

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

DISSERTAÇÃO

**Efeito da Superexpressão do Fator de Transcrição
OsDof25 sobre a Eficiência de Absorção de
Nitrogênio em *Oryza sativa* L.**

Renata Aparecida Costa Silva

2012



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

**EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO
OsDof25 SOBRE A EFICIÊNCIA DE ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO
EM *Oryza sativa* L.**

RENATA APARECIDA COSTA SILVA

*Sob a Orientação da Professora
Sonia Regina de Souza*

*e Co-orientação do Professor
Leandro Azevedo Santos*

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestra em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em
Agronomia, Área de Concentração
em Ciência do Solo

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2012

631.84

S586e

T

Silva, Renata Aparecida Costa, 1986-
Efeito da superexpressão do fator de transcrição
OsDof25 sobre a eficiência de absorção de nitrogênio
em *Oryza sativa* L. / Renata Aparecida Costa Silva –
2012.

52 f.: il.

Orientador: Sonia Regina de Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em
Agronomia.

Bibliografia: f. 44-49.

1. Nitrogênio – Fixação - Teses. 2. Plantas – Efeito do
Nitrogênio - Teses. 3. Arroz - Teses. 4. Clonagem
molecular – Teses. I. Souza, Sonia Regina de, 1962-.
II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Curso de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

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

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

RENATA APARECIDA COSTA SILVA

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 15/02/2012

Sonia Regina de Souza. Dra. UFRRJ
Orientadora

Altamiro Souza de Lima Ferraz Júnior, Dr. UEMA

Luiz Mors Cabral. Dr. UFF

DEDICATÓRIA

*A Deus, por estar ao meu lado em todos os momentos de minha vida
aos meus queridos pais, Idelma Mariana da Costa Silva e Nilo Flausino da
Silva os quais amo muito, pelo exemplo de vida e família.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, família e sabedoria para enfrentar os desafios e chegar até aqui;

Aos meus pais Idelma Mariana da Costa Silva e Nilo Flausino da Silva, por me proporcionar amor, carinho e respeito;

Aos meus irmãos Regina Costa Silva e Nilo Geraldo da Costa Silva, pelo amor e afeto;

Ao meu namorado Fernando Silva Coutinho pelo amor e carinho e por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis;

A Prof^a. Sonia Regina de Souza pela orientação, ensinamentos, amizade e carinho durante esse tempo de convivência;

Ao Prof. Leandro Azevedo Santos pela co-orientação, ensinamentos, paciência e amizade durante a condução dos trabalhos;

Ao Prof. Manlio Silvestre Fernandes pelos ensinamentos científicos e culturais que muito contribuíram para minha formação;

Aos membros da banca Altamiro Souza de Lima Ferraz Júnior e Luiz Mors Cabral pela contribuição neste trabalho.

As minhas amigas Elvia Mariam Stark e Silvana Constantino Rocha pelas conversas agradáveis, incentivos nos momentos difíceis e por sempre estarem ao meu lado;

Aos colegas de laboratório ao qual tive prazer de trabalhar e dar boas risadas, Cassia Coelho, Vinicius Miranda, Orlando Uertas, Prof. Carlos Bucher, Osmário Araújo, Marcus Vinicius, Rafaela Eloi, Leandro Ferreira e Janiélia Gonçalves;

Aos bolsistas de iniciação científica Luiziane Soares, Andressa Fabiane, Rafael Rangel, Sara Brasil, Jéssica Barros, Flávia Caldeira e Renan Braga pela amizade, apoio na condução dos trabalhos e análises laboratoriais;

Obrigada pela amizade, convívio, companheirismo, ajuda nas coletas, pelas boas risadas, pelas palavras de incentivo e carinho;

Aos professores e funcionários do Departamento de Solos, pela cordialidade, presteza e amizade, sempre prontos a nos atender em especial Roberto, Marcus, Beth, Cristiane, Pedro e Carlos;

Aos amigos Núbia Maia e Deivid Machado por fazerem parte da minha vida;

Ao CPGA-CS e sua coordenação pela atenção com que fui tratada.

A CAPES pelo fomento.

A todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

BIOGRAFIA

Renata Aparecida Costa Silva nasceu na cidade de Peçanha – MG, em 27 de maio de 1986. Concluiu o ensino fundamental no colégio Josefina Pimenta em São João Evangelista - 2000, a seguir ingressou no curso Técnico em Alimentação na Escola Agrotécnica Federal de São João Evangelista – MG onde se formou em 2003. Iniciou o curso de graduação em Agronomia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em 2005, diplomando-se em 2009. Durante a graduação foi estagiária por dois anos no Laboratório de Fertilidade Solo do Departamento de Solos e posteriormente foi por dois anos, bolsista de Iniciação Científica no mesmo laboratório. Em março de 2009 ingressou no mestrado em Agronomia – Ciência do Solo, da UFRRJ, na área de Nutrição Mineral de Plantas.

RESUMO

SILVA, Renata Aparecida Costa. **Efeito da superexpressão do fator de transcrição *OsDof25* sobre a eficiência de absorção de nitrogênio em *Oryza sativa* L.** 2012. 52f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

O nitrogênio é um dos elementos minerais que mais limita o desenvolvimento das plantas. Assim, aumentar a eficiência de uso de nitrogênio (EUN) é um fator é essencial para uma agricultura sustentável, levando a um aumento da produção de alimentos com menor uso de insumos e menos impactos ao ambiente. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da superexpressão do fator de transcrição *OsDof25* sobre a absorção de nitrogênio em duas linhagens transformadas de arroz (L1 e L4) da variedade Nipponbare comparando-as com plantas não transformadas (WT). Nas plantas transformadas, o *OsDof25* foi expresso sob o controle do promotor da ubiquitina 1 de milho (UBIL:*OsDof25*:3xHA). For feitos dois experimentos: um para avaliar os parâmetros cinéticos $V_{máx}$ e K_M , sob condições de alto e baixo suprimento de N- NO_3^- e N- NH_4^+ , e outro para analisar a expressão dos transportadores de NO_3^- (NRT2.1~2.2 e NAR) e NH_4^+ (AMT1.1~1.3) também sob alto e baixo suprimento desses íons. As plantas não transformadas apresentaram maior crescimento do que as linhagens transformadas. As L1 e a L2 mostraram menor valor de K_M no tratamento com ressuprimento de 0,2 mM de N- NO_3^- . No ressuprimento com 0,2 mM de N- NH_4^+ a L4 apresentou maior $V_{máx}$ e L1 menor K_M , mas, não houve grandes variações nos parâmetros cinéticos de absorção entre as plantas transformadas e não transformadas. Na raiz os NRT2 mostraram baixa expressão nas linhagens L1 e L4 quando submetidas ao suprimento constante de N- NO_3^- , em contrapartida, no tratamento sob ressuprimento com 0,2 mM de N- NO_3^- ocorreu aumento de expressão dos *OsNTR2.1~2.2* e NAR nas duas linhagens transformadas, porém na raiz a concentração de N- NO_3^- foi oposta a expressão dos NRT2 e NAR, em ambas as situações. Nas folhas, a linhagem L4 apresentou alta expressão do transportador *OsNRT2.1* com o ressuprimento de 0,2 e 2,0 mM de N- NO_3^- . Nas plantas submetidas ao suprimento constante de N- NH_4^+ , a L1 apresentou menor expressão dos AMT1 na raiz quando comparada a L4 e a planta não transformada. Quando submetida a deficiência de N- NH_4^+ , a expressão do *OsAMT1.2* aumentou nas raízes de todas as plantas. Entretanto, não houve correlação positiva entre a expressão dos transportadores de N e os teores de NO_3^- e NH_4^+ nas linhagens transformadas, indicando uma possível alteração na atividade das enzimas de redução e ou assimilação de N. As plantas transformadas quando submetidas ao ressuprimento com baixos teores de nitrato e amônio apresentaram melhor resposta dos parâmetros $V_{máx}$ e K_M em relação a não transformadas. Nas plantas transformadas o ressuprimento com nitrato em baixa concentração resultou em maior expressão dos genes dos transportadores *OsNTR2.1~2.2* e da proteína *OsNAR2.1* e o tratamento com suprimento constante proporcionou maior acúmulo de nitrato nestas plantas. Os resultados tanto dos parâmetros cinéticos quanto do acúmulo de matéria fresca sugerem que as plantas transformadas para expressão do *OsDof25* apresentaram maior tolerância ao estresse nutricional.

Palavras-chave: Transportador de amônio. Transportador de nitrato. Expressão gênica.

ABSTRACT

SILVA, Renata Aparecida Costa. **Effect of supereexpression of the transcription factor *OsDof25* on the efficiency of nitrogen uptake in *Oryza sativa* L.** 2012. 52f. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Nitrogen is one of the nutrient elements most limiting for plant growth. Thus, increasing plant nitrogen usage efficiency (NUE) is an essential factor for sustainable agriculture, leading to an increased food production with less fertilizer input and less environment impact. The aim of this study was to evaluate the effect of *OsDof25* overexpression on N-NO₃⁻ and N-NH₄⁺ uptake. In transgenic rice plants, *OsDof25* was expressed under control of maize ubiquitin promoter (UBIL:*OsDof25*:3xHA). Two experiments were conducted: one to evaluate the kinetic parameters V_{máx} and K_M, and another to analyze the expression level of nitrate (NRT2.1~2.2 and NAR) and ammonium transporters (AMT1.1~1.3), both under high and low NO₃⁻ and NH₄⁺ supply. The untransformed plants showed higher growth than transformed lineages. The L1 and L2 showed a lower value of the K_M in the resupply treatment of 0.2 mM N-NO₃⁻. In the resupply with 0.2 mM N-NH₄⁺ the L4 showed higher V_{max} and L1 lower K_M. There were no large variations in uptake kinetics between the transformed and untransformed plants. At the root the NRT2 showed low expression in lineages L1 and L4, when under constant supply of N-NO₃⁻, in contrast, in the treatment under resupply with 0.2 mM N-NO₃⁻ was increased expression of *OsNTR2.1* ~ 2.2, and NAR in both transformed lineages, but in the root the concentration of NO₃⁻ was opposed to the expression of NRT2 and NAR, in both conditions. In the leaves, the line L4 showed high expression of the transporter *OsNRT2.1* with the resupply of 0.2 and 2.0 mM N-NO₃⁻. In plants grown under constant supply of N-NH₄⁺, L1 showed lower expression of AMT1 in the root compared to L4 and untransformed plants. When subjected to nitrogen deficiency, there was an increased expression of the *OsAMT1.2*. However, there was no correlation between N transporter expression levels and NO₃⁻ and NH₄⁺ content in the transformed plants, indicating a possible change in enzyme activity and reduction or assimilation of N in these plants. The transformed plants when subjected to resupply with low levels of nitrate and ammonium showed better response parameters V_{max} and K_M compared to the untransformed. In the plants transformed the resupply with nitrate at low concentration resulted in increasing the gene expression of the transporters (*OsNTR2.1* ~ 2.2 and protein *OsNAR2.1*), and the treatment with constant supply provided greatest nitrate accumulation in these plants. The results of both kinetic parameters and accumulation of fresh matter suggest that plants transformed for the expression of the *OsDof25* presented highest tolerance to nutritional stress.

