NH_4^+ e NO_3^- , um novo experimento foi realizado para avaliar a resposta do genótipo Col-0 em relação àquelas de mutantes com alta e baixa expressão do gene que codifica a enzima GSNO_r (*gsnor*⁺ e *gsnor*⁻, respectivamente). Neste experimento, três fontes de N (1 mM NO_3^- , NH_4NO_3 ou NH_4^+) foram utilizadas e seus efeitos na arquitetura radicular foram analisados aos 4 e 7 dias de desenvolvimento.

O comprimento da raiz principal aos 4 dias de desenvolvimento foi significativamente menor em NH_4^+ no selvagem e no mutante *gsnor*⁺, efeito não observado no mutante *gsnor*⁻ (**Fig. 5A**). O número de pelos radiculares foi menor nos 3 genótipos em 1 mM de NH_4^+ (**Fig. 5B**). Apesar destas alterações, não houve diferenças significativas na densidade de pelos radiculares entre os genótipos e tratamentos (**Fig. 5C**).

Aos 7 dias de desenvolvimento foi possível observar a forte inibição causada pelo NH_4^+ no comprimento da raiz principal em relação às plantas tratadas com 1 mM NO_3^- ou NH_4NO_3 , não havendo diferenças significativas entre os genótipos (**Fig. 5D**). Por sua vez, o número de raízes laterais foi maior no tratamento com NH_4^+ , com diferenças significativas em relação ao tratamento com NO_3^- . Como consequência dessas alterações, a densidade de raízes laterais foi significativamente aumentada no tratamento com NH_4^+ em comparação aos outros tratamentos. Ainda, maior densidade de raízes laterais foi observada no mutante *gsnor*⁺ em relação ao selvagem (**Figs. 5E e 5F**).

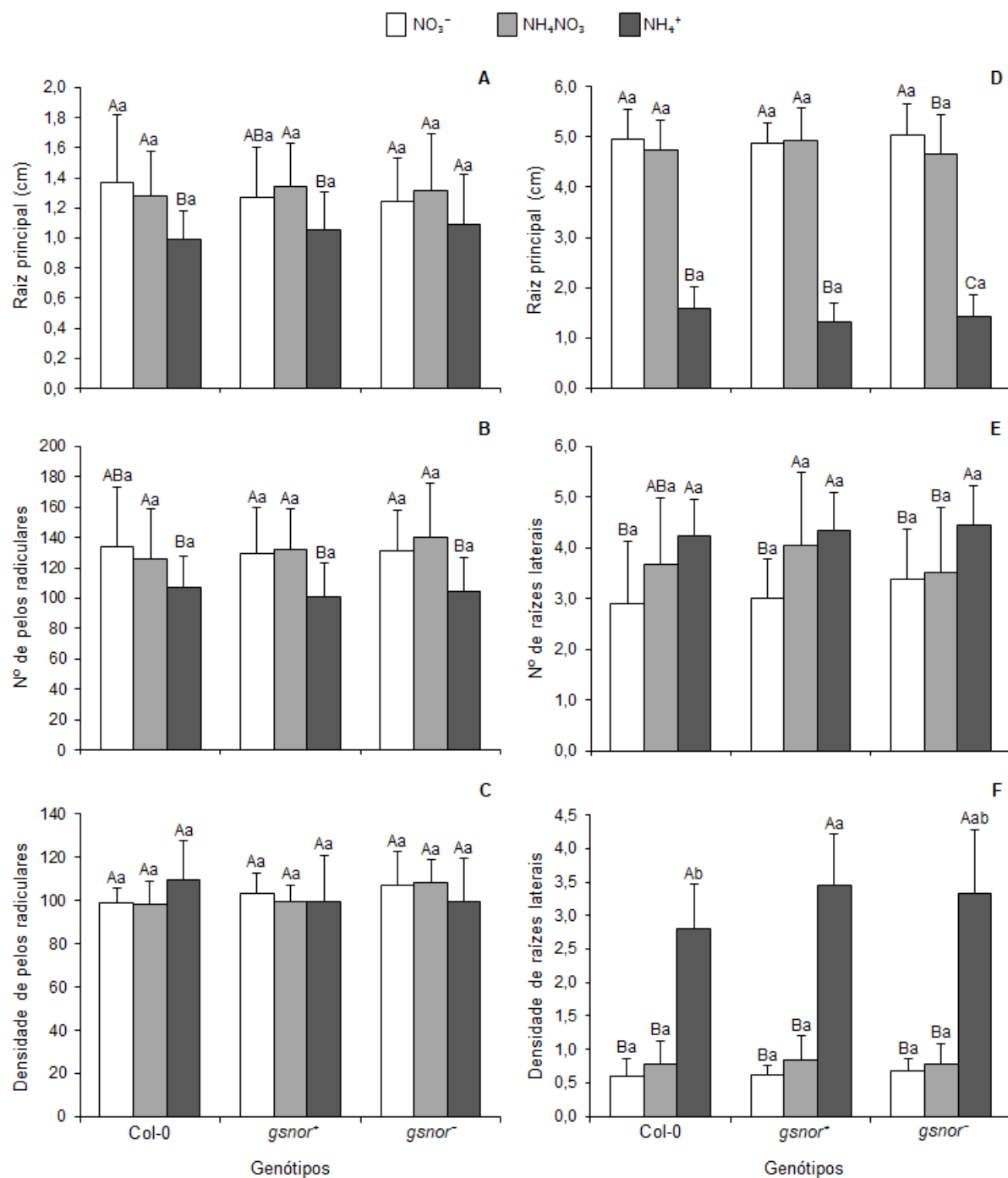


Figura 5 – Fenótipo radicular de *Arabidopsis*, genótipos selvagem (Col-0) e mutantes com alta e baixa expressão da enzima GSNOr (*gsnor*⁺ e *gsnor*⁻, respectivamente), aos quatro dias (A, B e C) e aos sete dias (D, E e F) de desenvolvimento em três fontes de N (1 mM NO₃⁻, 1 mM NH₄NO₃ e 1 mM NH₄⁺). A) Comprimento da raiz principal; B) Número de pelos radiculares; C) Densidade de pelos radiculares; D) Comprimento da raiz principal; E) Número de raízes laterais; F) Densidade de raízes laterais. ANOVA *one-way*, seguida de teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras maiúsculas comparam tratamentos e letras minúsculas comparam genótipos. Média e desvio padrão, n=10.

Em resumo, os resultados da **Figura 5** mostraram que o NH_4^+ foi a fonte de N que provocou as alterações mais significativas na arquitetura radicular, não observando-se diferenças importantes entre o tratamento com NO_3^- e aquele com NH_4NO_3 . Já aos 4 dias de desenvolvimento, observou-se no tratamento com NH_4^+ uma tendência de inibição do crescimento da raiz e da formação de pelos radiculares. Aos 7 dias, a inibição provocada por NH_4^+ no crescimento radicular foi melhor evidenciada, bem como o estímulo na formação de raízes laterais, em comparação ao tratamento com NO_3^- . Não foram observadas diferenças importantes entre os genótipos, sugerindo que as respostas foram dependentes mais da fonte exógena de N do que do conteúdo endógeno de NO, que difere entre estes 3 genótipos (ver **Fig. 11**).

De modo geral, os resultados apresentados na **Figura 5** mostram que NO_3^- e NH_4NO_3 favoreceram o alongamento da raiz principal, mas diminuíram a formação de raízes laterais. Efeito inverso foi observado em plantas cultivadas em NH_4^+ , que exibiram raízes menores e mais ramificadas, indicando um efeito deste íon na arquitetura radicular. Estes resultados estão de acordo com o que já foi observado em outros estudos com *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2010; Liu *et al.* 2013; Esteban *et al.*, 2016). Destaca-se que o desenvolvimento radicular aos quatro dias foi pouco afetado por NH_4^+ . Provavelmente as reservas da semente devem prover o N necessário para o crescimento das raízes nesta fase de desenvolvimento, visto que essas reservas são consumidas em até 96 horas após a embebição (Vidal *et al.*, 2014). Vale ressaltar que, apesar de o NH_4^+ apresentar certa toxicidade, as plantas sobreviveram e se desenvolveram sob essa condição por 14 dias, quando foram realizadas as coletas das raízes.

O efeito inibitório do NH_4^+ no desenvolvimento radicular pode não estar relacionado à toxicidade, uma vez que esses efeitos são observados em concentrações acima de 10 mM (Brito & Kronzucker, 2002). Li e colaboradores (2010) mostraram que a ponta da raiz é sensível ao NH_4^+ e apenas o contato com este íon foi capaz de desencadear respostas e alterar a arquitetura radicular. O NH_4^+ é uma forma nitrogenada capaz de permanecer na superfície do solo, em

função de sua carga positiva que o mantém adsorvido à matéria orgânica e argila, sofrendo menos efeitos da lixiviação (Strock, 2008). Dessa forma, a raiz entra em contato com o NH_4^+ logo no início do desenvolvimento. É possível que os efeitos observados na arquitetura radicular na concentração de 1 mM de NH_4^+ possam estar relacionados à resposta regulatória desencadeada por esta fonte nitrogenada e não pela toxicidade.

O desenvolvimento radicular foi similar entre os mutantes com diferentes níveis endógenos de NO e o selvagem, indicando que o teor endógeno desta molécula não afeta o desenvolvimento das raízes nesse estágio de desenvolvimento das plantas. Esses resultados diferem dos obtidos por Shi *et al.* (2015) com o mutante de inserção de T-DNA, *gsnor1-3*, que exibiu raízes mais curtas e menor número de raízes laterais em relação ao selvagem (Col-0) aos 6 dias de desenvolvimento, quando cultivados em meio contendo NH_4NO_3 .

Apesar dos mutantes *gsnor*⁺ e *gsnor*⁻ apresentarem menor desenvolvimento da parte aérea em relação ao selvagem Col-0, as plantas cresceram e produziram sementes viáveis (dados não mostrados), diferentemente do observado para o mutante *gsnor1-3*, que apresenta diversas alterações no desenvolvimento floral e fertilidade reduzida (Shi *et al.*, 2015). A análise de quatro mutantes para GSNOR de *Arabidopsis*, sendo dois mutantes nulos (*hot5-2* e *5-4*) e dois mutantes *missense* (*hot5-1* e *5-3*) durante todo o ciclo de vida da planta e em diferentes condições de luz e temperatura, mostrou que os dois primeiros apresentaram maiores efeitos pleiotrópicos e que foram incapazes de crescer em meio de cultura contendo 0,5% de sacarose, enquanto os mutantes *missense* se desenvolveram de forma similar ao selvagem Col-0 em todas as condições de crescimento impostas (Lee *et al.*, 2008).

Estudo anterior de Espunya *et al.* (2006) com as linhagens antisense e superexpressando GSNOR utilizadas no presente trabalho (Achkor *et al.*, 2003) mostrou que ambas apresentaram uma significativa redução no comprimento da raiz, o que foi relacionado aos menores níveis de GSH endógeno e à alteração na distribuição espacial do GSH no meristema da raiz, em comparação ao genótipo selvagem (Col-0). No trabalho de Espunya *et al.* (2006), o cultivo das

plantas foi feito em meio nutritivo de Murashige & Skoog (1962), enquanto no presente trabalho foi utilizado meio de Hoagland & Arnon (1950), com baixa concentração salina, o que poderia explicar o desenvolvimento similar das linhagens transgênicas em relação ao genótipo selvagem. Estas linhagens já foram também caracterizadas quanto às respostas nutricionais em culturas de células e o estudo evidenciou o papel da GSNO em modular os níveis de NO e SNO, bem como a funcionalidade mitocondrial (Frungilo *et al.* 2013). Outros estudos com estas linhagens evidenciaram o papel da GSNO na proteção ao estresse abiótico por ferimento (Díaz *et al.*, 2003) e na resposta de defesa da planta ao ataque de patógenos (Rustérucci *et al.*, 2007).

4.3. Efeito do GSNO na ação inibitória do crescimento da raiz por NH_4^+

O resultado do experimento anterior mostrou pouca variação entre os genótipos no desenvolvimento radicular nas três fontes de N testadas. Portanto, para o estabelecimento das curvas de concentração de GSNO e GSH, optou-se por utilizar somente o genótipo Col-0. O GSNO foi aplicado somente em meio contendo 1 mM de NH_4^+ , tendo em vista o objetivo do experimento de observar se o padrão de desenvolvimento radicular em NH_4^+ se deve à ausência de NO derivado do NO_3^- . O doador de NO (GSNO) e seu controle (GSH) foram aplicados nas concentrações de 0,1, 0,25, 0,5 e 0,75 mM. A escolha dessas concentrações se baseou em trabalhos anteriores do grupo realizados com *Arabidopsis* (Frungillo *et al.*, 2014, Moro *et al.*, 2017).

A adição de GSNO nas concentrações de 0,1 e 0,25 mM não afetou o desenvolvimento da raiz principal (**Fig. 6A**), mas aumentou significativamente o número de pelos radiculares (**Fig. 6B**), aos 4 dias de cultivo. Já as concentrações de 0,5 e 0,75 mM se mostraram tóxicas para as plantas, resultando no desenvolvimento tardio das raízes (**Fig. 6A**). O efeito positivo do GSNO na produção de pelos radiculares corrobora resultados anteriores do grupo mostrando que este doador de NO promove a formação de pelos radiculares em mutantes de *Arabidopsis* deficientes

na FPR (Moro *et al.*, 2017). O GSH não apresentou o mesmo efeito do GSNO, levando à forte inibição do desenvolvimento radicular.

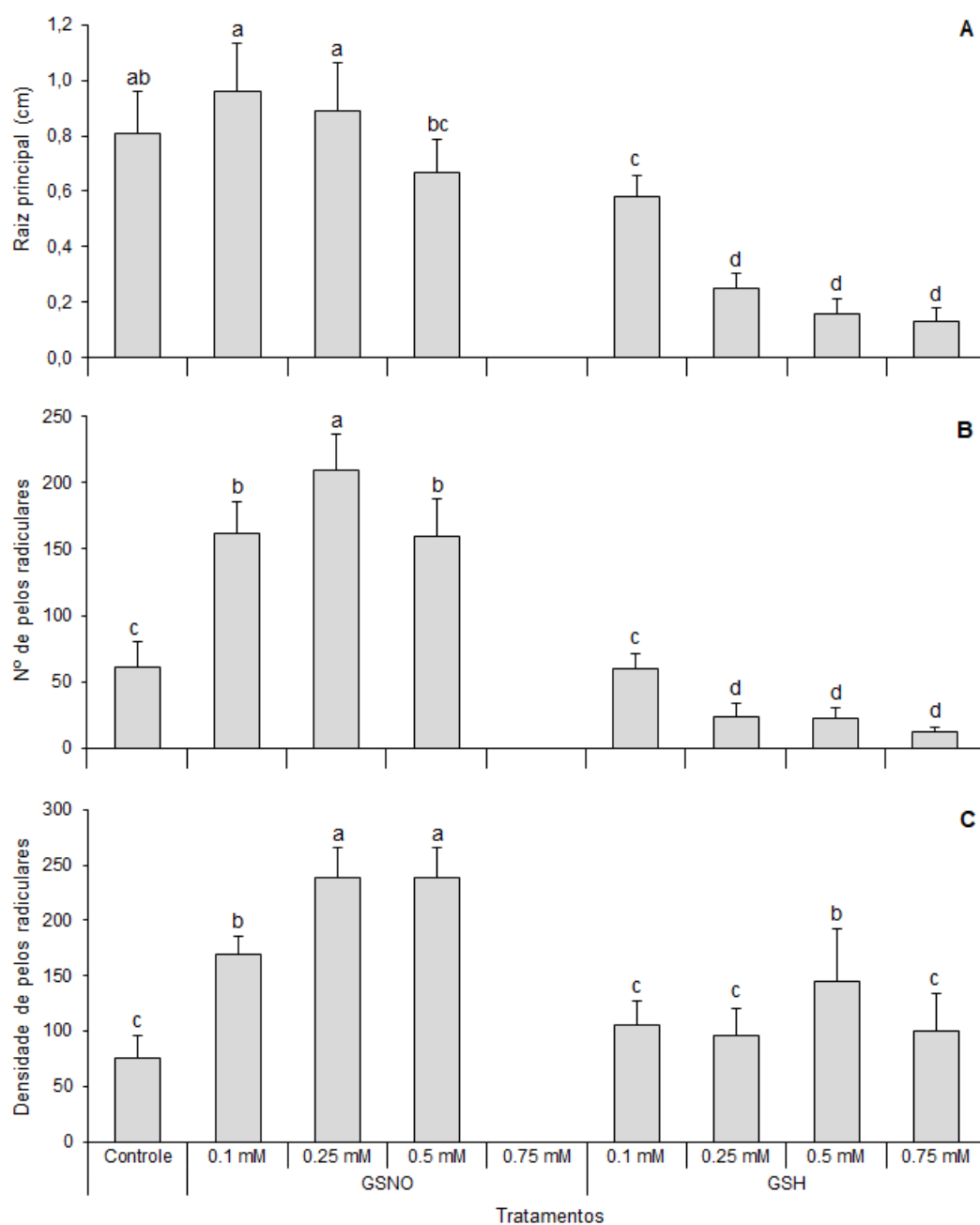


Figura 6 – Fenótipo radicular de *Arabidopsis* genótipo selvagem (Col-0), aos quatro dias de desenvolvimento, crescido em 1 mM de NH_4^+ (controle) com adição de diferentes concentrações de GSNO ou GSH (0,1, 0,25, 0,5 e 0,75 mM). A) Comprimento da raiz principal, B) Número de pelos radiculares, C) Densidade de pelos radiculares. ANOVA *one-way*, seguido de teste de *Tukey* ($P \leq 0,05$). Média e desvio padrão, $n=10$.

