



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

CAIO CEZAR FABIANO BARBOSA DOS SANTOS

**Urease na reciclagem de nitrogênio em plantas e o papel
do níquel como micronutriente essencial**

Campinas

2019

CAIO CEZAR FABIANO BARBOSA DOS SANTOS

**UREASE NA RECICLAGEM DE NITROGÊNIO EM
PLANTAS E O PAPEL DO NÍQUEL COMO
MICRONUTRIENTE ESSENCIAL**

*Dissertação
apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular, na
área de Genética Vegetal e
Melhoramento*

ESTE ARQUIVO DIGITAL
CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO CAIO
CEZAR FABIANO BARBOSA DOS SANTOS E
ORIENTADA PELO PROF. DR. PAULO
MAZZAFERA.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzafera

CAMPINAS

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F112u Fabiano, Caio Cezar, 1991-
Urease na reciclagem de nitrogênio em plantas e o papel do níquel como micronutriente essencial / Caio Cezar Fabiano Barbosa dos Santos. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Paulo Mazzafera.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Urease. 2. Níquel. 3. Arginina. 4. Seca. 5. Nitrogênio - Metabolismo. I. Mazzafera, Paulo, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Urease and nitrogen recycling and the role of nickel as an essencial micronutrient

Palavras-chave em inglês:

Urease

Nickel

Arginine

Drought

Nitrogen - Metabolism

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Paulo Mazzafera [Orientador]

Sara Adrián López de Andrade

Tiago Tezotto

Data de defesa: 15-05-2019

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-9661-5322>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7425350212675249>

Campinas, 15 de maio de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Mazzafera

Profa. Dra. Sara Adrian Lopez de Andrade

Dr. Tiago Tezzoto

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Agradecimentos

Agradeço à minha família e seu amor incondicional.

Agradeço imensamente ao Dr. Paulo Mazzafera pelos anos de orientação, compreensão e paciência.

Meus mais profundos agradecimentos à minha melhor amiga e irmã de alma, Aline Gazzola Fragnani Valença, que sempre me ajudou e me apoiou como só ela poderia.

Muito obrigado a todos os membros, novos e antigos, do LaFiMP que me auxiliaram e tornaram desses anos no laboratório, uma experiência maravilhosa.

Aos colegas e professores do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica, muito obrigado pelo apoio, colaboração e amizade.

Agradeço também à agência de fomento FAPESP pela concessão das bolsas: processo nº 2013/18416-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e processo nº 2015/05812-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

O fato do Ni fazer parte do sítio ativo da urease em plantas, e esta enzima ser a responsável pela eliminação de níveis tóxicos de ureia em plantas tem sido a justificativa para classificar este elemento como essencial. Por outro lado, a atividade da urease tem sido relacionada quase que estritamente à ureia produzida na conversão de arginina à ornitina, e principalmente em sementes. Nos tecidos vegetativos, folhas, por exemplo, os níveis de atividade de urease é muito baixo. Assim, são poucos os estudos que mostram que de fato Ni é essencial em plantas, estando restritos principalmente à leguminosa soja, e menos ainda os estudos que destacam o papel de urease no metabolismo de plantas. Estudos recentes têm mostrado que urease, e consequentemente Ni, pode ter papel importante na reciclagem de N entre pools metabólicos em plantas sob estresse. Dois experimentos foram realizados com plantas de *Arabidopsis thaliana* que receberam fornecimento de fontes nitrogenadas (ureia e arginina) associados à oferta de níquel. Um terceiro experimento submeteu plantas dessa espécie a situações de restrição hídrica. Análise da expressão gênica e quantificação das concentrações de aminoácidos e poliaminas foram realizadas em todos os experimentos. Essas análises mostraram que o fornecimento de níquel causou alterações em vias metabólicas variadas além da via do metabolismo de arginina e ureia. Compostos como arginina, ornitina, ureia, glutamato, glutamina, prolina, GABA, citrulina, agmatina e poliaminas tiveram suas concentrações alteradas pelos tratamentos. Genes de enzimas das vias metabólicas desses compostos também apresentaram variações em sua expressão de acordo com os diferentes tratamentos. Aparentemente, essas alterações têm relação com a fonte nitrogenada administrada em conjunto com o metal. Com o experimento de seca foi possível notar que a concentração de osmoprotetores como prolina e poliaminas podem ser ligadas a vias alteradas pelo níquel. Apesar de estudo ainda ser necessário, vemos que o níquel e a urease podem ser elementos importantes para todo o metabolismo vegetal do nitrogênio e não somente para detoxificação de ureia intracelular.

Abstract

The fact that Ni is part of the active site of urease in plants, and this enzyme is responsible for the elimination of toxic levels of urea in plants has been the justification for classifying this element as essential. In contrast, urease activity has been almost strictly related to the urea produced in the conversion of arginine to ornithine and especially in seeds. In vegetative tissues, leaves, for example, the levels of urease activity is very low. Thus, there are few studies that actually show that Ni is essential in plants, being restricted mainly to soybean, and even fewer studies that highlight the role of urease in plant metabolism. Recent studies have shown that urease, and consequently Ni, may play a role in the recycling of N between metabolic pools in plants under stress. Two experiments were performed using *Arabidopsis thaliana* plants receiving treatments with nitrogen sources (urea and arginine) and nickel. A third experiment used same species plants under drought stress. Analysis for gene expressions, aminoacids concentration and polyamines concentrations were part of all three experiments. Those data indicated that Ni treatment caused changes in a variety of metabolic pathways beyond arginine and urea's reactions. Levels of arginine, ornithine, urea, glutamate, glutamine, proline, GABA, citruline, agmatine e polyamines were altered by the treatments. Genes for the enzymes of these substances's metabolic pathways had their expression changed as well. Those changes seem to be connected with the nitrogen source applied to the plants on the experiments. The third experiment indicates that osmoprotectors, as proline and polyamines, may have their accumulation affected by metabolic pathways that may be prone to interferences caused by Ni. Urease and Ni may be important factors not only to intracellular urea detoxification but also for the N metabolism as a whole.

Índice de imagens

Figura 1: Plantas com sintomas relacionados à deficiência de níquel.....	17
Figura 2: Via de produção de metilglioxal e Via das Glioxalases.....	19
Figura 3: Rotas metabólicas relacionadas com o metabolismo de arginina e degradação de ureia em células vegetais.....	21
Figura 4: Formação da urease usando apo-urease e proteínas acessória.....	25
Figura 5: Expressão gênica no “Experimento 1: Ni e ureia” dos genes relacionados à biossíntese de poliaminas e citrulina.....	31
Figura 6: Expressão gênica no “Experimento 1: Ni e ureia” dos genes relacionados à biossíntese de aminoácidos.....	33
Figura 7: Quantificação de ureia e aminoácidos envolvidos na biossíntese de poliaminas no “Experimento 1: Ni e ureia”.....	34
Figura 8: Quantificação de poliaminas no “Experimento 1: Ni e ureia”.....	35
Figura 9: Quantificação de aminoácidos no “Experimento 1: Ni e ureia”.....	36
Figura 10: Expressão gênica no “Experimento 2: Ni e arginina” dos genes relacionados à biossíntese de poliaminas e citrulina.....	38
Figura 11: Expressão gênica no “Experimento 2: Ni e arginina” dos genes relacionados à biossíntese de aminoácidos.....	40
Figura 12: Quantificação de ureia e aminoácidos envolvidos na biossíntese de poliaminas no “Experimento 2: Ni e arginina”.....	42
Figura 13: Quantificação de poliaminas no “Experimento 2: Ni e arginina”.....	43
Figura 14: Quantificação de aminoácidos no “Experimento 2: Ni e arginina”.....	44
Figura 15: Valores de potencial hídrico obtidos durante os tratamentos de seca.....	45

Figura 16: Expressão gênica no “Experimento 3: seca” dos genes relacionados à biossíntese de poliaminas e citrulina.....	46
Figura 17: Expressão gênica no “Experimento 3: seca” dos genes relacionados à biossíntese de aminoácidos.....	47
Figura 18: Quantificação de citrulina e ornitina no “Experimento 3: seca”	48
Figura 19: Quantificação de poliaminas no “Experimento 3: seca”	49
Figura 20: Quantificação de aminoácidos no “Experimento 3: seca”	50

Índice geral

1. Introdução	11
1.1. Níquel: descrições gerais e suas relações com as plantas	11
1.2. Ni como metal tóxico para os vegetais e como eles se defendem	13
1.3. Ni é um micronutriente essencial vegetal	16
1.4. Metabolismo do nitrogênio: aquisição, reserva e reuso	20
1.5. Metabolismo de arginina e ureia em plantas	22
1.6. Urease: a primeira enzima vegetal dependente de Ni identificada	24
2. Objetivos	26
3. Hipótese	26
4. Métodos	26
4.1. Desenho experimental e material vegetal	26
4.2. Experimento 1: Aplicação combinada ou não de ureia e Ni	27
4.3. Experimento 2: Aplicação combinada ou não de Ni e arginina	27
4.4. Experimento 3: Estresse hídrico	28
4.5. Análises de expressão gênica	28
4.6. Análise de metabólitos em HPLC-MS	29
4.7. Medição de potencial hídrico	30
4.8. Análise estatística	30
5. Resultados	30
5.1. Experimento 1	30
5.2. Experimento 2	36
5.3. Experimento 3	44
6. Discussão	50
6.1.1. Experimento 1: ureia e Ni	50
6.1.2. Experimento 2: arginina e Ni	53
6.1.3. Experimento 3: seca	56
7. Conclusão	59
8. Referências	61
9. Apêndice I	82
10. Anexo I: Declaração de bioética/biossegurança	83
11. Anexo II: Declaração de direitos autorais	82

Introdução

Níquel: descrições gerais e suas relações com as plantas

Níquel (Ni) é um elemento químico metálico presente no grupo 8B da Tabela Periódica de Elementos e, por tanto, é um elemento de transição. Quando puro, apresenta estado físico sólido, coloração branco-prateada, ferromagnetismo e boa condutância térmica ou elétrica (<http://www.icz.org.br/portaldoniquel/niquel.php>). O metal é presente em ligas metálicas naturais da crosta terrestre, no núcleo da Terra e também em formas químicas livres ou complexos nos solos (Crooke, 1956), sendo, assim, um dos metais pesados mais comuns nesses substratos (Berton *et al.*, 2006). Apesar de ser difícil de ser laminado ou manipulado, este metal é usado em abundância pelo homem tanto atualmente quanto em períodos históricos passados (<http://www.icz.org.br/portaldoniquel/niquel.php>). Devido ao fato de melhorar a qualidade e resistência contra corrosão das ligas metálicas, o Ni, é amplamente utilizado na indústria metalúrgica entrando na composição de moedas, condutores, eletrodos, objetos domésticos, artigos de construção civil e muitos outros artefatos. Sua recorrente utilização demanda uma intensa atividade extrativista e refinadora para retirar o metal dos minérios naturalmente presentes na crosta e transformá-los nas formas utilizáveis.

No solo, o Ni se apresenta principalmente na forma Ni^{2+} (Adriano, 2001; Izosimova, 2005) e sua disponibilidade para absorção pelas raízes das plantas depende de diversos fatores como composição do solo, pH, microbiota e da presença de diferentes formas químicas do metal (Kabata-Pendias & Pendias; 2001; Fontes *et al.*, 2001). Além de ser a mais comum no solo (Adriano 2001), a forma iônica Ni^{2+} é aquela preferencialmente absorvida pelas plantas através do sistema radicular (He *et al.*, 2012), sendo que, sua disponibilidade no substrato é principalmente determinada pelo pH da solução (Uren, 1992). Geralmente, nos organismos vivos, o Ni^{2+} participa da estrutura de diversas proteínas e participa dos processos celulares. Nas plantas, dependendo da sua disponibilidade, o Ni é um metal pesado, tóxico, mas também um micronutriente essencial (He *et al.*, 2012; Gajewska & Sklodowska, 2009). Para as células vegetais, é necessária uma quantidade muito pequena do metal para que

completem seus ciclos de vida e a planta sobreviva (Epstein & Bloom, 2005; Chen *et al.*, 2009). Sendo assim, tênues alterações nas concentrações do metal no solo podem fazer com que as plantas passem a sofrer estresses, danos e até a morte. Este fato é particularmente preocupante, pois, a constante mineração, refino e descarte do Ni, de formas indevidas ou pouco eficientes, têm sido apontados como causadores de elevações alarmantes das concentrações de Ni em solos e mananciais de água por todo o globo (Iljin, 1991; Izosimova, 2005).

Sem a influência humana, as concentrações livres do metal são baixas na maioria dos solos, podendo variar de 5 a 500 mg.kg⁻¹ de solo. (Kabata-Pendias & Pendias, 1992; Bai *et al.*, 2006), podendo chegar a níveis tóxicos, para plantas, somente em solos de serpentina, podendo apresentar [Ni] de até 7.100 mg.kg⁻¹ de solo (Brooks, 1987; Kabata-Pendias & Pendias, 1992). Através da ação antrópica, solos antes com baixa presença de Ni, agora, apresentam maior concentração do metal (Izosimova, 2005; Wei *et al.*, 2009), o que representa risco não somente para a viabilidade da vida vegetal, de áreas naturais e de áreas de cultivo, como para toda a rede de cadeias alimentares (McLaughlin, 2002). Uma vez que plantas estejam expostas e absorvam o metal pesado, ele entra na cadeia alimentar representando risco de intoxicação para todos os organismos envolvidos, incluindo humanos. Além disso, como dito antes (Epstein & Bloom, 2005; Chen *et al.*, 2009), por ser um micronutriente, variações tênues na concentração do Ni nos solos podem representar mudanças nos perfis metabólicos e fisiológicos vegetais. Essas mudanças podem, então, interferir no crescimento vegetal e nos mecanismos de respostas contra estresses das plantas. A quantidade de estudos específicos da [Ni] disponível em solos agriculturáveis brasileiros ainda é pequena. De qualquer forma, é possível dizer que a prática agrícola intensa pode resultar no esgotamento ou deficiência desse metal disponível para as plantas.

Assim, o estudo, não somente dos mecanismos tóxicos do metal para plantas, mas também seu papel fisiológico, é vital para entendermos e criarmos estratégias inteligentes de fertilização e proteção das comunidades naturais e cultivadas. Apesar da importância deste conhecimento, a literatura tem se focado, em sua maioria, na elucidação dos efeitos tóxicos do Ni em organismos vegetais. A concentração de estudos que se ocupam do papel fisiológico do

metal nas plantas, e sua importância crescente como micronutriente essencial, ainda tem baixa representatividade.

Ni como metal tóxico para os vegetais e como eles se defendem

O estresse por exposição a metais pesados, para plantas, pode culminar em diversos danos celulares e teciduais (Foy *et al.*, 1978; Seregin & Kozhevnikowa, 2006; Gjorgieva, 2018). Ni entra na categoria de metais pesados que, quando presente em concentrações não ideais para as plantas, causa danos nas estruturas celulares e, caso a presença do metal continue fora do ideal, pode gerar danos extensos para os tecidos e para o indivíduo (Eskew *et al.*, 1984; Marschner, 1995; Pandey & Sharma, 2002; Gajewska *et al.*, 2006; Kopittke *et al.*, 2007; Ghasemi & Ghaderian, 2009). Os danos da presença do metal incluem: desequilíbrio no metabolismo antioxidante (Gajewska & Sklodowska, 2007 e 2008; Baccouch *et al.*, 2001), bloqueio de crescimento da parte radicular e aérea (Gajewska *et al.*, 2006; Gajewska & Sklodowska, 2007; Pandey & Sharma, 2002), deficiência nutricional de micro e macronutrientes (Ahmad *et al.*, 2011; Rahman *et al.*, 2005; Karimian, 1995; Brown *et al.*, 1990), danos nos processos mitóticos (L'Huillier *et al.*, 1996; Dalledonne *et al.*, 1999; Arrunategui-Jimenez *et al.*, 1999; Pribyl *et al.*, 2008), danos ao metabolismo de açúcares (Seregin & Kozhevnikowa, 2006; Rautio, 2000; Roitto *et al.*, 2005; Baccouch *et al.*, 1998; L'Huillier *et al.*, 1996; Kukkola & Huttunen, 1998; Appenroth *et al.*, 2010) e outros efeitos ligados a enzimas antioxidantes e aproveitamento dos íons de ferro pela planta (Kazemi *et al.*, 2010; Pandey & Sharma, 2002; Everhart *et al.*, 2006; Mazzafera *et al.*, 2013; Fabiano *et al.*, 2015). Devido a seu papel prejudicial no metabolismo de plantas, o Ni, tem sido o alvo de estudos que visam elucidar os seus efeitos danosos e os mecanismos vegetais que previnem e combatem os efeitos indesejados do estresse pelo metal pesado. Estes estudos são importantes, vez que, como dito antes, os níveis de contaminação de Ni em solos do meio ambiente, cultiváveis ou não, vem aumentando pela ação antrópica (Izosimova, 2005).

A literatura científica apresenta grande quantidade de informação sobre como os metais pesados podem estressar as plantas e como essas, por sua vez, se defendem dos danos causados (He *et al.*, 2012; Gjorgieva, 2018). Em concentrações não ideais o Ni pode causar muitos danos e entre eles está o estresse oxidativo, que pode levar à morte celular. As principais respostas contra oxidação em plantas são: a produção de vários compostos com atividade antioxidante, enzimas que eliminam os agentes causadores da oxidação (radicais óxidos), a produção de fitoquelatinas e a não absorção do metal nos tecidos radiculares (Noctor *et al.*, 2012; Yannarelli *et al.*, 2007; Yadav, 2010). A lista de compostos antioxidantes vegetais é longa, porém, alguns se destacam, tais como a glutathiona reduzida (GSH), o ácido ascórbico e o ácido cítrico (Noctor *et al.*, 2012). Esses compostos são barreiras químicas eficientes contra os danos oxidativos nas células, não só de plantas, mas de todos os organismos (Noctor *et al.*, 2012; Meister, 1994; Cairns *et al.*, 2006). As moléculas destes compostos perdem elétrons para as espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo oxidadas no lugar de estruturas como DNA, RNA, proteínas e lipídeos (Noctor *et al.*, 2012). Dentre os metabolismos dos compostos antioxidantes, um dos mais importantes é o das glutathionas.

O metabolismo de glutathiona é importante para a manutenção constante dos níveis de moléculas oxidantes normalmente presentes no ambiente celular. A GSH é constantemente produzida, oxidada por ROS ou outros reativos e reciclada. Após oxidada, a GSH se torna glutathiona oxidada (GSSG, forma dimerizada de GSH). Tendo GSSG como substrato, a enzima glutathiona redutase (GR) recicla, constantemente, GSH para a célula (Noctor *et al.*, 2012). Até 2014, não se sabia de nenhuma possível relação fisiológica entre Ni e o metabolismo de GSH, porém, em descoberta recente (Mustafiz *et al.*, 2014), o metal foi relatado podendo participar da Via de Glioxalases em *Oryza sativa*. Esta via metabólica usa e produz GSH, abrindo a discussão de que talvez o metal pesado tenha novos papéis fisiológicos relacionados ao metabolismo antioxidante ainda não descobertos (Fabiano *et al.*, 2015). Até então, o principal papel do Ni em plantas é como cofator da enzima urease, que degrada ureia a amônia e CO₂ (Polacco *et al.* 2013).

A via de produção de glutathiona também está envolvida na produção de fitoquelatinas (Noctor *et al.*, 2012; Rauser, 1995; Yadav, 2010). Estas

moléculas vegetais são oligômeros de glutathione, que se ligam quimicamente com grande afinidade aos metais pesados. Na circunstância do estresse por Ni, ou outros metais tóxicos, células vegetais iniciam o aumento da produção de fitoquelatinas (Rauser, 1995; Yang *et al.*, 2001) impedindo o desequilíbrio do estado oxidativo celular (Rauser 1995; Yadav, 2010). As moléculas de fitoquelatinas complexadas aos metais são, geralmente, encaminhadas e retidas nos vacúolos (Brouwer *et al.*, 1993; Eapen and D'Souza, 2005). Além disso, compostos como ácidos orgânicos, histidina, arginina e poliaminas também podem se ligar ao Ni e outros metais, para efetuar seu sequestro (Collin *et al.*, 2008; Yusuf *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2016). Estas estratégias são somente uma demonstração, dentre muitas outras, das formas que plantas lidam com o estresse oxidativo por metais pesados. Outras estratégias envolvem a atuação da microbiota do solo (Burd *et al.*, 1998; Burd *et al.*, 2000;).

Mecanismos protetores da homeostase vegetal, como os apresentados anteriormente, estão presentes em todas as plantas (Noctor *et al.*, 2012). Porém, certas plantas não somente sobrevivem aos metais pesados em abundância, mas também acumulam altas concentrações deles em seus tecidos (He *et al.*, 2012). Essas plantas, chamadas de hiperacumuladoras, podem suportar altíssimas concentrações de determinados metais que seriam mortais para a vasta maioria dos seres vivos (Brooks *et al.*, 1977; Rascio & Navari-Izzo, 2011). Para o Ni, inicialmente eram conhecidos e documentados 350 táxons vegetais com indivíduos capazes de sobreviver ao exagero do metal e também acumularem quantidades exorbitantes do mesmo em seus tecidos (Reeves, 1992). Hoje, são mais de 450 espécies identificadas, de 45 famílias, constituindo o maior grupo de plantas hiperacumuladoras de metais (Kotrba *et al.*, 2009). Originalmente descobertas em terrenos de solos de serpentina, naturalmente rico em Ni, estas espécies usam suas estratégias celulares e fisiológicas para sobreviverem e completarem seus ciclos de vida mesmo que apresentem concentrações de Ni extremamente elevadas em todos os seus tecidos (Reeves, 1992; Reeves *et al.*, 1981). A família *Brassicaceae* guarda 25% das espécies hiperacumuladoras de Ni (Prasad, 2005) sendo que, os gêneros *Alyssum* e *Thlaspi*, são aqueles com maior número de membros com essa capacidade (Brooks, 1998; Rascio & Navari-Izzo, 2011). São vários os estudos tentando elucidar como tais plantas conseguem tal feito (Harish *et al.*, 2008; Rascio and

Navari-Izzo, 2011) e como a humanidade pode utilizá-las na descontaminação dos solos com Ni de origem antrópica (He *et al.*, 2012; Reeves and Baker, 2000). A absorção do Ni por plantas hiperacumuladoras tem sido estudada com a finalidade de fitorremediação e fitomineração de solos e fontes de água, visando o aumento da produção vegetal e a melhoria da saúde do meio ambiente e do homem (Hanikenne & Nouet, 2011). Essas técnicas são promissoras, mas também apresentam diversos desafios, pois demandam a domesticação de espécies hiperacumuladoras selvagens e o desenvolvimento de técnicas de processamento do material vegetal com altas concentrações de metal pesado, evitando a nova contaminação do meio ambiente (Chaney *et al.*, 2000; Lasat, 2002; McGrath *et al.*, 2002). Processos de fitomineração e espécies hiperacumuladoras de níquel utilizadas para esse fim são listadas e descritas em detalhes na literatura (vander Ent *et al.*, 2015).

Ni é um micronutriente essencial vegetal

O Ni foi o último micronutriente a ser adicionado e reconhecido dessa forma, mas ainda é questão de debate. Atualmente, esse reconhecimento vem de diversas demonstrações dos danos causados pela sua omissão no desenvolvimento das plantas e sua participação do metabolismo de ureia (Brown *et al.*, 1987; Fageria *et al.*, 2002; Muyssen *et al.*, 2004). A primeira evidência de sua essencialidade foi dada por Dixon *et al.* (1975), que demonstraram a presença de dois íons de Ni na estrutura da enzima urease, que converte ureia a amônia e CO₂. Posteriormente foi mostrado que plantas de soja (*Glycine max* L.) privadas do metal apresentavam concentrações elevadas de ureia em seus tecidos foliares (Eskwe *et al.*, 1983) e consequentes danos necróticos (Figura 1). Esse efeito foi relacionado com a queda na ativação da via de degradação de ureia, pelo fato do Ni fazer parte do sítio ativo da urease (Eskew *et al.*, 1984; Polacco, 1976, 1977). Também foi demonstrado que plantas de cevada, crescidas por três gerações sem a presença do Ni, perdem a capacidade de gerar sementes viáveis (Brown *et al.*, 1987). A viabilidade da prole é restaurada com o fornecimento do metal e é dependente da dose fornecida (Brown *et al.*, 1987). A partir daí, foi descoberto que o Ni pode interagir com enzimas tais como: hidrogenases microbianas (Evans *et al.*, 1987), desidrogenases, glioxalase I

(Mustafiz *et al.*, 2014), diformilases, acetil-S-coenzima A sintase e superóxido desmutase usuária de Ni (NiSOD) (Ermler *et al.*, 1998; Mulrooney & Hausinger, 2003).