Keywords: Ammonium transporter. Nitrate transporter. Gene expression.

LISTA DE SÍMBOLOS

AMT1	Família gênica dos transportadores de NH ₄ ⁺ de alta afinidade (<i>Ammonium transporter 1</i>)
AMT2	Família gênica dos transportadores de NH ₄ ⁺ de baixa afinidade (<i>Ammonium transporter 1</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
DAG	Dias Após a Germinação
DOF	Domínio de ligação ao DNA tipo dedo de zinco – (<u>DNA</u> - “ <i>binding with one finger</i> ”)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
FT	Fatores de transcrição
HATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidade (“ <i>High Affinity Transport System</i> ”)
LATS	Sistema de Transporte de Baixa Afinidade (“ <i>Low Affinity Transport System</i> ”)
NRT1	Família gênica dos transportadores de NO ₃ ⁻ de baixa afinidade (<i>Nitrate transporter 1</i>)
NRT2	Família gênica dos transportadores de NO ₃ ⁻ de alta afinidade (<i>Nitrate transporter 2</i>)
OsDof25	Fator de transcrição <i>Dof25</i> de <i>Oryza sativa</i> L.
pb	Pares de bases
RNAm	Ácido Ribonucléico mensageiro (“ <i>Ribonucleic Acid Messenger</i> ”)
TRIS	2-(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol
WT	Tipo selvagem (“ <i>wild type</i> ”) ou planta não transformada

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos iniciadores (“ <i>primers</i> ”) “ <i>forward e reverse</i> ” utilizados nas amplificações do gene do fator de transcrição de arroz <i>OsDof25</i> por reação de PCR.	9
Tabela 2. Sequências dos “ <i>Primers</i> ” para amplificação do gene do fator de transcrição de arroz <i>OsDof25</i> com os sítios de recombinação <i>attB1</i> e <i>attB2</i> em duas reações.	10
Tabela 3. Reações de recombinação entre os sítios <i>att</i> do fago λ em <i>E. coli</i>	10
Tabela 4. Vetores doadores e suas funções para a geração de três tipos de clones de entrada.	11
Tabela 5. Sequências dos “ <i>primers</i> ” (“ <i>forward e reverse</i> ”) usados nas reações de PCR em tempo real para os genes dos transportadores de nitrato (<i>OsNRT2.1</i> , <i>OsNRT22.1</i> e <i>OsNAR2.1</i>), transportadores de amônio (<i>OsAMT1.1</i> , <i>OsAMT1.2</i> e <i>OsAMT1.3</i>) e actina (<i>OsAct11</i>) de arroz, e respectivos acessos nos bancos de dados TIGR e NCBI.	20
Tabela 6. Massa fresca (g planta ⁻¹) de raiz e parte aérea de duas linhagens transformadas de arroz (L1 e L4), expressando o fator de transcrição <i>OsDof25</i> , comparadas ao tipo selvagem (WT) da variedade Nipponbare, submetidas ao ressuprimento de N-NO ₃ ⁻ e N-NH ₄ ⁺ (0,2 e 2,0 mmoles.L ⁻¹) após 72 horas de privação de N.	25
Tabela 7. Parâmetros cinéticos (V _{máx} e K _M) da absorção de N-NO ₃ ⁻ e N-NH ₄ ⁺ de duas linhagens transformadas de arroz (L1 e L4), expressando o fator de transcrição <i>OsDof25</i> , comparadas ao tipo selvagem (WT) da variedade Nipponbare, submetidas ao ressuprimento de NO ₃ ⁻ e NH ₄ ⁺ (0,2 e 2,0 mmoles.L ⁻¹) após 72 horas de privação de N.	26
Tabela 8. Massa fresca (g planta ⁻¹) de raiz e parte aérea de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição <i>OsDof25</i> (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NO ₃ ⁻ e N-NH ₄ ⁺ , deficiência de N-NO ₃ ⁻ ou N-NH ₄ ⁺ (sem N), ressuprimento de N-NO ₃ ⁻ ou NH ₄ ⁺ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N.	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sequência do gene <i>OsDof25</i> . LOC_Os08g38220.1 11978.m07807. (http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/). Sublinhado representa a sequência de cDNA.....	9
Figura 2. Esquema ilustrativo da reação de recombinação BP para criação dos vetores de entrada, necessários para construção do vetor para expressão do <i>OsDof25</i> (adaptado de SANTOS, 2009).....	11
Figura 3. Reação LR triplo para obtenção dos vetores para superexpressão do gene de interesse. Neste trabalho foi usado o promotor UBIL (ubiquitina de milho) e um Tag-3xHA fusionado ao gene <i>OsDof25</i> . Ori – origem de replicação; Hyg ^R - gene de resistência a higromicina; <i>attB</i> , <i>attP</i> , <i>attL</i> e <i>attR</i> – sítios de recombinação; LB – borda esquerda; RB – borda direita (adaptado de SANTOS, 2009).....	12
Figura 4. Vetor pENTR- <i>OsDof25</i> usado na reação de recombinação LR tripla para formação do clone de expressão.	13
Figura 5. Vetor de expressão UBIL: <i>OsDof25</i> :3xHA usado para transformação das plantas de arroz via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Este vetor leva o gene de resistência a higromicina (<i>hyg</i>) para seleção das plantas transformadas.	14
Figura 6. Modelo do experimento I usando plantas de arroz da variedade Nipponbare (duas linhagens expressando o fator de transcrição <i>OsDof25</i> e a planta do tipo selvagem =não transformada) para análise dos parâmetros cinéticos ($V_{\text{máx}}$ e K_M) relativos a absorção de NO_3^- e NH_4^+ . Dias Após a Germinação (DAG).....	18
Figura 7. Modelo do experimento II usando plantas de arroz da variedade Nipponbare (duas linhagens expressando o fator de transcrição <i>OsDof25</i> e a planta não transformada =tipo selvagem) para análise da expressão dos transportadores de NO_3^- e NH_4^+ . Dias Após a Germinação (DAG).....	19
Figura 8. a) Sementes de arroz da variedade Nipponbare em meio nutritivo (N6D) contendo auxina (2,4D a 100mg L ⁻¹) como regulador para indução de calos embriogênicos; b), c) e d) Calos em estádio de desenvolvimento após 14 dias em meio nutritivo, alguns com característica friável que ao toque se desagregam facilmente.	21
Figura 9. a) Calos embriogênicos oriundos de semente de arroz, colocados sobre papel filtro para drenagem do excesso de solução incubadora contendo <i>Agrobacterium</i> ; b) Calos inoculados com <i>Agrobacterium</i> dispostos em meio de Co-cultivo, onde permaneceram por três dias no escuro a 25 °C.....	22
Figura 10. a) Lavagem dos calos em água destilada estéril contendo o antibiótico carbenicillina (500 mg L ⁻¹) para eliminação da <i>Agrobacterium</i> após o período de incubação; b) Calos em meio de seleção N6D, contendo carbenicilina (400 mg L ⁻¹), para a completa eliminação da <i>Agrobacterium</i> e higromicina (50 mg L ⁻¹) para eliminar os calos que não possuíam o gene resistente ao antibiótico.	22

- Figura 11.** a) Plântulas de arroz expressando o fator de transcrição *OsDof25*, regeneradas a partir de calos embriogênicos cultivados em meio de regeneração de parte aérea (RE-III); b) Planta de arroz completamente regenerada em meio de indução de raízes..... 23
- Figura 12.** Efeito do suprimento constante de 1,5 mM de N-NO₃⁻ ou N-NH₄⁺ sobre a expressão relativa do fator de transcrição *OsDof25* na parte aérea (P.A) e na raiz de plantas de arroz da variedade Nipponbare: transformadas (L1 e L4) e não transformada (tipo selvagem, WT), coletadas às 3 e 9h após a aplicação do tratamento. O gene da *Actina* foi utilizado como padrão interno nas reações de PCR. Barras representam erro padrão da média. 24
- Figura 13.** Depleção de N-NO₃⁻ na solução nutritiva com o cultivo de variedades de arroz Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ depois de 72 horas de privação de N. Barras representam o desvio padrão das médias. .. 27
- Figura 14.** Depleção de N-NO₃⁻ na solução nutritiva com o cultivo de variedades de arroz Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento com 2,0 mM de N-NO₃⁻ depois de 72 horas de privação de N. Barras representam o desvio padrão das médias. .. 27
- Figura 15.** Depleção de N-NH₄⁺ na solução nutritiva com o cultivo de variedades de arroz Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento com 0,2 mM de N-NH₄⁺ depois de 72 horas de privação de N. Barras representam o desvio padrão das médias. .. 28
- Figura 16.** Depleção de N-NH₄⁺ na solução nutritiva com o cultivo de variedades de arroz Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento com 2,0 mM de N-NH₄⁺ depois 72 horas de privação de N. Barras representam o desvio padrão das médias. 28
- Figura 17.** Expressão relativa de três transportadores de NO₃⁻ (*OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1*) na raiz de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NO₃⁻, deficiência de N-NO₃⁻ (sem N), ressuprimento de N-NO₃⁻ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram efetuadas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. A linhagem WT no tratamento constante com 1,5 mM de N-NO₃⁻ foi assumida como tratamento de referência. Barras representam o erro padrão das médias..... 31
- Figura 18.** Expressão relativa de três transportadores de NO₃⁻ (*OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1*) na parte aérea de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NO₃⁻, deficiência de N-NO₃⁻ (sem N), ressuprimento de N-NO₃⁻ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram efetuadas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. A linhagem WT no tratamento constante com 1,5 mM de N-NO₃⁻ foi assumida como tratamento de referência. Barras representam o erro padrão das médias..... 33
- Figura 19.** Teores de N-NO₃⁻ em folha (a, b), bainha (c, d) e raiz (e, f) de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e

L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NO₃⁻, deficiência de N-NO₃⁻ (sem N), ressuprimento de N-NO₃⁻ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram feitas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das medias de três repetições. * Indica diferença entre as linhagens dentro de cada tratamento, Tukey a 5% de significância. 34

Figura 20. Teores de N-NH₄⁺ em folha (a, b), bainha (c, d) e raiz (e, f) de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NO₃⁻, deficiência de N-NO₃⁻ (sem N), ressuprimento de N-NO₃⁻ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram feitas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das medias de três repetições. * Indica diferença entre as linhagens dentro de cada tratamento, Tukey a 5% de significância. 35

Figura 21. Teores de N-amino livre em folha (a, b), bainha (c, d) e raiz (e, f) de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NO₃⁻, deficiência de N-NO₃⁻ (sem N), ressuprimento de N-NO₃⁻ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram feitas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das medias de três repetições. * Indica diferença entre as linhagens dentro de cada tratamento, Tukey a 5% de significância. 36