Aos 7 dias de desenvolvimento, a inibição do crescimento da raiz principal observada na presença de NH_4^+ foi parcialmente revertida com a adição de GSNO, exceto pela concentração de 0,75 mM que foi tóxica para o desenvolvimento das raízes (**Fig. 7A**). Adicionalmente, o número de raízes laterais foi significativamente reduzido com a adição de GSNO (**Fig. 7B**). Esse efeito refletiu na densidade de raízes laterais que também apresentou valores menores na presença de GSNO (**Fig. 7C**). Estes efeitos não foram observados no tratamento com GSH, indicando que os efeitos observados estão relacionados ao NO liberado pelo GSNO.

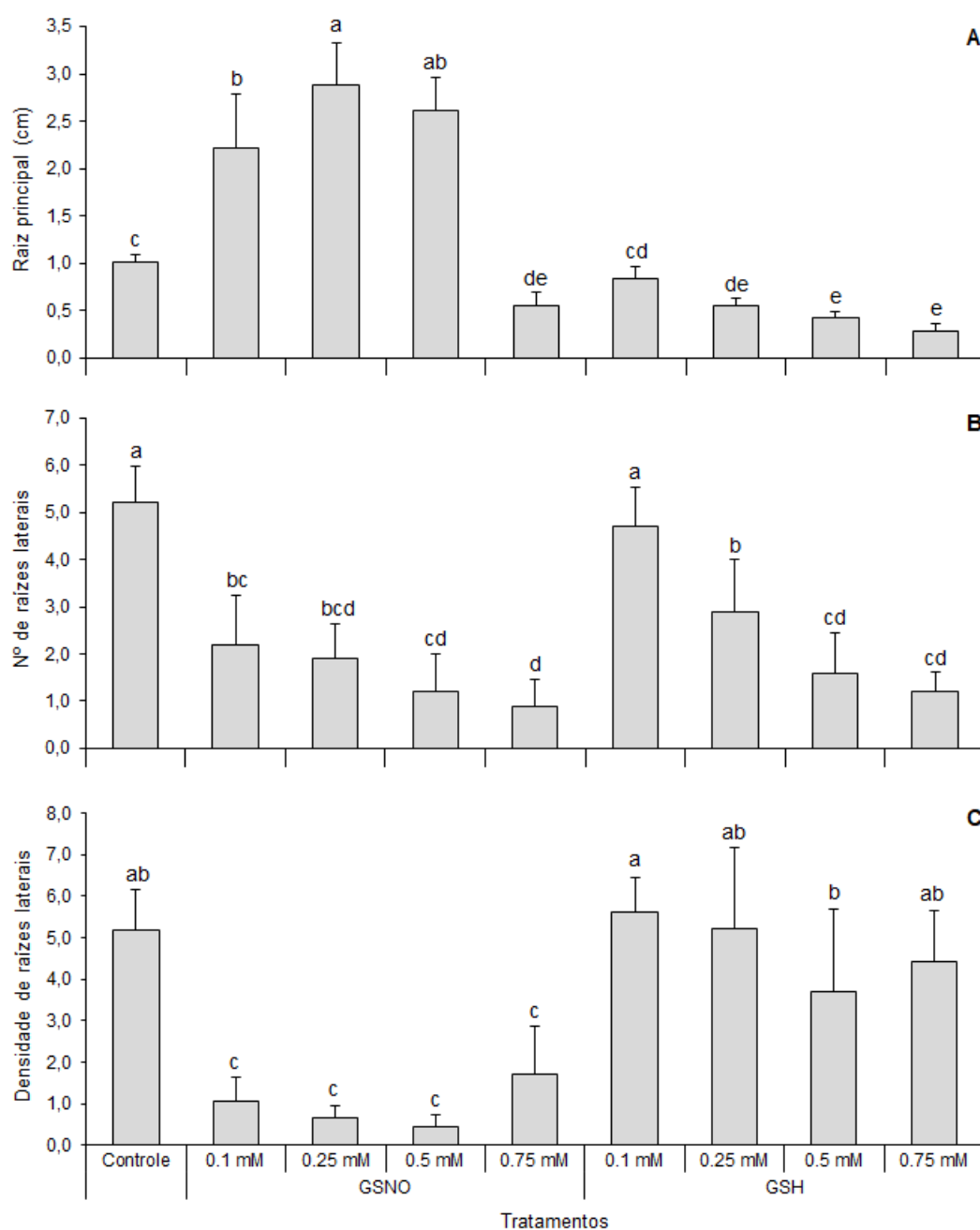


Figura 7 – Fenótipo radicular de *Arabidopsis* genótipo selvagem (Col-0), aos sete dias de desenvolvimento, crescido em 1 mM NH_4^+ (controle) com adição de diferentes concentrações de GSNO ou GSH (0,1, 0,25, 0,5 e 0,75 mM). A) Comprimento da raiz principal, B) Número de raízes laterais, C) Densidade de raízes laterais. ANOVA *one-way*, seguido de teste de *Tukey* ($P \leq 0,05$). Média e desvio padrão, n=10. Média e desvio padrão, n=10.

A **Figura 8** apresenta os fenótipos observados nos diferentes tratamentos. É interessante observar que no cultivo com NH_4^+ , o GSNO recuperou o crescimento das raízes, bem como o desenvolvimento da parte aérea, enquanto o GSH potencializou os efeitos do NH_4^+ .



Figura 8 – Imagens de raízes de *Arabidopsis* do genótipo selvagem (Col-0) cultivadas sem N, com 1 mM de NH_4NO_3 , NO_3^- ou NH_4^+ , ou com 1 mM de NH_4^+ acrescido de 0,25 mM de GSNO ou GSH aos quatro (A) e aos sete (B) dias de desenvolvimento. A) Formação de pelos radiculares nos diferentes

tratamentos observados em estereomicroscópio no aumento de 4X, Barra: 1 mm, B) Fenótipo radicular nos diferentes tratamentos, Barra: 1 cm.

Adicionalmente, a análise de regressão para as concentrações de GSNO e GSH (Anexo 4) foi significativa em todos os parâmetros analisados, exceto pela densidade de raízes laterais com a adição de GSH.

Em conjunto, os resultados das **Figura 7 e 8** mostram que o GSNO reverteu parcialmente o efeito inibitório do NH_4^+ no crescimento da raiz principal (**Fig. 7A, 8B**). O GSNO também inibiu a formação das raízes laterais (**Fig. 7B, 8B**), diminuindo consequentemente a densidade destas (**Fig. 7C**), se assemelhando neste parâmetro ao efeito do NO_3^- no desenvolvimento radicular (**Fig. 3**). Estes resultados sugerem que parte dos efeitos do NO_3^- na arquitetura das raízes seria mediada por NO e que os efeitos inversos do NH_4^+ , em relação aos efeitos do NO_3^- , podem ser devidos à ausência ou menor concentração endógena de NO quando as plantas são cultivadas com NH_4^+ como única fonte de N. Ensaios de localização da emissão de NO *in vivo* em raízes de plantas cultivadas com as diferentes fontes de N deram suporte a esta proposição (ver **Fig. 11**).

4.4. Efeito do GSNO no desenvolvimento radicular: comparação entre genótipos

Definidas as concentrações das fontes de N (1 mM NO_3^- ou NH_4^+) e do doador de NO e seu controle (0,25 mM GSNO ou GSH), foi realizado um novo experimento para avaliar os efeitos do GSNO nos mutantes com alta e baixa expressão da GSNO (*gsnor⁺* e *gsnor⁻*, respectivamente), juntamente com o selvagem (Col-0). Além do GSNO e do GSH, foi analisado também o efeito da adição de 0,25 mM de cPTIO, um sequestrador de NO, ao meio contendo NO_3^- , visando estabelecer se os efeitos do NO_3^- no desenvolvimento radicular se devem à produção de NO. Após quatro dias de cultivo, a adição de cPTIO não modificou a arquitetura radicular observada em NO_3^- (**Fig. 9A**). A adição de GSNO ao tratamento com NH_4^+ aumentou o número de pelos radiculares (**Fig. 9B**) e consequentemente a densidade destes (**Fig. 9C**).

Assim como observado para o selvagem (**Fig. 6**), o tratamento com GSH levou à diminuição do comprimento da raiz principal e do número de pelos radiculares nos genótipos *gsnor*⁺ e *gsnor*⁻ (**Fig. 9B**).

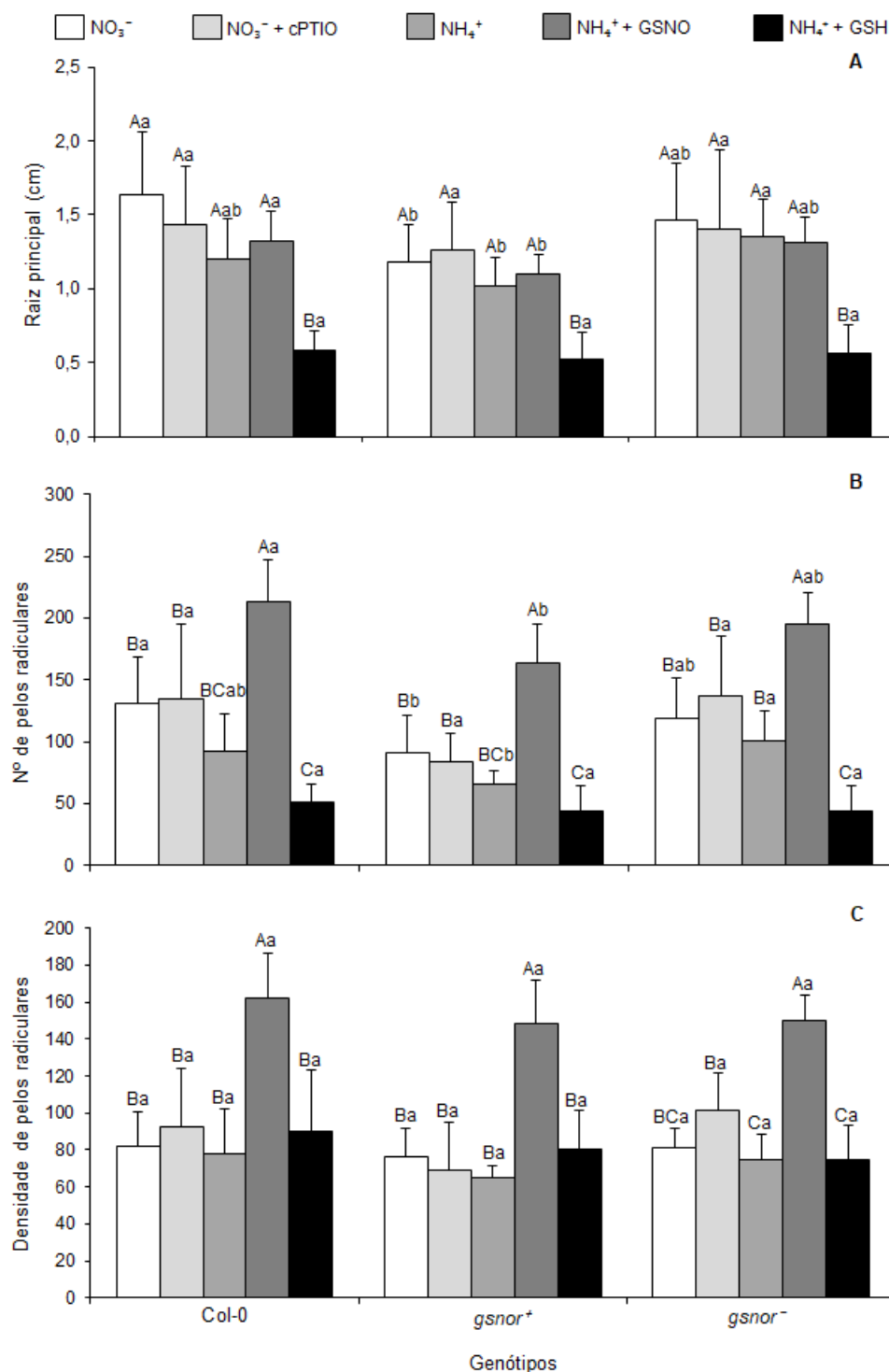


Figura 9 – Fenótipo radicular de *Arabidopsis* dos genótipos selvagem (Col-0) e mutantes com alta e baixa expressão da enzima GSNOr (*gsnor*⁺ e *gsnor*⁻, respectivamente) aos quatro dias de desenvolvimento em duas fontes de nitrogênio (1 mM NO_3^- ou NH_4^+): efeito da adição de 0,25 mM de cPTIO, GSNO ou GSH. A) Comprimento da raiz principal, B) Número de pelos radiculares, C)

Densidade de pelos radiculares. ANOVA *one-way*, seguida de teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras maiúsculas comparam tratamentos e letras minúsculas comparam genótipos. Média e desvio padrão, n=10.

Aos 7 dias de desenvolvimento, a remoção do NO pela adição de cPTIO ao meio contendo NO_3^- levou a uma diminuição significativa do comprimento da raiz principal nos 3 genótipos, resultando em raízes de comprimento intermediário entre os tratamentos com NO_3^- e NH_4^+ . A inibição causada por NH_4^+ foi significativamente revertida pela adição de GSNO nos três genótipos, embora apenas no selvagem e no *gsnor*⁺ as diferenças tenham sido significativas. O GSH inibiu o desenvolvimento radicular nos 3 genótipos (**Fig. 10A**). Com relação ao desenvolvimento de raízes laterais, o cPTIO não afetou esse parâmetro nos três genótipos em comparação ao NO_3^- e o GSNO reverteu parcialmente o aumento no número e densidade induzidos por NH_4^+ nos genótipos *gsnor*⁺ e *gsnor*⁻ (**Fig. 10B**).

Em resumo, os resultados das **Figuras 9 e 10** confirmaram para os 3 genótipos os efeitos do GSNO em promover a formação de pelos radiculares e reverter os efeitos do NH_4^+ na inibição do crescimento radicular, bem como na formação de raízes laterais. Também mostraram efeito negativo no crescimento radicular quando NO é removido do tratamento com NO_3^- . Estes resultados sustentam a proposição de que, pelo menos em parte, as alterações provocadas por NH_4^+ na arquitetura radicular resultariam dos menores níveis endógenos de NO na raiz em comparação aos níveis obtidos com NO_3^- . Embora algumas diferenças de resposta aos tratamentos tenham sido observadas entre os 3 genótipos analisados, no geral foram sutis, sendo observado um padrão global de resposta independente do genótipo.