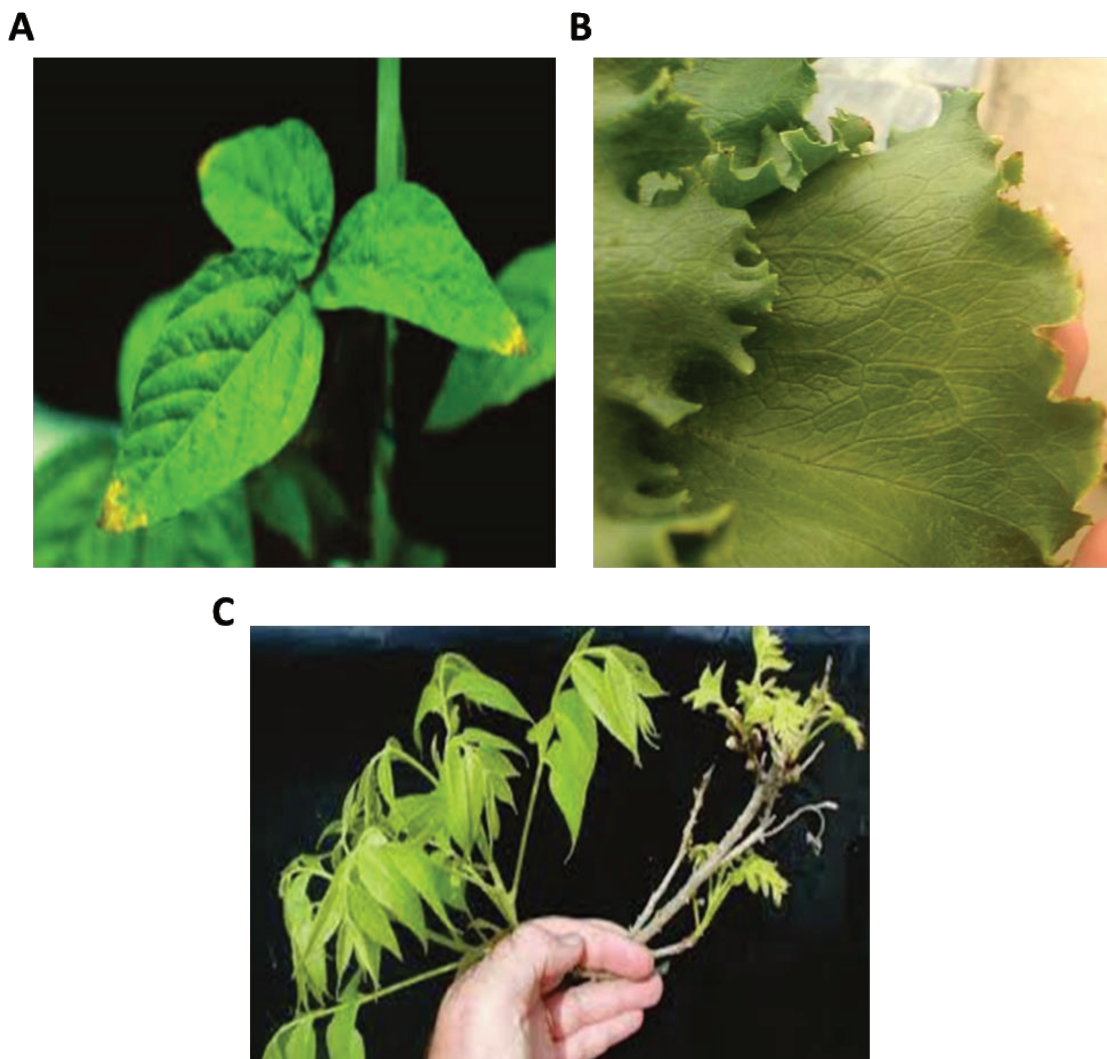


Figura 1: A- Danos necróticos nas pontas da folha de soja (*Glycine max*, L. Merrill) devido a deficiência de Ni no substrato. Fonte: Reis *et al.* (2014). B- Dano necrótico nas bordas das folhas de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Baker) com deficiência de níquel no substrato. Fonte: Khoshgoftarmanesh *et al.* (2011). C- Folhas de noqueira pecã (*Carya illinoensis* K.) com e sem deficiência nas concentrações de Ni. Esquerda: presença de Ni, direita: ausência de Ni. Fonte: Reis *et al.* (2014).

A descoberta de que a urease é dependente de Ni e que, sem o metal, as plantas podem enfrentar um cenário de desativação da enzima, sedimentou o papel fundamental do micronutriente (Polacco & Holland, 1993). A deficiência da urease leva ao acúmulo de ureia e consequente formação de lesões

necróticas nas folhas devido à toxicidade de ureia (Figura 1) (Eskew *et al.*, 1984; Walker *et al.*, 1985). Além disso, estudos mais recentes demonstraram que a falta do metal pode ser problemática para espécies arbóreas tanto quanto espécies cultivadas. Historicamente, o primeiro relato da deficiência de Ni em plantas de grande porte ocorreu com noqueira pecã (*Carya illinoensis* K.) nos Estados Unidos. No caso dessa espécie, o crescimento anormal de suas folhas (Figura 2), inicialmente atribuído ao frio ou a ação de algum patógeno, foi esclarecido como sendo causado por uma perturbação do metabolismo de carbono na árvore, levando ao acúmulo de níveis tóxicos de ácido láctico e ácido oxálico em folhas jovens deficientes em Ni (Bai *et al.*, 2006). A deficiência do Ni também induziu nesta espécie alterações acentuadas nos níveis de ureídeos (ureidoglicolato e alantoína), aminoácidos e intermediários do ciclo de ácidos tricarboxílicos. Esses dados sugeriram que a presença de Ni e a ação da urease podem ser decisivos para a viabilidade de cereais e plantas de pequeno porte tanto quanto para plantas arbóreas.

Apenas recentemente mostrou-se a dependência de outra enzima ao Ni. Mustafiz *et al.* (2014) mostraram a dependência da enzima glioxalase I ao Ni em *Oryza sativa* Indica. Esta enzima é uma das isoformas que participam do primeiro passo da Via de Glioxalases (Figura 2), rota pela qual acontece a metabolização, para uma forma inócua, do composto citotóxico metilglioxal (Kalapos, 2008; Ray, 1994; Li, 2016). Este composto é naturalmente produzido pelas células de todos os seres vivos (Li *et al.*, 2016) e precisa ter sua concentração finamente regulada pois pode causar grandes danos às estruturas celulares (Mustafiz *et al.*, 2014, Li, 2016, Martins *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2009 Singh & Dhaka, 2016). Mustafiz *et al.* (2014) demonstraram que a glioxalase I dependente do Ni e que pode ter papel importante na resposta contra estresses abióticos de plantas. Esta descoberta demonstra o pouco conhecimento que ainda temos do metal na fisiologia molecular de plantas.

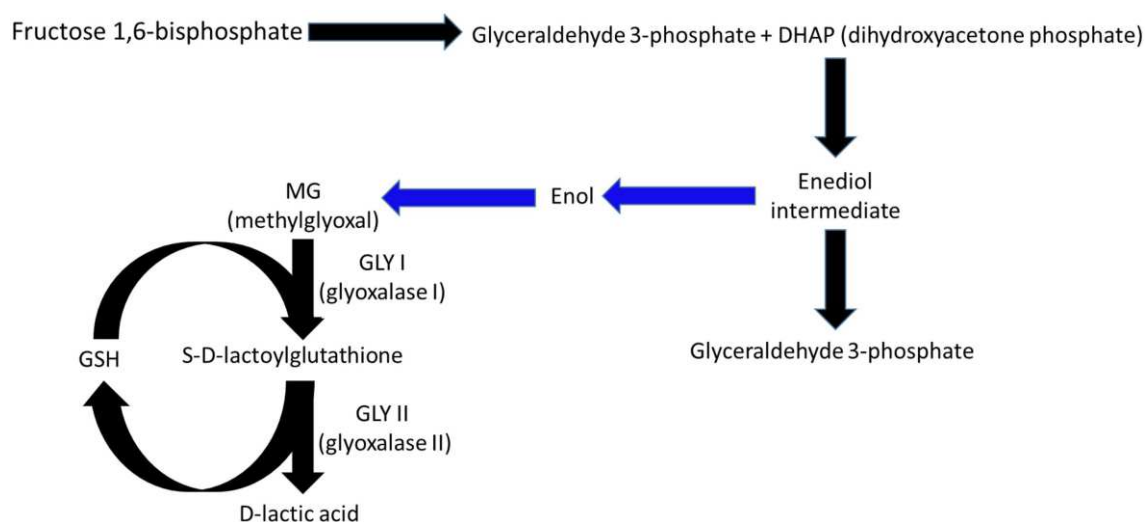


Figura 2: Via de produção de metilglioxal e Via das Glioxalases degradando MG e produzindo ácido láctico. Setas azuis representam reações espontâneas e setas pretas indicam reações enzimáticas. Fonte: Fabiano *et al.* (2015).

Essa falta de conhecimento deve-se, em parte, por dificuldades experimentais e práticas já que a maioria dos processos de purificação para eliminar contaminações não removem todos os vestígios no substrato de outros elementos quando se busca provar a essencialidade de um suposto nutriente (Gerendás & Sattelmacher, 1999). Assim, no caso de micronutrientes, ou seja, minerais que precisam estar em quantidades muito baixas nos sistemas vegetais, é muito difícil garantir um substrato completamente puro e, por conseguinte, um experimento com extremo controle da deficiência daquele nutriente. Além disso, como é o caso do Ni, é possível que a planta mãe encaminhe quantidades suficientes do mineral para as sementes de forma que se tente garantir a sobrevivência da prole (Kutman *et al.*, 2014). Como resultado, os estudos da essencialidade e importância do Ni são limitados e não muito numerosos.

Além disso poucas espécies de plantas foram estudadas em situações de privação de Ni ou do fornecimento controlado de concentrações não tóxicas do metal. A grande maioria dos estudos também é feita sob condições controladas, tanto do crescimento quanto do substrato usado, enquanto experimentos feitos em condições de cultivo em campo são, por enquanto, raros. O estudo abrangente da essencialidade do Ni para plantas

ainda enfrenta desafios, porém, expandir os horizontes desta área é vital para podermos otimizar o cultivo de plantas, melhorar o manejo de solos, além de, melhorar a proteção do meio ambiente e nosso estilo de vida.

Metabolismo do nitrogênio: aquisição, reserva e reuso

O nitrogênio é um dos elementos mais importantes para todos os seres vivos. É parte constituinte de grande número das moléculas vitais para os sistemas biológicos como ácidos nucleicos e proteínas (Kusano *et al.*, 2011). Porém, para as plantas, que realizam fotossíntese e não assimilam nitrogênio orgânico junto com sua assimilação de carbono, como fazem os animais, nem sempre é possível crescerem em substratos que sejam fontes abundantes desse elemento (Werner & Witte, 2011). Na verdade, a aquisição de nitrogênio, é um dos principais fatores limitantes ao crescimento das plantas ao redor do planeta (Schachtman & Shin, 2007, Werner & Witte, 2011). Durante a evolução diferentes grupos de plantas desenvolveram diferentes estratégias para a aquisição e aproveitamento de fontes nitrogenadas (Paungfoo-Lohienne *et al.*, 2010; Elser, *et al.*, 2006) estando entre elas as associações com microrganismos, aumento da eficiência de absorção do N disponível no solo e a captura e digestão de insetos, por exemplo, garantiram que certas espécies sobrevivessem. De forma geral, plantas absorvem pelas raízes nitrato e amônio do solo como a forma primária de aquisição do nitrogênio do ambiente (Stitt *et al.*, 2002; Yamaya and Oaks, 2004). Mas, também é importante na economia nitrogenada das plantas o desenvolvimento evolutivo de mecanismos moleculares e fisiológicos para a melhor distribuição, aproveitamento e reuso do nitrogênio adquirido (Elser *et al.*, 2006; Kusano *et al.*, 2010; Witte, 2011). A reutilização do nitrogênio da ureia é possível apenas pela ação da urease (Witte, 2011). A hidrólise da ureia é um dos passos do metabolismo de arginina (Figura 3) e representa uma etapa importante para a ciclagem e redirecionamento do nitrogênio em células vegetais (Polacco *et al.*, 2013). Além disso, a eliminação da ureia na célula vegetal é necessária pois seu acúmulo pode causar morte celular, dano tecidual e necrose (Eskew *et al.*, 1983 & 1984; Walker *et al.*, 1985). Como comentado, a falta de Ni pode levar ao acúmulo da ureia em plantas.

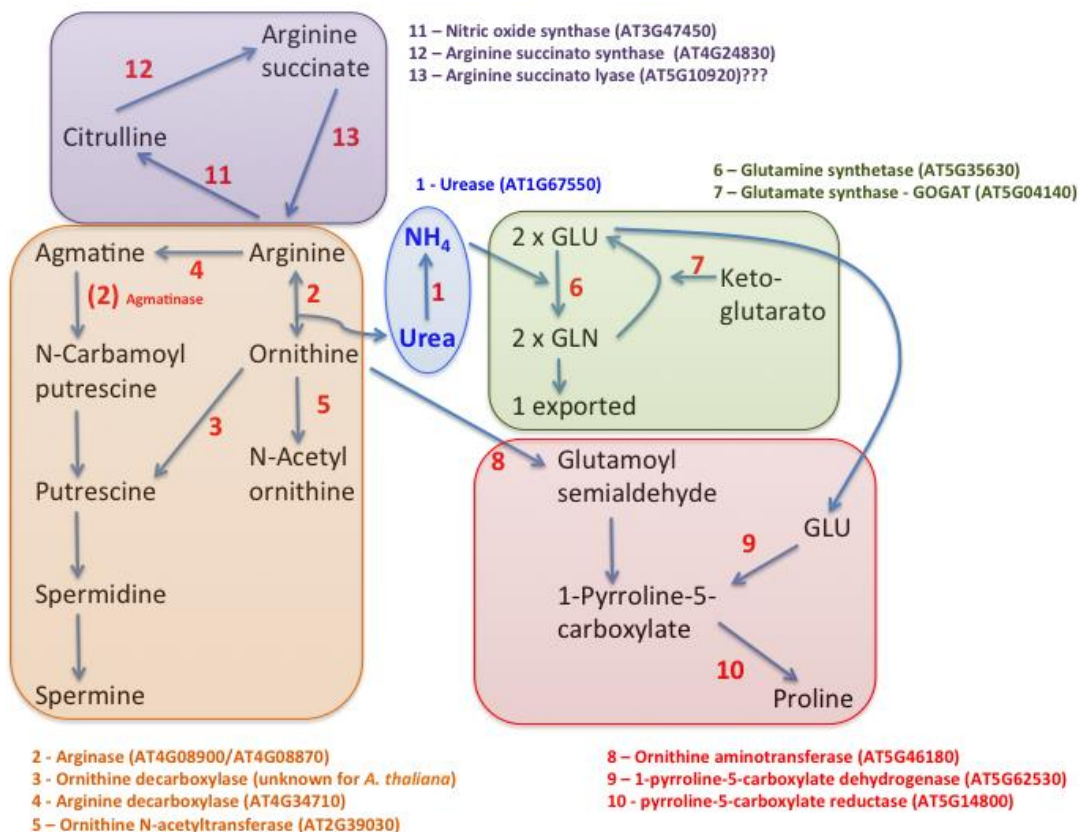


Figura 3: Rotas metabólicas relacionadas com a degradação de ureia em células vegetais. Quadro azul: reação de degradação de ureia via urease. Os números representam as enzimas responsáveis pelas reações metabólicas (setas). Os quadrantes coloridos destacados representam compartimentos metabólicos, não necessariamente localizados em diferentes compartimentos celulares. Fonte: Polacco *et al.* (2013).

O metabolismo dos aminoácidos é fundamental para o funcionamento das células. Esses são as partes constituintes das proteínas e qualquer perturbação nas suas concentrações intracelulares pode causar danos aos organismos. O metabolismo da arginina tem papel importante tanto na construção de proteínas quanto na reciclagem e reserva de nitrogênio (Witte, 2011; Winter *et al.*, 2015). Apesar das amidas asparagina e glutamina terem papel fundamental na remobilização de N entre os tecidos de plantas, seja em situação normal ou durante a senescência, a arginina também é um importante aminoácido, sendo o principal aminoácido de reserva em plantas (Slocum, 2005) sendo aquele com maior número de átomos de nitrogênio (4) por molécula e com maior razão nitrogênio-carbono (Polacco & Holland, 1993; Winter *et al.*, 2015).

Em sementes de algumas plantas a quantidade de nitrogênio alocada em arginina pode corresponder a 30-40% do nitrogênio em proteínas (VanEtten *et al.*, 1963; King & Gifford, 1997). Em soja, a arginina pode atingir 50% do pool de aminoácidos livres (Micallef & Shelp, 1989). Estas reservas são uma fonte de nitrogênio para o embrião durante a germinação da semente (Witte, 2011). Em outras espécies, arginina foi identificada como reserva de nitrogênio em tecidos radiculares e estruturas subterrâneas (Nordin & Nasholm, 1997; Bausenwein *et al.*, 2001; Rennenberg *et al.*, 2010). A arginina estocada, tanto em sementes quanto em tecidos vegetativos, é transformada em ornitina através de uma reação enzimática que libera ureia como produto (Figura 3). A ureia é então capturada e metabolizada pela enzima urease que a hidrolisa liberando NH_3 (Dixon *et al.*, 1975, Dixon *et al.*, 1980). A amônia liberada será assimilada para a produção de outros aminoácidos (Polacco *et al.*, 2013). Durante toda a vida da planta, o constante metabolismo dessas moléculas permite o redirecionamento, reaproveitamento e reciclagem do nitrogênio, minimizando o desperdício de um elemento tão precioso (Witte, 2011; Kusano *et al.*, 2010).

Metabolismo de arginina e ureia em plantas

Como dito anteriormente, a ureia endógena (vinda da quebra de arginina), em plantas, representa uma origem de nitrogênio para reuso nas células (Kusano *et al.*, 2010; Witte, 2011; Polacco *et al.*, 2013). Somado a isso, é possível que vegetais absorvam ureia exógena provinda da excreta de animais ou de fertilizantes aplicados pelo homem. O nitrogênio representa 47% da massa da ureia. A ureia é o principal fertilizante nitrogenado usado na agricultura (<http://faostat.fao.org>; <http://www.fertilizer.org/ifa>). Sua produção se dá pela captura no nitrogênio atmosférico, num processo com gasto alto de energia e, portanto, caro. Apesar de seus benefícios, o uso excessivo da ureia pode contaminar o meio ambiente com amônia, liberada pela atividade de ureases de microrganismos do solo (Mobley *et al.*, 1995).

A ureia aplicada em plantas pode ser absorvida diretamente pelo sistema radicular ou pelos tecidos aéreos, caso seja empregada em pulverização (Kojima *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). No solo, a ureia pode ser transformada em amônia pela urease de microrganismos, que pode ser absorvida pelas raízes

(Witte, 2011; Kusano *et al.*, 2010). Neste caso, a amônia pode ser assimilada diretamente pelo metabolismo de aminoácidos, pelas enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase (via GS/GOGAT) (Meeks *et al.*, 1978; Mifflin *et al.*, 1980). No caso da absorção da ureia diretamente pelos tecidos vegetais, ela precisa ser metabolizada pela urease para disponibilizar a amônia.

A ureia endógena, derivada da degradação de arginina pela ação da enzima arginase (Figura 3). Arginina também está no início da via de biossíntese de poliaminas (via da arginina decarboxilase) e de prolina (sobre certas situações) (Winter *et al.*, 2015), que são compostos envolvidos em uma vasta gama de respostas contra estresses em vegetais. Por exemplo, poliaminas são eficientes na eliminação de espécies reativas de oxigênio (Alcazar *et al.*, 2010) e prolina é um osmoprotetor (Szabados & Savoure, 2010).

Pela relação metabólica com arginina, essas vias estão intimamente ligadas à produção de ureia endógena (Figura 3). A ornitina para a síntese de arginina é formada a partir de N-acetilornitina e glutamato (via cíclica) ou a partir de N-acetilornitina (via linear) (Winter *et al.*, 2015). Na figura 3, somente a produção de N-acetilornitina, a partir de ornitina, é representada, mas é importante citar que o caminho inverso é responsável pela produção de ornitina e arginina nas células (Winter *et al.*, 2015). A ornitina é transformada em citrulina e, então, a argininasuccinato, (Slocum, 2005). Arginina succinato é metabolizada para arginina pela arginina succinato liase (Figura 3) (Slocum, 2005). A partir de sua formação, a arginina, só pode disponibilizar seu nitrogênio através da arginase.

O aumento na atividade da arginase resulta no aumento da produção de ureia e sua rápida hidrólise pela urease pode causar alcalinização localizada, que, por vezes, pode levar a uma alta na atividade da mesma arginase que possui, *in vitro*, pH ótimo acima de 9,5 (Jenkinson *et al.*, 1996). Assim, a reciclagem de ureia, que protege os tecidos de danos por toxicidade, permite a reciclagem de nitrogênio endógeno ou exógeno (Witte *et al.*, 2002) e, ainda mais, pode influenciar na reação da arginase e, assim, no pool de arginina celular. Por se conectar com a síntese de tantos compostos celulares (Figura 3), não só a reciclagem de ureia, mas a própria ação da urease pode ser importante na manutenção da homeostase celular geral das plantas em situações normais ou de estresse. Uma vez que a urease é regulada pelas concentrações de Ni disponível, é possível dizer que talvez exista uma forte ligação, ainda a ser

melhor estudada, entre o mineral e os compartimentos metabólicos citados até agora.

Urease: a primeira enzima vegetal dependente de Ni identificada

A urease é composta por uma unidade proteica que precisa de outras 3 proteínas acessórias para ter atividade e usa dois átomos de Ni em seu centro de reação para catalisar a hidrólise de ureia (Dixon *et al.*, 1975; Witte *et al.*, 2005; Follmer, 2008; Witte, 2011). Ela está presente na grande maioria dos seres vivos, por tanto, é uma proteína de presença evolutiva conservada (Mobey & Hausinger, 1989; Polacco & Havir, 1979; Hirayama *et al.*, 2000; Cox *et al.*, 2000).