Figura 22. Teores de açúcares em folha (a, b), bainha (c, d) e raiz (e, f) de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NO₃⁻, deficiência de N-NO₃⁻ (sem N), ressuprimento de N-NO₃⁻ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram feitas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das medias de três repetições. * Indica diferença entre as linhagens dentro de cada tratamento, Tukey a 5% de significância. 37

Figura 23. Expressão relativa de três transportadores de NH₄⁺ (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*) na raiz de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NH₄⁺, deficiência de N-NH₄⁺ (sem N), ressuprimento de N-NH₄⁺ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram efetuadas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. A linhagem WT no tratamento constante com 1,5 mM de N-NO₃⁻ foi assumida como tratamento de referência. Barras representam o erro padrão das médias. 38

Figura 24. Expressão relativa de três transportadores de NH₄⁺ (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*) na parte aérea de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT). Os tratamentos consistiram em suprimento constante com 1,5 mM de NH₄⁺, deficiência, e ressuprimento de NH₄⁺ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas na ausência de N. A linhagem WT no tratamento controle com 1,5 mM de NH₄⁺ constante foi assumido como tratamento de referência. Barras representam o erro padrão das médias. 39

Figura 25. Teores de N-NH₄⁺ em folha (a, b), bainha (c, d) e raiz (e, f) de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NH₄⁺,

deficiência de N-NH₄⁺ (sem N), ressuprimento de N-NH₄⁺ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram feitas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das medias de três repetições. * Indica diferença entre as linhagens dentro de cada tratamento, Tukey a 5% de significância.....40

Figura 26. Teores de N-amino livre em folha (a, b), bainha (c, d) e raiz (e, f) de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NH₄⁺, deficiência de N-NH₄⁺ (sem N), ressuprimento de N-NH₄⁺ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram feitas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das medias de três repetições. * Indica diferença entre as linhagens dentro de cada tratamento, Tukey a 5% de significância.....41

Figura 27. Teores de açúcares solúveis em folha (a, b), bainha (c, d) e raiz (e, f) de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NH₄⁺, deficiência de N-NH₄⁺ (sem N), ressuprimento de N-NH₄⁺ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram feitas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das medias de três repetições. * Indica diferença entre as linhagens dentro de cada tratamento, Tukey a 5% de significância.....41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Transportadores de Nitrato (NRT)	3
2.2	Transportadores de Amônio (AMT)	5
2.3	Fatores de Transcrição.....	7
3	MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1	Amplificação do Gene de Interesse	9
3.2	Tecnologia “Gateway®” e Clonagem dos Genes Amplificados.....	10
3.2.1	Purificação do gene com os sítios de recombinação	12
3.2.2	Reação BP – recombinação entre os sítios <i>attB</i> do gene e <i>attP</i> do vetor pDONR221 para a obtenção do vetor de entrada.....	13
3.2.3	Preparo de células competentes para eletroporação (DH5α).....	14
3.2.4	Reações de LR triplo para obtenção da construção UBIL: <i>OsDof25</i> :3xHA	14
3.3	Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
3.3.1	Preparo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> competente	15
3.3.2	Meio YEB para cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
3.4	Transformação de Arroz Mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
3.5	Avaliação dos Parâmetros Cinéticos Envolvidos na Absorção de NH_4^+ e NO_3^- em Arroz	17
3.5.1	Determinação dos parâmetros cinéticos ($V_{\text{máx}}$ e K_M)	18
3.6	Análise do Efeito dos Fatores de Transcrição <i>OsDof25</i> sobre a Expressão dos Transportadores de NO_3^- e NH_4^+ e Proteínas NAR	18
3.6.1	Analise de metabólitos solúveis	19
3.6.2	Extração de RNA total.....	19
3.6.3	Tratamento com DNase I e síntese do cDNA e PCR em tempo real	20
3.6.4	Desenho dos iniciadores (“primers”) para os estudos de expressão gênica	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1	Transformação Genética de Arroz Mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
4.2	Análise da Expressão do <i>OsDof25</i> em Plantas de Arroz da Variedade Nipponbare Transformadas e Não Transformadas.	23
4.3	Avaliação dos Parâmetros Cinéticos Envolvidos na Absorção de NH_4^+ e NO_3^- em Arroz	24
4.4	Efeito do <i>OsDof25</i> na Expressão dos Transportadores de NH_4^+ , NO_3^- e Proteínas NAR em Resposta a Nutrição Nítrica e Amoniacal	29
5	CONCLUSÕES	43
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
7	ANEXOS.....	50

1 INTRODUÇÃO

O crescimento acentuado da população mundial demanda um aumento significativo na produção de alimentos. Portanto, o desafio para as próximas décadas será suprir as necessidades da população em expansão, desenvolvendo uma agricultura altamente produtiva e sustentável (BEEK et al., 2010). O arroz tem grande importância na alimentação humana, sendo o principal componente na dieta básica de cerca da metade da população mundial (LIAN et al., 2005). No Brasil está presente na dieta alimentar da maior parte da população, com produção anualmente de 13 milhões de toneladas, sendo o país um dos maiores produtores do ocidente (IBGE, 2011).

Dentre os cereais, o arroz é uma fonte de proteína de qualidade, imprescindível em países onde grande parte da população não tem poder aquisitivo suficiente para se alimentar de outras fontes protéicas, o que justifica a busca de variedades com maior capacidade de produzir proteína nos grãos (SOUZA et al., 1998).

O nitrogênio (N) é o elemento mineral requerido pelas plantas em maiores quantidades e, consequentemente o fornecimento de quantidades insuficientes ou de forma inadequada tem influência negativa e imediata no metabolismo vegetal, limitando seu crescimento e produtividade (WHITE & BROWN, 2010). Além disso, o N é um dos mais caros dentre os fertilizantes representando o maior custo no cultivo (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2009). Há também, sérias preocupações com as perdas de nitrogênio no campo, que ocasionam poluição de cursos da águas e posterior eutrofização. Portanto, as pesquisas caminham no sentido de buscar alternativas para minimizar os impactos ambientais ao mesmo passo que maximizar a produção, incluindo o uso de espécies ou variedades adequadas ao solo e ao clima bem como a seleção de variedades que sejam mais eficientes na absorção de nitrogênio do solo (SOUZA et al., 1998; SANTOS et al., 2009), diminuindo assim os custos de produção pelo uso de fertilizantes.

Segundo HIREL et al. (2007) a duplicação da produção mundial de produtos agrícolas, incluindo alimentos, nas últimas quatro décadas tem sido associada ao aumento de sete vezes no uso de fertilizantes nitrogenados. Como consequência, tanto a intensificação recente como a futura da utilização de fertilizantes nitrogenados na agricultura, já tem e continuará ter grandes impactos prejudiciais sobre o ecossistema (BEEK et al., 2010; WHITE & BROWN, 2010). Deste modo, a elucidação dos mecanismos reguladores que controlam a economia de nitrogênio pela planta é vital para melhorar a eficiência de uso de nitrogênio (EUN) e para a redução do uso excessivo de fertilizantes, mantendo um nível aceitável de rendimento (HIREL et al., 2007).

A eficiência de uso de nitrogênio é definida como o rendimento de grãos por unidade de N disponível no solo (LEA & AZEVEDO, 2006). Para a maioria das espécies de plantas a EUN pode ser dividida em dois processos: eficiência de absorção e assimilação, que é a habilidade que as plantas possuem para extrair o nitrogênio do solo normalmente presente nas formas de N-NO_3^- e N-NH_4^+ e posteriormente converte-lo em aminoácidos e outros compostos nitrogenados, e em segundo a eficiência de remobilização, que é a capacidade da planta transferir o N de outras partes para o grão, onde predomina na forma de proteínas (LEA & AZEVEDO, 2006; MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2009; KANT et al., 2011).

O desenvolvimento de estratégias inovadoras que melhorem a EUN e minimizem as perdas é fundamental para a manutenção da agricultura à base de cereais (SHANAHAN et al., 2008). Porém o desenvolvimento de tais estratégias engloba parâmetros complexos, pois a EUN pode ser influenciada por inúmeros fatores genéticos e ambientais como: arquitetura da

raiz, razão C/N no solo e dentro da planta, tipo de solo, pluviosidade e temperatura (KANT et al., 2011).

Devido à grande importância do nitrogênio no metabolismo das plantas, ao longo do processo evolutivo, esses vegetais se adaptaram a ambientes com disponibilidade sazonal em nitrogênio e desenvolveram complexos sistemas de absorção, assimilação e remobilização desse nutriente que convergiram para uma maior eficiência de uso (SOUZA & FERNANDES, 2006). É importante entender a resposta das plantas a diferentes regimes de nitrogênio disponibilizado, principalmente em condições de limitação do nutriente, para isso pode ser utilizado métodos como análise transcracional, resposta de mutantes defectivos a limitação de N, e a análise de plantas que apresente melhor crescimento sob condições limitantes (KANT et al., 2011).

Nas últimas décadas, ocorreu um grande avanço na área da biologia molecular, que tem proporcionado uma revolução de fatos e conceitos relacionados ao melhoramento vegetal, em função da aplicação das técnicas de manipulação do DNA, visando à obtenção de alimentos geneticamente modificados. A tecnologia do DNA recombinante diz respeito às técnicas de engenharia genética que permitem a transferência de genes entre diferentes organismos por métodos assexuais (SILVA, 2009).

O uso da engenharia genética para a produção de plantas mais eficientes normalmente envolve características monogênicas como resistência a herbicidas ou insetos, para se estudar a eficiência de uso de nitrogênio, uma característica controlada por vários genes, seria necessário a manipulação de inúmeros genes, neste caso, se torna mais conveniente o estudo de fatores de transcrição, que são proteínas regulatórias transpcionais capazes de controlar a expressão de genes envolvidos em várias rotas metabólicas. Estudos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa com o fator de transcrição *OsDof25* e sua influência na absorção e utilização de nitrogênio por plantas de *Arabidopsis* (SANTOS, 2009), demonstraram o envolvimento deste fator de transcrição no controle da expressão de genes envolvidos em rotas do metabolismo do nitrogênio.

O presente trabalho teve por objetivo a produção de plantas transformadas de arroz da variedade Nipponbare por meio da inserção do fator de transcrição *OsDof25*, visando caracterizar sua influência sobre a eficiência de absorção de nitrogênio em comparação com plantas de arroz não transformadas (tipo selvagem).

2 REVISÃO DE LITERATURA

As plantas para uma agricultura produtiva necessitam de grande quantidade de fertilizantes nitrogenados que representam uma parte considerável dos custos de produção, principalmente nas regiões tropicais. Melhorar a eficiência de utilização de nitrogênio (EUN) das plantas cultivadas é de fundamental importância para diminuir os impactos ambientais decorrentes da fertilização nitrogenada. E esforços têm sido feitos para estudar as bases genéticas, bem como os mecanismos bioquímicos envolvidos na absorção, assimilação e remobilização de nitrogênio pelas culturas. A detecção dos fatores limitantes que podem ser manipulados para aumentar a EUN é o principal objetivo de tais pesquisas.