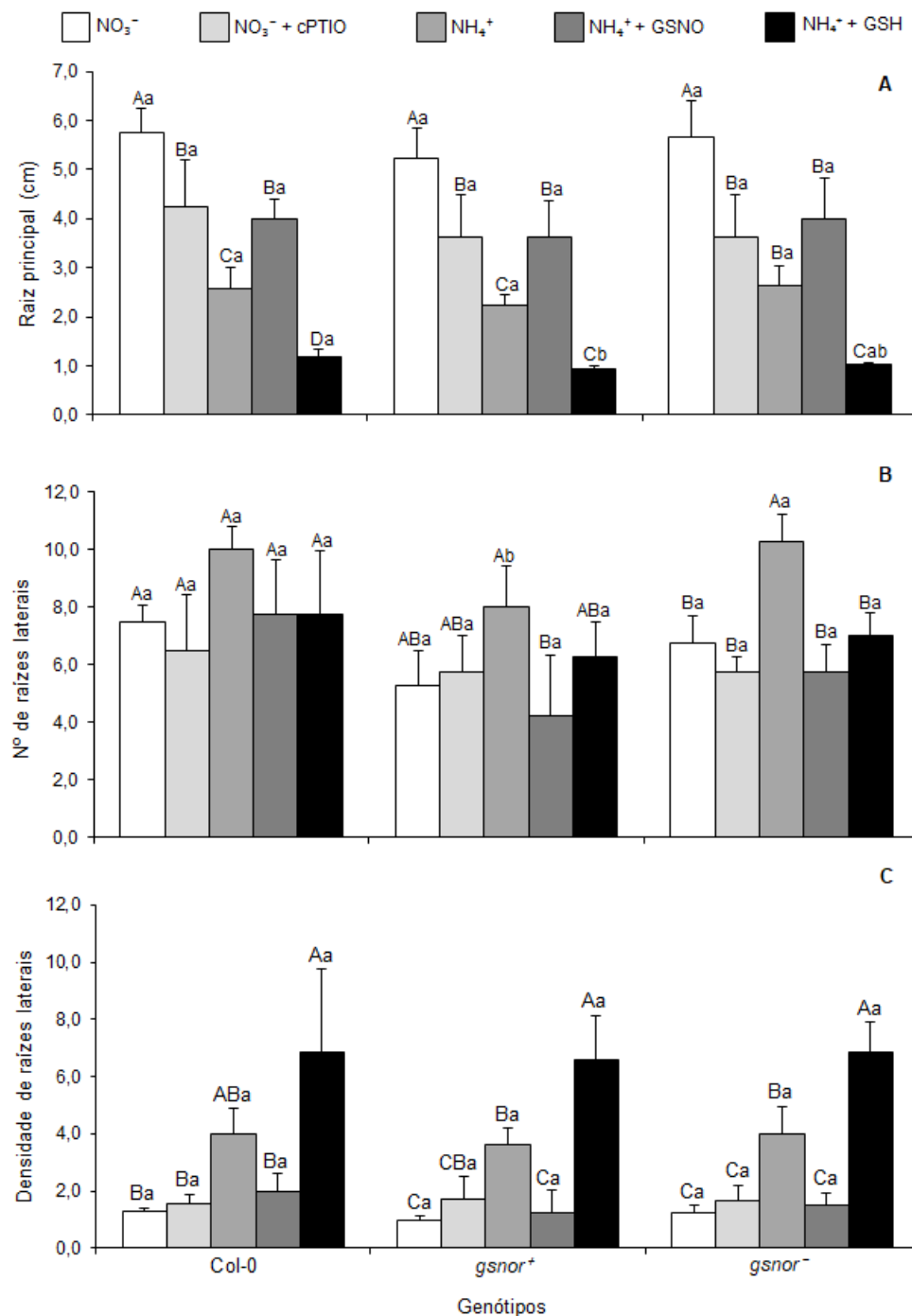


Figura 10 – Fenótipo radicular de *Arabidopsis* dos genótipos selvagem (Col-0) e mutantes com alta e baixa expressão da enzima GSNOr (*gsnor*⁺ e *gsnor*⁻, respectivamente) aos sete dias de desenvolvimento em duas fontes de N (1 mM NO_3^- ou NH_4^+): efeito da adição de 0,25 mM de cPTIO, GSNO ou GSH. A) Comprimento da raiz principal, B) Número de raízes laterais, C) Densidade de raízes laterais. ANOVA *one-way*, seguida de teste de *Tukey* ($P \leq 0,05$). Letras maiúsculas comparam tratamentos e letras minúsculas comparam genótipos. Média e desvio padrão, n=10.

O GSH se mostrou um bom controle para comparação com as alterações radiculares induzidas por GSNO, pois o desenvolvimento das raízes foi diferente nos dois tratamentos,

sugerindo que os efeitos observados na presença de GSNO estejam relacionadas à liberação de NO por esse doador. Já as plantas tratadas com GSH apresentaram inibição do desenvolvimento radicular sugerindo certa toxicidade desta molécula nas condições utilizadas em nosso estudo. Resultados similares foram observados em estudos realizados com os mesmos genótipos utilizados no nosso trabalho, onde o desenvolvimento radicular na presença de GSH foi fortemente inibido (Espunya *et al.*, 2006).

A participação do NO no desenvolvimento radicular já foi demonstrada em trabalhos anteriores, atuando no desenvolvimento de raízes laterais em plantas de tomate e arroz (Correa-Aragunde *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2018), no desenvolvimento de raízes adventícias em plantas de pepino (Pagnussat *et al.*, 2002) e na formação de pelos radiculares em alface (Lombardo *et al.*, 2006) e *Arabidopsis* (Lombardo & Lamattina, 2012; Moro *et al.*, 2017).

Em trabalho realizado com raízes de arroz, a aplicação de SNP (nitroprussiato de sódio) reverteu completamente os efeitos causados por NH_4^+ , levando ao mesmo fenótipo observado em cultivo com NO_3^- (Sun *et al.*, 2018). É importante destacar que o arroz possui preferência nutricional por NH_4^+ (Britto & Kronzucker, 2013), diferentemente de *Arabidopsis* que quando crescida em NH_4^+ apresenta um desenvolvimento diferenciado indicando a sua sensibilidade à esta fonte nitrogenada, sendo os efeitos observados inversos entre as duas espécies. A reversão completa do fenótipo e da emissão de NO obtida por Sun *et al.* (2018) se deu com a utilização do doador de NO SNP, que também libera cianeto. O cianeto está presente em todos os organismos, mas em altas concentrações pode ter efeitos tóxicos, inibindo a cadeia respiratória mitocondrial. Já foi reportado que em níveis não tóxicos, o cianeto está envolvido na regulação de diversos processos fisiológicos, entre os quais o desenvolvimento de pelos radiculares (Arenas-Alfonseca *et al.*, 2018). O GSNO, utilizado em nossos experimentos, é considerado um doador natural, já que pode ser produzido e acumulado em tecidos vegetais e sua decomposição gera GSSG e NH_3^+ , ambos também envolvidos em diversos processos fisiológicos em plantas (Salgado *et al.*, 2017; Bergara-Morales *et al.*, 2018). A não reversão

completa do fenótipo radicular obtida com a adição de GSNO ao tratamento com NH_4^+ não parece estar relacionada à concentração aplicada, pois a adição de doses mais altas deste doador resultou em um desenvolvimento tardio das plantas (**Fig. 6 e 7**; Anexo 2), possivelmente provocado por estresse nitrosativo pelo excesso de NO (Corpas & Barroso, 2013; Khajuria *et al.*, 2019).

Como discutido anteriormente, sugere-se que a falta de auxina no cultivo com NH_4^+ resulte no encurtamento da raiz (Krouk *et al.*, 2010a). Em concordância, foi observado que plantas de arroz crescidas em NO_3^- tiveram maior conteúdo de auxina em relação às aquelas tratadas com NH_4^+ e maior expressão do transportador de auxina PIN1. Adicionalmente, a aplicação de SNP ao tratamento com NH_4^+ aumentou a atividade de DR5::GUS (repórter responsivo a auxina) e o transporte de auxina nas raízes, em níveis similares ao observado no cultivo em NO_3^- , e levou a um aumento do comprimento da raiz principal e do número de raízes laterais. Por outro lado, a adição de cPTIO ao cultivo com NO_3^- levou à diminuição da atividade DR5::GUS e do transporte de auxina, para níveis similares aos observados em NH_4^+ , com concomitante alteração do fenótipo radicular (Sun *et al.*, 2018). A adição de GSNO ou auxina isoladamente também estimulou a formação de pelos radiculares no mutante *rhd6* de *Arabidopsis* mas, quando o cPTIO foi fornecido juntamente com a auxina, não houve formação de pelos radiculares (Moro *et al.*, 2017). Esses resultados demonstram que o NO está envolvido com a cascata de sinalização da auxina que leva a formação de pelos radiculares. Nossos resultados mostraram que o fornecimento de cPTIO juntamente com NO_3^- , inibiu apenas parcialmente o desenvolvimento da raiz principal, diferentemente do observado por Sun *et al.* (2018), onde a aplicação de 100 μM de cPTIO com 5 mM de NO_3^- levou a um fenótipo similar ao observado em NH_4^+ . A utilização do cPTIO nem sempre traz resultados consistentes, devido a possibilidade de reagir com outras moléculas que podem afetar o sequestro do NO. Além disso, foi demonstrado que o cPTIO é consumido rapidamente (100 μM , constante de decaimento de 15 min^{-1}) (D'Alessandro *et al.*, 2013). Considerando que foi feita uma única aplicação de cPTIO

no início da germinação das sementes e que nosso meio de cultivo ainda continha teores relativamente altos de NO_3^- , as plantas ainda captaram NO_3^- disponível e o reduziram a NO_2^- e, subsequentemente, a NO.

Portanto, é possível que a reversão parcial de fenótipo observada com a adição de GSNO ao NH_4^+ possa ter ocorrido pela sinalização do NO nas cascatas de regulação/sinalização da auxina, como por exemplo, pela inibição da atividade da IAA oxidase, que degrada auxina; ou por S-nitrosação do receptor de auxina TIR1 (Transport Inhibitor Response 1) (Terrile *et al.*, 2012; Freschi *et al.*, 2013; Sanz *et al.*, 2015). Experimentos futuros de quantificação de auxina e análise de expressão de genes envolvidos na síntese e transporte desse hormônio nos três genótipos, sob os diferentes tratamentos, permitirão elucidar se as alterações diferenciais de arquitetura radicular observadas no presente trabalho têm relação com a sinalização hormonal.

Estudos mostram também que o acúmulo de NH_4^+ leva ao aumento na produção de etileno (Barker & Corey, 1991; Barker, 1999) e que o aumento deste sinalizador está relacionado aos sintomas de toxicidade por NH_4^+ , observados em plantas de tomate (You & Barker, 2005). Nesse sentido, é interessante futuramente quantificar o acúmulo de etileno e observar como ele pode ser afetado pela adição de GSNO.

4.5. Localização *in situ* do NO nos diferentes tratamentos e mutantes

A **Figura 11** apresenta a localização *in situ* do NO em raízes cultivadas nos diferentes tratamentos. Como esperado, em meio contendo NO_3^- foi observada menor intensidade de fluorescência, correspondente a menor emissão de NO, no mutante *gsnor*⁺ em comparação ao mutante *gsnor*⁻ e à Col-0. As raízes apresentaram menor emissão de NO no tratamento com NH_4^+ em relação ao NO_3^- , sendo que a adição de GSNO ao meio contendo NH_4^+ induziu um aumento da intensidade de fluorescência, em níveis similares aos observados em NO_3^- . A adição de GSH não aumentou a emissão de NO. A adição do sequestrante de NO, cPTIO, levou a uma diminuição da intensidade de fluorescência em todos os genótipos. Em resumo, esses

dados sugerem que o cultivo em NO_3^- ou NH_4^+ modula, em parte, a concentração endógena de NO das raízes. As diferenças são mais visíveis quando consideramos os teores normais de NO, ou seja, sem adição exógena, sendo que no genótipo *gsnor*⁻ as diferenças foram mais sutis entre os tratamentos.

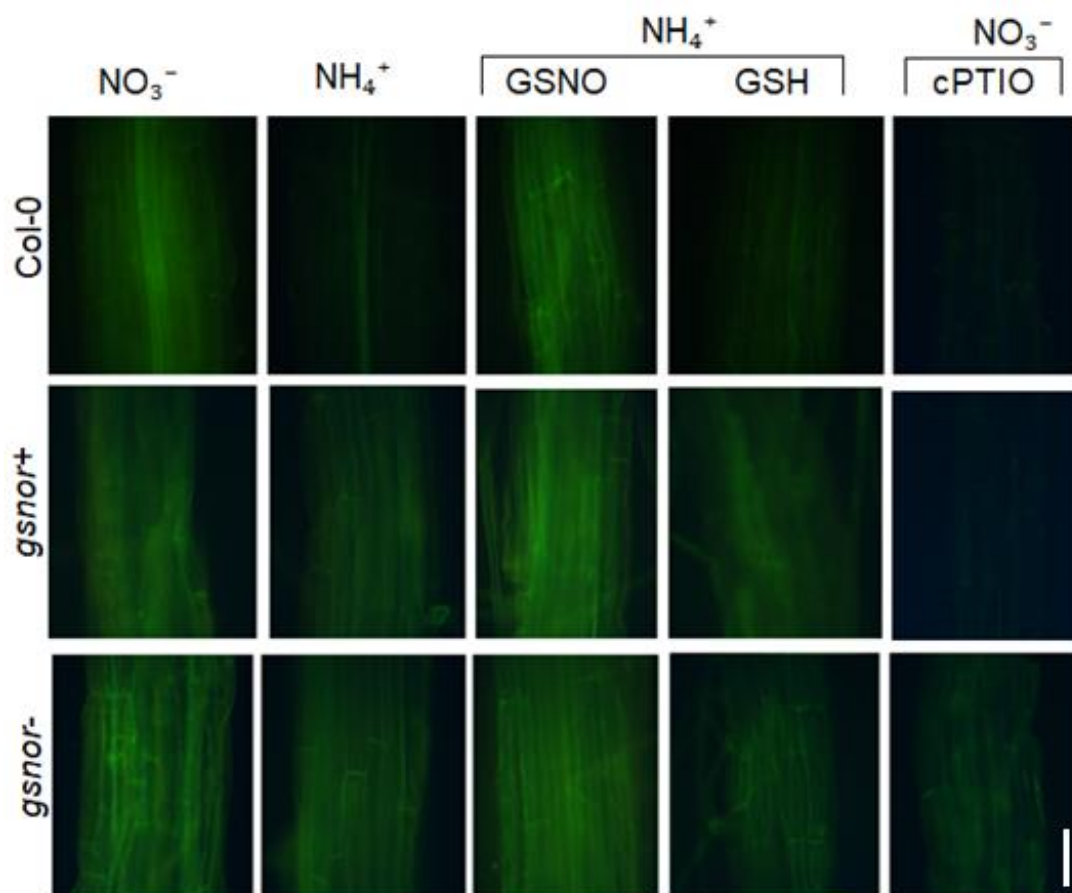


Figura 11 – Localização *in situ* da emissão de NO em raízes de *Arabidopsis* dos genótipos selvagem (Col-0) e mutantes com alta e baixa expressão da GSNO_r (*gsnor*⁺ e *gsnor*⁻, respectivamente) aos quatro dias de desenvolvimento, em duas fontes de nitrogênio (1 mM NO_3^- ou NH_4^+): efeito da adição de 0,25 mM de cPTIO, GSNO ou GSH. Emissão medida *in vivo* com tratamento de marcador de NO, DAF-2DA (10 μM 4,5 diaminofluoresceína-2 diacetato). Aumento 40x, barra: 50 μM .

A localização *in situ* de NO (**Fig. 11**) foi realizada na zona de alongamento da raiz principal. Nossos resultados são similares aos observados por Sun *et al.* (2018), onde maior intensidade de fluorescência foi observada em tratamento contendo NO_3^- e NH_4^+ acrescido de SNP, tanto nas raízes laterais, quanto na ponta da raiz principal.