A primeira urease vegetal a ser purificada foi da semente de feijoeiro (*Canavalia ensiformis*) e esta urease foi a primeira proteína a ser cristalizada da história. Sua cristalização abriu as portas para incontáveis descobertas científicas, entre elas, provar a natureza proteica das enzimas, sendo a urease de feijoeiro cerne do trabalho que ganhou o Prêmio Nobel de Química em 1946 (Sumner, 1926, Nobel Prize for Chemistry, 1946). Com o passar dos anos, a urease de *C. ensiformis* se tornou uma das enzimas mais bem caracterizada e estudada sendo, também, a primeira metaloenzima identificada como usuária de íons de Ni (Dixon *et al.*, 1975). A enzima, também se tornou interessante para os estudos de estrutura e mecanismos catalíticos pois, é capaz de sofrer o aumento de 10^{14} vezes na taxa de hidrólise de ureia, além de ser a única enzima hidrolítica a ter Ni em seu centro de ativação (Estiu *et al.*, 2006). Em plantas, como soja, foi possível identificar a presença de duas isoformas de ureases no genoma, uma está presente nos tecidos vegetativos (Hogan *et al.*, 1983; Torisky *et al.*, 1994) e outra nas sementes (Meyer-Bothling & Polacco, 1987; Bailey & Boulter, 1971). A primeira, chamada de “ubiquitous”, por estar em todos os tecidos vegetativos da planta, tem baixa atividade e concentração, a segunda está em sementes de forma abundante e com alta atividade no tecido reprodutivo, principalmente nas sementes. Outras plantas, porém, como batata (*Solanum tuberosum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) e *Arabidopsis thaliana* do ecótipo Columbia, possuem somente uma sequência da enzima no seu

genoma (Witte *et al.*, 2005). Desde a descoberta da enzima nas plantas, sua presença constitutiva nos organismos vegetais tem sido atestada segundo diversos estudos (Mobey & Hausinger, 1989; Polacco & Havir, 1979; Frankeberger & Tabatabai, 1982; Witte & Medina-Escobar, 2001; Mazzafera *et al.*, 2013).

A urease é uma enzima complexa. A apo-urease é formada por três proteínas, cada uma com sequências próprias no genoma: UreA, UreB e UreC (Witte *et al.*, 2005). Para a ativação da atividade catalítica são necessárias mais três proteínas, chamadas de acessórias: UreG (subunidade G), UreD (subunidade D) e UreF (subunidade F) (Figura 4). Com papéis distintos, as proteínas acessórias garantem a ligação de dois íons de Ni ao centro reativo, garantem a ligação da ureia na proteína e formam o centro de reação para que a catálise possa acontecer de forma correta. Em *A. thaliana* a apo-urease e cada subunidade possuem uma sequência cada no genoma e não apresentam variantes pós-transcricionais. Assim sendo, uma vez que a proteína urease está montada (apo-urease+UreG+UreD+UreF) a reação de hidrólise da ureia pode ocorrer.

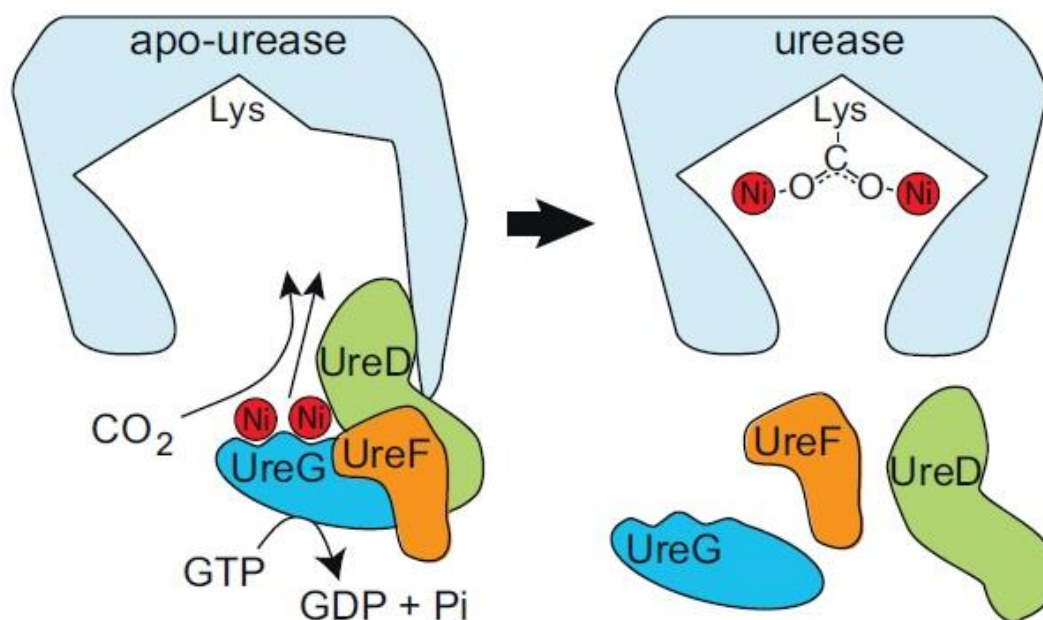


Figura 4: Formação da urease usando apo-urease e proteínas acessórias. UreG carrega íons de Ni para a centro catalítico da enzima. Fonte: Witte *et al.* (2005).

A reação de hidrólise da ureia acontece no citossol das células e é diretamente dependente da disponibilidade de Ni em seu ambiente (Witte, 2011; Polacco *et al.*, 2013). Por só ser ativa com esse metal, a atividade da urease é regulada pelas concentrações de níquel adquirido pela planta.

Objetivo

O objetivo desse trabalho foi verificar se a oferta de Ni pode causar alterações na reciclagem de N, via urease, quando ureia e arginina são fornecidas separadamente ou juntas com o metal, e também se a reciclagem é afetada em resposta à imposição de estresse hídrico.

Hipótese

Nossa hipótese é que o N da ureia, através da urease, pode conectar diferentes pools metabólicos, aumentando a eficiência do uso do N através da reciclagem do N entre os pools. O objetivo desse trabalho foi verificar se a oferta de Ni pode causar essas alterações.

Métodos

Desenho experimental e material vegetal

Foram realizados três experimentos, que são descritos a seguir. Nos três foram utilizadas plantas de *A. thaliana* ecótipo Columbia. Após o choque térmico das sementes (4°C por 4 dias consecutivos), semeadura foi feita diretamente em substrato composto por substrato comercial de jardinagem, vermiculita e perlita, na proporção 1:1:1 (v/v/v) em vasos de 0,5 litro de capacidade. Após 2 semanas foi feito o desbaste manual de forma que somente três plantas de tamanho semelhante restassem por vaso. Com um mês de idade as plantas foram usadas nos experimentos. Portanto, cada repetição biológica usada em todos os experimentos a seguir, corresponde a um vaso contendo três plantas de um mês de idade e de tamanho semelhante.

Todos os experimentos a seguir foram executados sob as mesmas condições de crescimento. Os vasos foram colocados em câmara de crescimento com temperatura constante de 20°C, umidade ao redor de 70% e 150 $\mu\text{mols.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ de luz branca e fotoperíodo de 8 horas de luz. As regas eram feitas a cada 3 dias pela adição de água destilada nos pratos coletores dos vasos.

Experimento 1: Aplicação combinada ou não de ureia e Ni

Foram utilizadas quatro repetições biológicas por tratamento, incluindo o controle. Os tratamentos foram:

- a) controle (sem adição de ureia ou Ni);
- b) solução aquosa de ureia a 0,5% aplicada nos pratos coletores dos vasos;
- c) aplicação de spray foliar de uma solução aquosa de 25 μM NiCl_2 com adição do espalhante foliar comercial Agral (0,01%);
- d) combinação dos tratamentos “b” e “c”.

Na aplicação do Ni o substrato foi protegido com algodão para que não escorresse para o solo. A pulverização não foi excessiva, evitando-se o escorrimento da solução pelas folhas.

Três dias após a aplicação dos tratamentos, foi feita a coleta das folhas de todas as plantas em nitrogênio líquido e depois armazenadas à -80°C. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas novamente à -80°C. As análises neste material foram de expressão gênica e quantificação relativa de metabólitos.

Experimento 2: Aplicação combinada ou não de Ni e arginina

Para esse estudo utilizou-se 9 repetições biológicas. Os tratamentos foram:

- a) controle;
- b) solução aquosa de arginina (50 μM) colocada no prato coletor dos vasos;

c) spray foliar com solução aquosa de NiCl_2 (25 μM) com a adição do espalhante adesivo comercial Agral (0,01%);

d) combinação dos tratamentos “b” e “c”.

As plantas foram coletadas, processadas e analisadas da mesma forma que no experimento 1.

Experimento 3: Estresse hídrico

Neste estudo foram utilizadas 9 repetições biológicas. O estresse hídrico foi aplicado por suspensão total da rega por 7 e 14 dias. Os grupos de controle receberam regas normalmente. As plantas foram coletadas, processadas e analisadas da mesma forma que nos experimentos 1 e 2.

Análises de expressão gênica

As sequências dos genes alvo (CDS) a serem analisados foram obtidas no banco de dados público TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>). Os primers foram desenhados com software Primer 3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Os genes analisados foram aqueles descritos na Figura 3. As sequências dos primers utilizados estão apresentadas no Apêndice 1. O primer para o gene da urease foi desenhado tendo como alvo a sequência da apo-urease. Pares de primers para os genes de actina e do fator de alongamento 1-alfa foram adquiridos e usados como genes constitutivos (Apêndice 1).

A extração do RNA total das amostras foi feita com o reagente comercial Tri Reagent (Sigma-Aldrich), de acordo com as especificações do protocolo fornecido pelo próprio fabricante. Após extração do RNA total as amostras foram tratadas com DNase (RNase-Free, Bioagency). A quantificação e verificação da qualidade do RNA extraído foi feita no equipamento NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific). A verificação da integridade do RNA foi feita em eletroforese gel de agarose contendo brometo de etídio e posterior observação em fotodocumentador sob luz UV (Gel Doc 2000, BIO RAD).

A síntese da fita simples de cDNA foi feita com o kit SuperScript IV (Thermo Fisher Scientific), seguindo o protocolo do fabricante.

As reações de PCR quantitativo em tempo real foram feitas de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante do reagente QuantiFast SYBR Green-PCR Mix (Qiagen). As reações tinham o volume final de 10 µL, sendo 5 µL do reagente “QuantiFast SYBR Green PCR Mix” (Qiagen), 0,2 µL de cada um dos primers (senso e antisenso), 3 µL de cDNA e 1,6 µL de água MilliQ fornecida no mesmo kit “QuantiFast SYBR Green PCR Mix”. As análises foram feitas usando o termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). O cálculo da curva de eficiência dos primers e de expressão gênica de cada gene foi feita no software do fabricante “StepOne™ Software”. O cálculo da expressão gênica relativa foi efetuado segundo o modelo $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Análise de metabólitos em HPLC-MS

Aproximadamente 100 mg de cada amostra foram extraídos com 1 mL de solução aquosa de 80% de metanol (Sigma-Aldrich) em tubos Eppendorf. Após homogeneização em vortex os extratos foram colocados por 30 min em banho de água com ultrassom. Em seguida os tubos foram centrifugados (15.000xg, 15 min, 4°C) e o sobrenadante foi recuperado, sendo armazenado a -80°C até o momento da análise em HPLC-MS

Todas as análises foram feitas em um “Ultra Performance Liquid Chromatography Acquity” (Waters) acoplado a um espectrômetro de massas TQD 157 triplo quadripolo (Micromass, Manchester, Inglaterra). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Waters Acquity BEH C18 (2,1 mm x 50 mm x 1,7 µm) e o gradiente de eluição foi de 8 minutos variando de 5% a 100% de acetonitrila (solvente B) em água MilliQ com 0,1% de ácido fórmico (solvente A). O fluxo foi de 0,2 mL.min⁻¹ e a temperatura da coluna de 30°C. A ionização foi em modo negativo com condições: capilar 3 kV e cone 50 V, temperatura da fonte de íons de 150°C e temperatura de dessolvatação de 300°C. Os espectros MS/MS foram obtidos por dissociação induzida por colisão (CID) com energia de colisão de 20 V. Para confecção da curva padrão das concentrações dos compostos analisados, padrões foram feitos e analisados pelo mesmo processo acima. Esses padrões foram feitos com a adição de 1 mg dos compostos alvos extra puros, da marca Sigma-Aldrich, em 1 mL de água

Milli-Q autoclavada. As curvas de concentração dos padrões foram constituídas de 5 pontos por curva.

Medição de potencial hídrico

O potencial hídrico no Experimento 3 foi medido utilizando uma Câmara de Scholander.

Análise estatística

As análises foram feitas no software R e os testes estatísticos aplicados foram o ANOVA e teste Tukey. O valor p, considerado significativo em ambos os testes, foi de $p < 0,05$.

Resultados

Experimento 1

A expressão urease (Figura 5A) apresentou variações entre os tratamentos aplicados. A adição de Ni aumentou, discretamente, o nível de expressão, com relação ao controle, em 1,3 vezes. A aplicação de ureia causou um aumento ainda maior da expressão, 3,2 vezes, sendo superado só pelo tratamento conjunto de Ni e ureia, com aumento de 5,7 vezes.

A adição somente do Ni diminuiu a expressão de arginase (Figura 5B). Nesse tratamento, o nível de expressão relativa foi de, aproximadamente, metade daquele quantificado no controle. Porém, a adição tanto de ureia quanto do metal em combinação com ureia elevou a expressão gênica da enzima, acima do grupo controle. Essa subida foi de, em média, 2,2 e 2,5 vezes, respectivamente, mas sem serem estatisticamente diferentes. Quase o mesmo cenário pode ser notado no caso da ADC1, (Figura 5C). Os tratamentos com ureia e ureia com Ni elevaram a expressão do gene dessa enzima muito acima do grupo controle, 5,6 e 7,1 vezes, respectivamente. Apesar disso, ambos os grupos têm níveis não diferentes de expressão relativa. Em contrapartida, a adição somente do Ni elevou o número de transcritos da ADC1 para além do

controle, mas, ainda abaixo dos outros dois grupos. Nesse grupo, o nível de expressão relativa foi de 1,9 vezes, aproximadamente. O gene da enzima ONAT, (Figura 5D), apresentou expressivo aumento em sua expressão com a aplicação de Ni com ureia, atingindo 33,1 vezes o nível médio do grupo controle. Os outros dois tratamentos elevaram a quantidade total de transcritos de 5 a 10 vezes o nível do controle, mas, além de expressivamente menores que o tratamento conjunto, esses valores parecem ser estatisticamente iguais.

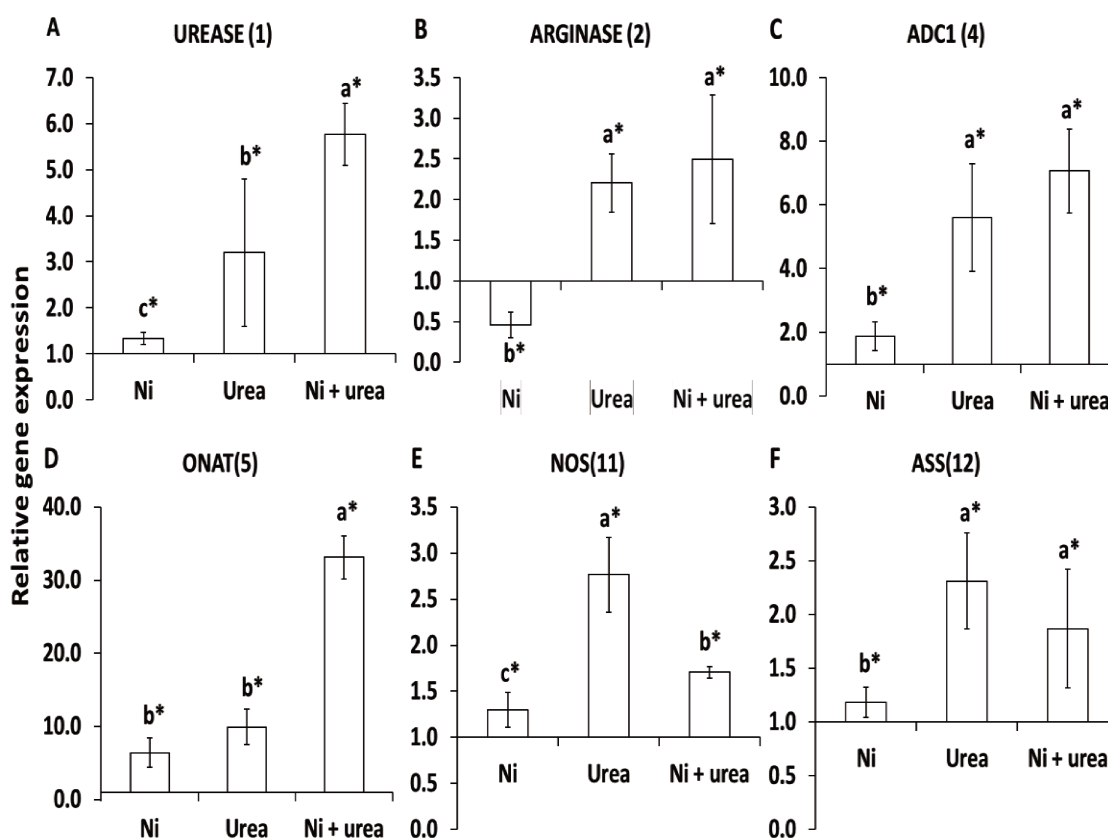


Figura 5: Expressão gênica no “Experimento 1: Ni e ureia” dos genes relacionados à biossíntese de poliaminas e citrulina. Asterisco indica diferença estatística em relação ao controle e letras indicam diferença estatística entre os tratamentos. Barras indicam o erro padrão.

A análise do gene NOS, (Figura 5E), revelou que a adição do Ni causou pequena perturbação com relação ao grupo controle, de apenas 1,3 vezes. Contudo, a expressão aumentou significativamente no grupo que recebeu ureia. Nessas plantas o aumento foi de 2,6 vezes o valor do controle. Na combinação de Ni e ureia a expressão do gene de NOS teve um pequeno aumento, de 1,7 vezes o nível do grupo controle. Essa diminuição foi significativa em comparação com o grupo que só recebeu ureia e significativamente maior do

que a do grupo com aplicação do Ni. A expressão do gene de ASS, (Figura 5F), teve um comportamento semelhante a ADC1, ou seja, a aplicação de ureia e a aplicação combinada de ureia e Ni aumentaram 2,3 e 1,8 vezes, respectivamente, mas não diferindo entre elas. Por outro lado, a aplicação apenas do metal praticamente não diferiu do controle.

Todos os tratamentos causaram elevação na expressão gênica da GS2 (Figura 6A) em relação ao grupo controle. A aplicação de Ni causou aumento de 8,7 vezes em comparação ao controle. A aplicação de ureia e de ureia combinada com Ni atingiu expressão semelhante, sendo seus valores 41,1 e 35,4 vezes maior que o controle, respectivamente. GLU2 (Figura 6B) não apresentou diferença nos níveis de expressão entre os tratamentos, porém, todos os tratamentos aumentaram a expressão em relação ao controle. A expressão de GLT (Figura 6C), pertencente à mesma família gênica de GLU2 e codante de uma enzima de ação semelhante, mostrou diferenças entre os tratamentos. Enquanto houve aumento de 2,8 vezes na aplicação combinada de ureia e Ni, a aplicação isolada de ureia e Ni aumentaram apenas 0,13 e 0,07 vezes o valor de expressão em relação ao grupo controle, não sendo significativas estas diferenças.

A expressão de ALDH (Figura 6D) não sofreu alteração significativa, com relação ao grupo controle com a aplicação do Ni. Porém, alterações significativas foram notadas com a aplicação de ureia ou de ureia com Ni, sendo os aumentos de 3,1 e 3,6 vezes, respectivamente, mas sem diferirem entre si. Apesar de participarem da mesma rota de produção de prolina, os padrões de expressão notados para ALDH (Figura 6E) e P5CR (Figura 6F) foram diferentes. O segundo gene mostrou diferenças significativas entre todos os grupos do experimento, sendo que o aumento de expressão foi bastante alto no tratamento combinado de ureia e Ni, de 90,2 vezes em relação ao controle. As plantas que receberam somente Ni aumentaram expressão em 20,5 vezes em relação às plantas controle. As que receberam apenas ureia, o aumento foi de 49 vezes.

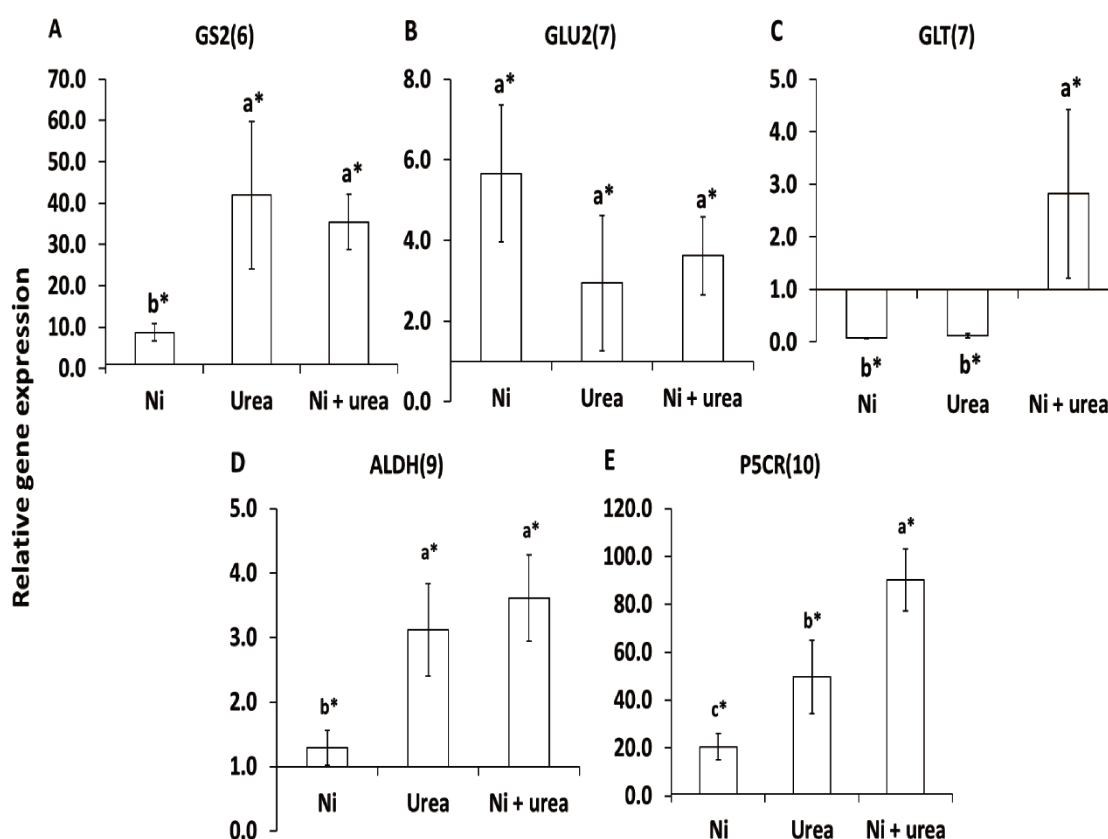


Figura 6: Expressão gênica no “Experimento 1: Ni e ureia” dos genes relacionados à biossíntese de aminoácidos. Asterisco indica diferença estatística em relação ao controle e letras indicam diferença estatística entre os tratamentos. Barras indicam o erro padrão.

Em relação às concentrações de arginina, citrulina, ornitina e ureia, os tratamentos, aparentemente, tiveram efeitos bem pronunciados (Figura 7). Arginina, ornitina e ureia (Figura 7A, 7B e 7D respectivamente) somente foram detectadas nos tratamentos em que ureia foi fornecida às plantas, associada ou não com Ni. Citrulina (Figura 7C) foi detectada em todos os tratamentos, mas as plantas que receberam ureia apresentam aumentos significativos quando comparadas às plantas controle ou que receberam apenas Ni, sendo o aumento de 3 a 5 vezes mais (Figura 7D).