O nitrogênio é um dos macronutrientes essenciais para as plantas e sua aquisição ocorre a partir de diversas fontes, principalmente na forma de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+), mas também como uréia, aminoácidos e peptídeos (GOJON et al., 2009). Esse nutriente associado a fatores como luz solar abundante, água e temperaturas favoráveis, aumenta o rendimento de matéria seca e de grãos. Além de seu papel como nutriente, as fontes orgânicas e inorgânicas de N têm um papel fundamental na sinalização que controla a expressão de diversos genes tanto em *Arabidopsis* como em outras espécies vegetais (VIDAL & GUTIÉRREZ, 2008).

2.1 Transportadores de Nitrato (NRT)

O nitrato (NO_3^-) é a principal fonte de nitrogênio para a maioria das plantas. Além de suprir as necessidades nutricionais o NO_3^- e os metabólitos derivados das vias de redução e assimilação, atuam na regulação de genes envolvidos em diversos processos de crescimento e desenvolvimento da raiz e parte aérea (VIDAL & GUTIÉRREZ, 2008; KANT et al., 2011). Portanto, é importante mostrar como o NO_3^- é distribuído nos diferentes tecidos e como isto é regulado, para a utilização mais eficiente em plantas superiores (CHIU et al., 2004).

A disponibilidade do nitrato na solução do solo pode ser amplamente variável, na ordem de μM a quantidades em torno de 20 mM ou até níveis superiores chegando a 70 mM (DECHORGNAT et al., 2011). Consequentemente as raízes são expostas a essa ampla variação nas concentrações, para isso as plantas desenvolveram mecanismos de regulação do transporte através da membrana que aumenta a eficiência de captação e mudanças na arquitetura do sistema radicular para aumentar o volume de solo explorado e se adaptar a esta variabilidade (GOJON et al., 2009).

As plantas absorvem o NO_3^- do solo utilizando transportadores localizados na membrana plasmática de células da epiderme e do córtex da raiz (CHIU et al., 2004; ALMAGRO et al., 2008). Estes transportadores podem operar em dois sistemas de absorção dependendo das concentrações externas do NO_3^- . O sistema de transporte de alta afinidade (HATS- “*High Affinity Transport System*”) é importante para aquisição de nitrogênio quando as concentrações externas são baixas, inferiores a 1 mmol L^{-1} e o sistema de baixa afinidade (LATS - “*Low Affinity Transport System*”) é requerido em concentrações superiores a 1 mmol L^{-1} de nitrogênio na solução (GLASS et al., 1992; ASLAM et al., 1992). Em resposta a presença de NO_3^- os sistemas HATS e LATS podem ser divididos em dois componentes, um que é induzível (iHATS e iLATS) e outro constitutivo (cHATS e cLATS) (CRAWFORD & GLASS, 1998; FORDE, 2000).

Duas famílias gênicas de transportadores de NO_3^- , NRT1 e NRT2 foram identificadas em plantas superiores, tais famílias codificam para os sistemas LATS e HATS respectivamente. Os NRT1s pertencem à família NRT1 (PTR), com alguns membros transportadores de nitrato (NRT1) e outros transportadores de peptídeo (PTR), contudo

evidências indicam que tais transportadores são funcionalmente distintos apesar de sequências similares (TSAY et al., 2007).

A família NRT1 (PTR) compreende 53 genes *Arabidopsis thaliana* e 80 genes em arroz. Os transportadores de NO_3^- da família NRT1 (PTR) inicialmente foram classificados para o transporte de baixa afinidade, até que o NRT1.1 também conhecido como CHL1 (*CHLorate resistant 1*) foi identificado para o transporte de dupla afinidade envolvido na absorção de NO_3^- em baixa e alta concentração (LIU et al., 1999; LIU & TSAY, 2003). No entanto, todos os outros membros da família NRT1 em *Arabidopsis* analisados até agora, o NRT1.2 (envolvido na absorção de nitrato), NRT1.4 (armazenamento de nitrato no pecíolo), NRT1.5 (carregamento do xilema), NRT1.6 (desenvolvimento de sementes), NRT1.7 (carregamento do floema e remobilização), NRT1.8 (descarregamento do xilema) e o NRT1.9 (carregamento do floema na raiz) são todos transportadores de baixa afinidade (HUANG et al., 1999; CHIU et al., 2004; LIN et al., 2008; ALMAGRO et al., 2008; FAN et al., 2009; LI et al., 2010; WANG et al., 2011).

O transporte de dupla afinidade é regulado por processos de fosforilação que ocorrem no resíduo do aminoácido T101 (Treonina 101), que ao ser fosforilado opera em baixas concentrações de nitrato e desfosforilado opera em altas concentrações de nitrato (LIU & TSAY, 2003). O NRT1.1 também funciona como sensor de nitrato que em baixas concentrações interage com a proteína CIPK23 (CBL-Interacting Protein Kinase 23) promovendo a fosforilação do resíduo de treonina na posição 101 (T101) e induz a expressão de genes ligados ao metabolismo de nitrato (HO et al., 2009). Contudo em altas concentrações de nitrato, NRT1.1 com T101 desfosforilado interage com CIPK8 e induz genes da absorção e assimilação de nitrato, não afetando a absorção em baixas concentrações (HU et al., 2009).

Além de ser componente essencial no transporte de nitrogênio, o NRT1.1 também está envolvido em vias de sinalização regulando a arquitetura das raízes (BARBIER-BRYGOO et al., 2011). Estudos em *Arabidopsis* utilizando mutante (*chl1-5*) deficiente no transporte de NO_3^- pelo NRT1.1 e um transgênico derivado desse mutante (35S-CHL1), demonstrou clara evidência que este transportador tem uma função direta na sinalização por NO_3^- e está envolvido na via de sinalização no qual o NO_3^- antagoniza o efeito do glutamato na mudança da arquitetura da raiz (WALCH-LIU & FORDE, 2008).

Em regiões maduras da raiz, o segundo membro da mesma família também envolvido no processo de absorção de N, o *AtNRT1.2* é expresso nos pêlos radiculares e na epiderme da raiz (HUANG et al., 1999). Ao contrário do NRT1.1 cuja expressão é induzível na presença de NO_3^- , o NRT1.2 não necessita dessa exposição para ser expresso, tornando-se um componente constitutivo do sistema LATS (DECHORGNAT et al., 2011).

O mecanismo iHATS para NO_3^- foi estudado pela análise funcional de mutantes (*atnrt2*) principalmente em *Arabidopsis thaliana*. A família dos NRT2s possui sete membros que codificam para o sistema de absorção de alta afinidade em *Arabidopsis*, com exceção do *AtNRT2.7* que está envolvido no processo de desenvolvimento de semente (CHOPIN et al., 2007). Na análise de dois mutantes *atnrt2.1* e *atnrt2.2* em que ambos tiveram a atividade interrompida, houve um decréscimo na capacidade de absorção de NO_3^- na fase induzível, principalmente em iHATS (CEREZO et al., 2001).

Em relação à expressão induzida por NO_3^- , os genes *AtNRT2.1* e *AtNRT2.2* foram classificados em induzíveis, enquanto o gene *AtNRT2.5* como repressivo na presença do íon (OKAMOTO et al., 2003). Ao contrário dos anteriores os genes *AtNRT2.3*, *AtNRT2.6* e *AtNRT2.7* parecem ser indiferentes a mudanças no suprimento de NO_3^- . Os genes *AtNRT2* são expressos principalmente nas raízes, com exceção do *AtNRT2.7*, onde a expressão é maior na parte aérea (ORSEL et al., 2002; OKAMOTO et al., 2003; CHOPIN et al., 2007).

A eficiência de armazenamento de NO_3^- no vacúolo das sementes influencia a cinética de germinação, onde o transportador *AtNRT2.7* localizado na membrana vacuolar demonstrou ter função específica nesta acumulação (CHOPIN et al., 2007).

Estudando os genes envolvidos no transporte de NO_3^- no sistema de alta afinidade em arroz, ARAKI & HASEGAWA (2006) encontraram quatro genes da família NRT2 envolvidos na absorção em alta afinidade (*OsNRT2.1~2.4*). Contudo o *OsNRT2.1* e o *OsNRT2.2* possuem a mesma sequência na região codante, mas as regiões não codantes 5' e 3' UTR (“*untranslated region*”, região não traduzida) são diferentes, gerando diferentes padrões de expressão entre os genes, e tais diferenças na expressão dos transportadores pode ser devido as diferentes respostas de cada isoforma à concentração de N na planta.

Em resposta a deficiência e ressuprimento de N- NO_3^- em plantas de arroz da variedade Nipponbare, SPERANDIO et al. (2011) avaliaram a expressão de três transportadores de NO_3^- (*OsNRT1.1*, *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2*) e demonstraram que os transportadores de NO_3^- *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* apresentaram alta indução com o ressuprimento de NO_3^- na parte aérea e raiz, enquanto que o *OsNRT1.1* apresentou indução somente na parte aérea com o ressuprimento e deficiência de NO_3^- .

O sistema de absorção de N além de ser induzido ou reprimido a partir da sinalização por NO_3^- , pode ser regulado por metabolitos formados pela redução de NO_3^- . Estudos em plantas transgênicas de tabaco superexpressando *NpNRT2.1*, mostrou que a absorção de NO_3^- em alta afinidade não esta relacionada positivamente com o nível de RNAm de *NpNRT2.1*, quando fornecidas fontes reduzidas de N como o NH_4^+ ou a geração de metabólitos oriundos da redução de N, estes compostos provavelmente exercem efeito repressivo no influxo de NO_3^- em nível transcripcional e pós-transcripcional (FRAISIER et al., 2000).

A absorção de NO_3^- via transportadores de alta afinidade, requer uma proteína denominada NAR (“*Nitrate Assimilation Related*”, relacionada à absorção de nitrato), que a partir da interação direta com os NRT2 aumenta o influxo de NO_3^- pelas raízes. Inicialmente estudos em ovócitos confirmaram a função do NAR2, quando as proteínas NAR2 e NRT2.1 foram injetadas separadamente não ocorreu atividade de transporte de NO_3^- , mas após a injeção de ambas proteínas o transporte de NO_3^- pôde ser mensurado (ZHOU et al., 2000). Em plantas vários trabalhos com mutantes sem a expressão da proteína NAR mostram sua forte influência no transporte de nitrato no sistema de alta afinidade. Plantas de *Arabidopsis* transformadas por T-DNA sem expressão de *AtNRT3* (similar ao NAR2 em *Chlamydomonas reinhardtii*), mostraram redução no influxo de NO_3^- pelo sistema de alta afinidade, porém plantas cultivadas em alta concentração de N se desenvolveram normalmente comparadas a tipo selvagem, indicando que o sistema de baixa afinidade se manteve inalterado nos mutantes (OKAMOTO et al., 2006). Já em arroz, ARAKI e HASEGAWA (2006) também indicam que o NO_3^- induziu a expressão do *OsNAR2.1* em apenas meia hora após a adição do nitrato acompanhando a expressão do *OsNRT2.1* e *OsNRT2.4*. Por outro lado, o *OsNAR2.2* já apresentava expressão mesmo em solução sem N (ARAKI e HASEGAWA, 2006).