4.6. Expressão do gene *GSNOR1* nos diferentes genótipos

Embora não tenham sido observadas diferenças marcantes no desenvolvimento radicular dos mutantes em relação ao selvagem, as análises moleculares desses genótipos confirmaram as diferenças de expressão do gene *GSNOR1*. A avaliação do fragmento amplificado por eletroforese (**Fig. 12A**) mostra banda de maior intensidade para o *gsnor*⁺ e de menor intensidade para o *gsnor*⁻. A análise quantitativa por qRT-PCR (**Fig. 12B**), mostra que o mutante *gsnor*⁺ possui expressão da GSNOr 60 vezes maior do que o selvagem (Col-0), sendo que o mutante *gsnor*⁻ apresentou valores de expressão próximos de zero ($0,00209 \pm 0,00065$).

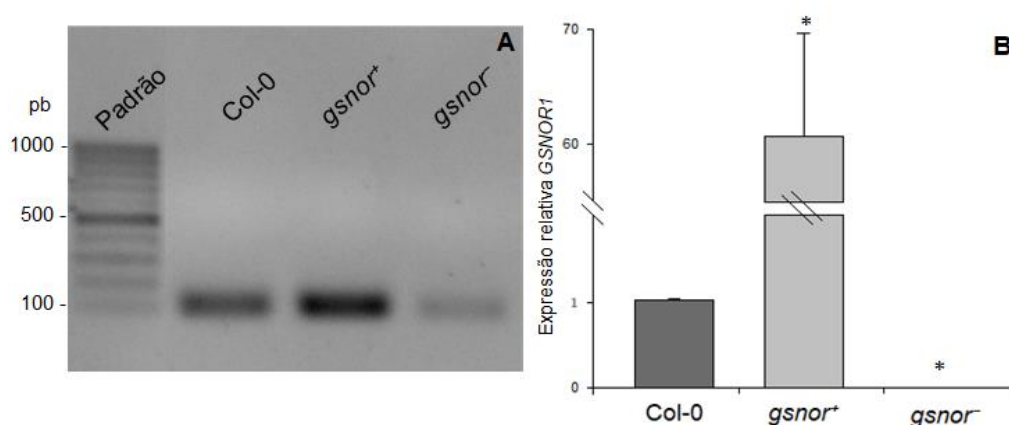


Figura 12 – Amplificação e expressão do gene *GSNOR1* em raízes de *Arabidopsis* dos genótipos selvagem (Col-0) e mutantes com alta e baixa expressão da enzima GSNOr (*gsnor*⁺ e *gsnor*⁻, respectivamente) aos 14 dias de desenvolvimento em 1 mM NO₃⁻. A) Fragmentos analisados em gel de agarose 1% corado com Gel Red, B) Expressão relativa do gene *GSNOR1* nos diferentes genótipos em relação ao selvagem. A expressão relativa foi calculada a partir da média de duas réplicas técnicas de três réplicas biológicas e normalizada contra o gene de referência SAND. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle, teste *t* ($P \leq 0,05$).

4.7. Atividade GSNOr e teor de SNO, NO₃⁻ e NO₂⁻

A atividade da GSNOr foi 5,3 vezes maior no mutante *gsnor*⁺ e 3,5 vezes menor no mutante *gsnor*⁻, quando comparados ao Col-0. No genótipo selvagem, foi observado aumento da atividade GSNOr no tratamento contendo GSNO, diferentemente do mutante *gsnor*⁺ que teve atividade aumentada nos tratamentos contendo NH₄⁺ e GSNO (**Fig. 13A**).

A **Figura 13B** mostra que o conteúdo de SNO não diferiu entre os tratamentos com NO_3^- e NH_4^+ nos mutantes, diferentemente do selvagem em que houve diferença significativa entre estes tratamentos. Entretanto, em concordância ao observado para a atividade GSNO_r, o conteúdo de SNO nos tratamentos com NO_3^- ou NH_4^+ , foi maior no mutante *gsnor*⁻ e menor no mutante *gsnor*⁺, quando comparado ao conteúdo do Col-0. Quando o GSNO foi adicionado ao tratamento com NH_4^+ , o conteúdo de SNO foi significativamente diminuído no genótipo selvagem e no mutante *gsnor*⁻, mas não no mutante *gsnor*⁺, contrariamente ao esperado. Estes resultados indicam que o teor endógeno de SNO não é alterado em função da fonte externa de N, mas pôde ser reduzido pela adição de GSNO ao tratamento com NH_4^+ nos genótipos com maior expressão da GSNO_r (**Fig. 13**). O método colorimétrico utilizado para estimar S-nitrosotióis é considerado menos sensível que métodos amperométricos ou fluorimétricos (Hogg *et al.*, 2017; Mito *et al.*, 2017; Bedioui *et al.*, 2018), mas permitiu detectar diferenças significativas entre os mutantes com baixa e alta atividade de GSNO_r. Medidas adicionais com outros métodos devem ser realizadas para confirmar esses resultados.

Conforme esperado, o conteúdo endógeno de NO_3^- foi maior nas raízes cultivadas em NO_3^- e menor nas raízes cultivadas em NH_4^+ , com ou sem a adição de GSNO ou GSH, sem variações significativas entre os diferentes genótipos (**Fig. 13C**). Assim como observado para o teor de NO_3^- , o teor de NO_2^- foi maior no cultivo com NO_3^- em relação ao cultivo com NH_4^+ , nos três genótipos (**Fig. 13D**).

No presente trabalho as plantas foram cultivadas na presença de 1 mM de NO_3^- desde o início da germinação, estando essa fonte disponível em maiores concentrações no início do experimento e sendo consumida gradualmente (Anexo 2). No entanto, mesmo após 14 dias, foram observados níveis endógenos de NO_3^- da ordem de 4 μmol /raiz de Col-0 cultivadas em NO_3^- . Schofield *et al.* (2009) mediram o teor endógeno de NO_3^- em plântulas de *Arabidopsis* do genótipo Col-0 cultivadas com 3 mM de NO_3^- durante 14 dias e mostraram que os níveis se aproximavam de zero ao final do experimento. Segundo esses autores, em função dos dados de

crescimento, senescência e status nutricional, a concentração de 9 mM foi considerada como ideal para promover o crescimento por 12 dias, a concentração de 3 mM foi considerada limitante e 1 e 0,3 mM causaram estresse por deficiência de N, levando à produção de antocianinas nas folhas (Schofield *et al.*, 2009). Em nosso experimento a concentração de 1 mM não pareceu ser limitante, tendo em vista que as plantas se desenvolveram normalmente e que a parte aérea não apresentou acúmulo de antocianina (**Fig. 8**). Vale ressaltar que enquanto em nosso trabalho foram cultivadas apenas 10 plantas por placa, no trabalho de Schofield *et al.* (2009) foram cultivadas 96, o que deve ter contribuído para um esgotamento mais rápido do NO_3^- do meio.

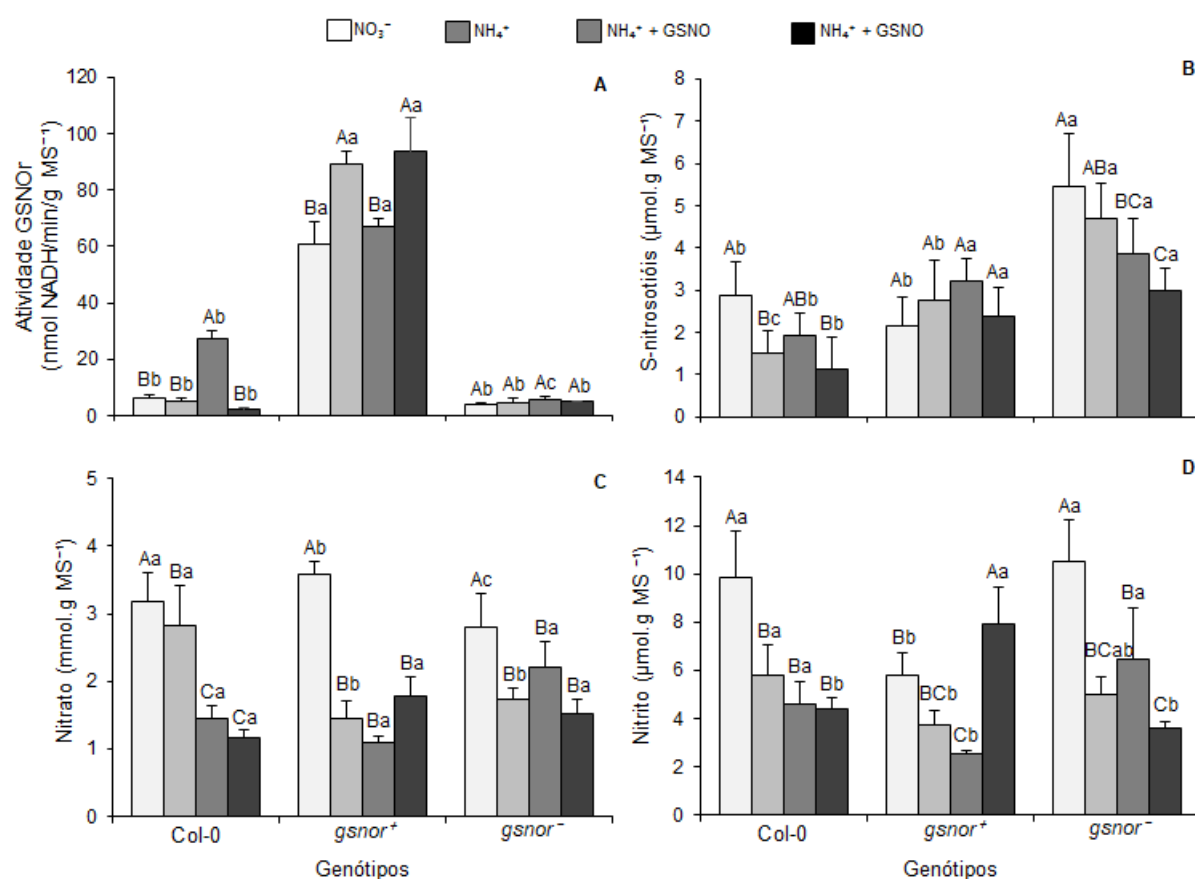


Figura 13 – Atividade GSNO_r e teor de SNOs, NO_3^- e NO_2^- em raízes de *Arabidopsis*, genótipo selvagem (Col-0) e mutantes com alta e baixa expressão da enzima GSNO_r (*gsnor*⁺ e *gsnor*⁻, respectivamente) aos 14 dias de desenvolvimento em duas fontes de N (1 mM NO_3^- ou NH_4^+): efeito da adição de 0,25 mM de cPTIO, GSNO ou GSH. A) Atividade GSNO_r, B) Conteúdo de SNO, C) Teor de NO_3^- endógeno e D) Teor de NO_2^- endógeno. ANOVA two-way, seguida de teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Letras maiúsculas comparam tratamentos e letras minúsculas comparam genótipos. Média e desvio padrão. n=3.

É interessante observar que as análises fenotípicas das raízes (**Figs. 7 a 10**), bem como a determinação da emissão de NO *in vivo* (**Fig. 11**), sugeriram que o efeito do GSNO na arquitetura radicular resultaria da elevação dos níveis endógenos de NO na planta. Já os resultados da **Figura 13B** mostraram que o tratamento com GSNO foi capaz de diminuir os níveis de SNO. Assim, o GSNO parece atuar como um doador de NO e, ao mesmo tempo, por ser substrato para a GSNO_r, liberar tióis que podem atuar como agentes anti-nitrosativos no sistema NO-superóxido (Hu & Ho, 2011).

O teor de SNOs nas raízes crescidas em NO₃⁻ foi similar ao de raízes crescidas em NH₄⁺. Já foi demonstrado por Frungillo et al. (2014) que na presença de maiores concentrações de NO₃⁻ há uma maior produção de NO₂⁻ e consequentemente de NO, que S-nitrosa e inibe a GSNO_r e previne a degradação do GSNO. Não há estudos similares na presença de elevadas quantidades de NH₄⁺, mas pode-se supor que o excesso deste produto de degradação do GSNO também promova inibição da atividade e/ou expressão da GSNO_r, assim como observado por Frungillo et al. (2014) para o acúmulo de NO, mas experimentos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese. Adicionalmente, níveis similares de SNOs no cultivo em NO₃⁻ ou NH₄⁺ podem ser explicados pela diminuição nos níveis de NO₃⁻ disponível no meio de cultivo aos 14 dias (Anexo 2). Essa diminuição na disponibilidade de NO₃⁻ poderia explicar os níveis de SNOs similares entre as duas fontes de N. O mesmo pode-se sugerir para o teor observado de NO₂⁻ nos diferentes tratamentos, já que este está correlacionado positivamente com o teor de NO₃⁻ nas raízes.

O NO atua em importantes mecanismos de defesa da planta a diversos estresses abióticos e bióticos como salinidade, altas temperaturas, danos mecânicos e defesa contra patógenos (Fares et al., 2011; Romero-Puertas et al., 2013). Contudo a interação entre NO e os mecanismos que levam à toxicidade por NH₄⁺ não é muito discutida. Além do trabalho de Sun et al. (2018) com plantas de arroz, apenas outro trabalho, realizado com a espécie macrófita

Hydrilla verticillata, avaliou a interação entre NO e NH_4^+ (Wang *et al.*, 2011). Embora esta espécie se desenvolva em ambiente aquático, foi observado que a adição de SNP ao tratamento com NH_4^+ minimizou o acúmulo de ROS e o estresse oxidativo, provavelmente em função da diminuição do teor de O_2^- pela reação com NO, formando ONOO^- que é menos tóxico. Os mesmos autores relataram aumento do conteúdo de ácido ascórbico (AsA) e glutathiona (GSH), além de aumento da atividade de catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) com a adição de NO em relação ao tratamento com NH_4^+ , indicando que o NO pode atuar na manutenção de um potencial redox estável em células de *H. verticillata*. Com base nos resultados obtidos por Wang *et al.* (2011) seria interessante analisar o metabolismo antioxidante em experimentos futuros com *Arabidopsis* em nossas condições de cultivo.

4.8. Análise de expressão de genes do metabolismo de NO_3^- e NO

Tendo em vista que os principais transportadores de NO_3^- expressos na raiz, *NPF6.3* (anteriormente designado *NRT1.1*) e *NRT2.1*, são importantes para determinar a sua arquitetura, foi analisada a expressão desses genes, em conjunto com os genes *GSNOR1* e *NIA2*, inicialmente no genótipo Col-0, nos diferentes tratamentos. Os resultados obtidos por qRT-PCR foram expressos em relação ao tratamento com NH_4^+ .

Foram observadas diferenças significativas na expressão de *GSNOR1*, com menor expressão no tratamento com NO_3^- e aumento da expressão nos tratamentos com GSNO e GSH (**Fig. 14A**). A expressão do gene *GSNOR1* foi compatível com os teores de SNOs medidos em Col-0, sendo que os tratamentos com maior expressão do gene foram os que apresentaram menores teores de SNOs (**Fig. 13B**).

A expressão do gene *NIA2* foi significativamente maior na presença de NO_3^- (**Fig. 14B**). Já está bem estabelecido que tanto a NR como a NiR são induzidas por NO_3^- e reprimidas por NH_4^+ (Meyer & Stitt, 2000). Os resultados da **Figura 13C, D** mostram que os teores endógenos

de NO_3^- e NO_2^- foram maiores nas plantas cultivadas com NO_3^- em relação às aquelas em NH_4^+ , corroborando os dados de expressão gênica.

A expressão do gene *NPF6.3* foi inibida nos tratamentos com NO_3^- e NH_4^+ + GSNO e induzida no tratamento com NH_4^+ + GSH (**Fig. 14C**). O *NRT2.1* foi o gene que apresentou maior variação de expressão, sendo a expressão em meio contendo NO_3^- 15 vezes maior do que em NH_4^+ (**Fig. 14D**).