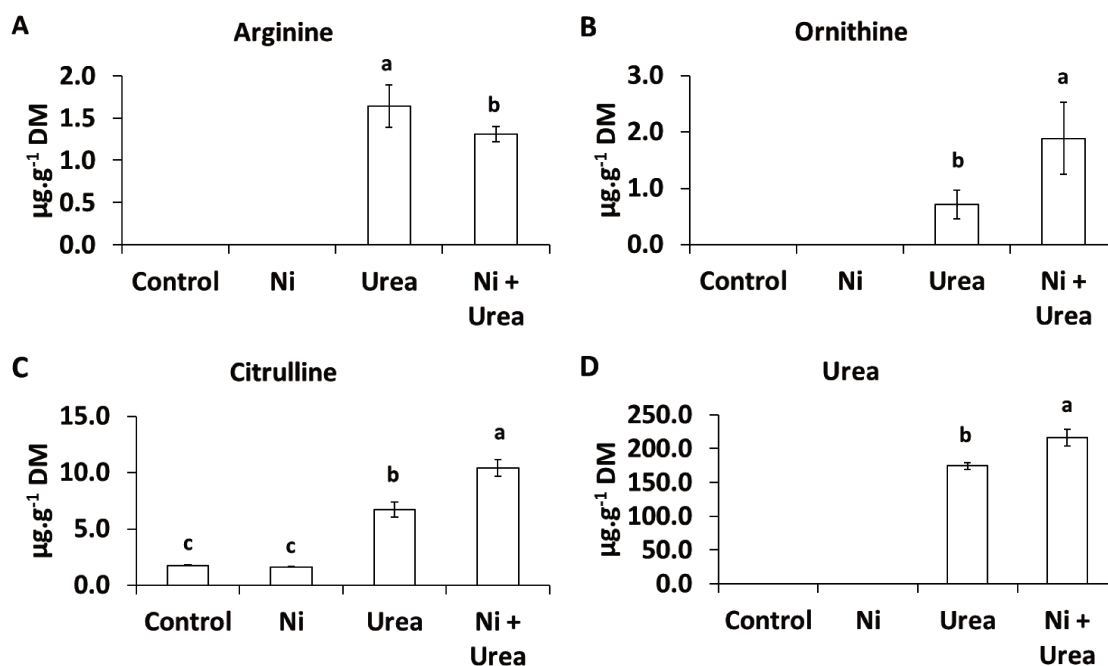


Figura 7: Quantificação de ureia e aminoácidos envolvidos na biossíntese de poliaminas no “Experimento 1: Ni e ureia”. Letras indicam diferença estatística entre os tratamentos. Barras indicam o erro padrão.

Agmatina foi detectada apenas nos tratamentos com uréia (Figura 8A). Nessas plantas foi observado que aplicação de apenas ureia levou a concentração de agmatina a $5,91 \mu\text{g.g}^{-1}$ sendo que quando ureia foi aplicada com Ni, o valor quantificado foi de $8,02 \mu\text{g.g}^{-1}$. Na via de síntese de poliaminas, agmatina é transformada em putrescina, que apenas não foi detectada no tratamento com apenas Ni (Figura 8B). O que se observou foi que, as plantas que foram submetidas à adição de ureia ou desse fertilizante com o metal, apresentaram concentrações menores de putrescina, sendo as quantidades $2,99 \mu\text{g.g}^{-1}$, $2,77 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $5,70 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente. As quantidades encontradas eram estatisticamente iguais nos três tratamentos. O segundo e terceiro passos da via de síntese de poliaminas são a formação de espermidina e de espermina, respectivamente. Ureia e Ni, aplicados isoladamente, causaram a diminuição de espermidina, porém, parece ter havido um efeito sinérgico quando foram aplicados juntos, restaurando o mesmo valor do controle (Figura 8C). Por outro lado, não houve este efeito em espermina, sendo que juntos ou não, ureia e Ni levaram à diminuição desse composto, comparativamente às plantas controle (Figura 8D).

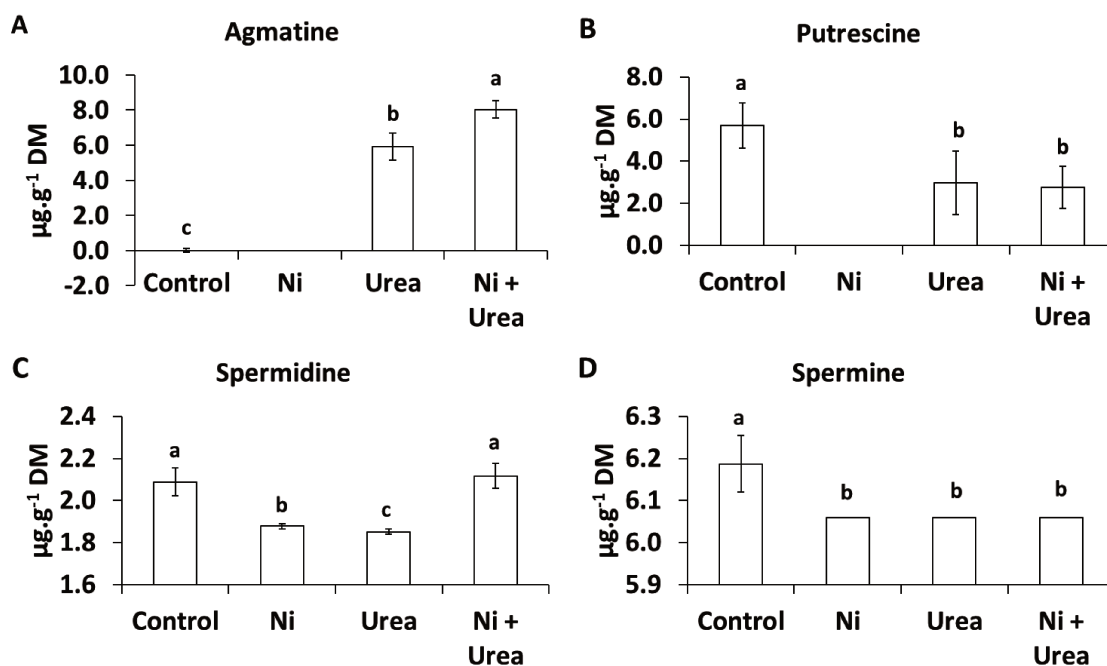


Figura 8: Quantificação de poliaminas no “Experimento 1: Ni e ureia”. Letras indicam diferença estatística entre os tratamentos. Barras indicam o erro padrão.

Em relação aos aminoácidos analisados, a aplicação isolada ou em conjunto de Ni e ureia levou ao aumento de prolina e GABA (Figura 9C e 9D, respectivamente). A aplicação de Ni sozinho não levou ao aumento de glutamina em relação ao controle, mas isto foi verificado quando ureia foi aplicada nas plantas. Por outro lado, Ni e ureia isoladamente levaram ao aumento de glutamato, mas juntos, o nível verificado foi igual ao observado com ureia, não se demonstrando um efeito sinérgico (Figura 9B). A adição de Ni, na concentração administrada para os tratamentos, não foi suficiente para gerar diferenças significativas nas concentrações de glutamina (Figura 9A), entre o grupo controle e o grupo que recebeu somente o metal. Os valores obtidos nos dois grupos foram de 15,66.

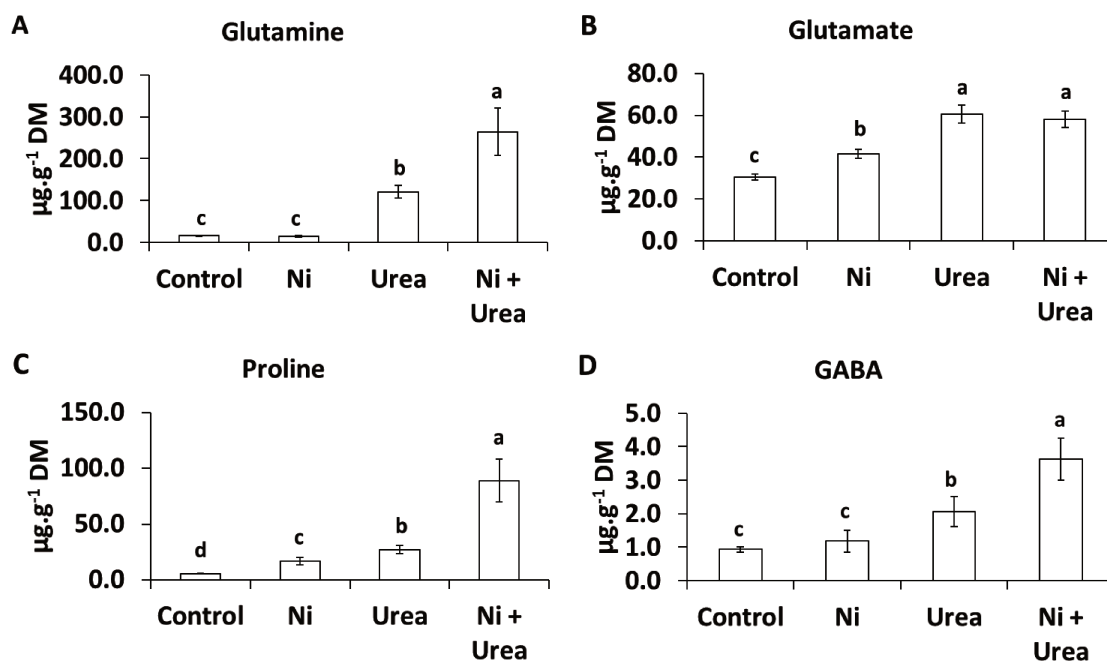


Figura 9: Quantificação de aminoácidos no “Experimento 1: Ni e ureia”. Letras indicam diferença estatística entre os tratamentos. Barras indicam o erro padrão.

Experimento 2

A expressão da urease (Figura 10A) foi alterada significativamente pelos tratamentos aplicados neste experimento. Plantas que receberam o spray de Ni tiveram o menor aumento, que foi de, aproximadamente 2 vezes. Porém, as plantas que receberam spray de arginina ou aquelas que receberam Ni e arginina não apresentaram diferenças significativas entre si, mas tiveram expressão significativamente maior que as plantas controle e as que receberam somente Ni. As plantas que receberam somente arginina mostraram 3,41 vezes de aumento na expressão quando comparadas ao controle. Plantas que receberam arginina e Ni tiveram 3,46 vezes de aumento na expressão em comparação ao controle.

Os genes de arginase e ADC1 tiveram comportamento semelhante ao de urease, ou seja, o aumento foi maior nos tratamentos em que arginina estava presente (Figura 10B e 10C, respectivamente). Plantas que receberam o tratamento com solução de arginina tiveram aumento 1,78 vezes na expressão de arginase, as que receberam Ni, 1,96 vezes, e as com arginina + Ni, 2,36

vezes. As plantas que receberam arginina não diferiram significativamente daquelas que receberam arginina + Ni.

No caso de ADC1, os três tratamentos foram significativamente diferentes do grupo de plantas controle (Figura 10C). As plantas que receberam a aplicação somente de arginina mostraram expressão 1,42 vezes maior em comparação ao controle. Já plantas com aplicação somente de Ni apresentaram expressão 0,81 vezes menor. Na aplicação simultânea de arginina e Ni, a expressão de ADC1 foi 1,26 vezes maior que a média do controle. Os tratamentos com arginina não diferiram entre si.

A quantificação da expressão dos genes ONAT e ASS mostrou comportamento semelhante, mas o aumento de expressão de ONAT foi muito maior (Figuras 10D e 10F). Plantas que receberam aplicação de arginina tiveram aumento na expressão de ONAT de 43,6 vezes em relação ao controle. As plantas que receberam a aplicação de Ni tiveram níveis 35,5 vezes maiores na expressão do gene ONAT. Plantas que receberam arginina + Ni aumentaram 31,6 vezes a expressão. Plantas pulverizadas com arginina não diferiram de plantas pulverizadas com Ni, mas plantas pulverizadas somente com arginina diferiram daqueles em que o aminoácido foi combinado com Ni.

Em relação ao gene ASS (Figura 10F), somente a aplicação de arginina aumentou a expressão 2,16 vezes mais que o valor do controle. Esse valor foi, além de significativamente diferente das plantas controle, o maior dentre os valores obtidos durante as quantificações desse gene. Plantas que receberam Ni e arginina + Ni aumentos de expressão de 1,77 vezes e 1,45 vezes, respectivamente, acima do valor do controle. Estatisticamente, os três grupos de tratamento foram diferentes do grupo controle e, também, diferentes entre si.

O gene de ONAT não foi o único a ter a expressão tão aumentada pelos tratamentos. O gene NOS (Figura 10E) também se mostrou bastante influenciável pelos tratamentos. As plantas tratadas somente com arginina e somente com Ni tiveram valores 29,34 e 34,01 vezes maiores que o valor do controle. Esses dois valores não foram significativamente diferentes. As plantas que receberam arginina + Ni tiveram expressão de NOS 46,55 vezes acima do controle. Neste caso, o último grupo de plantas citado teve diferença significativa quando comparado aos dois outros grupos.

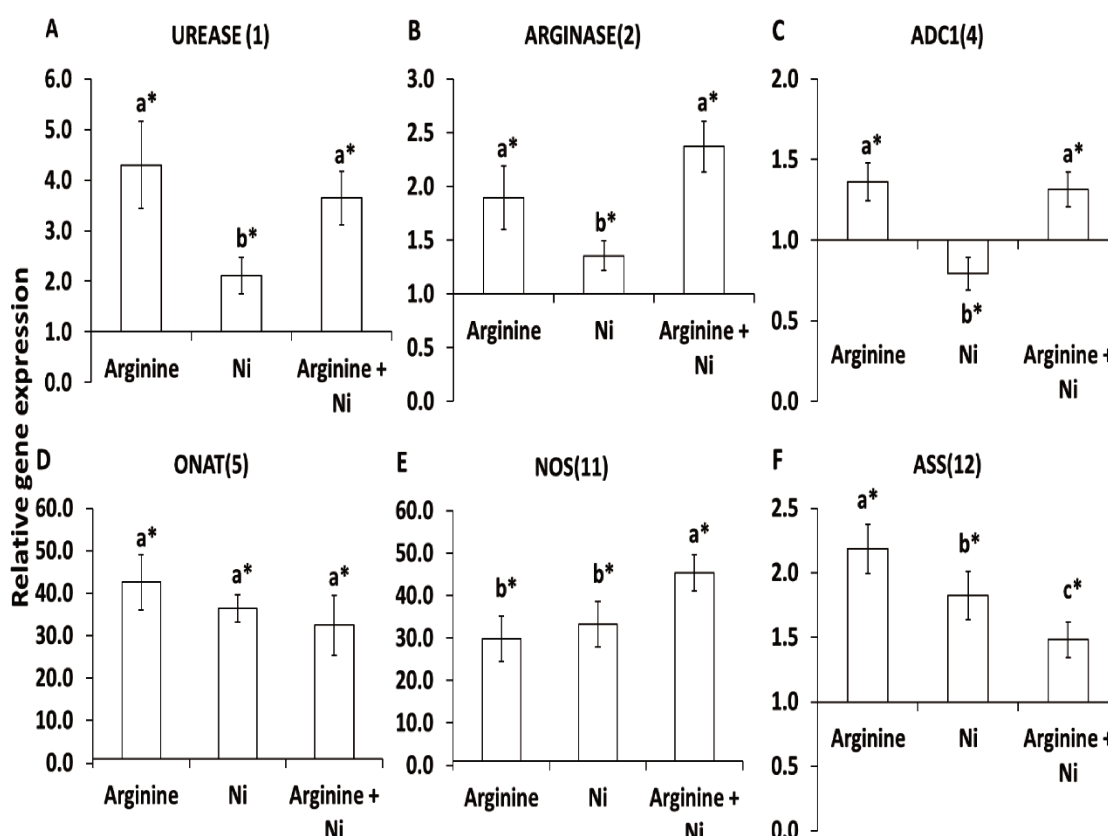


Figura 10: Expressão gênica no “Experimento 2: Ni e arginina” dos genes relacionados à biossíntese de poliaminas e citrulina. Asterisco indica diferença estatística em relação ao controle e letras indicam diferença estatística entre os tratamentos. Barras indicam o erro padrão

A expressão do gene GS2 foi influenciada pelos tratamentos realizados (Figura 11A). As plantas expostas a arginina tiveram quase 2 vezes de aumento na expressão quando comparadas ao controle. Plantas que receberam o spray de Ni tiveram valor 1,54 vezes maior e aquelas que receberam spray de arginina + Ni, 1,32 vezes maior que o controle. Na comparação dos valores obtidos, os dois últimos grupos de plantas não tiveram valores diferentes estatisticamente. Em contrapartida, o primeiro grupo de plantas foi diferente dos outros dois, mostrando um aumento da expressão de GS2 não só contra o controle, mas entre os tratamentos também.

Contrastando com o gene anterior, o gene GLT1 teve decréscimo dos níveis de expressão (Figura 11C). Plantas que receberam somente Ni ou em combinação com arginina foram as que tiveram maior redução de expressão, sendo de 0,04 vezes e 0,03 vezes, respectivamente. A diminuição foi menor no

tratamento somente com arginina, que foi de apenas 0,72 vezes o valor do controle.

De forma oposta, o gene GLU2 (Figura 11B) apresentou grande aumento na expressão em todos os tratamentos aplicados. As plantas com maior aumento foram aquelas expostas a arginina de quase 80 vezes na comparação com as plantas controle. Os outros dois grupos de plantas apresentaram valores médios de 39,59 e 57,56 vezes para a aplicação de Ni e de arginina+Ni, respectivamente. Apesar da diferença acentuada entre esses tratamentos, elas não são significativamente diferentes.

Diferente do Experimento 1, e também do 3, cujos resultados serão apresentados mais adiante, no experimento 2 foi possível detectar níveis de expressão do gene de OAT (Figura 11D). Houve aumento de expressão com a aplicação de arginina sozinha ou aplicação de arginina+Ni juntos, quando comparados ao controle. Os valores dessas plantas foram de 2,39 e 1,89 vezes mais, respectivamente. Os dois tratamentos não foram estatisticamente entre si. Além disso, o grupo de plantas que recebeu somente a aplicação de Ni aumentou a expressão significativamente em 1,22 vezes mais que o controle, mas ainda significativamente menor que os outros dois tratamentos.

No caso do gene de ALDH (Figura 11E), o tratamento combinado de arginina e Ni levou a um aumento de expressão de 67,36 vezes, ou seja, significativamente mais alto que o controle e os outros dois tratamentos, arginina e Ni, que tiveram 1,80 e 1,26 vezes o valor do controle, mas que não foram significativamente diferentes entre eles e em relação ao controle.

Para o gene de P5CR (Figura 11F) as plantas que receberam spray de Ni mostraram aumento da expressão em relação ao controle. Nas plantas que só receberam arginina, a expressão aumentou quase duas vezes mais que o controle, porém, sem ser diferente estatisticamente do controle. As plantas que receberam a aplicação somente do Ni tiveram aumento de expressão de 3,48, sendo significativamente maior que o controle, mas menor do que o aumento ocasionado pela aplicação conjunta de arginina e Ni, que foi de 5,34.

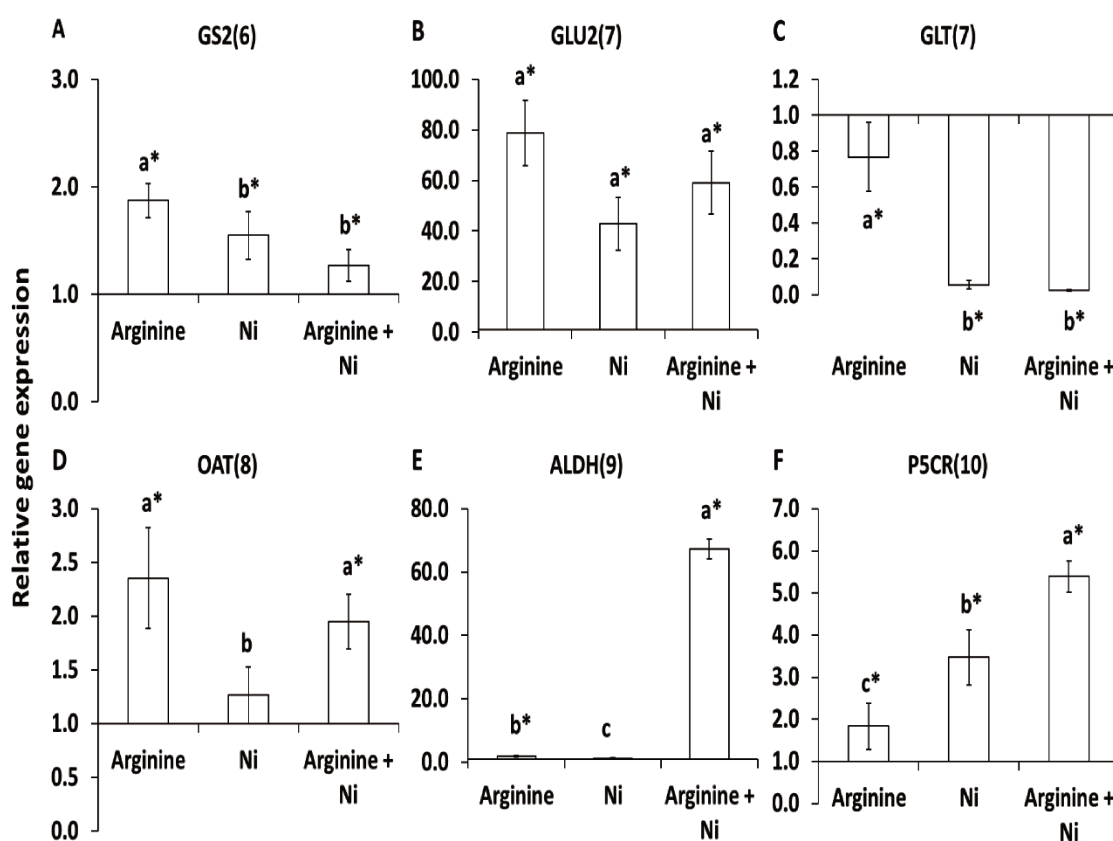


Figura 11: Expressão gênica no “Experimento 2: Ni e arginina” dos genes relacionados à biossíntese de aminoácidos. Asterisco indica diferença estatística em relação ao controle e letras indicam diferença estatística entre os tratamentos. Barras indicam o erro padrão.

As concentrações de arginina (Figura 12A) variaram entre os tratamentos e entre eles e o controle. Primeiramente, todos os valores dos tratamentos foram significativamente maiores que o valor do controle. As plantas que receberam a solução de arginina apresentaram $0,29 \mu\text{g.g}^{-1}$, que é 74% a mais do aminoácido que plantas do grupo controle. O aumento foi ainda mais acentuado no grupo que recebeu somente a solução de Ni, mas muito mais ainda quando a aplicação de arginina foi combinada com o Ni. Plantas que receberam Ni tiveram concentração de arginina de $0,41 \mu\text{g.g}^{-1}$, o que significa acréscimo na presença do aminoácido de 136% quando comparadas ao controle, de valor igual a $0,17 \mu\text{g.g}^{-1}$. Os valores das aplicações isoladas de arginina e Ni foram estatisticamente diferentes do controle e entre si. A combinação de arginina e Ni elevou o teor de arginina nas folhas para $2,48 \mu\text{g.g}^{-1}$, representando um acréscimo de 14,17 vezes o valor do controle.

Apesar de terem praticamente dobrado os valores do controle e serem estatisticamente diferentes dele, nenhum dos tratamentos aplicados diferiu entre si em relação ao teor de ornitina (Figura 12B). Apesar dos valores médios obtidos em todos os grupos de tratamento estarem acima do valor do controle, estatisticamente eles não são significativamente diferentes entre si.

A aplicação de arginina só ou combinada com Ni levou ao aumento significativo de citrulina quando comparados os valores com o controle e o tratamento com Ni. Os valores encontrados para o controle e o tratamento com Ni foram, respectivamente, 0,0036 e 0,0045 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Arginina aplicada sozinha elevou o nível de citrulina para 0,051 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e quando aplicada com Ni, para 0,19 $\mu\text{g.g}^{-1}$, valores que representam 14,2 e 52,3 vezes mais em relação às plantas do controle.

As concentrações de ureia nos tecidos de plantas dos três tratamentos aumentaram significativamente em relação ao controle (Figura 12D). Plantas tratadas com arginina tiveram, estatisticamente, as mesmas concentrações de ureia daquelas que receberam somente o Ni, mas plantas que receberam arginina+Ni o aumento de ureia foi significativamente. Arginina e Ni aplicados isoladamente apresentam os conteúdos de 6,9 e 7,77 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de ureia, respectivamente, representando um aumento médio de 1,6 vezes o valor das plantas controle, 4,7 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Plantas com arginina+Ni tiveram um aumento de 2,13 vezes mais ureia nos tecidos que plantas controle, atingindo o conteúdo de 10,02 $\mu\text{g.g}^{-1}$.