Estudos de histolocalização do NAR em *A. thaliana*, mostraram que o complexo *AtNRT2.1* e *AtNAR2.1* esta na membrana plasmática (YONG et al., 2010). Os mesmos autores analisaram mutantes sem a expressão do *AtNAR2.1* (*atnar2.1*) e constataram baixa atividade do sistema de absorção de alta afinidade, seguida de grande redução do crescimento das plantas cultivadas em baixas concentrações de NO_3^- como única fonte de N.

2.2 Transportadores de Amônio (AMT)

O fornecimento localizado de nitrogênio estimula o crescimento da raiz, a ramificação e alongamento das raízes laterais, mas a maioria dos efeitos positivos sobre a

proliferação de raízes tem sido atribuída ao nitrato, ao invés de amônio (LUDEWIG et al., 2007). No entanto, as plantas claramente beneficiam da absorção de amônio, por estar na forma reduzida, que normalmente se encontra na faixa de 20-200 μM em solos agrícolas, mas a sua preferência é contrária a sua toxicidade quando disponibilizado em excesso (MILLER et al., 2004; LOQUÉ et al., 2004).

Ao contrário do que acontece para o nitrato, as plantas em geral não tendem a acumular altas concentrações do íon NH_4^+ (LEA e AZEVEDO, 2006). Sintomas de toxicidade são comumente observados em várias culturas cultivadas com amônio, porém o arroz parece ser uma exceção. O estudo dos eventos primários de aquisição de NH_4^+ em altas concentrações em cevada e arroz demonstrou que o efluxo de NH_4^+ representa cerca de 80% do influxo primário. Este fato resulta em um ciclo através da membrana plasmática da raiz, que demanda alto custo energético e é acompanhado do declínio no crescimento. Contudo em arroz, devido à evolução da estratégia de defesa celular esse ciclo tende a um balanço energético neutro, ou seja, possui um eficiente sistema de controle do potencial da membrana (potencial menos negativo), e consequentemente menor acúmulo de NH_4^+ no citossol, fazendo com que o gasto de energia no efluxo deste íon seja menor. (BRITTO et al., 2001).

A absorção de NH_4^+ é mediada por transportadores da família multigênica AMT (“*Ammonium Transporter*”), que comumente opera em um sistema bifásico, quando as concentrações de NH_4^+ no meio externo estão abaixo de 1 mmol L^{-1} é ativado o sistema de absorção de alta afinidade (HATS), e em concentrações superiores a 1 mmol L^{-1} , opera o sistema de absorção de baixa afinidade (LATS).

Uma família de cinco genes de transportadores de amônio (AMT1.1 a AMT1.5) foi originalmente identificada em *Arabidopsis*, enquanto que em tomate apenas três genes foram isolados (LEA e AZEVEDO, 2006). Em arroz, pela análise de similaridade da sequência de aminoácidos do *OsAMT2.1* foram identificados dez diferentes genes envolvidos na absorção de amônio e podem ser divididos em quatro grupos, ou seja, três para cada grupo, *OsAMT1*, *OsAMT2*, *OsAMT3* e um para *OsAMT4* (SUENAGA et al., 2003). O número de transportadores da família AMT em arroz é maior do que *Arabidopsis* e tomate, o que indica que cada planta forma seu sistema de transporte de acordo com as condições seletivas a que foi submetida (LOQUÉ & VON WÍREN, 2004).

A expressão da isoforma *OsAMT1.1* foi detectada na parte aérea e raiz independente do suprimento de nitrogênio, apesar de maior expressão na presença de amônio, enquanto a expressão da *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* foi restrita para a raiz, sendo a primeira fortemente induzida por amônio e a segunda reprimida após a aplicação de nitrogênio (SONODA et al., 2003). De acordo com KUMAR et al. (2003) os três transportadores de alta afinidade em arroz respondem de forma expressiva quando as plantas são cultivadas em concentrações de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NH_4^+ , reduzindo os níveis de expressão quando transferidas para uma solução de 10 mmol L^{-1} de NH_4^+ .

SPERANDIO et al. (2011) avaliaram a expressão dos transportadores de NH_4^+ *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* e mostraram que todos apresentaram repressão no ressuprimento com 2 mM de N- NH_4^+ e alta indução sob deficiência, sendo *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* os mais induzidos na deficiência (cerca de 32 e 15 vezes, respectivamente). A repressão dos transportadores de NH_4^+ é provocada provavelmente pelo alto influxo e assimilação de NH_4^+ , gerando altos teores de N-amino livre nas raízes que reprimem a expressão dos transportadores responsáveis pela absorção de NH_4^+ (SONODA et al., 2003). Esse efeito negativo pode ser correlacionado principalmente aos níveis de glutamina, em que os transcritos do *AtAMT1.1* e o influxo de NH_4^+ foram reprimidos após o ressuprimento em plantas privadas de N, sugerindo que a glutamina pode ser um sinal de “feedback” para o influxo de NH_4^+ depois do ressuprimento (RAWAT et al., 1999).

A isoforma *OsAMT1.1* expressa predominantemente no córtex radicular, periciclo, epiderme e pêlos radiculares se mostrou um importante membro do sistema HATS, por apresentar redução de 70% na absorção de NH_4^+ em plantas contendo uma inserção de T-DNA no gene *AMT1.1* (KAISER et al., 2002). Já a localização do transportador *OsAMT1.2* detectada principalmente nas células do cilindro central das raízes sugerem que este pode estar envolvido em duas funções, tanto na absorção de amônio da solução do solo quanto na recuperação de amônio do sistema vascular, como a principal forma de nitrogênio no sistema vascular de arroz é a glutamina, seus níveis podem regular diversos genes envolvidos na resposta das plantas ao NH_4^+ (SONODA et al., 2003).

2.3 Fatores de Transcrição

A evolução no campo da genômica de plantas e sistemas biológicos, incluindo a disponibilidade das seqüências do genoma de *Arabidopsis* e arroz tem oferecido oportunidades para identificar genes de regulação e rotas metabólicas que controlam inúmeras características. Segundo CENTURY et al. (2008), devido aos fatores de transcrição (FT) naturalmente atuarem como reguladores de processos celulares espera-se que sejam excelentes candidatos a modificação de características complexas em plantas cultivadas.

Devido à sua imobilidade, as plantas são suscetíveis a inúmeros fatores bióticos e abióticos, para isso possuem sistemas distintos de adaptação ao meio ambiente visando sua sobrevivência, tais adaptações incluem defesas contra patógenos, predadores e o crescimento de órgãos específicos, como flores e sementes (YAMASAKI et al., 2008). Contudo o desenvolvimento e a diferenciação em plantas são programados primariamente em nível de transcrição gênica, que são controlados por FT (UDVARDI et al., 2007).

Fatores de transcrição são geralmente definidos como proteínas que contêm um domínio de ligação que reconhece uma seqüência específica de DNA e controlam o passo mais importante da regulação gênica, a transcrição, uma vez que este controle assegura que nenhum intermediário supérfluo seja sintetizado e, obviamente, porque sem transcrição ou sem síntese de RNA, não haverá síntese protéica (MITSUDA & TAKAGI, 2009). A regulação da transcrição pode ocorrer a partir da ligação dos FT a seqüências de bases específicas presente na região promotora do gene e/ou pela interação com outros reguladores transpcionais promovendo o remodelamento da cromatina e modificações de proteínas, visando recrutar ou bloquear o acesso da RNA polimerase (enzima responsável pela síntese de RNAm) a determinadas regiões do DNA (GROTEWOLD, 2008; UDVARDI et al., 2007).

Em *Arabidopsis thaliana* há mais de 1.800 genes que codificam para FTs (GUO et al., 2005; IIDA et al., 2005). No entanto, somente um décimo destes FTs já foi caracterizado geneticamente (QU & ZHU, 2006). Além de um grande número de genes que codificam os FTs, em *Arabidopsis* há uma maior variedade de FTs que apresentam maior diversidade e especificidade de ligação ao DNA, quando comparado a outros organismos como *D. melanogaster* ou *C. elegans*.

A expressão de genes em plantas envolve classes de FTs que são especificamente relacionados com a regulação de genes específicos e/ou mediação de uma variedade de sinais específicos, estes genes podem ser agrupados em diferentes famílias com base no domínio de ligação ao DNA e outras características conservadas (CENTURY et al., 2008). As proteínas de domínio Dof contêm uma classe particular de domínio de ligação ao DNA tipo dedo de zinco (Dof, DNA one finger) e são membros de uma grande família de fatores de transcrição encontrados somente em plantas. Nas proteínas Dof especificamente, o domínio de ligação ao DNA é extremamente conservado, conferindo grande similaridade de ligação ao DNA entre as diferentes proteínas que compõem esta família, porém fora do domínio de ligação as seqüências de aminoácidos são divergentes e reflete a variedade de funções descritas para estes fatores (YANAGISAWA, 2002; YANAGISAWA, 2004).

Os FT reconhecem sequências regulatórias específicas situadas na região promotora dos genes ao qual se ligam por intermédio do domínio de ligação, por sua vez esta interação determina o início e a eficiência da transcrição. O domínio de ligação do tipo dedo de zinco é caracterizado por uma região de 50 aminoácidos altamente conservada, ao qual o íon zinco é coordenado por resíduos de cisteina (C₂-C₂), associados a uma região base que se liga ‘a seqüência (regulatória) de nucleotídeos AAAG, denominadas motivos de ligação. As proteínas Dof analisadas até o momento, exceto uma de abóbora, reconhecem o motivo de ligação AAAG, esta sequência específica foi estabelecida a partir de ensaios *in vitro* e *in vivo* (YANAGISAWA, 2002). As proteínas Dof geralmente aparecem compostas por dois domínios principais: um domínio conservado de ligação ao DNA na porção N-terminal e um domínio C-terminal de regulação da transcrição que pode fazer interação com outras proteínas (YANAGISAWA, 2002).

Em *Arabidopsis* foram identificados 37 prováveis genes que codificam proteínas de domínio Dof, no genoma do arroz foram encontrado 30 genes (YANAGISAWA, 2002; LIJAVETZKY et al., 2003). A primeira proteína com domínio de ligação do tipo Dof (*ZmDof1*) foi isolada a partir do milho por YANAGISAWA & IZUI (1993) desde então vários membros da família, em diversas espécies e envolvidos em diferentes processos fisiológicos, foram caracterizados. Embora muitas das funções fisiológicas das proteínas de domínio Dof não estejam esclarecidas, pelo grande número dessas proteínas nas plantas, já é evidente que desempenham papel fundamental como reguladores de transcrição influenciando no crescimento e desenvolvimento das plantas cultivadas (YANAGISAWA, 2004).