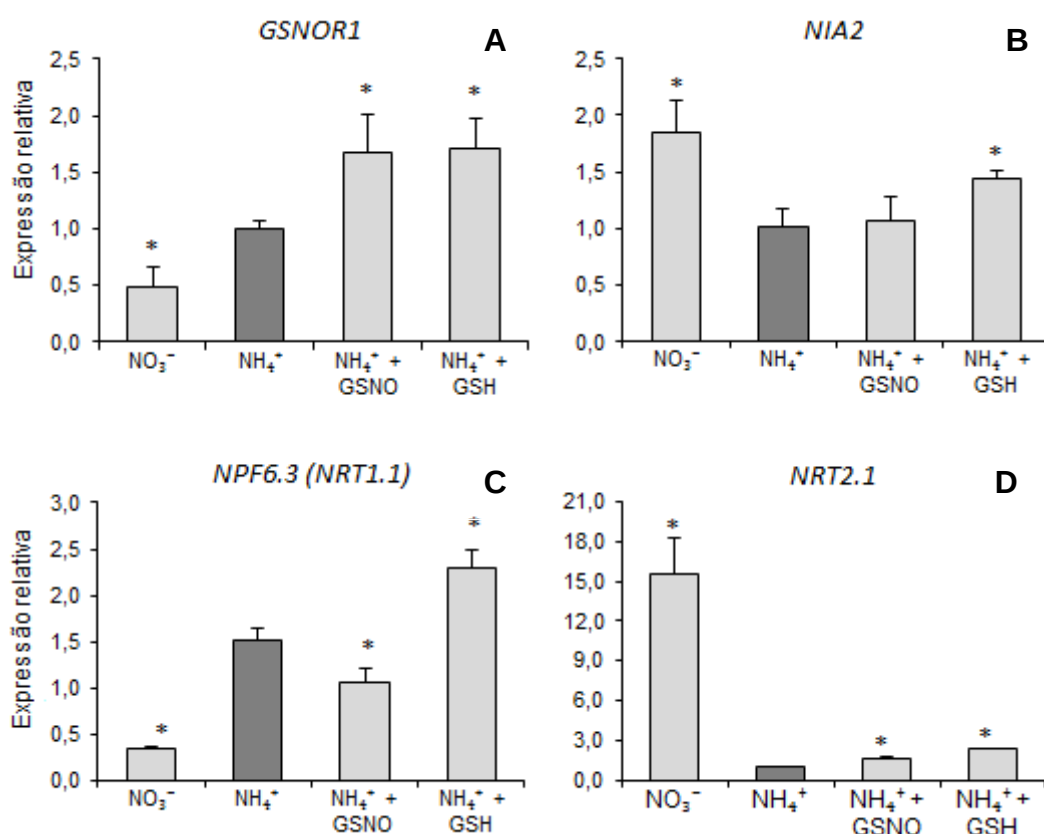


Figura 14 – Análise de expressão relativa dos genes *GSNOR1*, *NIA2*, *NPF6.3* e *NRT2.1*, em raízes de *Arabidopsis* do genótipo selvagem (Col-0) aos 14 dias de desenvolvimento em duas fontes de N (1 mM NO_3^- ou NH_4^+): efeito da adição de 0,25 mM de GSNO ou GSH. A expressão relativa foi calculada a partir da média de duas réplicas técnicas de três réplicas biológicas e normalizada contra o gene de referência SAND. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle, teste *t* ($P \leq 0,05$).

O NO_3^- é captado pelas raízes por um complexo sistema de transportadores, dentre os quais os mais estudados são o transportador de dupla afinidade *NPF6.3* e o transportador de alta afinidade *NRT2.1* (Tsay *et al.*, 2007). O perfil oposto de expressão desses dois genes, já bem documentado na literatura, foi observado em nossos resultados. Em comparação ao cultivo em

NH_4^+ , a expressão de *NPF6.3* diminuiu e a de *NRT2.1* aumentou no cultivo em NO_3^- . Existem evidências de que a repressão em feedback de *NRT2.1* por *NRT1.1* ocorra pois *NRT1.1* é um indutor de *LBD39*, um regulador negativo da expressão de *NRT2.1* (Bougouyon *et al.*, 2015). Análises adicionais de expressão de outros genes candidatos podem incluir *LBD39*, visando verificar se esse mecanismo de regulação é observado nas condições utilizadas nesse trabalho. *NRT2.1* é induzido por NO_3^- ou por ausência de N. Por fazer parte do sistema induzível de alta afinidade, a expressão do gene *NRT2.1* é fortemente induzida na primeira hora após a aplicação de um pulso de NO_3^- , atinge um pico máximo de expressão após três horas e diminui após seis horas de tratamento com 10 mM de NH_4NO_3 em raízes do genótipo Col-0 (Bougouyon *et al.*, 2015). No presente trabalho, mesmo após 14 dias de cultivo e consumo do NO_3^- do meio, a expressão de *NRT2.1* se mostrou induzida em relação ao meio contendo NH_4^+ . Alguns estudos já demonstraram que o NH_4^+ tem um efeito repressor na expressão de *NRT2.1* (Glass *et al.*, 2002; Hachiya & Sakakibara, 2016). Nossos dados mostram que a expressão foi fortemente reprimida em NH_4^+ em relação ao NO_3^- , sendo que a adição de GSNO ou GSH não reverteu esse perfil de inibição.

A análise de RNAseq realizada por Moro *et al.* (2017) mostrou que a adição de GSNO regulou positivamente *NRT1.1* e *ANR1* e negativamente *NRT2.1* e também os transportadores de NH_4^+ . Frungillo *et al.* (2014) observaram que a expressão de *NRT1.1* se manteve estável nos tratamentos com GSNO enquanto a expressão de *NRT2.1* foi reprimida nas mesmas condições. Vale ressaltar que as condições de cultivo nos dois estudos diferem das do presente estudo, pois em ambos as plantas não foram cultivadas em NH_4^+ como única fonte de N e sim em NH_4NO_3 , sendo que em Moro *et al.* (2017) as análises foram realizadas com o mutante *rhd6*. Futuramente será realizada a análise de genes relacionados ao transporte de NH_4^+ . Adicionalmente poderão ser incluídos genes relacionados à modificação da parede celular de acordo com os listados por Moro *et al.* (2017), tendo em vista que raízes crescidas em NH_4^+ desenvolvem paredes celulares

mais rígidas (Podgórska *et al.*, 2017) e que o NO atua nas alterações da parede celular em resposta a diferentes estresses (Xiong *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011).

4.9. Análise do perfil metabólico de metabólitos polares

A análise do perfil metabólico das raízes foi realizada no genótipo selvagem, Col-0, submetido aos diferentes tratamentos. É importante ressaltar que as alterações fenotípicas das raízes observadas após 7 dias de cultivo foram mantidas aos 14 dias (resultados não mostrados), quando as amostras para a realização do perfil metabólico foram coletadas.

De acordo com a análise do perfil metabólico foram identificados 34 compostos, com destaque para os aminoácidos (alanina, ácido gama-aminobutírico-GABA, leucina, norvalina e prolina); carboidratos (glicose, sacarose, trealose, manose e talose); açúcares álcoois (glicerol, manitol e mio-inositol); ácidos orgânicos (ácido glicérico, ácido benzoico, ácido oxálico, ácido láctico, ácido málico, ácido pirúvico e ácido succínico); ácidos graxos (ácido palmítico, ácido oleico e ácido esteárico) e outros compostos como aucubina e escopolina (**Fig. 15**).

O maior acúmulo de ácidos orgânicos foi observado em raízes crescidas com NO_3^- . O aumento dos ácidos pirúvico, cítrico, succínico, málico e glutárico indica que o crescimento das raízes no cultivo com NO_3^- ocorre por um processo essencialmente aeróbico. O crescimento e desenvolvimento de tecidos vegetativos, como as raízes, é um processo dinâmico e os metabólitos atingem um equilíbrio por meio de síntese e decomposição contínuas. Enquanto a fotossíntese gera um grande número de carboidratos, a respiração converte esses carboidratos em ácidos orgânicos e outros produtos intermediários através do ciclo do ácido cítrico. O ciclo do ácido cítrico está intimamente relacionado ao metabolismo de açúcares, proteínas, ácidos graxos e outros compostos (Zhang *et al.*, 2018). Assim, é possível que o NO_3^- tenha fornecido substrato ideal para o crescimento e manutenção do metabolismo de carbono nas folhas,

forneendo energia e esqueletos de carbono para as raízes via açúcares oriundos da glicólise e do metabolismo de carboidratos. Esse fato é confirmado pelos menores conteúdos de glicose e sacarose que certamente foram consumidos neste tratamento. Outro provável significado do acúmulo de ácidos orgânicos para o tratamento com NO_3^- é a participação destes no equilíbrio de cargas durante o metabolismo de ânions como o NO_3^- (Liu *et al.*, 2019).

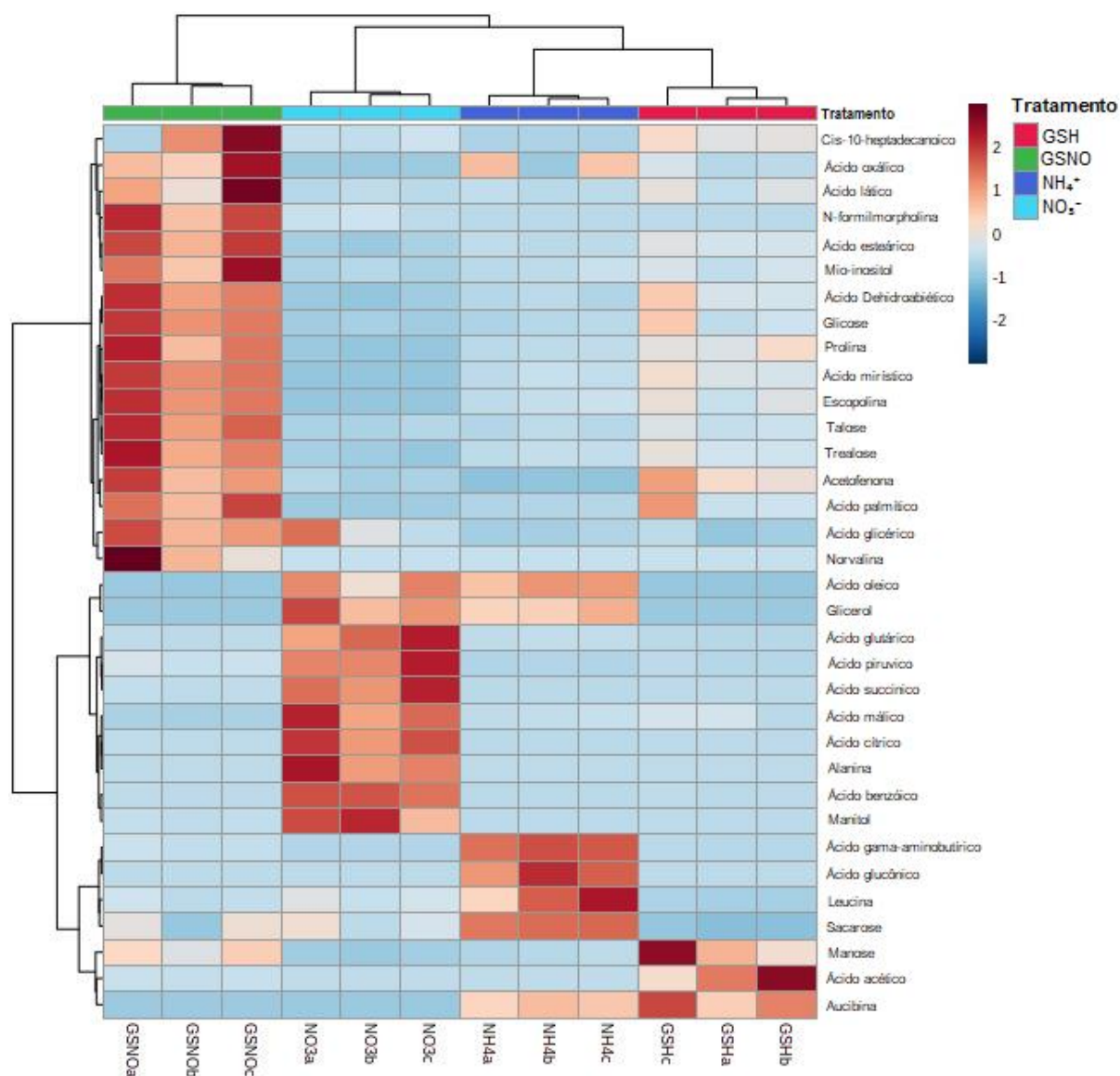


Figura 15 – Heatmap dos metabólitos polares detectados por CG-EM em raízes de *Arabidopsis* genótipo selvagem (Col-0) aos 14 dias de desenvolvimento em duas fontes de N (1 mM NO_3^- ou NH_4^+): efeito da adição de 0,25 mM de GSNO ou GSH. Os dados foram normalizados pela média.

Por outro lado, em raízes crescidas em NH_4^+ , foi observado incremento no conteúdo de sacarose e ácido glucônico (GA). Parte da sacarose acumulada pode ter sido convertida em glucose e esta rapidamente convertida em GA por reação de oxidação (Ramachandran *et al.*, 2006). Além disso, a maior quantidade de NH_4^+ disponível pode ter sido assimilada em aminoácidos, como indicado pelo aumento de GABA e leucina. O acúmulo de NH_4^+ é prejudicial ao crescimento das plantas, mas pode ser reduzido ou evitado pela rápida conversão deste em aminoácidos, favorecendo a assimilação de N (Liu *et al.*, 2019). Aumento na enzima glutamato descarboxilase (GAD), que converte glutamato em GABA foi observado em raízes de *Arabidopsis* cultivadas em NH_4^+ por 21 dias, em comparação com raízes crescidas em NO_3^- (Coletto *et al.*, 2019). O GABA desempenha um papel importante na regulação do pH e na coordenação do balanço C/N (Li *et al.*, 2018). Assim, o balanço C/N em raízes, associado à captação, transporte e armazenamento de NH_4^+ , parece essencial para manter o pH celular e a homeostase eletroquímica no crescimento de plantas cultivadas em NH_4^+ (Coletto *et al.*, 2019).

O tratamento com GSNO provocou alterações expressivas no teor de metabólitos de diferentes classes quando comparado aos demais tratamentos. Dentre os aminoácidos houve incremento de prolina e norvalina, enquanto glucose, trealose, talose e mio-inositol foram os açúcares detectados em maior quantidade. Foi observado aumento no teor de alguns ácidos orgânicos (ácidos láctico, oxálico, glicérico e dehidroabiético), bem como dos ácidos graxos (ácidos mirístico, heptadecenóico, esteárico e palmítico). Também foi possível observar para o tratamento com GSNO aumento significativo de outros compostos, como acetofenona, morfolina e escopolina. A adição de GSNO ao meio sugere mudanças metabólicas direcionadas a minimizar o estresse, que pode ter resultado em maior desenvolvimento das raízes quando comparado ao tratamento com NH_4^+ . O NH_4^+ causa despolarização transitória da membrana plasmática, alcalinização do citosol, fosforilação de proteínas citosólicas sinalizadoras e de enzimas envolvidas na síntese de aminoácidos e no metabolismo secundário (Liu & von Wirén, 2017). O aumento de escopolina, um metabólito secundário relacionado a síntese de cumarinas

e de grande ocorrência em raízes de *Arabidopsis*, está relacionado a defesa a estresses bióticos e abióticos (Ahn *et al.*, 2010). O aumento de açúcares como glicose, trealose e mio-inositol, bem como dos aminoácidos prolina e norvalina neste estudo pode estar associado ao balanço C/N. Uma das consequências da assimilação de NH_4^+ , é o alto consumo de energia e carbono. Nesta linha, estudos anteriores relatam que os efeitos do acúmulo de NH_4^+ nas raízes podem ser parcialmente mitigados pelo fornecimento de carbono adicional (Ariz *et al.*, 2011; Vega-Mas *et al.*, 2015). Esse carbono adicional serviria à assimilação de N, mas também equilibraria os íons celulares, as taxas respiratórias e a disponibilidade de ATP (Coletto *et al.*, 2019).