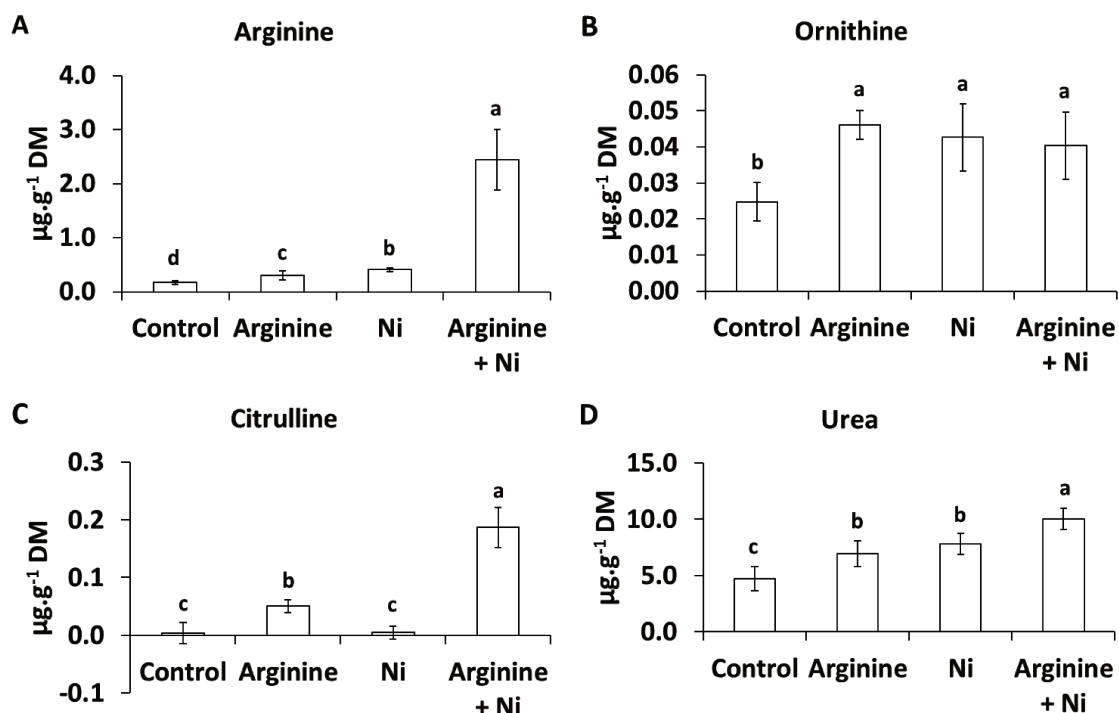


Figura 12: Quantificação de ureia e aminoácidos envolvidos na biossíntese de poliaminas no “Experimento 2: Ni e arginina”. Letras indicam diferença estatística entre os tratamentos. Barras indicam o erro padrão.

Os níveis de poliaminas nas plantas deste experimento são mostrados na Figura 13. Agmatina e espermidina (Figuras 13A e 13C, respectivamente) apresentaram os níveis mais baixos, sendo em média 1.300 x mais baixos que putrescina. Por sua vez, os níveis de putrescina (Figura 13B) foram ao redor de 50 vezes maior que espermina (Figura 13D).

O teor de agmatina teve aumento significativo nos tratamentos com Ni e arginina+Ni em relação ao controle, mas na aplicação isolada de arginina houve redução de 0,42 vezes. Plantas dos tratamentos com Ni e arginina+Ni tiveram valores 0,0072 e 0,0059 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente. Apesar da alta concentração de putrescina nas plantas dos tratamentos e do controle, não houve diferença estatística significativa entre elas.

Em plantas tratadas com arginina não foi possível detectar espermidina (Figura 13C). Em contrapartida, plantas do controle apresentaram níveis de espermidina de $6 \times 10^{-4} \mu\text{g.g}^{-1}$, valor não significativamente diferente daquele encontrado em plantas que receberam apenas Ni, $7 \times 10^{-4} \mu\text{g.g}^{-1}$. Porém, as plantas que receberam arginina+Ni tiveram concentração de $1 \times 10^{-3} \mu\text{g.g}^{-1}$ de

espermidina, representando um aumento de 1,54 vezes em relação ao controle. Espermidina é o precursor de espermina, cujo teor nas plantas que receberam arginina foi de $0,051 \mu\text{g.g}^{-1}$, o mesmo valor encontrado nas plantas controle. As plantas que receberam somente o Ni tiveram queda no conteúdo de espermidina, com valor de $0,039 \mu\text{g.g}^{-1}$, sendo significativamente menor que o controle e plantas com arginina. Por fim, a combinação do aminoácido com Ni aumentou espermidina nas plantas, $0,13 \mu\text{g.g}^{-1}$, sendo significativamente maior que o controle e os outros dois tratamentos.

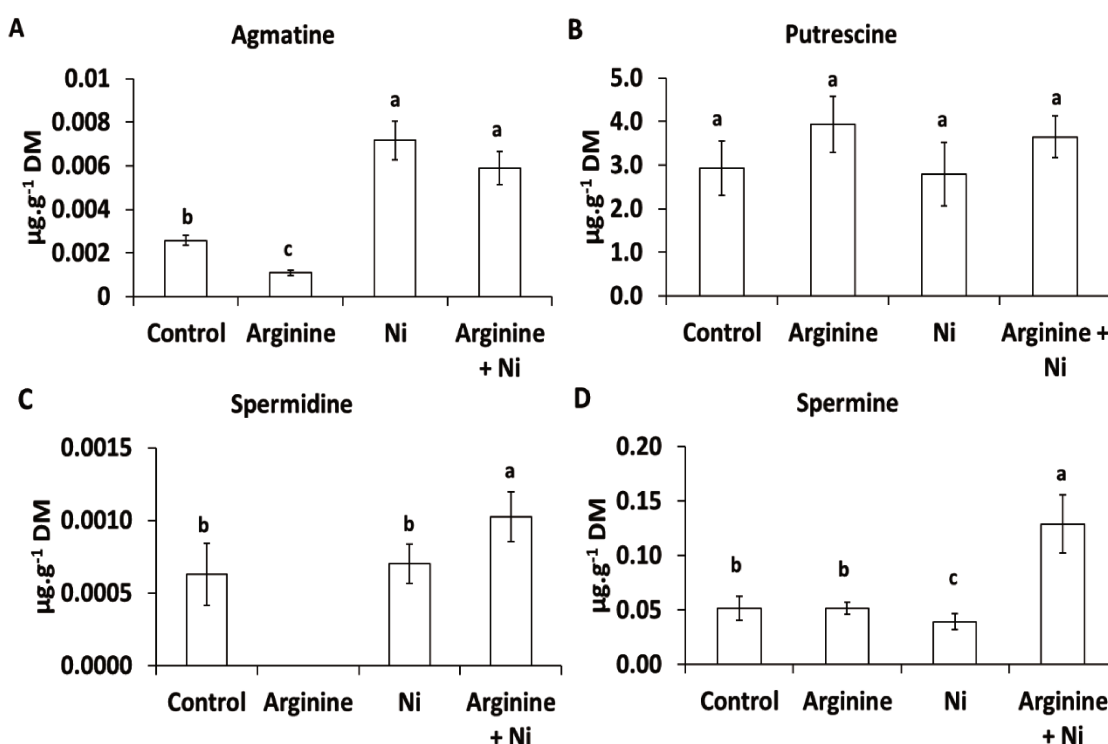


Figura 13: Quantificação de poliaminas no “Experimento 2: Ni e arginina”. Letras indicam diferença estatística entre os tratamentos. Barras indicam o erro padrão.

O tratamento com arginina isoladamente ou em associação com o Ni levou ao aumento de glutamina (Figura 14A). Por outro lado, o tratamento com Ni não afetou o teor desse aminoácido, ficando em semelhante ao controle, com valor ao redor de $0,01 \mu\text{g.g}^{-1}$. Arginina isoladamente elevou o teor de glutamina para $0,048 \mu\text{g.g}^{-1}$, enquanto que em associação com Ni o valor atingido significativamente maior, de $0,07 \mu\text{g.g}^{-1}$. Glutamato aumentou apenas no tratamento com arginina + Ni ($0,15 \mu\text{g.g}^{-1}$) sendo significativamente maior que o controle e os outros tratamentos, que não diferiram entre si e mostraram valores

médios próximos a $0,03 \mu\text{g.g}^{-1}$. Por sua vez, prolina aumentou de forma similar e significativamente nos três tratamentos quando comparados ao controle, mas não houve diferença entre eles (Figura 14C). Os valores encontrados para o controle e o valor médio dos tratamentos foram $6,6 \times 10^{-3}$ e $90,8 \times 10^{-3} \mu\text{g.g}^{-1}$, ou seja, um aumento de 13,81 vezes. O aminoácido GABA (Figura 14D) no tratamento com arginina teve aumento ($0,036 \mu\text{g.g}^{-1}$) de 4,3 vezes em relação ao controle, $0,0085 \mu\text{g.g}^{-1}$. Plantas dos outros dois tratamentos não tiveram valores significativamente diferentes entre si, sendo ao redor de $0,015 \mu\text{g.g}^{-1}$. Mesmo assim, com relação ao controle, esses números representam um aumento de 1,7 vezes maior que o controle.

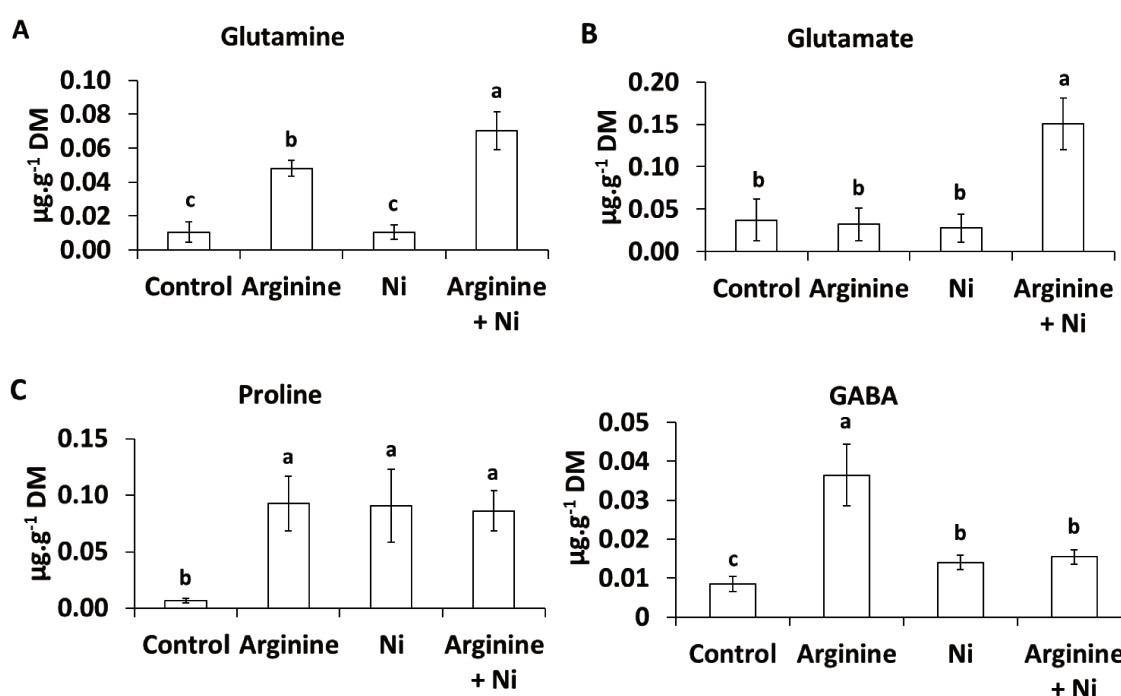


Figura 14 Quantificação de aminoácidos no “Experimento 2: Ni e arginina”. Letras indicam diferença estatística entre os tratamentos. Barras indicam o erro padrão.

Experimento 3

A aplicação de um tratamento de estresse hídrico se justifica por alterar o pool de prolina. Para verificar se as plantas realmente se encontravam em estado fisiológico de estresse por privação de água, foram medidos os potenciais hídricos das plantas após a suspensão da rega (Figura 15). No dia do

início do tratamento, dia 0, o potencial encontrado foi de -0,2 Mpa. Nas amostragens seguintes, os controles eram plantas que foram regadas diariamente e o potencial da água foi semelhante a -0,2 MPa. No dia 7, os valores dos potenciais hídricos das plantas continuaram próximos, mas aumentaram em relação do dia 0, ficaram entre -0,3 e -0,33 MPa. Não havia sinais de murcha nestas plantas. Depois de 14 dias sem rega, o potencial hídrico continuou caindo, ficando entre -0,38 e -0,42 MPa. Neste ponto, as plantas apresentavam folhas murchas (perda de turgidez) e, em algumas folhas, foram notadas áreas de amarelamento.

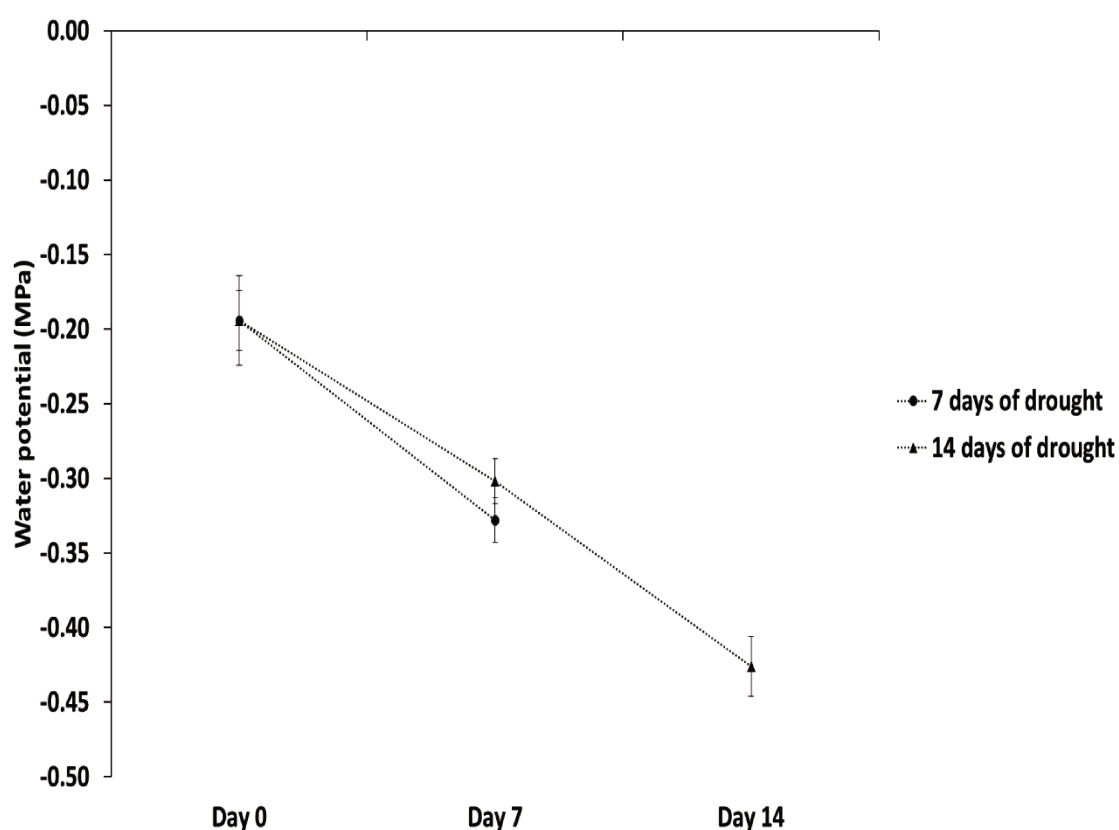


Figura 15: Valores de potencial hídrico obtidos durante os tratamentos de seca. As barras representam erro padrão.

As análises de expressão urease, arginase, ADC1, ONAT, NOS e ASS mostraram que de modo geral ou não houve alteração ou houve pequena redução aos 7 dias de estresse em relação ao controle do dia de coleta (Figura 16). Por outro lado, aos 14 dias de suspensão da rega houve aumento de

xpressão de todos os genes, alguns sendo maiores do que outro quando comparados ao controle. O maior aumento foi de arginase.

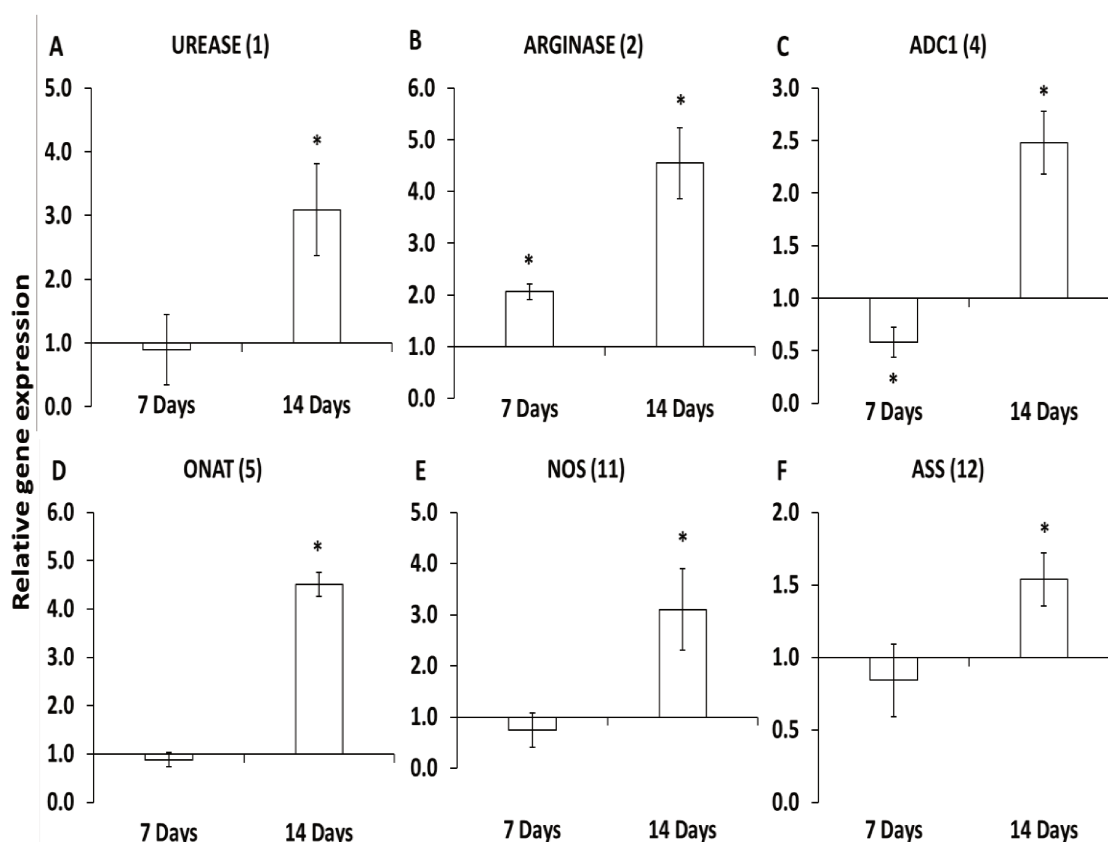


Figura 16: Expressão gênica no “Experimento 3: seca” dos genes relacionados à biossíntese de poliaminas e citrulina. Asteriscos indicam diferença estatística em relação aos controles irrigados de cada dia de coleta. Barras indicam o erro padrão.

Com exceção de GLT e ALDH, a análise de expressão dos outros três genes relacionados à biossíntese de aminoácidos apresentaram padrão diferente aos genes comentados acima (Figura 17). GS2 (Figura 17A) teve pequeno aumento de expressão nos três dias de amostragem após a suspensão da rega, sendo de 1,73 e 1,78 vezes maiores que os respectivos controles. As expressões dos dias 7 e 14 não foram significativamente diferentes de seus controles diários. Como comentado, GLT e ALDH (Figuras 17C e 17D, respectivamente) tiveram a expressão aumentada apenas no dia 14. Quanto ao gene P5CR (Figura 17E), sua expressão ficou abaixo da metade do controle na amostragem do dia 7. No dia 14, a expressão aumentou significativamente entre 2,5 em relação ao controle.

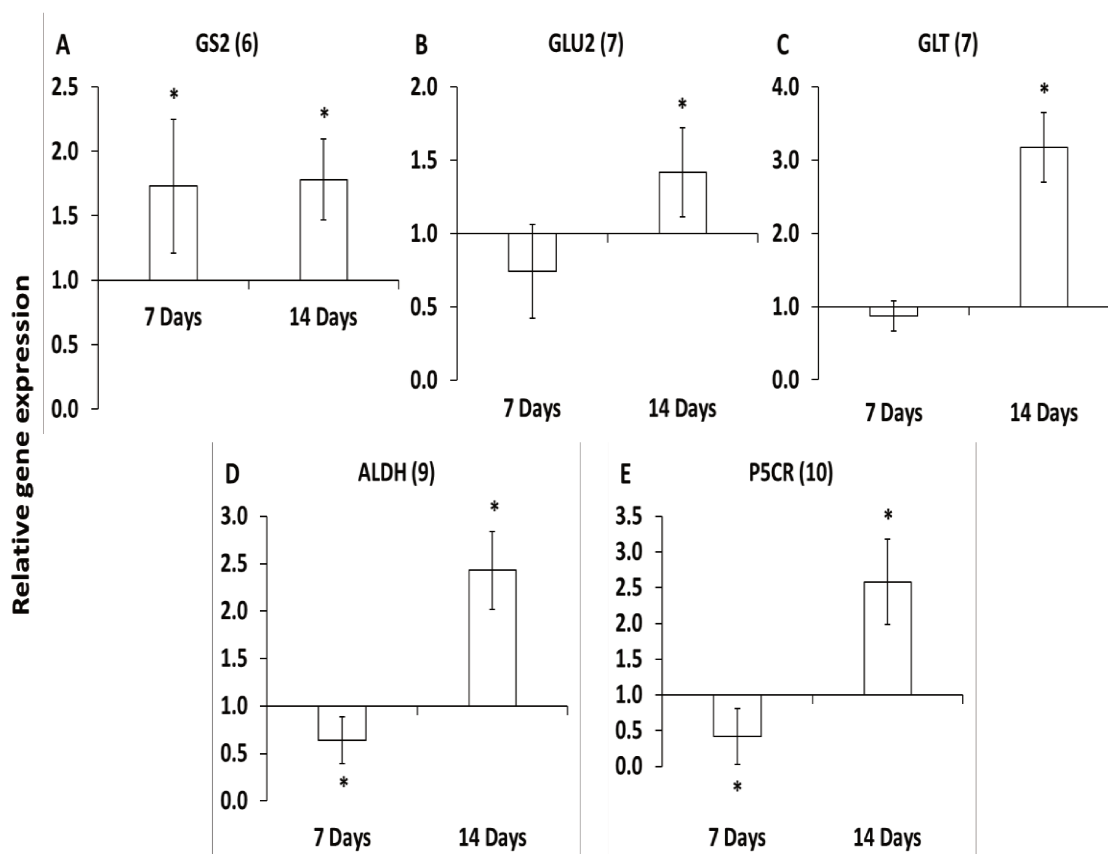


Figura 17: Expressão gênica no “Experimento 3: seca” dos genes relacionados à biossíntese de aminoácidos. Asteriscos indicam diferença estatística em relação aos controles irrigados de cada dia de coleta. Barras indicam o erro padrão.

Não foi possível detectar arginina ou ureia nas plantas desse experimento. As concentrações destes compostos, muito provavelmente, estavam abaixo do limiar de detecção do método empregado. Foram usadas amostras apenas dos dias 7 e 14. Citrulina foi encontrada em maior quantidade que ornitina (Figura 18A), mas não se verificou alteração entre os dias 7 e 14 e respectivos controles. Por outro lado, ornitina (Figura 18B) aumentou significativamente em relação ao controle no dia 7. No dia 14 ornitina foi detectada somente nas plantas estressadas, mas em quantidade menor que no dia 7.