YANAGISAWA e SHEEN (1998) já mostraram com o ensaio de mobilidade eletroforética que o *Dof1* de milho foi capaz de se ligar ao promotor da fosfoenolpiruvato carboxilase de milho e induzir a sua atividade. Já SANTOS (2009), estudando a superexpressão *ZmDof1* e seu ortólogo em arroz *OsDof25*, sugere que o aumento de expressão da fosfoenolpiruvato carboxilase e piruvato quinase pode ser uma estratégia das plantas transformadas para aumentar a produção de esqueletos de carbono, especialmente o 2-oxoglutarato, buscando a detoxificação do excesso de amônio absorvido. Outra possibilidade é que este fator de transcrição coordene a expressão conjunta dos transportadores de amônio e dessas enzimas do metabolismo de carbono.

Estudos de YANAGISAWA et al. (2004), com fator de transcrição *Dof1* de milho em plantas transgênicas de *Arabidopsis*, indicam que a expressão deste fator aumenta a expressão de vários genes envolvidos na produção de esqueleto de carbono, além de aumento significativo da concentração de aminoácidos, especialmente glutamina, além de elevação no teor de N. Segundo esses autores a superexpressão do *Dof1* melhorou a assimilação de nitrogênio e no crescimento de plantas em baixas concentrações deste nitrogênio.

Já em espécies de *Pinus pinaster*, outro fator de transcrição da família Dof esta relacionado à regulação transcripcional antagônica entre duas isoformas da enzima glutamina sintetase citosólica (GS1) (RUEDA-LÓPEZ et al., 2008). Estes autores mostram que a superexpressão do *PpDof5* sob o comando do promotor 35S, atuou como repressor da GS1a, reduzindo o nível de expressão em torno de 40%, enquanto que na isoforma GS1b este FT causou o dobro de aumento da expressão.

Os FT Dof estão envolvidos em várias funções, incluindo desenvolvimento de sementes, processo complexo que exige muitas proteínas regulatórias. Estudos recentes com análise “*in silico*” mostraram que mais de 50% dos genes *Dof* no genoma de arroz, trigo e *Arabidopsis* participam do desenvolvimento de sementes (GAUR et al., 2011). Foram analisados 30 genes *Dof*, onde a expressão de 17 revelou o envolvimento destas proteínas em várias fases do desenvolvimento desde o florescimento até a maturação das sementes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amplificação do Gene de Interesse

O gene *OsDof25* não possui íntrons e foi amplificado a partir do genoma nuclear (Figura 1). Foram desenhados iniciadores (“*primers*”), específicos para amplificação do gene inteiro (Tabela 1), para em seguida adicionar os sítios de recombinação necessários para clonagem nos vetores “*Gateway*”.

Tabela 1. Sequências dos iniciadores (“*primers*”) “*forward e reverse*” utilizados nas amplificações do gene do fator de transcrição de arroz *OsDof25* por reação de PCR.

Gene	Primers	Sequência
<i>OsDof25</i>	<i>OsDof25F</i>	5'-GTGTCGTCCGAGCTTTCTG-3'... <u>ATG</u>
	<i>OsDof25R</i>	5'-TGCTAACCATCCTCTCGTTCTG-3'

Nota: Sublinhado representa o códon de iniciação

GCGACTGCGACCATAAGAGACTCCCGCTTCCGCCAACCGCCCACCACCCGTTGACCATTGCTTGCC
CCCGCTCCTCGGTTCTCCGACTCCACCGGCGCGCGCGCGGGAGGGACCAGAGCAGCCACGGCGCC
GCCGCGCATGCAGGAGCAGCAGCCGGAGACCGGCCGCCGCCAGCAGTCGCCACCGTCGACC
TGCGCCGTCCAAGGGCTACGCGGGCTCCCGCGACGCCACAGCCTGGTCGGCTGCGACTGCTGCT
GCCGCCGTGGCCCGGCTGCGACGGCGCAGCGCGGGGGAGGGTGACCCGTGCCCGGGTG
CGAGTCGCGGGACACCAAATTCTGCTACTACAACAACACTACAACACCTCCAGCCCCGGCACTTCTGCA
AGTGTGCGCCGCTACTGGACCAAGGGTGGCACGCTCCGCAACGTCCCCGTCGGCGGACGCGC
AAGAAGTCCTCGTCTCGTCGTCTCGTCTCGTACCGCCGCCGCGCAGCACCCGCCCAA
GCGCCAGAAGACGTCGAAGAAGCGCCCGTCACTCGACTCCGAGCCCCTGCCGCCACACCCCGTCC
TCACCGAAGCCGCCGCTGACTCCGCGCCAAGACGACGACCAGAAGCTACGTCGGAGAAGAAGACGACG
ACTTCCACAACGACGACGACACCGCCGGCGCTGACACCACGAGCGAGATCACCACGGAGCTGCTG
CCCGGCCGTGGAGGAGGACTCGTACGGACCTCTGCAGCGGACTCCGCCGCCGTACCCCTCGGCC
TCGACTCTCCGACTACCGTCCATACCAAGAGTCTGGCGACCCGGACCTGCACTCGAGTGGCCG
CCGCCGGCGTGCACATGGCGTCTACTGGCCGGCGGCCGGCTCGCCGACCCGGACCCGACCGC
CGTGTCTCAACCTCCCATGAGCCACTCGCCCGGCCGGCGGCCGGCTCAGGTGGGTGGGG
GTTTCAACTACACCGATGATGATTCTCATCAGTTCCGATTAATTAGTAAATTGCGGTGGGTATA
TGGTAAAAATGATGACGTTAATCTTAGCTTTGAGATTAGTGGCGTGTACTCTCGAGAGGGGC
TAACTCAACCAAGTTGGGTTGTTTCTATGTTAACTCCTATCAAGGCTGGCTTTTTTTC
ATACAATGGTCTGCTATTCTACTCCA

Figura 1. Sequência do gene *OsDof25*. LOC_Os08g38220.1|11978.m07807. (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/>). Sublinhado representa a sequência de cDNA.

A reação de PCR foi realizada com uma DNA polimerase de alta fidelidade, a *Platinum Pfx*, para uma maior fidelidade na amplificação. A reação foi realizada com a solução “*enhancer*” PCR_x 1X, tampão de amplificação *Pfx* 1X, dNTP 0,3mM cada, MgSO₄ 1mM, “*primers*” 0,3μM, *Pfx* DNA polimerase 1U e 200ng de DNA (var. Nipponbare). Como o gene de interesse possui uma alta quantidade de CG, antes de iniciar a reação de PCR, o mix de reação sem a “*Platinum Pfx*” passou por uma etapa de desnaturação a 94°C durante 10 minutos. Logo em seguida foi adicionada a *Pfx* e a PCR prosseguiu com a seguinte programação: desnaturação a 94°C por 2min e 45seg e 35 ciclos de 15seg de desnaturação a 94°C, 30 seg de anelamento 57°C e 1min de extensão a 68°C.

As construções gênicas foram realizadas utilizando a tecnologia “*MultiSite Gateway*” de clonagem. Depois da amplificação do gene houve mais duas reações de PCR

com “primers” híbridos para a construção dos sítios de recombinação *attB1* e *attB2* (Tabela 2). Na primeira reação os “primers” anelam-se no início e final do gene e levam metade do sítio de recombinação, e na segunda reação os “primers” anelam-se na primeira metade dos sítios *attB* e levam a outra metade (Tabela 2). A primeira reação foi realizada com uma desnaturação inicial de 2min e 45seg e 25 ciclos de 15seg de desnaturação a 94°C, 30seg de anelamento a 58°C e 1min de extensão a 68°C. A segunda reação também foi realizada em 25 ciclos com a mesma programação descrita acima, exceto pelos dois primeiros ciclos, que foram a uma temperatura de anelamento de 50°C e os 23 ciclos restantes a 60°C.

Tabela 2. Sequências dos “Primers” para amplificação do gene do fator de transcrição de arroz *OsDof25* com os sítios de recombinação *attB1* e *attB2* em duas reações.

Gene	Reação	“Primers”	Sequência
<i>OsDof25</i>	1 ^a	<i>OsDof25attB1</i>	5'-AAAAAGCAGGCTACTGCGACCATAAGAGACTC -3'
		<i>OsDof25attB2</i>	5'-AGAAAGCTGGGTATGGGAGGTTGAGGAACAC -3'
Adaptador	2 ^a	Adapt. <i>attB1</i>	5'-GGGGACAAGTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'
		Adapt. <i>attB2</i>	5'-GGGGACCACTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'

3.2 Tecnologia “Gateway®” e Clonagem dos Genes Amplificados

A tecnologia Gateway desenvolvida pela Invitrogen é baseada na reação de recombinação sítio-específica mediada por fago lambda (λ), onde fragmentos de DNA flanqueado por sítios de recombinação (*att*), podem ser transferidos em vetores que contêm sítios de recombinação compatíveis (*attB* \times *attP* ou *attL* \times *attR*) (KARIMI et al., 2002).

O bacteriófago lambda pode crescer como um fago lítico, onde a célula do hospedeiro é lisada com a liberação da progênie do vírus. Alternativamente, o fago λ pode integrar um sítio específico dentro do genoma de *E. coli* por um processo chamado lisogenização.

No estado lisogênico o genoma do fago pode ser transmitido para as células filhas em muitas gerações até que surjam condições que viabilizam sua excisão do genoma. Neste momento, o vírus entra na fase lítica do seu ciclo de vida. A passagem entre as rotas líticas e lisogênicas é um dos processos mais bem estudados da biologia molecular. As reações de recombinação integrativa e excisiva do fago λ são mediadas por proteínas codificadas pelo próprio fago λ e pela *E. coli*. Estas reações de recombinação, feitas *in vitro*, são à base da tecnologia de clonagem “gateway” (Tabela 3).

Tabela 3. Reações de recombinação entre os sítios *att* do fago λ em *E. coli*.

Rota	Reação	Catalisada por...
Lisogênica	<i>attB</i> x <i>attP</i> \rightarrow <i>attL</i> x <i>attR</i>	(Int e IHF) BP Clonase™ II
Lítica	<i>attL</i> x <i>attR</i> \rightarrow <i>attB</i> x <i>attP</i>	(Int, IHF e Xis) LR Clonase™ II

Nota: Int – Integrase; IHF – Fator de Integração do Hospedeiro; Xis – Excisionase.

Os quatro sítios contêm locais de ligação das proteínas que medeiam à reação. Os sítios *attB*, *attP*, *attL* e *attR* contêm 243, 25, 100, e 168 pares de base respectivamente. A reação *attB* x *attP* (Integração) é mediada pelas proteínas Int (Integrase) e IHF (Fator de Integração do Hospedeiro). A reação *attL* x *attR* (excisão) é mediada pelas proteínas Int, IHF,

e Xis (Excisionase). Int e Xis são codificadas pelo genoma do fago λ , enquanto IHF é uma proteína de *E. coli* (Tabela 3).