O tratamento com GSH foi o que provocou as menores alterações no perfil metabólico. Destaca-se o aumento do conteúdo de manose, provavelmente oriundo da conversão da sacarose, e que pode ter influenciado o crescimento radicular. O efeito inibitório da manose no crescimento radicular foi relatado anteriormente para *Arabidopsis* (Lukowitz *et al.*, 2001; Barth *et al.*, 2010). Barth *et al.* (2010) demonstraram que o fenótipo de inibição radicular do mutante *vtc-1*, deficiente na conversão de D- manose-1P em GDP-D manose se deve, em parte, a uma hipersensibilidade ao NH_4^+ , sugerindo uma relação direta entre o teor endógeno de manose e o status nutricional do meio de cultivo.

Por fim, a expressiva alteração no perfil metabólico provocada pelo tratamento com GSNO confirma o importante papel do NO no metabolismo e desenvolvimento vegetal. Realmente, a PCA indicou clara separação entre a composição do perfil de metabólitos e os tratamentos com diferentes fontes de N (Anexo 3). Ficou claro que o eixo PC1 desempenhou um papel significativo na discriminação entre a participação dos compostos no desenvolvimento das raízes de *Arabidopsis* crescidas em NH_4^+ + GSNO explicando 72% da variabilidade total. O eixo PC2 teve uma capacidade comparativamente forte de agrupar os demais tratamentos contribuindo com 22.7% da variabilidade dos dados, indicando que o perfil metabólico das raízes crescidas em NO_3^- , NH_4^+ e NH_4^+ + GSH foram mais semelhantes.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os processos de transporte e assimilação de N envolvem uma série de etapas distintas com a participação de inúmeros genes e proteínas, além de interagir com a cascata de sinalização hormonal, o que torna bastante complexo o entendimento desses processos na regulação tanto do metabolismo quanto do desenvolvimento vegetal. Por essa razão, no presente trabalho foi escolhida a espécie modelo *Arabidopsis*, para a qual mutantes do metabolismo de N e NO estão disponíveis e cujo genoma já foi previamente sequenciado, visando avançar no entendimento da interação NO/fontes nitrogenadas na determinação da arquitetura radicular. No entanto, apesar destas e outras características desejáveis, como ciclo de vida curto e grande disponibilidade de sementes, *Arabidopsis* também apresenta algumas desvantagens, como seu tamanho diminuto, que dificulta a obtenção de material vegetal para múltiplas análises bioquímicas e moleculares.

Com as estratégias experimentais aqui adotadas, conseguimos responder algumas das questões que nortearam o desenvolvimento desse trabalho, sendo que experimentos adicionais são necessários para avançar no entendimento da interação NO/fontes nitrogenadas no desenvolvimento radicular.

- 1) Diferentes fontes de N modulam diferencialmente o desenvolvimento radicular em genótipos de *Arabidopsis* com alto e baixo teor endógeno de NO?

Nas condições de cultivo utilizadas no presente trabalho, não foram observadas diferenças fenotípicas e metabólicas significativas entre os mutantes *gsnor*⁺ e *gsnor*⁻, sugerindo que as alterações de arquitetura radicular não sejam dependentes do teor endógeno de NO ou que, de alguma forma, as diferenças metabólicas observadas não tenham se refletido no fenótipo radicular, mas em algum outro processo fisiológico que não foi investigado, como por exemplo desenvolvimento foliar, fotossíntese, floração, entre outros.

- 2) As alterações na arquitetura radicular induzidas por NO₃⁻ estariam relacionadas à produção de NO?

O fato da adição de GSNO ter revertido parcialmente o perfil de inibição de crescimento observado em plantas tratadas com NH_4^+ , sugere que a determinação da arquitetura radicular em NO_3^- tem participação da sinalização por NO. Da mesma forma, o sequestro de NO por cPTIO em meio contendo NO_3^- resultou em um fenótipo intermediário entre o observado em NO_3^- e NH_4^+ , reforçando o papel do NO nesse processo. Diferentes hormônios estão envolvidos no desenvolvimento radicular e deve haver uma sobreposição entre a sinalização por NO derivado do NO_3^- e a sinalização hormonal no controle do desenvolvimento radicular, como sugerido por alguns autores. Experimentos adicionais de dosagem do teor endógeno de auxinas, citocininas e giberelinas, assim como o uso de inibidores do transporte de auxina, poderiam contribuir para o entendimento do *cross-talk* entre as vias de sinalização hormonal e de NO em diferentes fontes nitrogenadas.

- 3) Plantas tratadas com NO_3^- tem maior teor de NO e/ou SNOs em comparação às plantas tratadas com NH_4^+ ?

Os teores de SNOs foram similares em raízes de plantas cultivadas em NO_3^- ou NH_4^+ . Já foi demonstrado que o NO, como um dos produtos finais do metabolismo de nitrogênio, pode regular negativamente a atividade da enzima GSNO_r, levando a um acúmulo de GSNO. Ainda não se sabe se o NH_4^+ , como produto da atividade GSNO_r, teria a mesma capacidade de regular os níveis de GSNO. Nossos dados mostraram uma tendência de inibição da atividade de GSNO_r em NH_4^+ , embora os níveis de transcrito dessa enzima tenham sido um pouco mais elevados nessa fonte nitrogenada. Métodos mais precisos de estimativa do teor de nitrosotióis devem ser empregados para confirmar os resultados obtidos por colorimetria. Adicionalmente, seria interessante correlacionar os teores de nitrosotióis nas diferentes fontes de N ao perfil de proteínas nitrosiladas por meio da técnica de nitrosoproteoma, visando identificar proteínas S-nitrosiladas que possam estar relacionadas às alterações de arquitetura radicular.

- 4) A capacidade de recuperação fenotípica estaria relacionada à expressão de genes do transporte e assimilação de N e do metabolismo de NO?

Os genes analisados apresentaram perfil distinto de expressão em NH_4^+ e NO_3^- . No entanto, a adição de GSNO ao NH_4^+ não reverteu o perfil de expressão desses genes para níveis próximos aos observados em NO_3^- . O tempo de cultivo de 14 dias com consequente diminuição do NO_3^- disponível no meio, assim como o uso de doador de NO de liberação rápida podem ter contribuído para os perfis de expressão observados. Experimentos com aplicação de pulsos de NH_4^+ e NO_3^- e avaliação da expressão em tempos mais curtos, além do uso de nanopartículas doadoras de NO com liberação lenta podem trazer informações adicionais sobre os perfis de expressão desses genes. Além disso, outros genes candidatos devem ser avaliados, como os transportadores de NH_4^+ e ANR1, fator de transcrição envolvido no controle da arquitetura radicular em cultivo com NO_3^- .

- 5) A recuperação fenotípica estaria relacionada a ajustes no perfil metabólico? Caso sim, plantas cujo fenótipo de arquitetura radicular tenha sido recuperado por tratamento com NO teriam perfil metabólico similar ao de plantas tratadas com NO_3^- ?

Perfis metabólicos distintos foram observados nas diferentes fontes nitrogenadas e com a adição de GSNO e GSH. No entanto, os perfis das raízes tratadas com NO_3^- e com NH_4^+ + GSNO não foram similares, descartando uma reversão do perfil metabólico associada à reversão fenotípica parcial observada nesse tratamento. Por outro lado, os ajustes metabólicos observados sugerem que a adição de GSNO minimizou o “estresse” do cultivo em NH_4^+ , contribuindo positivamente para o desenvolvimento radicular. Análises adicionais do conteúdo de GSH e GSSG e de outros metabólitos e enzimas do sistema antioxidante podem ajudar a explicar quais mecanismos foram favorecidos com a adição de GSNO ao cultivo com NH_4^+ , contribuindo para reverter parcialmente o fenótipo de inibição radicular.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Achkor, H., Díaz, M., Fernández, M.R., Biosca, J.A., Parés, X. & Martínez, M.C., 2003. Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132: 2248–2255.
- Ahn, Y.O., Shimizu, B.I., Sakata, K., Gantulga, D., Zhou, Z., Bevan, D.R., & Esen, A. 2010. Scopolin-hydrolyzing β -glucosidases in roots of *Arabidopsis*. *Plant and cell physiology* 51: 132-143.
- Arenas-Alfonseca, L., Gotor, C., Romero, L.C., & García, I. 2018. β -Cyanoalanine synthase action in root hair elongation is exerted at early steps of the root hair elongation pathway and is independent of direct cyanide inactivation of NADPH oxidase. *Plant and Cell Physiology* 59: 1072-1083.
- Ariz, I., Asensio, A.C., Zamarreño, A.M., García-Mina, J.M., Aparicio-Tejo, P.M., & Moran, J.F. 2013. Changes in the C/N balance caused by increasing external ammonium concentrations are driven by carbon and energy availabilities during ammonium nutrition in pea plants: the key roles of asparagine synthetase and anaplerotic enzymes. *Physiologia Plantarum* 148: 522-537.
- Astier, J., & Lindermayr, C. 2012. Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update. *International journal of molecular sciences* 13: 15193-15208.
- Bedioui, F., Ismail, A., & Griveau, S. 2018. Electrochemical detection of nitric oxide and S-nitrosothiols in biological systems: Past, present & future. *Current Opinion in Electrochemistry* 12: 42-50.
- Barth, C., Gouzd, Z.A., Steele, H.P., & Imperio, R.M. 2010. A mutation in GDP-mannose pyrophosphorylase causes conditional hypersensitivity to ammonium, resulting in *Arabidopsis* root growth inhibition, altered ammonium metabolism, and hormone homeostasis. *Journal of experimental botany* 61: 379-394.
- Barker, A.V. & Corey, K.A. 1991. Interrelations of ammonium toxicity and ethylene action in tomato. *HortScience* 26: 177-180.
- Barker, A.V., 1999. Ammonium accumulation and ethylene evolution by tomato infected with root-knot nematode and grown under different regimes of plant nutrition. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 30: 175-182.
- Begara-Morales, J.C., Chaki, M., Valderrama, R., Sánchez-Calvo, B., Mata-Pérez, C., Padilla, M.N., Corpas, F.J. & Barroso, J.B. 2018. Nitric oxide buffering and conditional nitric oxide release in stress response. *Journal of Experimental Botany* 69: 3425-3438.
- Begara-Morales, J.C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Valderrama, R., Mata-Pérez, C., Padilla, M. N., Corpas, F.J & Barroso, J.B. 2016. Antioxidant systems are regulated by nitric oxide-mediated post-translational modifications (NO-PTMs). *Frontiers in plant science* 7: 152.
- Bethke, P.C., Badger, M.R., & Jones, R.L. 2004. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *The Plant Cell* 16: 332-341.
- Bittsánszky, A., Pilinszky, K., Gyulai, G., & Komives, T. 2015. Overcoming ammonium toxicity. *Plant Science* 231: 184-190.

- Bouguyon, E., Brun, F., Meynard, D., Kubeš, M., Pervent, M., Leran, S., Lacombe, B., Krouk, G., Guiderdoni, E., Zažímalová, E., Hoyerová, K., Nacry, P. & Hoyerová, K. 2015. Multiple mechanisms of nitrate sensing by *Arabidopsis* nitrate transceptor NRT1. 1. *Nature Plants* 1: 1-8.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem* 72: 248-254.
- Bredemeier, C. & Mundstock, C.M. 2000. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. *Ciência Rural* 30: 365-372.
- Britto, D.T. & Kronzucker, H.J. 2002. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology* 159: 567–584.
- Britto, D.T. & Kronzucker, H.J. 2013. Ecological significance and complexity of N-source preference in plants. *Annals of botany* 112: 957-963.
- Cameron, K.C., Di, H.J., & Moir, J.L. 2013. Nitrogen losses from the soil/plant system: a review. *Annals of Applied Biology* 162: 145-173.
- Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E., Youngs, V.L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissues by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6: 71-80.
- Chamizo-Ampudia, A., Sanz-Luque, E., Llamas, Á., Galván, A., Fernández, E. 2017. Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis. *Trends in Plant Science* 22: 163–174.
- Coleto, I., Vega-Mas, I., Glauser, G., González-Moro, M.B., Marino, D., & Ariz, I. 2019. New Insights on *Arabidopsis thaliana* root adaption to ammonium nutrition by the use of a quantitative proteomic approach. *International journal of molecular sciences* 20: 814.
- Corpas, F.J.; Barroso, J.B. 2013. Nitro-oxidative stress vs oxidative or nitrosative stress in 8 higher plants. *New Phytologist* 199: 633-635.
- Corpas, F.J., & Barroso, J.B. 2014. Functional implications of peroxisomal nitric oxide (NO) in plants. *Frontiers in plant science* 5: 97.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M. & Lamattina, L., 2004. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* 218: 900-905.
- Crawford, N.M., & Arst Jr, H.N. 1993. The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. *Annual review of genetics* 27: 115-146.
- D'Alessandro S., Posocco B., Costa A., Zahariou G., Schiavo F.L., Carbonera D. & Zottini M. 2013. Limits in the use of cPTIO as nitric oxide scavenger and EPR probe in plant cells and seedlings. *Frontiers in Plant Science* 4: 340.
- Daniel-Vedele, F., Krapp, A., & Kaiser, W. M. 2010. Cellular biology of nitrogen metabolism and signaling. In: R. Hell and R.-R. Mendel (eds.), *Cell Biology of Metals and Nutrients* 145-171.

- Dechorgnat, J., Nguyen, C.T., Armengaud, P., Jossier, M., Diatloff, E., Filleur, S. & Daniel-Vedele, F. 2011. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *Journal of Experimental Botany* 62: 1349-1359.
- del Río, L.A., Corpas, F.J., & Barroso, J.B. 2004. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* 65: 783-792.
- Diaz, C., Saliba-Colombani, V., Loudet, O., Belluomo, P., Moreau, L., Daniel-Vedele, F., Morot-Gaudry, J.F. & Masclaux-Daubresse, C. 2006. Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 47: 74-83.
- Dinakar, C. & Bartels, D. 2013. Disiccation tolerance in resurrection plants: new insights from transcriptome, proteome, and metabolome analysis. *Frontiers in Plant Science* 4: 1-14
- Espunya, M.C.; Díaz, M.; Moreno-Romero, J.; Martínez, M.C. 2006. Modification of intracellular levels of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase alters glutathione homeostasis and root development. *Plant Cell Environ.* 2006: 1002–1011.
- Esteban, R., Ariz, I., Cruz, C., & Moran, J.F. 2016. Mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. *Plant Science* 248: 92-101.
- Fageria, N.K. (Ed.). 2009. The use of nutrients in crops plants. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Fares, A., Rossignol, M., and Peltier, J.B. 2011. Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 416: 331–336.
- Fan, X., Naz, M., Fan, X., Xuan, W., Miller, A.J. & Xu, X. 2017. Plant nitrate transporters: From gene function to application. *Journal of Experimental Botany* 68: 2463–2475.
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B.W., Wang, Y., Pallas, J.A. & Loake, G.J. 2005. A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 8054-8059.
- Freschi, L. 2013. Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Frontiers in Plant Science* 4: 398.
- Friebe, A. & Koesling, D. 2009. The function of NO-sensitive guanylyl cyclase: what we can learn from genetic mouse models. *Nitric Oxide* 21: 149-156.
- Frungillo, L., de Oliveira, J.F.P., Saviani, E.E., Oliveira, H.C., Martínez, M.C., & Salgado, I. 2013. Modulation of mitochondrial activity by S-nitrosoglutathione reductase in *Arabidopsis thaliana* transgenic cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1827: 239-247.
- Frungillo, L., Skelly, M. J., Loake, G.J., Spoel, S.H. & Salgado, I. 2014. S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nature Communication* 5: 1-10.
- Frungillo, L., Spoel, S. H. & Salgado, I. 2016. Control of Nitrogen Assimilation in Plants through S-nitrosothiols. In D. Wendehenne (Ed.), *Nitric Oxide and Signaling in Plants*, pp. 55–78.