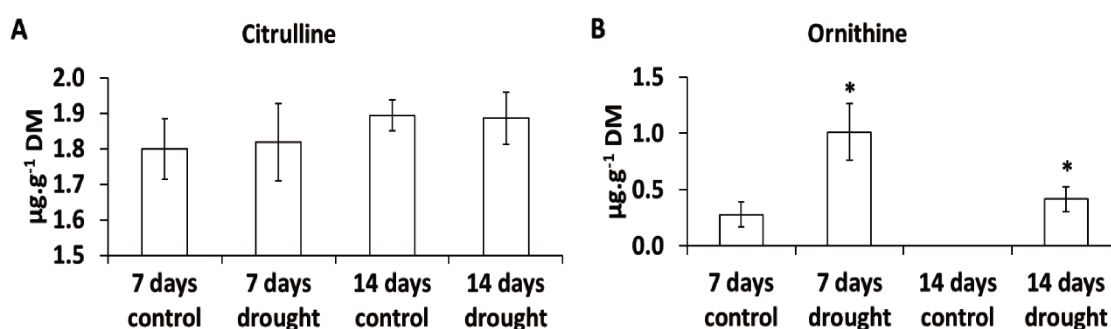


Figura 18: Quantificação de citrulina e ornitina no “Experimento 3: seca”. Asteriscos indicam diferença estatística em relação aos controles irrigados de cada dia de coleta. Barras indicam o erro padrão.

Assim como para a quantificação de arginina e ureia, não foi possível detectar agmatina nas plantas desse experimento. As plantas do dia 7 tiveram em média 23 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de putrescina (Figura 19A), estatisticamente maior que as plantas controle, que tiveram 18,14 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Os teores dessa poliamina no dia 14 variaram entre 21,6 e 19,97 $\mu\text{g.g}^{-1}$, nas plantas estressadas e respectivos controles, respectivamente, mas sem serem estatisticamente diferentes. Os teores de espermidina (Figura 19B) variaram entre 2,8 e 3 $\mu\text{g.g}^{-1}$, mas sem apresentarem diferenças entre os tratamentos e seus respectivos controles. Para espermina (Figura 19C), apenas as plantas do controle irrigado do dia 7 foram diferentes das plantas controle e estressadas do dia 14, com valor de 7,12 $\mu\text{g.g}^{-1}$.

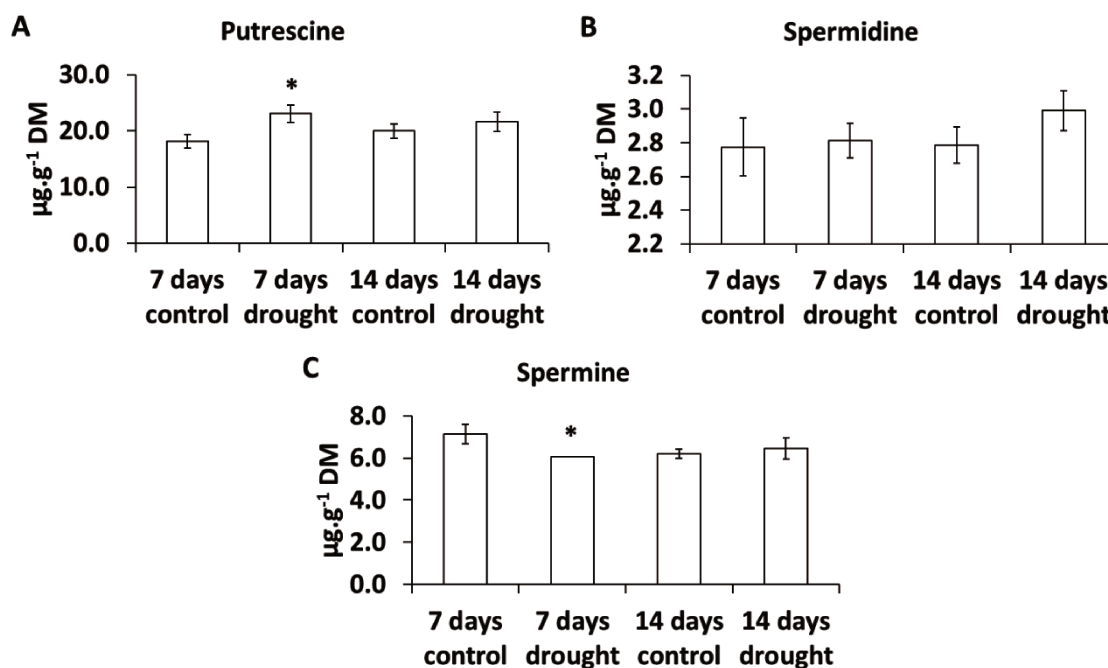


Figura 19: Quantificação de poliaminas no “Experimento 3: seca”. Asteriscos indicam diferença estatística em relação aos controles irrigados de cada dia de coleta. Barras indicam o erro padrão.

Como esperado, a maior variação entre os aminoácidos analisados foi de prolina (Figura 20C). Enquanto glutamato pouco variou entre plantas controle e estressadas (Figura 19B), glutamina (Figura 20A) reduziu em plantas estressadas aos 14 dias de estresse e GABA (Figura 20D) reduziu aos 14 dias tanto em plantas estressadas e controle, mas mais nas estressadas. As plantas controle do dia 7 (Figura 20C) tinham teor de prolina de $9,84 \mu\text{g.g}^{-1}$, aumentando para $19,03 \mu\text{g.g}^{-1}$ nas plantas estressadas. Aos 14 dias, aquelas do controle com irrigação tinham $17,70 \mu\text{g.g}^{-1}$ e as estressadas $51,95 \mu\text{g.g}^{-1}$.

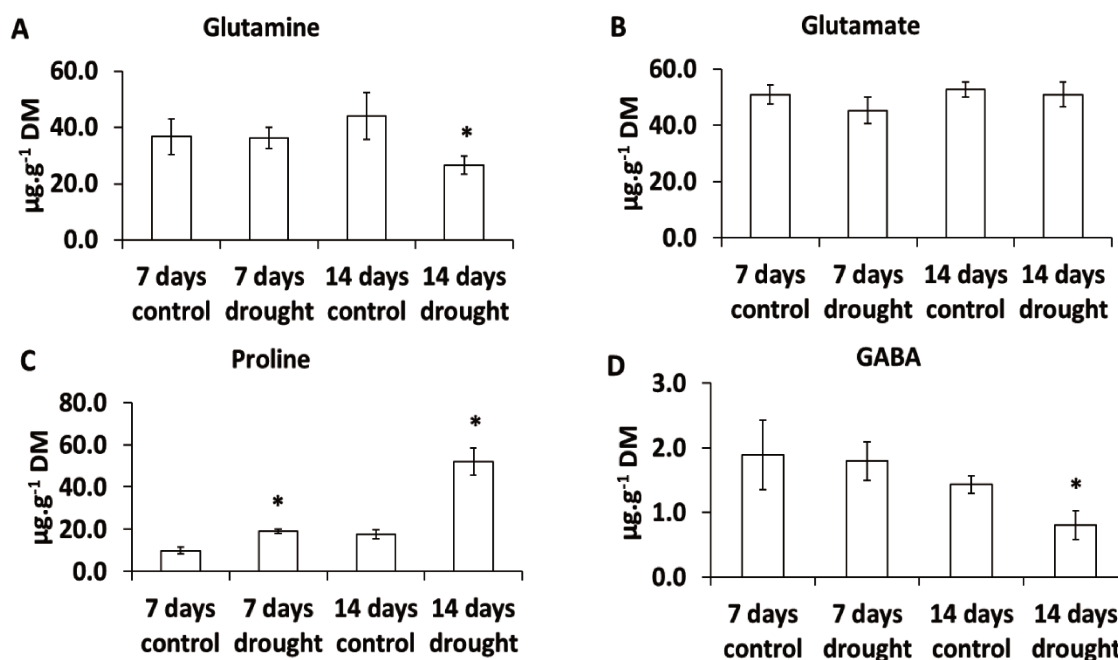


Figura 20 Quantificação de aminoácidos no “Experimento 3: seca”. Asteriscos indicam diferença estatística em relação aos controles irrigados de cada dia de coleta. Barras indicam o erro padrão.

Discussão

Experimento 1: ureia e Ni

A ureia oferecida no Experimento 1 foi absorvida e metabolizada pela enzima urease, fazendo o seu nitrogênio disponível para o metabolismo vegetal. A forma de administração desse tratamento, adicionando a solução no prato sob os vasos, foi escolhida para que uma quantidade suficiente do fertilizante pudesse ser absorvido e transportado para a parte aérea das plantas. Foi levado em conta que o composto nitrogenado estaria sofrendo metabolização pelos microrganismos do substrato nos vasos e esse nitrogênio estaria sendo disponibilizado através de formas mais acessíveis como nitratos e amônio (Miller & Cramer, 2004; Yang *et al.*, 2015). Porém, as raízes estariam em contato com volume suficiente da solução para que o transporte direto de ureia acontecesse para as folhas. Isso porque, as raízes de *A. thaliana* possuem transportadores capazes de transportar ureia para dentro da planta e esse composto poderia seguir para as folhas (Liu *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2015). Uma vez disponível, o

nitrogênio pode ter dois destinos: entrar na formação de arginina ou de glutamina (ver figura 3). As plantas que receberam ureia ou ureia+Ni no experimento 1 mostraram maiores concentrações de ureia em seus tecidos, mas chama atenção que nas plantas do tratamento ureia+Ni o nível foi maior.

O aumento de ureia foi acompanhado por um aumento de vários compostos, mas principalmente aminoácidos, tanto aqueles que estão na rota de biossíntese de poliaminas e citrulina como também de glutamato, glutamina, prolina e GABA. Com exceção de arginina e glutamato, ureia+Ni induziram maiores níveis do que apenas ureia. Apenas ureia e ureia+Ni também induziram aumento de agmatina, mas não houve aumento dos compostos subsequentes na rota de poliaminas, ao contrário, houve redução de putrescina, espermidina e espermina, em relação ao controle. É importante citar que o vacúolo pode ser um destino importante para o equilíbrio de ureia nas células (Liu *et al.*, 2003; Martinoia *et al.*, 2006), assim não todo o fertilizante nitrogenado que chegou para as folhas das plantas, estaria disponível para ser metabolizado pela urease, uma enzima citoplasmática. No caso da ureia presa no vacúolo, seu nitrogênio não estaria prontamente disponível para formar novas moléculas mas, seria detectado no método de análise do experimento.

Ni aplicado sozinho teve pouco efeito em todos os compostos analisados, sendo este efeito menor ainda que ureia aplicada sozinha, indicando que existe uma associação positiva entre ureia e Ni. Essa associação pode ser explicada pela maior expressão de urease nas plantas que receberam ureia e ureia+Ni, sendo maior a expressão no segundo caso. Urease é dependente de Ni para sua ativação (Polacco *et al.*, 2013) e tanto o metal quanto a ureia podem ser fatores regulatórios da sua atividade e de sua expressão (Polacco *et al.*, 2013; Mazzafera *et al.*, 2013). Numa situação de alta concentração intracelular de ureia, a disponibilidade de Ni é crucial para a metabolização do composto (Polacco *et al.*, 2013). Mesmo que pouco influente para a expressão da urease quando aplicado sozinho, o Ni parece ter papel regulatório importante dessa expressão quando aplicado com a ureia.

Sabidamente, além de sua importância na síntese de proteínas, arginina constitui uma importante reserva de nitrogênio na maioria das plantas (Polacco & Holland, 1993; Winter *et al.*, 2015). Os aumentos de arginina e agmatina nos tratamentos com ureia foram seguidos pela maior expressão de

arginase e ADC1, mas nesse caso não houve diferenciação de expressão em relação à adição de Ni. É sabido que, o pH ótimo *in vitro* para arginase é ao redor de 9,5 (Jenkinson *et al.*, 1996), e uma vez que ureia é um agente alcalinizante, o aumento de expressão de arginase, assim como de urease, pode refletir uma tentativa de redução de ureia solúvel.

Apesar do aumento observado de arginina e agmatina, isto não se refletiu na biossíntese de outras poliaminas, i.e., putrescina, espermidina e espermina. Em parte, isto poderia ser explicado pelo aumento de citrulina, que desviaria parte da arginina que poderia ser usada na biossíntese de poliaminas. Estes aumentos de concentrações foram seguidos por aumentos nas expressões dos genes relacionados. Assim, além de arginase e ADC1, houve aumento na expressão de NOS e ASS, sendo que aqui também não se observou o efeito associado de ureia+Ni. Oposto a biossíntese de arginina, também houve aumento de ornitina e da expressão de ONAT.

Entre os genes associados à biossíntese de glutamina, ácido glutâmico e prolina, que claramente aumentaram com ureia, houve aumento na expressão de GS2, ALDH e P5CR, mas não de GLU2, que está envolvida na biossíntese de glutamato. Por outro lado, o tratamento com ureia+Ni causou aumento de GLT, que também está envolvida na biossíntese de glutamato. GLU2 indica a enzima glutamato sintase dependente de ferredoxina, enquanto GLT indica glutamato sintase dependente de NADH, que é principalmente encontrada em tecidos não clorofilados, como raízes, meristemas apicais, feixes vasculares entre outros (Konishi *et al.*, 2014). GLU2 é expressa predominantemente em folhas. Dessa forma, não deixa de ser uma surpresa a expressão aumentada do tratamento ureia+Ni.

A glutamina é a amina originada da incorporação do nitrogênio amoniacal em moléculas de glutamato e é a principal porta de entrada do nitrogênio nas células vegetais. O aumento de glutamina em relação ao fornecimento de Ni foi observado por Lin *et al.* (2007). Apesar disso, os autores notaram que o acúmulo de glutamina tinha pouca ligação com o acúmulo de prolina. Neste caso, o glutamato, produzido a partir de glutamina era metabolizado para compostos como GABA. Da mesma forma, o acúmulo de ornitina não foi tido como responsável pelo acúmulo de prolina, mas sim a diminuição na metabolização de prolina dentro das células e hidrólise proteica.

No caso desse estudo, é possível dizer que o acúmulo de glutamina pode ter sido resultado da maior incorporação de N amoniacal durante o fornecimento de Ni.

O conteúdo de GABA também aumentou nas plantas tratadas com ureia, sendo maior com a presença de Ni. Uma vez que GABA no tratamento com Ni apenas se manteve no mesmo nível do controle, presume-se que não houve um efeito de estresse por este metal, como observado em várias plantas. GABA é um forte sinalizador de estresses em plantas (Kinnersley & Turano, 2000), mas o nível de ureia usado aqui é aquele comum na pulverização de plantas no campo, como forma de fornecimento de N via foliar. Assim, o efeito observado pode ser uma resposta ao simples fornecimento de N, uma vez que a biossíntese de GABA está intimamente associada ao metabolismo primário de N em plantas (Michaeli & Froom, 2015). De fato, a biossíntese de GABA se dá a partir de glutamato por ação da enzima glutamato descarboxilase.

Experimento 2: arginina e Ni

Como esperado, o fornecimento de arginina, sozinha ou em combinação com Ni, levou ao aumento de arginina nas folhas de *A. thaliana*. Assim como para a ureia, plantas são capazes de captar aminoácidos via suas raízes usando transportadores celulares (Svennerstam *et al.*, 2008). Dessa forma, é possível dizer que a arginina fornecida pôde ser absorvida, transportada e metabolizadas nas folhas das plantas estudadas. Entretanto, o aumento notado nos resultados foi muito maior, da ordem de quase 6 vezes, quando arginina foi aplicada com Ni, indicando um efeito sinérgico. Curioso também foi o fato de que o aumento de arginina com fornecimento de Ni sozinho foi maior do que o fornecimento do aminoácido sozinho. Este efeito sinérgico entre arginina e Ni muito provavelmente não reside em atividade de enzimas relacionadas a síntese ou degradação deste aminoácido. Em certas espécies, a absorção de ureia pode ser favorecida pela deficiência de Boro (Yang *et al.*, 2015), nesse caso vemos uma relação entre a concentração de um nutriente e a absorção radicular do fertilizante, que pode ser uma alternativa para explicar

os dados mostrados. A concentração usada de NiCl_2 para a pulverização das plantas foi de 25 μM , um nível que eventualmente poderia ser tóxico às plantas e que poderia acarretar a produção de poliaminas, que podem atenuar estresses causados por metais (Choudhary, *et al.*, 2010; Shevyakoya *et al.*, 2011; Nasibi *et al.*, 2013, Minocha *et al.*, 2014). Nasibi *et al.* (2013) estudaram o efeito da aplicação de arginina, como precursora de poliaminas, na atenuação da toxicidade de Ni, sendo o aminoácido e o metal fornecidos para as raízes e em concentrações maiores do que as usadas aqui. Estes autores observaram que o fornecimento de arginina alterou bastante o padrão de enzimas relacionados ao metabolismo antioxidante e também a produção de peróxido, indicando uma ação protetiva. Observaram ainda que o fornecimento de arginina levou ao aumento de Ni nas folhas e sugeriram que, de forma similar a histidina, que complexa Ni e facilita seu transporte pelo xilema para a parte aérea, arginina poderia ter o mesmo efeito. Entretanto, em nosso experimento o Ni foi fornecido via foliar, e houve proteção para que não caísse no substrato, e arginina foi colocada como solução no prato sob o vaso contendo as plantas. Ni é móvel pelo floema (Yusuf *et al.*, 2011), mas o aumento de arginina endógena no tratamento indicaria que o Ni transportado para as raízes estaria facilitando a absorção de arginina ou seu transporte pelo xilema para a parte aérea. Entretanto, não parece haver limitação para absorção de arginina pelas raízes. Plantas absorvem aminoácidos do solo como fonte de N, assim como micorrizas associadas a elas, além do fato que em *A. thaliana* são conhecidos ao menos 53 transportadores de membrana associados à aminoácidos (Svennerstam *et al.*, 2008)

Curiosamente, arginina aplicada sozinha não ocasionou aumento de nenhuma poliamina, o que de certa forma não apoia a hipótese de Nasibi *et al.* (2013), na qual o fornecimento desse aminoácido induziria a biossíntese desses compostos. Estes autores, no entanto, não dosaram poliaminas em seu estudo. Por outro lado, arginina+Ni levou ao aumento maior das poliaminas agmatina, espermidina e espermina, mas não de putrescina. A relação entre toxicidade do Ni como metal e poliaminas tem sido exaustivamente estudada (Zhao *et al.*, 2008; Shevyakoya *et al.*, 2011; Nasibi *et al.*, 2013), o que poderia explicar o aumento de agmatina quando este metal foi aplicado sozinho. Entretanto, os níveis das outras poliaminas se mativeram semelhantes ao controle na pulverização de apenas Ni, sugerindo que não houve fitotoxicidade no

experimento. Cabe comentar que não se observou nenhum sintoma de toxicidade nas plantas, como, por exemplo, amarelecimento de folhas.

Vale ainda comentar que no experimento 1 os níveis de arginina nos tratamentos com ureia e ureia+Ni ficaram ao redor de $1,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ enquanto que no experimento 2, o tratamento arginina+Ni elevou o nível endógeno de arginina a quase o dobro disso. Porém, os níveis de ornitina, citrulina, e poliaminas foram bastante inferiores quando arginina foi usada como fonte de N, indicando que provavelmente muito do aminoácido absorvido tenha sido usado na biossíntese de proteínas. Uma grande diferença entre os tratamentos com ureia e arginina também pode ser vista nos níveis dos aminoácidos glutamina, glutamato, prolina e GABA. Apesar de essas diferenças poderem ser relacionadas ao metabolismo alterado das plantas em resposta aos tratamentos, elas poderiam também ser atribuídas ao fato dos experimentos 1 e 2 terem sido feitos em épocas diferentes, portanto, com variação entre as plantas.

O aumento da expressão de urease e arginase é concordante no sentido de que os tratamentos com arginina aumentaram a expressão de ambas, mostrando que havia degradação de arginina, gerando ureia. Entretanto, Ni aplicado sozinho aumentou o teor de arginina, mais até que arginina aplicada sozinha, o que não foi verificado na expressão de urease ou arginase. Ou seja, houve aumento de expressão, mas em menor grau que nos tratamentos com arginina aplicada isoladamente ou em associação com Ni. Isto indica que o Ni por si só mostra, e confirma os dados com ureia, tem uma influência no metabolismo de ureia, mas que o efeito é mais pronunciado mediante o fornecimento de uma fonte de N relacionada, ou seja, ureia ou arginina.

O efeito do fornecimento de arginina e Ni, combinados ou não, também foram observados na expressão de genes relacionados à biossíntese de citrulina e N-acetil-ornitina, i.e., ONAT e NOS, sendo muito mais pronunciados do que ADC da biossíntese de poliaminas. Estas altas expressões de ONAT e NOS poderiam ser explicadas pela possibilidade de ornitina ser sintetizada por uma via linear e uma cíclica. A via cíclica de produção de ornitina consiste em uma série de reações metabólicas que, usando glutamato, originam ornitina e N-acetilglutamato (Winter *et al.*, 2015). Esse composto segue por reações enzimáticas que produzirão N-acetilornitina, composto que pela ação da enzima N-acetilornitina-glutamato-acetiltransferase (NAOGAcT) gera ornitina e

regenera N-acetilglutamato para o ciclo. A via linear consiste na transformação enzimática de N-acetilornitina para ornitina de forma direta. Após formação de ornitina, seja de forma linear ou cíclica, acontece sua transformação em citrulina, argininosuccinato e arginina, nesta ordem. Dessa forma, o nitrogênio pode ser reciclado dentro da célula, saindo de arginina através da ureia e da urease e através de glutamato e ornitina voltar a arginina. Outro destino possível desse N é para prolina que pode ser produzida via OAT e ornitina. Essa via tem sido estudada como importante em situações de estresse abiótico (Anwar *et al.*, 2018) porém inexpressiva em situações não estressantes (Funck *et al.*, 2008).

O envolvimento da via linear de biossíntese de ornitina no experimento 3 encontra suporte na alta expressão de GLU2, fornecendo glutamato para a biossíntese de ornitina e de prolina, sendo que no caso deste último aminoácido houve grande aumento de expressão de ALDH, mas menos de P5CR. Desta forma, levando em conta os dados de expressão o efeito de arginina seria muito mais via metabolismo de ornitina do que de ureia.

Experimento 3: seca

Durante situações de privação hídrica, plantas lançam mão de diversas estratégias para economizar e absorver água, assim como para otimizar seu uso dentro de seus tecidos (Lipied *et al.*, 2013; Vishwakarma *et al.*, 2017).

Plantas quando submetidas a esse estresse podem sofrer danos de intensidades variadas a seus tecidos, indo desde o comprometimento do crescimento até a morte celular. Entre os mecanismos de sobrevivência das plantas está o aproveitamento dos nutrientes e minerais de forma otimizada, com a finalidade de produzir os compostos que efetivamente remediarão a quebra da homeostase, causada pelo estresse, e, mais além, garantirem a manutenção de estruturas danificadas e formação de novos tecidos para completarem seus ciclos de vida (Lipied *et al.*, 2013; Vishwakarma *et al.*, 2017). A biossíntese e acúmulo de prolina em plantas submetidas a estresse hídrico ilustra esta estratégia de plantas (Hare *et al.*, 1998; Verbruggen & Hermans, 2008; Szabados & Saviouré, 2010; Singh *et al.*, 2015; Zarattini *et al.*, 2017). Esse mecanismo é bem estudado nas plantas como uma das principais respostas contra seca. Sendo assim, estudos hoje em dia tem se concentrado principalmente em

descobrir os mecanismos que levam ao acúmulo de prolina em diferentes situações estressantes (Zanella *et al.*, 2016; Zarattini *et al.*, 2017; Anwar *et al.*, 2018).