O Kit para construção do vetor contendo três fragmentos desejados fornecido pela tecnologia “MultiSite Gateway” usa uma modificação da reação de recombinação sítio específica da tecnologia “Gateway” e permite a simultânea clonagem de três fragmentos (promotor desejado, gene de interesse e região terminadora ou proteína de fusão) em uma ordem e orientação definidas, para criar o clone de expressão desejado.

No sistema “MultiSite Gateway®” os sítios *att* do λ foram modificados e otimizados para acomodar clonagens recombinacionais simultâneas de múltiplos fragmentos de DNA. As modificações incluem alterações de sequências e comprimentos dos sítios *att* resultando na criação de novos sítios *att* que exibem aumento de especificidade e promovem a eficiência requerida para a clonagem de múltiplos produtos de PCR em uma única reação. Na tecnologia “MultiSite Gateway®” quatro sítios *att* são utilizados, contra apenas dois da tecnologia “Gateway®” padrão. Isso permite que mais de um produto de PCR possa ser clonado em apenas uma reação. Os vetores doadores da tecnologia “MultiSite Gateway®” são usados para clonar os produtos de PCR flanqueados pelos sítios *attB* para gerar os clones de entrada. Portanto, devido a estes fragmentos serem flanqueados por diferentes sítios *att*, três diferentes vetores doadores são requeridos para possibilitar a geração de três tipos de clones de entrada requerido para o “MultiSite Gateway®” (Tabela 4). Exemplo da reação BP é mostrado na Figura 2.

Tabela 4. Vetores doadores e suas funções para a geração de três tipos de clones de entrada.

Vetor doador	Função
pDONR™ P4-P1R	Utilizado para clonar o produto de PCR flanqueado pelos sítios <i>attB4</i> e <i>attB1</i> .
pDONR™ 221	Utilizado para clonar o produto de PCR flanqueado pelos sítios <i>attB1</i> e <i>attB2</i> .
pDONR™ P2R-P3	Utilizado para clonar o produto de PCR flanqueado pelos sítios <i>attB2</i> e <i>attB3</i> .

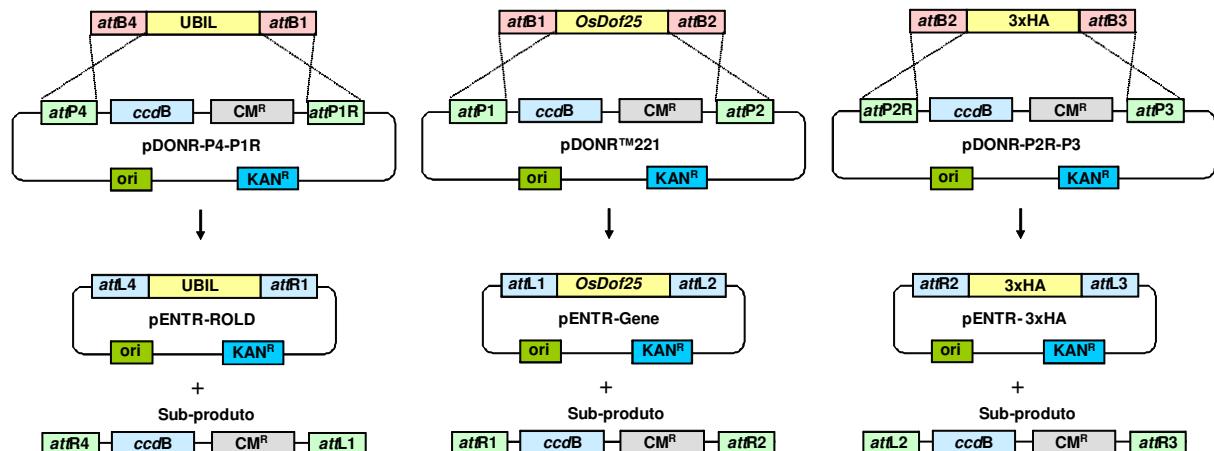


Figura 2. Esquema ilustrativo da reação de recombinação BP para criação dos vetores de entrada, necessários para construção do vetor para expressão do *OsDof25* (adaptado de SANTOS, 2009).

Depois da obtenção de todos os vetores de entrada na reação BP, é necessária a aquisição de um vetor de destino, ou seja, aquele que vai permitir a recombinação coordenada

dos três vetores doadores na reação de recombinação múltipla, também chamada de reação LR, pois envolve a recombinação entre sítios *attL* e *attR* dos vetores de entrada e do vetor de destino respectivamente (Figura 3).

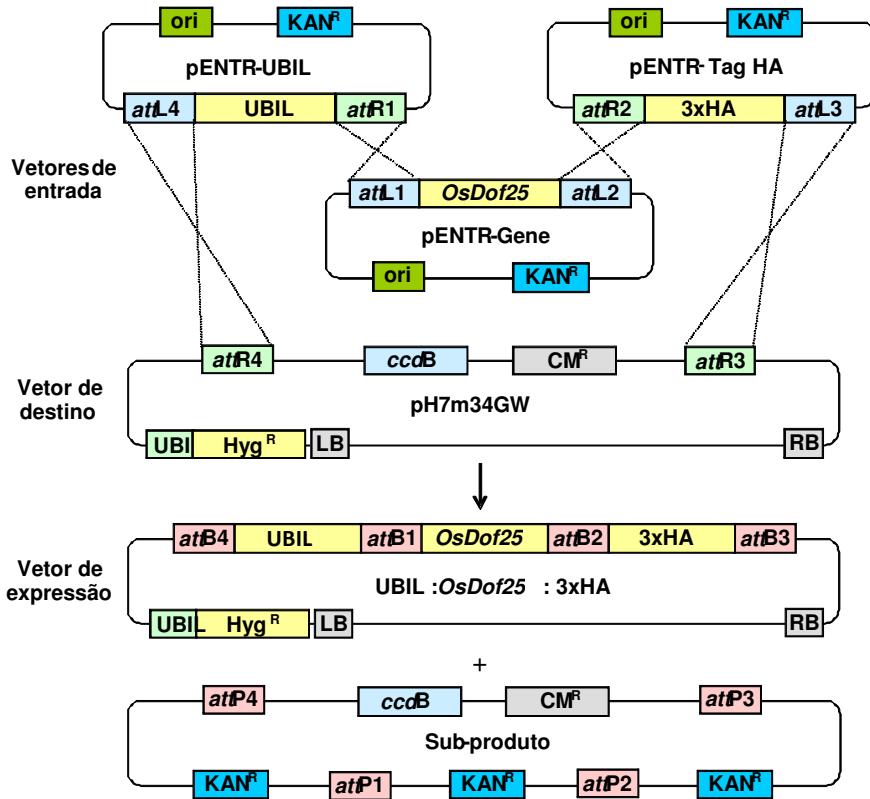


Figura 3. Reação LR triplo para obtenção dos vetores para superexpressão do gene de interesse. Neste trabalho foi usado o promotor UBIL (ubiquitina de milho) e um Tag-3xHA fusionado ao gene *OsDof25*. *Ori* – origem de replicação; *Hyg*^R - gene de resistência a higromicina; *attB*, *attP*, *attL* e *attR* – sítios de recombinação; *LB* – borda esquerda; *RB* – borda direita (adaptado de SANTOS, 2009).

3.2.1 Purificação do gene com os sítios de recombinação

Depois de amplificado o gene com os sítios de recombinação, é recomendada a purificação do produto amplificado para remoção do excesso de “*primers*” e dímeros de “*primers*”. Esses “*primers*” e seus dímeros podem recombinar eficientemente com o vetor doador na reação BP e aumentar o “*background*” depois da transformação em *E. coli*.

Obs.: O protocolo padrão para purificação de produtos de PCR usando extração com fenol/clorofórmio seguido de precipitação com isopropanol ou etanol com acetato de sódio não é recomendado para purificação destes produtos contendo o sítio *attB*. Este protocolo tem um limite de exclusão de fragmentos menores que 100pb e não remove eficientemente os dímeros de “*primers*”. Dessa forma foi utilizado o PEG 8000/MgCl₂ para purificação, que pode remover fragmentos de até 300pb.

A purificação foi feita com cerca de 90μL de reação da PCR, para aumentar a quantidade de produto de PCR recuperado. Aos 90μL do produto amplificado contendo os sítios *attB* foram adicionados 270μL de TE pH8,0 e 180μL de PEG 8000 contendo 30mM MgCl₂. Esta mistura foi agitada em vórtex e em seguida centrifugada a 10.000g por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi então retirado cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta do lado oposto ao da formação do precipitado. O precipitado foi

dissolvido em 16 μ L de TE pH 8,0 e a qualidade do produto recuperado foi visualizada em gel de agarose 1%. Após a verificação de que o produto recuperado estava com boa pureza foram realizadas as reações de recombinação BP para criar os vetores de entrada.

3.2.2 Reação BP – recombinação entre os sítios *attB* do gene e *attP* do vetor pDONR221 para a obtenção do vetor de entrada

A reação BP foi realizada com o gene amplificado levando os sítios de recombinação *attB1* e *attB2* e o vetor doador pDONR221 (Figura 4) para criação do vetor de entrada pENTR-*OsDof25*. Esse vetor participa na reação de LR tripla para formação da construção gênica usada na transformação das plantas. Nesta mesma reação de LR tripla estão também os vetores de entrada levando o promotor UBIL e o tag de 3xHA (peptídio de fusão com o gene).

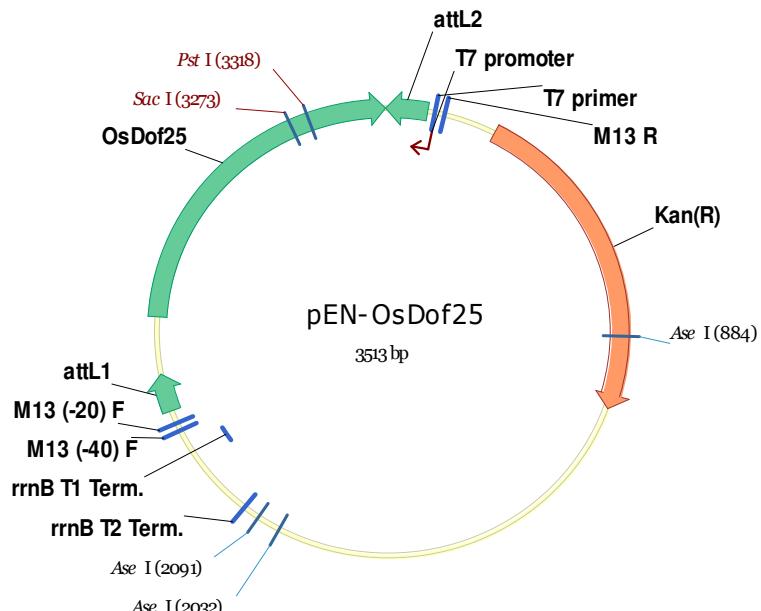


Figura 4. Vítor pENTR-*OsDof25* usado na reação de recombinação LR tripla para formação do clone de expressão.