- García-Mata, C. & Lamattina, L. 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology* 126: 1196-1204.
- Gazzarrini, S., Lejay, L., Gojon, A., Ninnemann, O., Frommer, W.B. & von Wiren, N. 1999. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into arabidopsis roots. *Plant Cell* 11: 937–947.
- Giehl, R.F. & von Wirén, N. 2014. Root nutrient foraging. *Plant Physiology* 166: 509-517.
- Glass, A.D., Britto, D. T., Kaiser, B.N., Kinghorn, J.R., Kronzucker, H.J., Kumar, A., Okamoto, M., Rawat, S., Siddiqi, M.Y., Unkles, S.E. & Vidmar, J.J. 2002. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 855-864.
- Gotte, G., Amelio, E., Russo, S., Marlinghaus, E., Musci, G. & Suzuki, H. 2002. Short-time non-enzymatic nitric oxide synthesis from L-arginine and hydrogen peroxide induced by shock waves treatment. *FEBS Letters* 520: 153–5.
- Gouvêa, C.M.C.P; Souza, J.F.; Magalhães, A.C. N. & Martins, I.S. 1997. NO.-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation* 21: 183-187.
- Gupta, K.J., Fernie, A.R., Kaiser, W.M. & Van Dongen, J.T. 2011. On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science* 16: 160-168.
- Kapuganti, J.G., Kolbert, Z., Durner, J., Lindermayr, C., Corpas, F.J., Brouquisse, R., Barroso, J.B., Umbreen, S., Palma, J.M., Hancock, J.T. & Petrivalsky, M., 2020. Regulating the regulator: nitric oxide control of post-translational modifications. *New Phytologist* 227: 1319-1325.
- Hachiya, T. & Sakakibara, H. 2016. Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants. *Journal of Experimental Botany* 68: 2501-2512.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. 1950. The water culture method of growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station, Bulletin* 347.
- Hogg, N., Zielonka, J., & Kalyanaraman, B. 2017. Detection of Nitric Oxide and Peroxynitrite in Biological Systems: A State-of-the-Art Review. In *Nitric Oxide* 23-44. Academic Press.
- Hu, J., Huang, X., Chen, L., Sun, X., Lu, C., Zhang, L., Wang, Y. & Zuo, J. 2015. Site-specific nitrosoproteomic identification of endogenously S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology* 167: 1731-1746.
- Hu, T.M., & Ho, S.C. 2011. Similarity and dissimilarity of thiols as anti-nitrosative agents in the nitric oxide–superoxide system. *Biochemical and biophysical research communications* 404: 785-789.
- Imran, Q.M., Hussain, A., Lee, S.U., Mun, B.G., Falak, N., Loake, G.J., & Yun, B.W. 2018. Transcriptome profile of NO-induced Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative regulatory role in multiple biological processes. *Scientific reports* 8: 1-14.
- Jain, P. & Bhatla, S.C. 2018. Molecular mechanisms accompanying nitric oxide signalling through tyrosine nitration and S-nitrosylation of proteins in plants. *Functional Plant Biology* 45: 70-82.

- Jeandroz, S., Wipf, D., Stuehr, D.J., Lamattina, L., Melkonian, M., Tian, Z., Zhu, Y., Carpenter, E.J., Won, G.K. & Wendehenne, D. 2016. Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Sci. Signal.* 9: re2.
- Kant, S., Bi, Y.M. & Rothstein, S.J. 2011. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany* 62: 1499-1509.
- Kato, H., Takemoto, D., & Kawakita, K. 2013. Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in potato plant. *Physiologia Plantarum* 148: 371-386.
- Khajuria, A., Bali, S., Sharma, P., Kaur, R., Jasrotia, S., Saini, Ohril, P. & Bhardwaj, R. 2019. S-Nitrosoglutathione (GSNO) and Plant Stress Responses. *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms* 627-644.
- Kiba, T., & Krapp, A. 2016. Plant nitrogen acquisition under low availability: regulation of uptake and root architecture. *Plant and Cell Physiology* 57: 707-714.
- Krapp, A. 2015. Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Current opinion in plant biology* 25: 115-122.
- Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., Zazimalova, E., Benkova, E., Nacry, P. & Gojon, A. 2010a. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental Cell* 18: 927-937.
- Krouk, G., Mirowski, P., LeCun, Y., Shasha, D.E. & Coruzzi, G.M. 2010b. Predictive network modeling of the high-resolution dynamic plant transcriptome in response to nitrate. *Genome Biol.* 11: 123.
- Léran, S., Varala, K., Boyer, J.C., Chiurazzi, M., Crawford, N., Daniel-Vedele, F., David, L., Dickstein R., Fernandez, E., Forde, B. & Gassmann, W. 2014. A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends in Plant Science* 19: 5–9.
- Lee, U., Wie, C., Fernandez, B.O., Feelisch, M., Vierling, E. 2008. Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 786-802.
- Laghari, S.J., Wahocho, N.A., Laghari, G.M., HafeezLaghari, A., MustafaBhabhan, G., HussainTalpur, K., Bhutto, T.A., Wahocho, S.A. & Lashari, A.A. 2016. Role of nitrogen for plant growth and development: a review. *Adv. Environ. Biol.* 10: 209-219.
- León, J., & Costa-Broseta, Á. 2019. Present knowledge and controversies, deficiencies, and misconceptions on nitric oxide synthesis, sensing, and signaling in plants. *Plant, cell & environment* 43: 1-15.
- León, J., Costa, Á. & Castillo, M.C., 2016. Nitric oxide triggers a transient metabolic reprogramming in *Arabidopsis*. *Scientific Reports* 6: 37945. Li, B., Li, Q., Su, Y., Chen, H., Xiong, L., Mi, G. et al. 2011. Shoot supplied ammonium targets the root auxin in flux carrier AUX1 and inhibits lateral root emergence in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* 34: 933–946.

- Li, H., Hu, B. & Chu, C., 2017. Nitrogen use efficiency in crops: lessons from *Arabidopsis* and rice. *Journal of Experimental Botany* 68: 2477-2488.
- Li, J., Tian, Z., Wu, X., Lv, G., Ma, W., Zhang, Y., & Gao, H. 2018. Gamma-aminobutyric acid (GABA) modulates nitrate concentrations and metabolism in the leaves of Pakchoi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino) treated with a nitrogen-rich solution. *Plant Molecular Biology Reporter* 36: 530-542.
- Li, Q., Li, B.-H., Kronzucker, H.J. & Shi, W.-M. 2010. Root growth inhibition by NH_4^+ in *Arabidopsis* is mediated by the root tip and is linked to NH_4^+ efflux and GMPase activity. *Plant, Cell & Environment* 33: 1529–1542.
- Lima, J.E., Kojima, S., Takahashi, H., & von Wirén, N. 2010. Ammonium triggers lateral root branching in *Arabidopsis* in an AMMONIUM TRANSPORTER1; 3-dependent manner. *The Plant Cell* 22: 3621-3633.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., & Fernie, A. R. 2006. Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature protocols* 1: 387.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., & Durner, J. 2005. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 137: 921-930.
- Linkohr, B.I., Williamson, L.C., Fitter, A.H., & Leyser, H.O. 2002. Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 29: 751-760.
- Liu, Y., & von Wirén, N. 2017. Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *Journal of Experimental Botany* 68: 2581-2592.
- Liu, F. & Guo, F.Q. 2013. Nitric oxide deficiency accelerates chlorophyll breakdown and stability loss of thylakoid membranes during dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *PLoS One* 8: e56345.
- Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M. & Que, L. 2001. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* 410: 490.
- Liu, X., Wang, K., Zhang, J., Wang, J., Wu, J., & Peng, F. 2019. Ammonium removal potential and its conversion pathways by free and immobilized *Scenedesmus obliquus* from wastewater. *Bioresource technology* 283: 184-190.
- Liu, Y., Lai, N., Gao, K., Chen, F., Yuan, L. & Mi, G., 2013. Ammonium inhibits primary root growth by reducing the length of meristem and elongation zone and decreasing elemental expansion rate in the root apex in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 8.
- Liu, Y., Li, M., Xu, J., Liu, X., Wang, S., & Shi, L. 2019. Physiological and metabolomics analyses of young and old leaves from wild and cultivated soybean seedlings under low-nitrogen conditions. *BMC plant biology* 19: 389.
- Loqué, D., Ludewig, U., Yuan, L., & von Wirén, N. 2005. Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2; 1 and AtTIP2; 3 facilitate NH_3 transport into the vacuole. *Plant physiology*, 137: 671-680.
- Loqué D, Yuan L, Kojima S, Gojon A, Wirth J, Gazzarrini S, Ishiyama K, Takahashi H & Von Wirén N. 2006. Additive contribution of AMT1; 1 and AMT1; 3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal* 48: 522-

534. Lombardo, M.C. & Lamattina, L. 2012. Nitric oxide is essential for vesicle formation and trafficking in *Arabidopsis* root hair growth. *Journal of Experimental Botany* 63: 4875-4885.
- Lombardo, M.C., Graziano, M., Polacco, J.C. & Lamattina, L., 2006. Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signaling & Behavior* 1: 28-33.
- Lozano-Juste, J., Colom-Moreno, R., León, J. 2011. In vivo protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 62: 3501-3517.
- Lukowitz, W., Nickle, T.C., Meinke, D.W., Last, R.L., Conklin, P.L., & Somerville, C.R. 2001. *Arabidopsis* *cyt1* mutants are deficient in a mannose-1-phosphate guanylyltransferase and point to a requirement of N-linked glycosylation for cellulose biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 2262-2267.
- Meyer, C. & Stitt, M. 2000. Nitrate reduction and signalling. In: Lea, P.J. & Morot-Gaudry, J.-F., eds. *Plant nitrogen*. Berlin, Germany: INRA Editions – Springer Verlag, 37–59.
- Mioto, P.T., Rodríguez-Ruiz, M., Mot, A.C., Zuccarelli, R., Corpas, F.J., Freschi, L., & Mercier, H. 2017. Alternative fluorimetric-based method to detect and compare total S-nitrosothiols in plants. *Nitric Oxide* 68: 7-13.
- Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M., Magalhaes, J.R. & Salgado, I. 2005. Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. *FEBS Letters* 579: 3814-3820.
- Montilla-Bascón, G., Rubiales, D., Hebelstrup, K.H., Mandon, J., Harren, F.J.M., Cristescu, S. M., Mur, L.A.J. & Prats, E. 2017. Reduced nitric oxide levels during drought stress promote drought tolerance in barley and is associated with elevated polyamine biosynthesis. *Scientific reports* 7: 1-15.
- Moro, C.F., Gaspar, M., da Silva, F.R., Pattathil, S., Hahn, M.G., Salgado, I., & Braga, M.R. 2017. S-nitrosoglutathione promotes cell wall remodelling, alters the transcriptional profile and induces root hair formation in the hairless root hair defective 6 (*rhd6*) mutant of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 213: 1771-1786.
- Morot Gaudry-Talarmain, Y., Rockel, P., Moureaux, T., Quilleré, I., Leydecker, M., Kaiser, W. & Morot-Gaudry, J. 2002. Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signaling in nitrite reductase antisense tobacco. *Planta* 215: 708–715.
- Murashige, T., & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15: 473-497.
- Noguero, M., & Lacombe, B. 2016. Transporters involved in root nitrate uptake and sensing by *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science* 7: 1391.
- Pagnussat, G.C., Simontacchi, M., Puntarulo, S. & Lamattina, L., 2002. Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology* 129: 954-956.
- Péret, B., de Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplaze, L. et al. 2009. *Arabidopsis* lateral root development: na emerging story. *Trends in Plant Science* 14: 399–408.

- Pelsy, F., & Caboche, M. 1992. Molecular genetics of nitrate reductase in higher plants. In *Advances in genetics* (30: 1-40). Academic Press.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Res.* 29: 45.
- Podgórska, A., Burian, M., Gieczewska, K., Ostaszewska-Bugajska, M., Zebrowski, J., Solecka, D., & Szal, B. 2017. Altered cell wall plasticity can restrict plant growth under ammonium nutrition. *Frontiers in plant science* 8: 1344.
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., & Larroche, C. 2006. Gluconic acid: Properties, applications and microbial production. *Food Technology & Biotechnology* 44.
- Radi, R. 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 4003–4008.
- Radi, R. 2013. Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc. Chem. Res.* 46: 550–559.
- Raven, P.H., Evert, R.F. & Eichhorn, S.E. 2007. *Biologia Vegetal*. 7^a. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.
- Reddy, M.M., & Ulaganathan, K. 2015. Nitrogen nutrition, its regulation and biotechnological approaches to improve crop productivity. *American Journal of Plant Sciences* 6: 2745.
- Romero-Puertas, M.C., Rodríguez-Serrano, M., & Sandalio, L.M. 2013. Protein S-nitrosylation in plants under abiotic stress: an overview. *Frontiers in Plant Science* 4: 373.
- Rustérucci, C., Espunya, M.C., Díaz, M., Chabannes, M., & Martínez, M.C. 2007. S-nitrosogluthathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiology* 143: 1282-1292.
- Salgado, I., Oliveira, H.C., & Gaspar, M. 2017. Plant nitric oxide signaling under environmental stresses. *Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress* 1: 345-370.
- Sanz, L., Albertos, P., Mateos, I., Sánchez-Vicente, I., Lechón, T., Fernández-Marcos, M., & Lorenzo, O. 2015. Nitric oxide (NO) and phytohormones crosstalk during early plant development. *Journal of Experimental Botany* 66: 2857-2868.
- Saville, B. 1958. A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* 83: 670-672.
- Schofield, R.A., Bi, Y.M., Kant, S., & Rothstein, S.J. 2009. Over-expression of STP13, a hexose transporter, improves plant growth and nitrogen use in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant, Cell & Environment* 32: 271-285.
- Seligman, K., Saviani, E. E., Oliveira, H. C., Pinto-Maglio, C. A., Salgado, I. 2008. Floral transition and nitric oxide emission during flower development in *Arabidopsis thaliana* is affected in nitrate reductase-deficient plants. *Plant Cell Physiol.* 49: 1112-112.
- Shi, Y.F., Wang, D.L., Wang, C., Culler, A.H., Kreiser, M.A., Suresh, J., Cohen, J.D., Pan, J., Baker, B. & Liu, J.Z. 2015. Loss of GSNOR1 function leads to compromised auxin signaling and polar auxin transport. *Molecular plant* 8: 1350-1365.

- Signora, L., De Smet, I., Foyer, C.H., & Zhang, H. 2001. ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 28: 655-662.
- Silveira N.M., Marcos F.C.C, Frungillo L., Moura B.B., Seabra A.B., Salgado I., Machado E.C., Hancock J.T. & Ribeiro R.V. 2017. S-nitrosoglutathione spraying improves stomatal conductance, Rubisco activity and antioxidant defense in both leaves and roots of sugarcane plants under water deficit. *Physiologia Plantarum* 160: 383–395.
- Stein, L.Y., & Klotz, M.G. 2016. The nitrogen cycle. *Current Biology*, 26: 94-98.
- Strock, J.S., 2008. Ammonification. In *Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set* (pp. 162-165). Elsevier Inc..
- Sun, H., Feng, F., Liu, J. & Zhao, Q. 2018. Nitric oxide affects rice root growth by regulating auxin transport under nitrate supply. *Frontiers in plant science* 9: 659.
- Tailor, A., Tandon, R., & Bhatla, S.C. 2019. Nitric oxide modulates polyamine homeostasis in sunflower seedling cotyledons under salt stress. *Plant signaling & behavior* 14: 1667730.
- Tegeder, M. & Masclaux D. 2018. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. *New Phytologist* 1: 35-53.
- Terrile, M.C., París, R., Calderón-Villalobos, L.I., Iglesias, M.J., Lamattina, L., Estelle, M., & Casalagué, C.A. 2012. Nitric oxide influences auxin signaling through S-nitrosylation of the *Arabidopsis* TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 auxin receptor. *The Plant Journal* 70: 492-500.
- Tossi, V., Amenta, M., Lamattina, L. & Cassia, R. 2011. Nitric oxide enhances plant ultraviolet-B protection up-regulating gene expression of the phenylpropanoid biosynthetic pathway. *Plant, Cell & Environment* 34: 909-921.
- Tsay, Y.F., Chiu, C.C., Tsai, C.B., Ho, C.H. & Hsu, P.K. 2007. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters* 581: 2290-2300.
- Vega-Mas, I., Marino, D., Sanchez-Zabala, J., Gonzalez-Murua, C., Estavillo, J.M., & González-Moro, M.B. 2015. CO₂ enrichment modulates ammonium nutrition in tomato adjusting carbon and nitrogen metabolism to stomatal conductance. *Plant Science* 241: 32-44.
- Vidal, E.A., Moyano, T.C., Canales, J. & Gutiérrez, R.A., 2014. Nitrogen control of developmental phase transitions in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany* 65: 5611-5618.
- Wang, C., Zhang, S. H., Li, W., Wang, P.F., & Li, L. 2011. Nitric oxide supplementation alleviates ammonium toxicity in the submerged macrophyte *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle. *Ecotoxicology and environmental safety* 74: 67-73.
- Wilkinson, J.Q., Crawford, N.M. 1991. Identification of the *Arabidopsis* CHL3 gene as the nitrate reductase structural gene *Nia2*. *Plant Cell* 3: 461–471.
- Xiong, J., An, L., Lu, H., & Zhu, C. 2009. Exogenous nitric oxide enhances cadmium tolerance of rice by increasing pectin and hemicellulose contents in root cell wall. *Planta* 230: 755-765.