Uma vez que o N amoniacal proveniente da degradação de ureia pode ser incorporado em glutamina e afetar o pool de glutamato, usado para a síntese de prolina, ou prolina ser sintetizada a partir de ornitina via mediação de OAT (Jun *et al.*, 2012), plantas de *A. thaliana* foram expostas a déficit hídrico para se verificar como poderia ser a modulação do fornecimento vindo de ureia.

A suspensão da rega mostrou uma queda acentuada no potencial da água nas plantas de *A. thaliana*. Esta queda se refletiu no aumento significativo de prolina, como esperado, sendo maior aos 14 dias sem água. A expressão de ALDH e P5CR também aumentou aos 14 dias, mas curiosamente com 7 dias de estresse foram menores que o controle. Eventualmente o aumento em prolina seria em função do uso do pool metabólico de glutamato, ou ornitina (Jun *et al.*, 2012). Ureia e arginina também poderiam estar contribuindo para a biossíntese de glutamato e, por consequência de prolina. Estas duas substâncias não foram detectadas nas plantas estressadas, mas, contraditoriamente, a expressão de urease e arginase foram aumentadas aos 14 dias em três e quatro vezes e meia em relação ao controle, respectivamente. A possibilidade do uso do N amoniacal para a biossíntese de aminoácidos não se refletiu no aumento de glutamato, o que poderia ser explicado pela sua canalização para a biossíntese de prolina. GABA, cuja síntese também tem como precursor glutamato, reduziu seu teor aos 14 dias, mostrando também provável canalização de glutamato para a biossíntese de prolina. Enquanto GS2 aumentou sua expressão aos 7 e 14 dias de estresse, o teor de glutamina diminuiu aos 14 dias. Eventualmente a queda dos níveis desse aminoácido poderia ter estimulado a expressão gênica.

O aumento de prolina não foi acompanhado pelo aumento no teor de glutamato, o que sugere seu uso intenso. Além de prolina, ornitina aumentou aos 7 e 14 dias de estresse, sendo maior o aumento no primeiro período. Os genes das enzimas do metabolismo de ornitina também aumentaram aos 14 dias de estresse, como ONAT, NOS e ASS. A síntese de prolina é possível através da enzima OAT e ornitina (Jun *et al.*, 2012; Zarattini *et al.*, 2017; Anwar *et al.*, 2018). Essa via produz P5C e posteriormente glutamato para as células. Entretanto, Funck *et al.* (2008) identificaram que, em *A. thaliana*, essa rota metabólica não

contribui significativamente para a síntese de prolina em situações fisiológicas não estressantes. Para os autores, a reação com OAT seria importante para a metabolização de arginina e ornitina, mas inexpressiva na síntese de prolina. Sendo assim, a principal via de síntese de prolina ainda seria a rota através de glutamato com as enzimas ALDH e P5CR em situações fisiológicas normais. Entretanto, Anwar *et al.* (2018) apontam a atividade de OAT para síntese e acúmulo de prolina como importante em situações de estresse abiótico como seca. Considerando isso, os resultados mostram que a ornitina pode estar sendo usada para produção de prolina, pois as concentrações do primeiro aminoácido são maiores que os controles e caem com 14 dias de estresse.

Curiosamente, entre as poliaminas detectadas neste experimento apenas o teor de putrescina aumentou, mas aos 7 dias, enquanto que a expressão de ADC1 reduziu neste período, mas aumentou ao redor de 3 vezes aos 14 dias. O papel de poliaminas em plantas submetidas à estresse hídrico tem sido bastante discutido e em *A. thaliana* a biossíntese de putrescina a partir de ornitina, via ODC, não foi ainda provada em plantas (Alcázar *et al.*, 2006). A aplicação de espermina em *A. thaliana* levou à proteção contra estresse térmico através da indução genes heat-shock (Sagor *et al.*, 2013). Mutantes de *A. thaliana* deficientes na produção de espermina são hipersensíveis ao estresse hídrico e o fenótipo era restaurado quando se fornecia espermina exógena (Yamaguchi *et al.*, 2007). Entretanto, isto não ocorria quando se usava outra poliamina, mostrando especificidade de resposta. No experimento 3, o teor de espermina diminuiu aos 7 dias de estresse, mas não se alterou em relação ao controle aos 14 dias.

Os dados desse experimento mostram que durante estresse hídrico é muito provável que a maior via de precursor, i.e., glutamato, para a síntese de prolina se dá via ornitina. Entretanto, a maior expressão de arginase e urease, e a não detecção de ureia mostra que o N amoniacal resultante da ação de urease pode estar sendo canalizado para a biossíntese de glutamato, que por sua vez será usado para a biossíntese de prolina

Conclusão

O Ni é um metal de transição importante em diversas áreas industriais e tecnológicas. Especificamente, no metabolismo de plantas, se sabe muito pouco sobre a ação do metal. Mesmo assim, ele é considerado como micronutriente para esses seres vivos e, assim, é necessário em quantidades ínfimas nos substratos de crescimento deles. Esse papel só lhe foi concedido por causa de seu papel como ativador da enzima urease vegetal que depende exclusivamente do metal para metabolizar a ureia intracelular em uma fonte de nitrogênio acessível ao metabolismo das plantas. Até hoje, os estudos sobre esse metal no metabolismo vegetal são limitados em quantidade e diversidade de abordagens e organismos modelos estudados. Considerando que a reação da urease é a única forma do nitrogênio dessa molécula se tornar acessível para as células, não é impossível imaginar que a importância desse metal, enquanto ativador da urease, pode atingir não só essa reação, mas deve ser capaz de afetar outras vias do metabolismo de nitrogênio em plantas.

Os resultados dos 3 experimentos conduzidos nesta tese mostram o papel importante da urease em reciclar o N de ureia proveniente da arginina. O experimento 3 mostra que durante falta de água, a reação de hidrólise de ureia permite que o N seja reciclado e assimilado para aminoácidos importantes na defesa contra o estresse, como prolina e GABA. Os experimentos 1 e 2 mostram que a disponibilidade do Ni para as plantas pode alterar o padrão de metabolização dos aminoácidos estudados. Mais do que isso, o padrão de metabolização dos aminoácidos é alterado novamente dependendo da fonte de nitrogênio disponível, quando administrada junto com o metal. De forma geral, as adições de diferentes fontes de nitrogênio com o metal alteraram os pools metabólicos que receberam o N metabolizado pela urease. As diferenças nas respostas obtidas nos casos de fornecimento de Ni, ureia, arginina, Ni+ureia e Ni+arginina sugerem que a influência desse metal não se limita aos compostos diretamente ligados à reação da urease. Sendo assim, compostos importantes na resposta à seca, como prolina, podem ser afetados pelo papel fisiológico do micronutriente, como visto no Experimento 3. Isto tem implicações práticas, uma vez que ureia tem sido usada em pulverizações de plantas e a potencialização

do uso do N de ureia por plantas demandaria a inclusão de Ni na calda de pulverização.

De outra forma, Ni tem sido incluído em misturas usadas na agricultura, acreditando-se que pode afetar a longevidade das folhas. Este assunto não foi o alvo desta tese, mas os resultados aqui obtidos mostram que em tais formulações, com a inclusão de ureia, poderiam ter um efeito duplo da ação do Ni. Todas as informações apresentadas podem contribuir para a melhora da formulação de fertilizantes com intuito de melhorar o aproveitamento dos nutrientes e otimizar o crescimento vegetal.

Referências

1. Adriano, D. C. (2001). Arsenic. In *Trace elements in terrestrial environments* (pp. 219-261). Springer, New York, NY.
2. Ahmad, M. S. A., Ashraf, M., & Hussain, M. (2011). Phytotoxic effects of nickel on yield and concentration of macro-and micro-nutrients in sunflower (*Helianthus annuus* L.) achenes. *Journal of hazardous materials*, 185(2-3), 1295-1303.
3. Alcázar, R., Marco, F., Cuevas, J. C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., ... & Altabella, T. (2006). Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology letters*, 28(23), 1867-1876.
4. Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., ... & Tiburcio, A. F. (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 231(6), 1237-1249.
5. Anwar, A., She, M., Wang, K., Riaz, B., & Ye, X. (2018). Biological roles of ornithine aminotransferase (OAT) in plant stress tolerance: Present progress and future perspectives. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3681
6. Appenroth, K. J., Krech, K., Keresztes, A., Fischer, W., & Koloczek, H. (2010). Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation. *Chemosphere*, 78(3), 216-223.
7. Arrunategui-Jimenez, J., Beron, W., Bertini, F., & Lopez, L. A. (1999). Nickel (2+) is a strong mitotic inhibitor of meristematic cells of *Allium cepa* root. *Biocell*, 23(2), 113-118.
8. Bai, C., Reilly, C. C., & Wood, B. W. (2006). Nickel deficiency disrupts metabolism of ureides, amino acids, and organic acids of young pecan foliage. *Plant physiology*, 140(2), 433-443.
9. Baccouch, S., Chaoui, A., & Ferjani, E. E. (1998). Nickel toxicity: effects on growth and metabolism of maize. *Journal of plant nutrition*, 21(3), 577-588.

10. Baccouch, S., Chaoui, A., & El Ferjani, E. (2001). Nickel toxicity induces oxidative damage in *Zea mays* roots. *Journal of plant nutrition*, 24(7), 1085-1097.
11. Bailey, C. J., & Boulter, D. (1971). Urease, a typical seed protein of the Leguminosae. *Chemotaxonomy of the Leguminosae*, 485-502.
12. Banu, M. N. A., Hoque, M. A., Watanabe-Sugimoto, M., Islam, M. M., Uraji, M., Matsuoka, K., ... & Murata, Y. (2010). Proline and glycinebetaine ameliorated NaCl stress via scavenging of hydrogen peroxide and methylglyoxal but not superoxide or nitric oxide in tobacco cultured cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74(10), 2043-2049.
13. Bausenwein, U., Millard, P., Thornton, B., & Raven, J. A. (2001). Seasonal nitrogen storage and remobilization in the forb *Rumex acetosa*. *Functional Ecology*, 15(3), 370-377.
14. Berton, R. S., Pires, A. M. M. M., de Andrade, S. A. L., de Abreu, C. A., Ambrosano, E. J., & da Silveira, A. P. D. (2006). Toxicidade do Ni em plantas de feijão e efeitos sobre a microbiota do solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41(8), 1305-1312.
15. Brooks, R. R., Lee, J., Reeves, R. D., & Jaffré, T. (1977). Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal of Geochemical Exploration*, 7, 49-57.
16. Brooks, R. R. (1987). *Serpentine and its vegetation: a multidisciplinary approach*. Dioscorides Press.
17. Brooks, R. R. (1998). *Plants that hyperaccumulate heavy metals: their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration, and phytomining*.
18. Brown, P. H., Welch, R. M., & Cary, E. E. (1987). Nickel: A micronutrient essential for higher plants. *Plant physiology*, 85(3), 801-803.
19. Brown, P. H., Welch, R. M., & Madison, J. T. (1990). Effect of nickel deficiency on soluble anion, amino acid, and nitrogen levels in barley. *Plant and Soil*, 125(1), 19-27.

20. Burd, G. I., Dixon, D. G., & Glick, B. R. (1998). A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3663-3668.
21. Burd, G. I., Dixon, D. G., & Glick, B. R. (2000). Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian journal of microbiology*, 46(3), 237-245.
22. Cairns, N. G., Pasternak, M., Wachter, A., Cobbett, C. S., & Meyer, A. J. (2006). Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiology*, 141(2), 446-455.
23. Caldovic, L., & Tuchman, M. (2003). N-acetylglutamate and its changing role through evolution. *Biochemical Journal*, 372(2), 279-290.
24. Chaney, R. L. (1999). Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems. Approaches and progress. *Phytoremediation of contaminated soil and water*.
25. Chen, C., Huang, D., & Liu, J. (2009). Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 37(4-5), 304-313.
26. Choudhary, S. P., Bhardwaj, R., Gupta, B. D., Dutt, P., Gupta, R. K., Kanwar, M., & Dutt, P. (2010). Changes induced by Cu²⁺ and Cr⁶⁺ metal stress in polyamines, auxins, abscisic acid titers and antioxidative enzymes activities of radish seedlings. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22(4), 263-270.
27. Collin, V. C., Eymery, F., Genty, B., Rey, P., & Havaux, M. (2008). Vitamin E is essential for the tolerance of *Arabidopsis thaliana* to metal-induced oxidative stress. *Plant, cell & environment*, 31(2), 244-257.
28. Coruzzi, G. M. (2003). Primary N-assimilation into amino acids in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 2.

29. Coruzzi, G., & Bush, D. R. (2001). Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. *Plant physiology*, 125(1), 61-64.
30. Cox, G. M., Mukherjee, J., Cole, G. T., & Casadevall, A. (2000). Perfect JR. *Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. Infect Immun*, 68, 443-448.
31. Crook, E. M., & Law, K. (1952). Glyoxalase: the role of the components. *Biochemical Journal*, 52(3), 492.
32. Crooke, W. M. (1956). Effect of soil reaction on uptake of nickel from a serpentine soil. *Soil Science*, 81(4), 269-276.
33. Cunin, R., Glansdorff, N., Pierard, A., & Stalon, V. (1986). Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiological reviews*, 50(3), 314.
34. DalleDonne, I., Milzani, A., Ciapparelli, C., Comazzi, M., Gioria, M. R., & Colombo, R. (1999). The assembly of Ni²⁺-actin: some peculiarities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1426(1), 32-42.
35. Davis, R. H. (1986). Compartmental and regulatory mechanisms in the arginine pathways of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews*, 50(3), 280.
36. Dixon, N. E., Gazzola, C., Blakeley, R. L., & Zerner, B. (1975). Jack bean urease (EC 3.5. 1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel. *Journal of the American Chemical Society*, 97(14), 4131-4133.
37. Dixon, N. E., Riddles, P. W., Gazzola, C., Blakeley, R. L., & Zerner, B. (1980). Jack bean urease (EC 3.5. 1.5). V. On the mechanism of action of urease on urea, formamide, acetamide, N-methylurea, and related compounds. *Canadian journal of biochemistry*, 58(12), 1335-1344.
38. Elser, J. J., Fagan, W. F., Subramanian, S., & Kumar, S. (2006). Signatures of ecological resource availability in the animal and plant proteomes. *Molecular biology and evolution*, 23(10), 1946-1951.

39. van der Ent, A., Baker, A. J., Reeves, R. D., Chaney, R. L., Anderson, C. W., Meech, J. A., ... & Echevarria, G. (2015). Agromining: farming for metals in the future?.
40. Epstein, E., Bloom, A.J., (2004). *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
41. Eskew, D. L., Welch, R. M., & Cary, E. E. (1983). Nickel: an essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. *Science*, 222(4624), 621-623.
42. Eskew, D. L., Welch, R. M., & Norvell, W. A. (1984). Nickel in higher plants: further evidence for an essential role. *Plant Physiology*, 76(3), 691-693.
43. Espartero, J., Sánchez-Aguayo, I., & Pardo, J. M. (1995). Molecular characterization of glyoxalase-I from a higher plant; upregulation by stress. *Plant molecular biology*, 29(6), 1223-1233.
44. Estiu, G., Suárez, D., & Merz, K. M. (2006). Quantum mechanical and molecular dynamics simulations of ureases and Zn β -lactamases. *Journal of computational chemistry*, 27(12), 1240-1262.
45. Ermler, U., Grabarse, W., Shima, S., Goubeaud, M., & Thauer, R. K. (1998). Active sites of transition-metal enzymes with a focus on nickel. *Current opinion in structural biology*, 8(6), 749-758.
46. Evans, H. J., Harker, A. R., Papen, H., Russell, S. A., Hanus, F. J., & Zuber, M. (1987). Physiology, biochemistry, and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. *Annual Reviews in Microbiology*, 41(1), 335-361.
47. Everhart, J. L., McNear Jr, D., Peltier, E., Van der Lelie, D., Chaney, R. L., & Sparks, D. L. (2006). Assessing nickel bioavailability in smelter-contaminated soils. *Science of the Total Environment*, 367(2-3), 732-744.
48. Fabiano, C., Tezotto, T., Favarin, J. L., Polacco, J. C., & Mazzafera, P. (2015). Essentiality of nickel in plants: a role in plant stresses. *Frontiers in plant science*, 6, 754.
49. Fageria, N. K., Baligar, V. C., & Clark, R. B. (2002). Micronutrients in crop production. In *Advances in Agronomy*(Vol. 77, pp. 185-268). Academic Press.

50. Follmer, C. (2008). Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry*, 69(1), 18-28.
51. Fontes, M. P. F., Camargo, O. D., & Sposito, G. (2001). Eletroquímica das partículas coloidais e sua relação com a mineralogia de solos altamente intemperizados. *Scientia Agricola*, 58(3), 627-646.
52. Foy, C. D., Chaney, R. T., & White, M. C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Annual review of plant physiology*, 29(1), 511-566.
53. Frankenberger, W. T., & Tabatabai, M. A. (1982). Amidase and urease activities in plants. *Plant and Soil*, 64(2), 153-166.
54. Funck, D., Stadelhofer, B., & Koch, W. (2008). Ornithine- δ -aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biology*, 8(1), 40.
55. Gajewska, E., Skłodowska, M., Słaba, M., & Mazur, J. (2006). Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biologia Plantarum*, 50(4), 653-659.
56. Gajewska, E., & Skłodowska, M. (2007). Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves. *Biometals*, 20(1), 27-36.
57. Gajewska, E., & Skłodowska, M. (2009). Nickel-induced changes in nitrogen metabolism in wheat shoots. *Journal of plant physiology*, 166(10), 1034-1044.
58. Gerendas, J., & Sattelmacher, B. (1999). Influence of Ni supply on growth and nitrogen metabolism of *Brassica napus* L. grown with NH_4NO_3 or urea as N source. *Annals of Botany*, 83(1), 65-71.
59. Ghasemi, R., & Ghaderian, S. M. (2009). Responses of two populations of an Iranian nickel-hyperaccumulating serpentine plant, *Alyssum inflatum* Nyar., to substrate Ca/Mg quotient and nickel. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), 260-268.
60. Ghosh, A., Kushwaha, H. R., Hasan, M. R., Pareek, A., Sopory, S. K., & Singla-Pareek, S. L. (2016). Presence of unique glyoxalase III proteins in plants indicates the existence of shorter route for methylglyoxal detoxification. *Scientific reports*, 6, 18358.

61. Ghosh, A., Pareek, A., Sopory, S. K., & Singla-Pareek, S. L. (2014). A glutathione responsive rice glyoxalase II, Os GLYII-2, functions in salinity adaptation by maintaining better photosynthesis efficiency and anti-oxidant pool. *The Plant Journal*, 80(1), 93-105.
62. Gjorgieva Ackova, D. (2018). Heavy metals and their general toxicity on plants. *Plant Science Today*, 5(1), 15-19.
63. Ojeda, A. G., Escobosa, A. R. C., Wrobel, K., Barrientos, E. Y., & Wrobel, K. (2013). Effect of Cd (II) and Se (IV) exposure on cellular distribution of both elements and concentration levels of glyoxal and methylglyoxal in *Lepidium sativum*. *Metallomics*, 5(9), 1254-1261.
64. Hare, P. D., Cress, W. A., & Van Staden, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, cell & environment*, 21(6), 535-553.
65. Sundaramoorthy, S., Kumar, D., & Vaijapurkar, S. G. (2008). A new chlorophycean nickel hyperaccumulator. *Bioresource technology*, 99(9), 3930-3934.
66. He, S., He, Z., Yang, X., & Baligar, V. C. (2012). Mechanisms of nickel uptake and hyperaccumulation by plants and implications for soil remediation. In *Advances in agronomy* (Vol. 117, pp. 117-189). Academic Press.
67. Hirayama, C., Sugimura, M., Saito, H., & Nakamura, M. (2000). Purification and properties of urease from the leaf of mulberry, *Morus alba*. *Phytochemistry*, 53(3), 325-330.
68. Hogan, M. E., Swift, I. E., & Done, J. (1983). Urease assay and ammonia release from leaf tissues. *Phytochemistry*, 22(3), 663-667.
69. Hoque, M. A., Uraji, M., Torii, A., Banu, M. N. A., Mori, I. C., Nakamura, Y., & Murata, Y. (2012). Methylglyoxal inhibition of cytosolic ascorbate peroxidase from *Nicotiana tabacum*. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 26(8), 315-321.
70. Hossain, M. A., Hossain, M. Z., & Fujita, M. (2009). Stress-induced changes of methylglyoxal level and glyoxalase I activity in

pumpkin seedlings and cDNA cloning of glyoxalase I gene. *Australian Journal of Crop Science*, 3(2), 53.

71. Iljin, V. (1991). Heavy metals in the plant-soil system. *Novosibirsk: Publ House Nauka*.

72. Izosimova, A. (2005). *Modelling the interaction between calcium and nickel in the soil-plant system*. Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL).

73. Jenkinson, C. P., Grody, W. W., & Cederbaum, S. D. (1996). Comparative properties of arginases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 114(1), 107-132.

74. You, J., Hu, H., & Xiong, L. (2012). An ornithine δ -aminotransferase gene OsOAT confers drought and oxidative stress tolerance in rice. *Plant Science*, 197, 59-69.

75. Kabata-Pendias, A.; Pendias, H. (2001). Trace elements in soil and plants. Boca Raton, CRC PRes, 3^a Ed, 413.

76. Kalapos, M. P. (2008). The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chemico-biological interactions*, 171(3), 251-271.

77. Karimian, N. (1995). Effect of nitrogen and phosphorus on zinc nutrition of corn in a calcareous soil. *Journal of plant nutrition*, 18(10), 2261-2271.

78. Kaur, C., Kushwaha, H. R., Mustafiz, A., Pareek, A., Sopory, S. K., & Singla-Pareek, S. L. (2015). Analysis of global gene expression profile of rice in response to methylglyoxal indicates its possible role as a stress signal molecule. *Frontiers in plant science*, 6, 682.

79. Kaur, C., Sharma, S., Singla-Pareek, S. L., & Sopory, S. K. (2015). Methylglyoxal, triose phosphate isomerase, and glyoxalase pathway: implications in abiotic stress and signaling in plants. In *Elucidation of abiotic stress signaling in plants* (pp. 347-366). Springer, New York, NY.

80. Kaur, C., Sharma, S., Singla-Pareek, S. L., & Sopory, S. K. (2016). Methylglyoxal detoxification in plants: Role of glyoxalase pathway. *Indian Journal of Plant Physiology*, 21(4), 377-390.
81. Kazemi, N., Khavari-Nejad, R. A., Fahimi, H., Saadatmand, S., & Nejad-Sattari, T. (2010). Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in leaves of *Brassica napus* L. under nickel stress. *Scientia Horticulturae*, 126(3), 402-407.
82. Khoshgoftarmanesh, A. H., Hosseini, F., & Afyuni, M. (2011). Nickel supplementation effect on the growth, urease activity and urea and nitrate concentrations in lettuce supplied with different nitrogen sources. *Scientia horticulturae*, 130(2), 381-385.
83. King, J. E., & Gifford, D. J. (1997). Amino acid utilization in seeds of loblolly pine during germination and early seedling growth (l. arginine and arginase activity). *Plant Physiology*, 113(4), 1125-1135.
84. Konishi, N., Ishiyama, K., Matsuoka, K., Maru, I., Hayakawa, T., Yamaya, T., & Kojima, S. (2014). NADH-dependent glutamate synthase plays a crucial role in assimilating ammonium in the *Arabidopsis* root. *Physiologia plantarum*, 152(1), 138-151.
85. Kinnersley, A. M., & Turano, F. J. (2000). Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(6), 479-509.
86. Kojima, S., Bohner, A., Gassert, B., Yuan, L., & Wirén, N. V. (2007). AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal*, 52(1), 30-40.
87. Kopittke, P. M., Asher, C. J., Kopittke, R. A., & Menzies, N. W. (2007). Toxic effects of Pb²⁺ on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environmental pollution*, 150(2), 280-287.
88. Kotrba, P., Najmanova, J., Macek, T., Ruml, T., & Mackova, M. (2009). Genetically modified plants in phytoremediation of heavy metal and metalloid soil and sediment pollution. *Biotechnology advances*, 27(6), 799-810.