- Xu, G., Fan, X. & Miller, A.J. 2011. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology* 63: 153-182.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y. & Takahashi, S. 1999. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in Plant Science* 4: 128–129.
- Yoneyama, T., & Suzuki, A. 2019. Exploration of nitrate-to-glutamate assimilation in non-photosynthetic roots of higher plants by studies of ¹⁵N-tracing, enzymes involved, reductant supply, and nitrate signaling: A review and synthesis. *Plant physiology and biochemistry* 136: 245-254.
- You, W. & Barker, A.V. 2005. Ethylene evolution and ammonium accumulation by tomato plants after root-applied glufosinate-ammonium treatment in the presence of ethylene inhibitors. *Communications in soil science and plant analysis* 35: 1957-1965.
- Zhang, H., Jennings, A., Barlow, P.W. and Forde, B.G., 1999. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 6529-6534.
- Zhang, H. & Forde, B.G. 2000. Regulation of Arabidopsis root development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany* 51: 51–59.
- Zhang, H., Rong, H., & Pilbeam, D. 2007. Signalling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany* 58: 2329-2338.
- Zhang, Y., Swart, C., Alseekh, S., Scossa, F., Jiang, L., Obata, T., Graf, A. & Fernie, A. R. 2018. The extra-pathway interactome of the TCA cycle: expected and unexpected metabolic interactions. *Plant physiology* 177: 966-979.
- Zhang, Z., Wang, H., Wang, X., & Bi, Y. 2011. Nitric oxide enhances aluminum tolerance by affecting cell wall polysaccharides in rice roots. *Plant cell reports* 30: 1701.
- Zhao, D.Y., Tian, Q.Y., Li, L.H., & Zhang, W.H. 2007. Nitric oxide is involved in nitrate-induced inhibition of root elongation in *Zea mays*. *Annals of Botany* 100: 497-503.

ANEXOS

Anexo 1

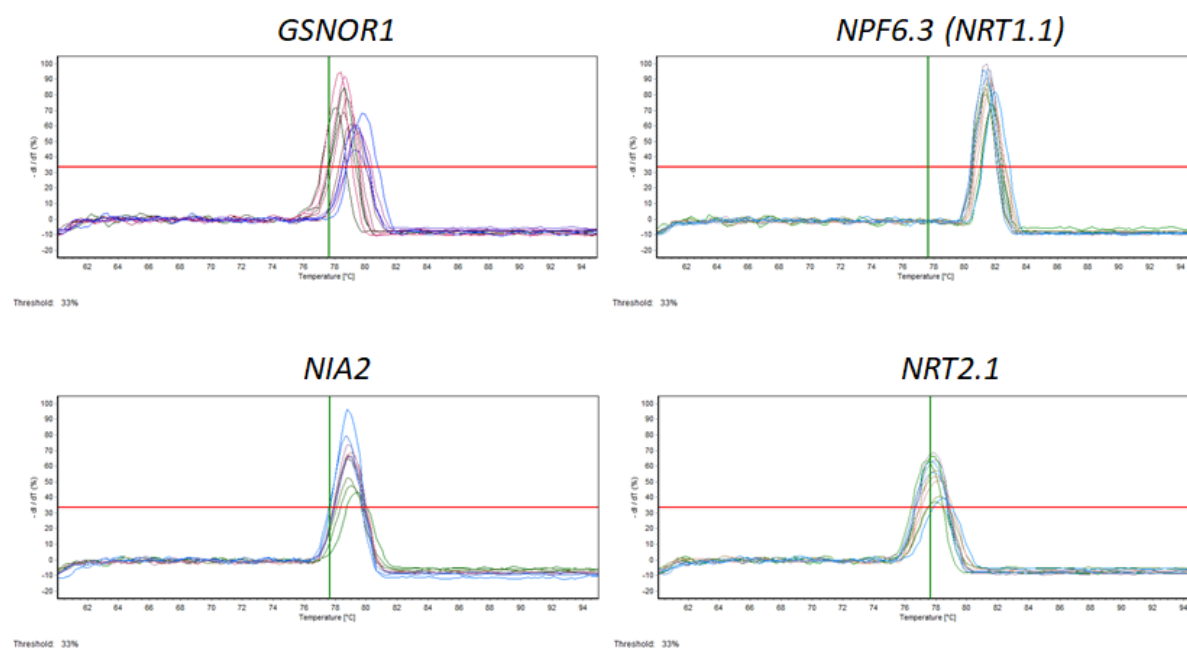


Figura 16 – Curvas de *melting* dos fragmentos amplificados, utilizando os pares de *primers* selecionados para os genes *GSNOR1*, *NIA2*, *NPF6.3 (NRT1.1)*, *NRT2.1*.

Anexo 2

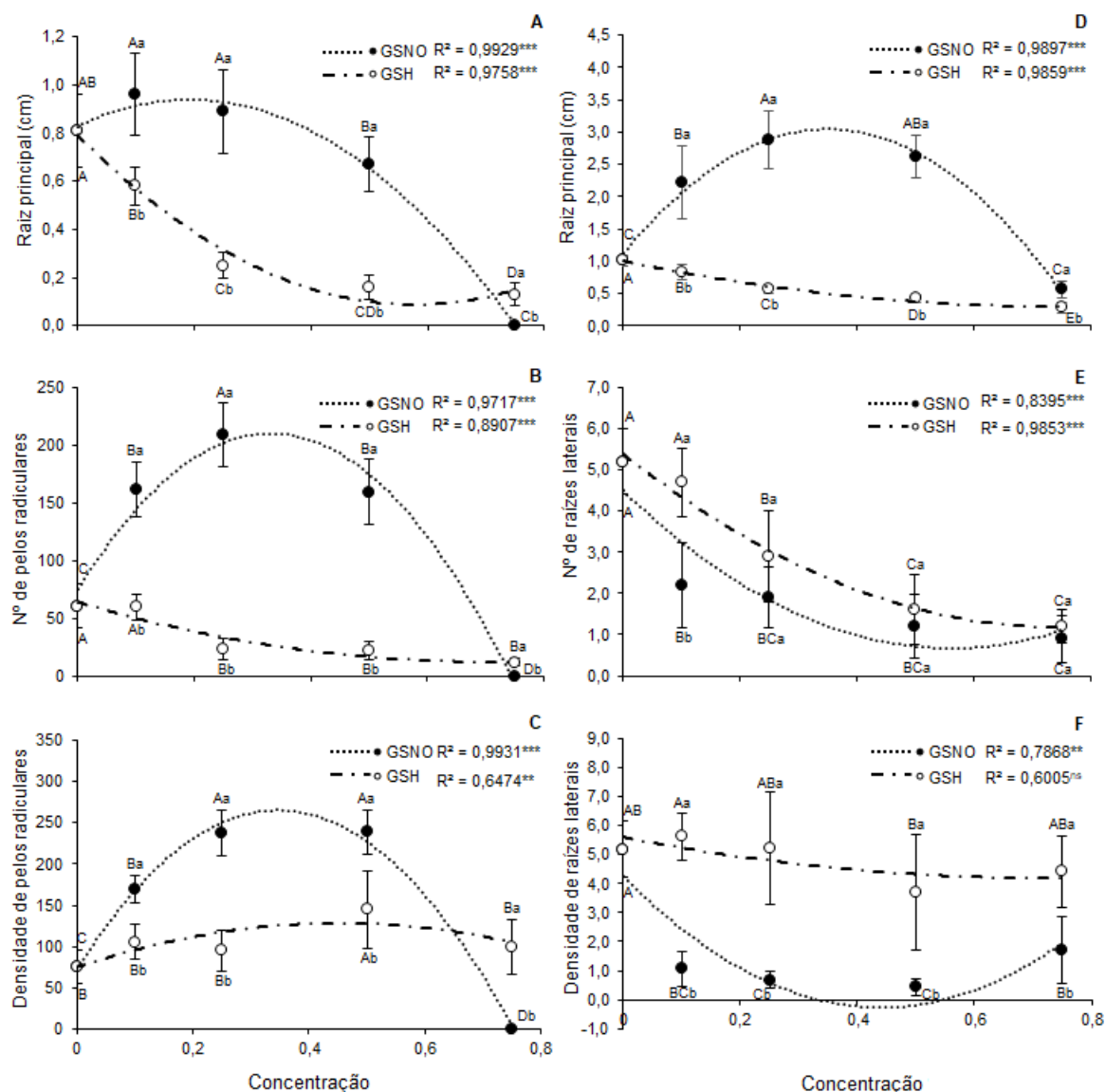


Figura 17 – Fenótipo radicular de *Arabidopsis* genótipo selvagem (Col-0), aos quatro (A, B e C) e aos sete (D, E e F) dias de desenvolvimento, crescido 1 mM de NH_4^+ (controle) com adição de diferentes concentrações de GSNO ou GSH (0,1, 0,25, 0,5 e 0,75 mM). A) Comprimento da raiz principal, B) Número de pelos radiculares, C) Densidade de pelos radiculares. Linha de tendência analisada pela regressão quadrática para as concentrações de GSNO (pontilhado) e GSH (tracejado). ANOVA *one-way* seguido de teste de *Tukey* ($P \leq 0,05$) para os tratamentos (letras maiúsculas) e teste *t* para comparação entre a concentração (letras minúsculas). Média e desvio padrão, $n=10$.

Anexo 3

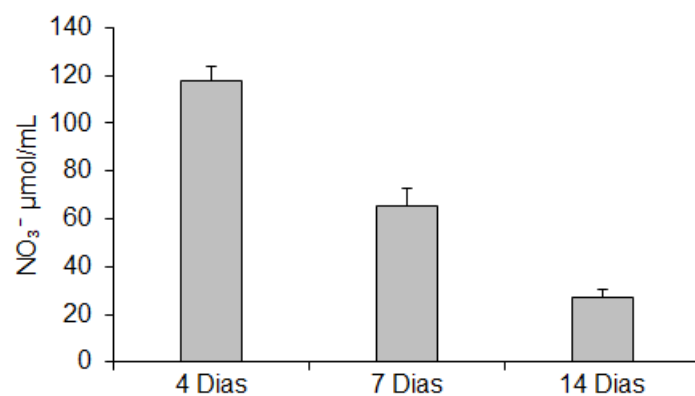


Figura 18 – Concentração de NO_3^- no meio de cultivo aos quatro, sete e 14 dias de desenvolvimento.

Anexo 4

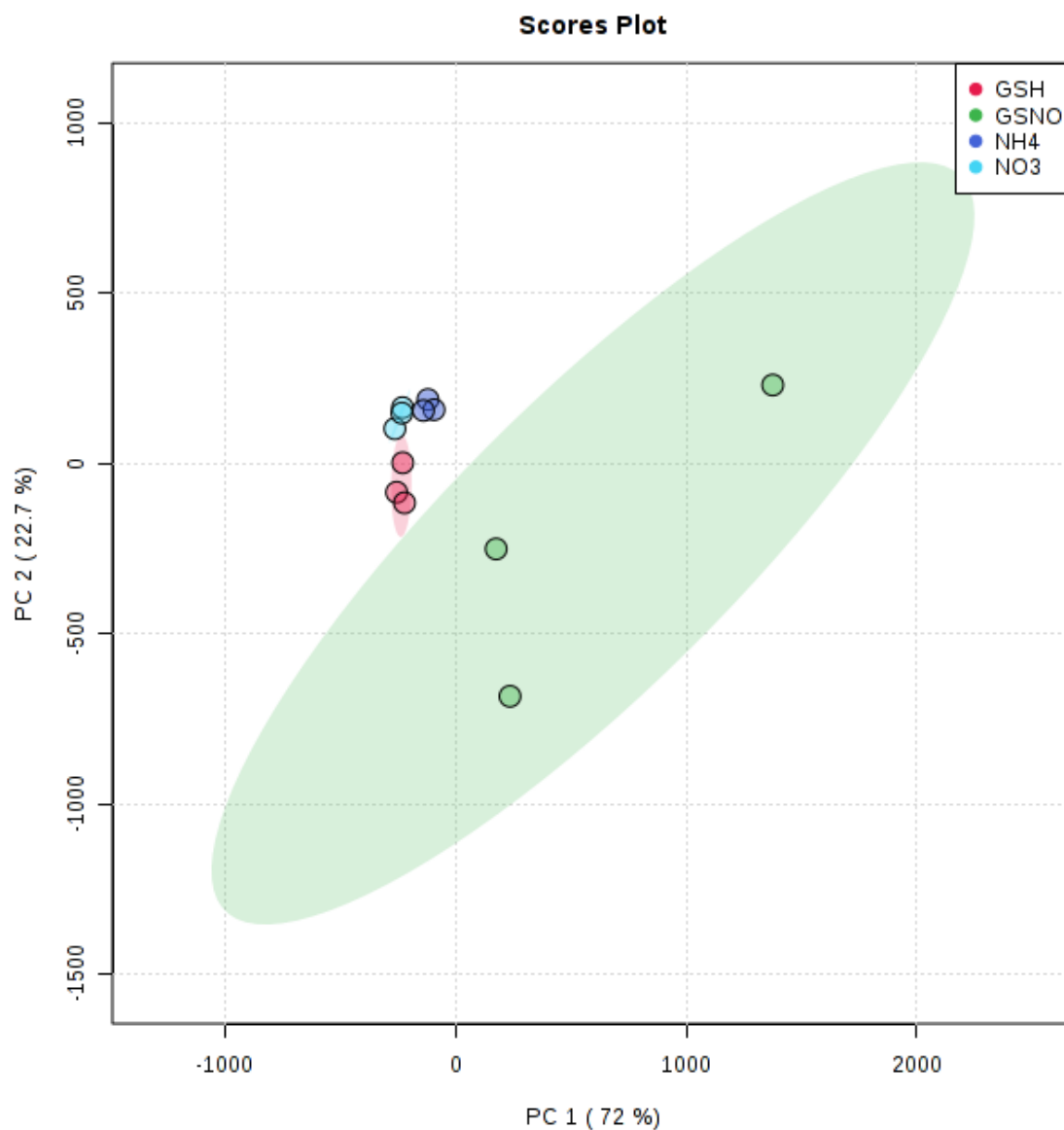


Figura 19 – Análise de Componentes Principais (PCA) dos metabólitos de raízes de *Arabidopsis* genótipo selvagem (Col-0) aos 14 dias de desenvolvimento em duas fontes de N (1 mM NO_3^- ou NH_4^+): efeito da adição de 0,25 mM de GSNO ou GSH. Os círculos em azul claro representam o tratamento com NO_3^- , os círculos em azul escuro o tratamento com NH_4^+ , os círculos em vermelho o tratamento com NH_4^+ + GSH e os círculos em verde o tratamento NH_4^+ + GSNO.