89. Kukkola, E., & Huttunen, S. (1998). Structural observations on needles exposed to elevated levels of copper and nickel. *Chemosphere*, 36(4-5), 727-732.
90. Kusano, M., Fukushima, A., Redestig, H., & Saito, K. (2011). Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(4), 1439-1453.
91. Kutman, B. Y., Kutman, U. B., & Cakmak, I. (2014). Effects of seed nickel reserves or externally supplied nickel on the growth, nitrogen metabolites and nitrogen use efficiency of urea-or nitrate-fed soybean. *Plant and soil*, 376(1-2), 261-276.
92. Lam, H. M., Coschigano, K. T., Oliveira, I. C., Melo-Oliveira, R., & Coruzzi, G. M. (1996). The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 569-593.
93. Lasat, M. M. (2002). Phytoextraction of toxic metals. *Journal of environmental quality*, 31(1), 109-120.
94. Li, Z. G. (2016). Methylglyoxal and glyoxalase system in plants: old players, new concepts. *The Botanical Review*, 82(2), 183-203.
95. Lin, Y.C. & Kao, C.H. (2007). Proline accumulation induced by excess nickel in detached rice leaves. *Biol Plant*, 51(2), 351-354. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0071-3>.
96. Lipiec, J., Doussan, C., Nosalewicz, A., & Kondracka, K. (2013). Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: a review. *International Agrophysics*, 27(4), 463-477.
97. Liu, L. H., Ludewig, U., Gassert, B., Frommer, W. B., & von Wirén, N. (2003). Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in Arabidopsis. *Plant physiology*, 133(3), 1220-1228.
98. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
99. L'Huillier, L., d'Auzac, J., Durand, M., & Michaud-Ferrière, N. (1996). Nickel effects on two maize (*Zea mays*) cultivars:

growth, structure, Ni concentration, and localization. *Canadian Journal of Botany*, 74(10), 1547-1554.

100. Marschner, H. (1995). Mineral Nutrition of Higher Plants (2nd ed.). London, UK: Academic Press.

101. Martins, A. M. T., Cordeiro, C. A. A., & Ponces Freire, A. M. J. (2001). In situ analysis of methylglyoxal metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 499(1-2), 41-44.

102. Martinoia, E., Maeshima, M., & Neuhaus, H. E. (2006). Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of experimental botany*, 58(1), 83-102.

103. Mazzafera P., Tezotto T., Polacco J.C. (2013) Nickel in Plants. In: Kretsinger R.H., Uversky V.N., Permyakov E.A. (eds) *Encyclopedia of Metalloproteins*. Springer, New York, NY.

104. McGrath, S. P., Zhao, J., & Lombi, E. (2002). Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides.

105. McLaughlin, D. (2002). Soil investigation and human health risk assessment for the Rodney Street Community, Port Colborne. *Ontario Ministry of the Environment*.

106. Meeks, J. C., Wolk, C. P., Lockau, W., Schilling, N., Shaffer, P. W., & Chien, W. S. (1978). Pathways of assimilation of $[^{13}\text{N}] \text{N}_2$ and $^{13}\text{NH}_4^+$ by cyanobacteria with and without heterocysts. *Journal of bacteriology*, 134(1), 125-130.

107. Meister, A. (1994). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *Journal of Biological Chemistry-Paper Edition*, 269(13), 9397-9400.

108. Meyer-Bothling, L. E., & Polacco, J. C. (1987). Mutational analysis of the embryo-specific urease locus of soybean. *Molecular and General Genetics MGG*, 209(3), 439-444.

109. Michaeli, S., & Fromm, H. (2015). Closing the loop on the GABA shunt in plants: are GABA metabolism and signaling entwined?. *Frontiers in plant science*, 6, 419.

110. Micallef, B. J., & Shelp, B. J. (1989). Arginine metabolism in developing soybean cotyledons: I. Relationship to nitrogen nutrition. *Plant physiology*, 90(2), 624-630.

- 111.** Miflin, B.J. and Lea, P. J. (1980) Ammonia Assimilation (Miflin, B.J., Ed.), *The Biochemistry of Plants* Vol. 5, , Academic Press, New York.
- 112.** Miller, A. J., & Cramer, M. D. (2005). Root nitrogen acquisition and assimilation. In *Root Physiology: from Gene to Function*(pp. 1-36). Springer, Dordrecht.
- 113.** Miller, A. J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S. J., & Wells, D. M. (2007). Nitrate transport and signalling. *Journal of experimental Botany*, 58(9), 2297-2306.
- 114.** Minocha, R., Majumdar, R., & Minocha, S. C. (2014). Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship1. *Frontiers in Plant Science*, 5, 175.
- 115.** Mobley, H. L., & Hausinger, R. P. (1989). Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological reviews*, 53(1), 85-108.
- 116.** Mobley, H. L., Island, M. D., & Hausinger, R. P. (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiological reviews*, 59(3), 451-480.
- 117.** Morris, C. J., Thompson, J. F., & Johnson, C. M. (1969). Metabolism of glutamic acid and N-acetylglutamic acid in leaf discs and cell-free extracts of higher plants. *Plant physiology*, 44(7), 1023-1026.
- 118.** Mulrooney, S. B., & Hausinger, R. P. (2003). Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), 239-261.
- 119.** Mustafiz, A., Ghosh, A., Tripathi, A. K., Kaur, C., Ganguly, A. K., Bhavesh, N. S., ... & Singla-Pareek, S. L. (2014). A unique Ni^{2+} -dependent and methylglyoxal-inducible rice glyoxalase I possesses a single active site and functions in abiotic stress response. *The Plant Journal*, 78(6), 951-963.
- 120.** Mustafiz, A., Singh, A. K., Pareek, A., Sopory, S. K., & Singla-Pareek, S. L. (2011). Genome-wide analysis of rice and *Arabidopsis* identifies two glyoxalase genes that are highly expressed in abiotic stresses. *Functional & integrative genomics*, 11(2), 293-305.

121. Muyssen, B. T., Brix, K. V., DeForest, D. K., & Janssen, C. R. (2004). Nickel essentiality and homeostasis in aquatic organisms. *Environmental Reviews*, 12(2), 113-131.
122. Nahar, K., Hasanuzzaman, M., Alam, M., & Fujita, M. (2015). Glutathione-induced drought stress tolerance in mung bean: coordinated roles of the antioxidant defence and methylglyoxal detoxification systems. *AoB Plants*, 7.
123. Nasibi, F., Heidari, T., Asrar, Z., & Mansoori, H. (2013). Effect of arginine pre-treatment on nickel accumulation and alleviation of the oxidative stress in *Hyoscyamus niger*. *Journal of soil science and plant nutrition*, 13(3), 680-689.
124. Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y. I., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B. E. L. E. N., ... & Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment*, 35(2), 454-484.
125. Nordin, A., & Näsholm, T. (1997). Nitrogen storage forms in nine boreal understorey plant species. *Oecologia*, 110(4), 487-492.
126. Pandey, N., & Sharma, C. P. (2002). Effect of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science*, 163(4), 753-758.
127. Paungfoo-Lonhienne, C., Rentsch, D., Robatzek, S., Webb, R. I., Sagulenko, E., Näsholm, T. ... & Lonhienne, T. G. (2010). Turning the table: plants consume microbes as a source of nutrients. *PLOS one*, 5(7), e11915.
128. Přibyl, P., Cepák, V., & Zachleder, V. (2005). Cytoskeletal alterations in interphase cells of the green alga *Spirogyra decimina* in response to heavy metals exposure: I. The effect of cadmium. *Protoplasma*, 226(3-4), 231-240.
129. Polacco, J. C. (1976). Nitrogen metabolism in soybean tissue culture: I. Assimilation of urea. *Plant physiology*, 58(3), 350-357.

- 130.** Polacco, J. C. (1977). Nitrogen metabolism in soybean tissue culture: II. Urea utilization and urease synthesis require Ni^{2+} . *Plant physiology*, 59(5), 827-830.
- 131.** Polacco, J. C., & Havir, E. A. (1979). Comparisons of soybean urease isolated from seed and tissue culture. *Journal of Biological Chemistry*, 254(5), 1707-1715.
- 132.** Polacco, J. C., & Holland, M. A. (1993). Roles of urease in plant cells. *International review of cytology*, 65-65.
- 133.** Polacco, J. C., Mazzafera, P., & Tezotto, T. (2013). Opinion—nickel and urease in plants: still many knowledge gaps. *Plant Science*, 199, 79-90.
- 134.** Rabbani, N., & Thornalley, P. J. (2011, May). Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 22, No. 3, pp. 309-317). Academic Press.
- 135.** Rabbani, N., & Thornalley, P. J. (2014). The critical role of methylglyoxal and glyoxalase 1 in diabetic nephropathy. *Diabetes*, 63(1), 50-52.
- 136.** Racker, E. (1951) The mechanism of action of Glyoxalase. *J. Biol. Chem.* 190, 685–696.
- 137.** Rahman, H., Sabreen, S., Alam, S., & Kawai, S. (2005). Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition*, 28(3), 393-404.
- 138.** Rascio, N., & Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant science*, 180(2), 169-181.
- 139.** Rautio, P. T. (2002). Nutrient alterations in Scots pines (*Pinus sylvestris* L.) under sulphur and heavy metal pollution.
- 140.** Rauser, W. E. (1995). Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant physiology*, 109(4), 1141.
- 141.** Ray, S., Dutta, S., Halder, J., & Ray, M. (1994). Inhibition of electron flow through complex I of the mitochondrial

respiratory chain of Ehrlich ascites carcinoma cells by methylglyoxal. *Biochemical Journal*, 303(1), 69-72.

142. Reeves, R. D., Brooks, R. R., & Macfarlane, R. M. (1981). Nickel uptake by Californian *Streptanthus* and *Caulanthus* with particular reference to the hyperaccumulator *S. polygaloides* Gray (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 68(5), 708-712.

143. Reeves, R. D. (1992). The hyperaccumulation of nickel by serpentine plants. *The vegetation of ultramafic (serpentine) soils*, 253-277.

144. Reeves, R. D. (2000). Metal-accumulating plants. *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*.

145. Reis, A. D., Rodak, B. W., Putti, F. F., & Moraes, M. F. (2014). Papel fisiológico do Ni: essencialidade e toxidez em plantas. *Informações agronômicas*, (147), 10-24.

146. Rennenberg, H., Wildhagen, H., & Ehling, B. (2010). Nitrogen nutrition of poplar trees. *Plant Biology*, 12(2), 275-291.

147. Roitto, M., Rautio, P., Julkunen-Tiitto, R., Kukkola, E., & Huttunen, S. (2005). Changes in the concentrations of phenolics and photosynthates in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings exposed to nickel and copper. *Environmental Pollution*, 137(3), 603-609.

148. Sagor, G. H. M., Berberich, T., Takahashi, Y., Niitsu, M., & Kusano, T. (2013). The polyamine spermine protects *Arabidopsis* from heat stress-induced damage by increasing expression of heat shock-related genes. *Transgenic research*, 22(3), 595-605.

149. Sankaranarayanan, S., Jamshed, M., Kumar, A., Skori, L., Scandola, S., Wang, T., ... & Samuel, M. A. (2017). Glyoxalase goes green: the expanding roles of glyoxalase in plants. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 898.

150. Seregin, I. V., & Kozhevnikova, A. D. (2006). Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(2), 257-277.

151. Shevyakova, N. I., Cheremisina, A. I., & Kuznetsov, V. V. (2011). Phytoremediation potential of *Amaranthus* hybrids: antagonism

between nickel and iron and chelating role of polyamines. *Russian journal of plant physiology*, 58(4), 634-642.

152. Shimakawa, G., Suzuki, M., Yamamoto, E., Saito, R., Iwamoto, T., Nishi, A., & Miyake, C. (2014). Why don't plants have diabetes? Systems for scavenging reactive carbonyls in photosynthetic organisms.

153. Singh, M., Kumar, J., Singh, S., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14(3), 407-426.

154. Singh, P., & Dhaka, N. (2015). Glyoxalase system and salinity stress in plants. *Managing Salt Tolerance in Plants: Molecular and Genomic Perspectives*, 173.

155. Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2016). Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in plant science*, 6, 1143.

156. Singla-Pareek, S. L., Reddy, M. K., & Sopory, S. K. (2003). Genetic engineering of the glyoxalase pathway in tobacco leads to enhanced salinity tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 14672-14677.

157. Singla-Pareek, S. L., Yadav, S. K., Pareek, A., Reddy, M. K., & Sopory, S. K. (2006). Transgenic tobacco overexpressing glyoxalase pathway enzymes grow and set viable seeds in zinc-spiked soils. *Plant Physiology*, 140(2), 613-623.

158. Singla-Pareek, S. L., Yadav, S. K., Pareek, A., Reddy, M. K., & Sopory, S. K. (2008). Enhancing salt tolerance in a crop plant by overexpression of glyoxalase II. *Transgenic research*, 17(2), 171-180.

159. Sirko, A., & Brodzik, R. (2000). Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochimica Polonica*, 47(4), 1189-1195.

160. Slocum, R. D. (2005). Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(8), 729-745.

161. Splittstoesser, W. E. (1969). Metabolism of arginine by aging and 7 day old pumpkin seedlings. *Plant physiology*, 44(3), 361-366.
162. Stitt, M., Müller, C., Matt, P., Gibon, Y., Carillo, P., Morcuende, R. & Krapp, A. (2002). Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal of experimental botany*, 53(370), 959-970.
163. Sumner, J. B. (1926). The isolation and crystallization of the enzyme urease preliminary paper. *Journal of Biological Chemistry*, 69(2), 435-441.
164. Svennerstam, H., Ganeteg, U., & Näsholm, T. (2008). Root uptake of cationic amino acids by *Arabidopsis* depends on functional expression of amino acid permease 5. *New Phytologist*, 180(3), 620-630.
165. Szabados, L., & Savoure, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, 15(2), 89-97.
166. Takagi, D., Inoue, H., Odawara, M., Shimakawa, G., & Miyake, C. (2014). The Calvin cycle inevitably produces sugar-derived reactive carbonyl methylglyoxal during photosynthesis: a potential cause of plant diabetes. *Plant and Cell Physiology*, 55(2), 333-340.
167. Torisky, R. S., Griffin, J. D., Yenofsky, R. L., & Polacco, J. C. (1994). A single gene (Eu4) encodes the tissue-ubiquitous urease of soybean. *Molecular and General Genetics MGG*, 242(4), 404-414.
168. THOMPSON, J. F. (1980). Arginine synthesis, proline synthesis, and related processes. In *Amino acids and derivatives* (pp. 375-402).
169. Thornalley, P. J. (1990). The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochemical Journal*, 269(1), 1.
170. Thornalley, P. J. (2008). Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems-role in ageing and disease. *Drug metabolism and drug interactions*, 23(1-2), 125-150.
171. Upadhyaya, C. P., Venkatesh, J., Gururani, M. A., Asnin, L., Sharma, K., Ajappala, H., & Park, S. W. (2011). Transgenic

potato overproducing L-ascorbic acid resisted an increase in methylglyoxal under salinity stress via maintaining higher reduced glutathione level and glyoxalase enzyme activity. *Biotechnology letters*, 33(11), 2297.

172. Uren, N. C. (1992). Forms, reactions, and availability of nickel in soils. In *Advances in Agronomy* (Vol. 48, pp. 141-203). Academic Press.

173. VanEtten, C. H., Miller, R. W., Wolff, I. A., & Jones, Q. (1963). Nutrients in seeds, amino acid composition of seeds from 200 angiospermous plant species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 11(5), 399-410.

174. Veena, Reddy, V. S., & Sopory, S. K. (1999). Glyoxalase I from *Brassica juncea*: molecular cloning, regulation and its over-expression confer tolerance in transgenic tobacco under stress. *The Plant Journal*, 17(4), 385-395.

175. Verbruggen, N., & Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino acids*, 35(4), 753-759.

176. Verslues, P. E., & Sharma, S. (2010). Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 8.

177. Viveros, M. F. Á., Inostroza-Blancheteau, C., Timmermann, T., González, M., & Arce-Johnson, P. (2013). Overexpression of GlyI and GlyII genes in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) plants confers salt tolerance by decreasing oxidative stress. *Molecular biology reports*, 40(4), 3281-3290.

178. Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., & Sharma, S. (2017). Absciscic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in plant science*, 8, 161.

179. Vitousek, P. M., & Howarth, R. W. (1991). Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur?. *Biogeochemistry*, 13(2), 87-115.

- 180.** Wang, H., Liu, J., & Wu, L. (2009). Methylglyoxal-induced mitochondrial dysfunction in vascular smooth muscle cells. *Biochemical pharmacology*, 77(11), 1709-1716.
- 181.** Wang, W. H., Köhler, B., Cao, F. Q., & Liu, L. H. (2008). Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant Science*, 175(4), 467-477.
- 182.** Wani, S. H., & Gosal, S. S. (2011). Introduction of Osglyll gene into *Oryza sativa* for increasing salinity tolerance. *Biologia Plantarum*, 55(3), 536-540.
- 183.** Wei, C., Wang, C.Y., & Yang, L. (2009). Characterizing spatial distribution and sources of heavy metals in the soils from mining-smelting activities in Shuikoushan, Hunan Province, China. *Journal of environmental sciences*, 21 9, 1230-6.
- 184.** Werner, A. K., & Witte, C. P. (2011). The biochemistry of nitrogen mobilization: purine ring catabolism. *Trends in plant science*, 16(7), 381-387.
- 185.** Winter, G., Todd, C. D., Trovato, M., Forlani, G., & Funck, D. (2015). Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Frontiers in plant science*, 6, 534.
- 186.** Witte, C. P. (2011). Urea metabolism in plants. *Plant Science*, 180(3), 431-438.
- 187.** Witte, C. P., & Medina-Escobar, N. (2001). In-gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenol reaction. *Analytical biochemistry*, 290(1), 102-107.
- 188.** Witte, C. P., Rosso, M. G., & Romeis, T. (2005). Identification of three urease accessory proteins that are required for urease activation in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 139(3), 1155-1162.
- 189.** Witte, C. P., Tiller, S., Isidore, E., Davies, H. V., & Taylor, M. A. (2004). Analysis of two alleles of the urease gene from potato: polymorphisms, expression, and extensive alternative splicing of the corresponding mRNA. *Journal of experimental botany*, 56(409), 91-99.

190. Yadav, S. K., Singla-Pareek, S. L., Ray, M., Reddy, M. K., & Sopory, S. K. (2005). Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione. *Biochemical and biophysical research communications*, 337(1), 61-67.
191. Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African journal of botany*, 76(2), 167-179.
192. Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T., Imai, A., Takahashi, T., Michael, A. J., & Kusano, T. (2007). A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*. *Biochemical and biophysical research communications*, 352(2), 486-490.
193. Yamaya, T., & Oaks, A. (2004). Metabolic regulation of ammonium uptake and assimilation. In *Nitrogen Acquisition and assimilation in higher plants* (pp. 35-63). Springer, Dordrecht.
194. Yannarelli, G. G., Fernández-Alvarez, A. J., Santa-Cruz, D. M., & Tomaro, M. L. (2007). Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry*, 68(4), 505-512.
195. Yang, X. E., Yang, M. J., Shen, Z. Y., Bacon, J. R., Paterson, E., & Wilson, J. M. (2001). Some mechanisms of zinc and cadmium detoxification in a zinc and cadmium hyper-accumulating plant species (*Thlaspi*). In *Plant Nutrition* (pp. 444-445). Springer, Dordrecht.
196. Yang, H., Menz, J., Häussermann, I., Benz, M., Fujiwara, T., & Ludewig, U. (2015). High and low affinity urea root uptake: involvement of NIP5; 1. *Plant and Cell Physiology*, 56(8), 1588-1597.
197. Yusuf, M., Fariduddin, Q., Hayat, S., & Ahmad, A. (2011). Nickel: an overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 86(1), 1-17.
198. Yusuf, M., Fariduddin, Q., & Ahmad, A. (2012). 24-Epibrassinolide modulates growth, nodulation, antioxidant system, and osmolyte in tolerant and sensitive varieties of *Vigna radiata* under different levels of nickel: a shotgun approach. *Plant physiology and biochemistry*, 57, 143-153.

- 199.** Zanella, M., Borghi, G. L., Pirone, C., Thalmann, M., Pazmino, D., Costa, A., ... & Sparla, F. (2016). β -amylase 1 (BAM1) degrades transitory starch to sustain proline biosynthesis during drought stress. *Journal of experimental botany*, 67(6), 1819-1826.
- 200.** Zarattini, M., & Forlani, G. (2017). Toward unveiling the mechanisms for transcriptional regulation of proline biosynthesis in the plant cell response to biotic and abiotic stress conditions. *Frontiers in plant science*, 8, 927.
- 201.** Zhao, J., Shi, G., & Yuan, Q. (2008). Polyamines content and physiological and biochemical responses to ladder concentration of nickel stress in *Hydrocharis dubia* (Bl.) Backer leaves. *Biometals*, 21(6), 665.

Apêndice 1: Sequência dos primers para qRT-PCR:

TAIR ID	Gene	Foward primer
		Reverse primer
AT1G67550	Urease	GAGGGGAGCCATTGATCCT TATGCTCGCATTTGCATCGC
AT4G08870	Arginase	ATGCATCTTCTTTTGCTCGTATC ACAAGGTTTCGCATCTCATAC
AT4G34710	Arginine decarboxylase 1 (ADC1)	AATCTGTTCCGGTGGACCAAG CTCGGCTCGGTGTTTAAGAG
AT2G39030	Ornithine-N-Acetil-transferase (ONAT)	GTGGCTGGATTTCGTTCTGTT ACCCAACCTCACTGCTTGCT
AT3G47450	Nitric oxide synthase (NOS)	CTGGGGAGGTCTCGTTAGGA GCCGGTCTTTTTGCATCGTT
AT4G24830	Arginine succinate synthase (ASS)	ATTGGGCGGATTGACATGGT TGGACTCCCTAAGCGGATCA
AT5G53460	NADH dependent glutamate-synthase-1 (GLT)	TAGAAGATCGTGACGGCGC TCCGGAACAGCGGAAAATGA
AT5G35630	Glutamine synthetase (GS2)	CCGTGGAGGCAATAACATCT TGTCAGCTCCAACCTCCACAG
AT5G04140	Ferredoxin-dependent-GOGAT-2 (GLU2)	GTGGGTGAAGCCAACGACTA CCAGTGCCTTCAACAACAGC
AT5G46180	δ-Ornithine amino transferase (OAT)	GCAGGAACAAGTGGAGAAGC GCAGCCACAACAAGAGACAA
AT5G62530	δ-1-pyrroline-5-carboxylate-dehydrogenase (ALDH)	GGTGGCAAGGAATTGAAGAA AAGTCCACATCTTCAGCGGG
AT5G14800	Pyrroline-5-carboxylate-reductase (P5CR)	ATCGTATATGCACCGCCGTT TCCAGCTGCAACAGAAACCA
AT1G49240	Actin8	CCCAAAAGCCAACAGAGAGA CATCACCAGAGTCCAACACAAT
AT5G60390	Elongation factor 1-alfa (EF1-α)	CACCACTGGAGGTTTTGAGG TGGAGTATTTGGGGGTGGT



Anexo I DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada “***Urease na reciclagem de nitrogênio em plantas e o papel do níquel como micronutriente essencial***”, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Caio Cezar".

Assinatura: _____

Nome do(a) aluno(a): Caio Cezar Fabiano Barbosa dos Santos

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Paulo Mazzafera".

Assinatura: _____

Nome do(a) orientador(a): Paulo Mazzafera

Data: 10/07/2019

Anexo II

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Urease na reciclagem de nitrogênio em plantas e o papel do níquel como micronutriente essencial**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 10 de julho de 2019

Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **Caio Cezar Fabiano Barbosa dos Santos**

RG n.º 36320635-8

Assinatura : _____

Nome do(a) orientador(a): **Paulo Mazzafera**

RG n.º 8336840-1