As reações BP foram realizadas utilizando o kit “*Gateway® BP Clonase II Enzyme Mix*” (Invitrogen). Em um microtubo de 1,5mL, foram adicionados: 5 μ L do produto amplificado e purificado (gene), contendo os sítios *attB*, 1 μ L do vítor pDONR221, 2 μ L do tampão de reação BP e 2 μ L do mix de enzimas BP clonase. A mistura da reação foi homogeneizada vagarosamente por pipetagem e a reação ocorreu à temperatura ambiente durante a noite. Depois deste período a reação foi paralisada pelo tratamento com 1 μ L de Proteinase K a 37°C durante 10 min.

Antes de proceder à transformação foi realizada uma diálise por três horas em papel de filtro de 0,025 μ m colocado sobre água ultrapura autoclavada dentro de uma placa de Petri estéril. O volume de reação foi reduzido para 5 μ L em centrífuga a vácuo e utilizado para transformação de células competentes de *E. coli* (DH5 α). Misturou-se a reação BP (5 μ L), com 40 μ L de células competentes, que foi deixado em descanso no gelo por 5 min. Após este período a mistura foi submetida a eletroporação a 1.700V e logo em seguida misturada com 400 μ L de meio SOC. As bactérias, agora transformadas foram cultivadas por 1h a 37°C em agitador orbital a 150rpm. Para seleção das bactérias transformadas, 100 μ L foi riscado em meio LB contendo 50 μ g/mL de canamicina.

3.2.3 Preparo de células competentes para eletroporação (DH5 α)

O estoque de *E. coli* DH5 α foi riscado em meio LB sólido e incubado durante a noite a 37°C. Na tarde do dia seguinte, uma colônia isolada foi inoculada em 5mL de meio LB sólido e mantida sob agitação constante a 150rpm durante a noite. No dia seguinte pela manhã 3mL da cultura fresca foi inoculada em 300mL de meio LB líquido acondicionado em erlenmeyer de 2L, mantido sob agitação constante a 200rpm e 37°C até a cultura atingir uma DO₆₀₀ entre 0,5 a 0,8. Entre 3 e 4 horas de cultivo foram suficientes para alcançar uma DO₆₀₀ entre esses valores. Depois de atingida a DO₆₀₀, alíquotas de 50mL da solução de células foram acondicionadas em seis tubos falcon e mantidas em descanso no gelo por 30 min. Em seguida as células foram precipitadas a 4.000g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram solubilizadas, cuidadosamente, em 50mL de água destilada estéril gelada, para retirada do excesso de sais. As células foram novamente precipitadas como descrito acima e solubilizadas em 25mL de água destilada estéril gelada. As células foram então acondicionadas em três tubos falcon e novamente precipitadas como já descrito. O precipitado de cada tubo foi solubilizado em 2mL de glicerol 10% gelado e as células transferidas para um único tubo. Finalmente, as células foram precipitadas como descrito acima e o precipitado solubilizado em 550 μ L de glicerol 10% gelado. A suspensão de células foi dividida em alíquotas de 50 μ L, acondicionadas em microtubos de 1,5mL e mantidas em freezer -80°C.

3.2.4 Reações de LR triplo para obtenção da construção UBIL:OsDof25:3xHA

A reação de LR foi realizada utilizando o kit “Gateway LR Clonase II Plus Enzyme Mix” (Invitrogen). Em um microtubo de 1,5mL foram adicionados: 12,5fmoles do pENTR-UBIL, 12,5fmoles do pENTR-3xHA, 12,5fmoles pENTR-OsDof25 e 25fmoles do vetor de destino pH7m34GW. O volume foi elevado para 8 μ L com TE 1X pH 8,0 e adicionado 2 μ L do mix de enzimas. A mistura da reação foi homogeneizada vagarosamente por pipetagem e a reação ocorreu à temperatura ambiente durante a noite. Depois deste período a reação foi paralisada pelo tratamento com 1 μ L de Proteinase K a 37°C durante 10 min. Antes de proceder à transformação foi feita uma diálise por três horas em papel de filtro de 0,025 μ m colocado sobre água ultrapura autoclavada dentro de placa de Petri estéril. O volume de reação foi reduzido para 5 μ L em centrífuga a vácuo.

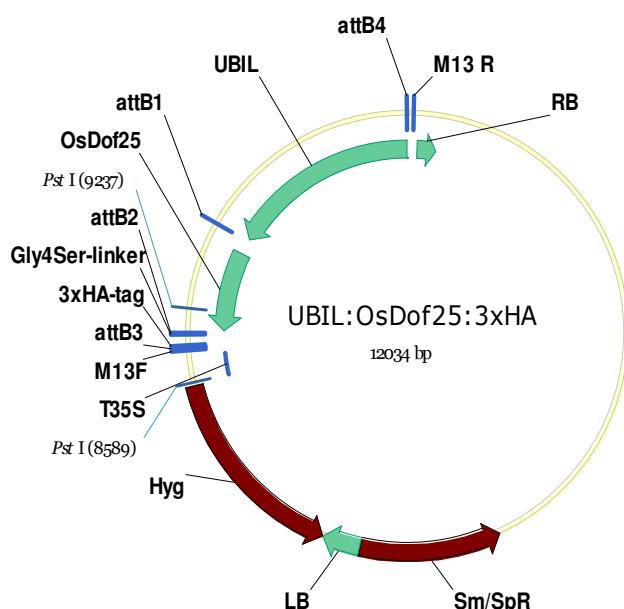


Figura 5. Vetor de expressão UBIL:OsDof25:3xHA usado para transformação das plantas de arroz via *Agrobacterium tumefaciens*. Este vetor leva o gene de resistência a higromicina (hyg) para seleção das plantas transformadas.

A fim de caracterizar os clones obtidos, foi realizada a transformação de *E.coli* como descrito anteriormente para a reação BP. O volume total obtido após transformação e cultivo, foi plaqueado em meio LB contendo Espectinomicina (Sm) 50 μ g/mL e Estreptomicina (Sp) 20 μ g/mL para seleção das células transformadas com o vetor levando a construção gênica. A confirmação da clonagem foi feita por digestão dos plasmídios com enzimas de restrição.

3.3 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Depois de caracterizadas as construções gênicas, estas foram inseridas em *Agrobacterium tumefaciens* estirpe LBA4404 como descrito a seguir.

Foi adicionado 1 μ g de plasmídio a 100 μ L de *Agrobacterium* competente (obtida conforme descrito no item 3.3.1), a mistura foi homogeneizada suavemente e incubada no gelo por 30 minutos. As células com o plasmídio foram congeladas em nitrogênio líquido por cinco minutos e em seguida incubada a 37°C em banho-Maria por mais cinco minutos. Após este tempo, foi adicionado 1mL de meio YEB, e as células foram mantidas a 28°C, com agitação constante a 150rpm durante duas horas. A transformação (1mL) foi plaqueada em meio YEB sólido com os antibióticos correspondentes a construção (Sp/Sm) mais Rf-Rifamicina (100 μ g/mL) e Gm-Gentamicina (40 μ g/mL). As placas foram incubadas a 28°C até o aparecimento de colônias (dois a três dias). A transformação foi confirmada por PCR de colônia.

3.3.1 Preparo de *Agrobacterium tumefaciens* competente

O estoque de *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) foi riscado em meio YEB sólido (item 3.3.2) contendo rifamicina (Rf) (100 μ g mL⁻¹) e gentamicina (Gm) (40 μ g mL⁻¹), e incubado a 28°C por 24 horas. Com uma alça flambada foi transferida apenas uma colônia isolada para um tubo falcon de 50mL contendo 3mL de meio YEB (Rf/Gm) que foi incubado a 28°C com agitação de 150rpm por 48 horas. Pela manhã do dia seguinte, 2mL da cultura fresca foi inoculada em 50mL de meio YEB contendo Rf e Gm em erlenmeyer de 250mL. A incubação foi realizada a 28°C sob agitação constante de 150rpm) até atingir uma DO₆₀₀ de aproximadamente 0,6. A cultura foi então dividida em dois tubos falcon de 50mL e incubada no gelo por 20 minutos. A seguir, as células foram precipitadas a 1.000g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado solubilizado em 500 μ L de uma solução contendo CaCl₂ 20mM e glicerol 10%. As células foram divididas em alíquotas de 100 μ L acondicionadas em microtubos estéreis de 1,5mL e mantidas em freezer -80°C.

3.3.2 Meio YEB para cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

Para cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* foi usado o meio YEB contendo 5g L⁻¹ de extrato de carne, 1g L⁻¹ de extrato de levedura, 1g L⁻¹ de peptona, 5g L⁻¹ de sacarose, 0,002g L⁻¹ de MgSO₄, pH 7,4. Para meios sólidos, 1,5% de agar foi adicionado ao meio de cultura.

3.4 Transformação de Arroz Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

O método para transformação de arroz se baseou na produção de calos embriogênicos provenientes da região do escutelo de sementes de arroz germinadas em meio nutritivo contendo 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxyacético). Os calos foram então infectados por *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor com a construção gênica desejada (UBIL:OSDof25:3xHA) e então uma nova planta de arroz foi regenerada a partir do calos transformado em meio contendo antibiótico de seleção (TOKI et al., 2006).

Foram descascadas e desinfestadas 300 sementes de arroz variedade Nipponbare. As sementes foram lavadas em 40mL de etanol 70%, por inversão durante um minuto. Em seguida, foram realizadas duas lavagens de 15min cada, com hipoclorito de sódio a 2,5%, onde a primeira recebeu Tween 20 a 0,05% e a segunda foi feita sem o detergente. Entre as lavagens com hipoclorito de sódio, foi feita lavagem com água destilada estéril por cinco vezes. Ao final da segunda lavagem com hipoclorito as sementes foram lavadas com água estéril por seis vezes, em minuto, cada até a completa remoção do hipoclorito.

As sementes foram distribuídas em 12 placas de Petri com 25 sementes cada. Na primeira etapa as sementes passaram por um processo de indução de calos embriogênicos em meio de cultivo N6D (Anexo 1) contendo 2,4D na concentração de 2mg L⁻¹ onde foram mantidas a 32°C por duas semanas para indução dos calos.

Após o período de indução, os calos foram transferidos para o meio de Co-cultivo N6-As (Anexo 2) sem a presença de agente seletivo, onde permaneceram por três dias, na ausência de luz a 25°C. Três dias antes dos calos serem transferidos para o meio de Co-cultivo, a *Agrobacterium* transformada contendo a construção de interesse, foi colocada para crescer em meio AB (Anexo 3). Uma solução de *Agrobacterium* foi preparada a partir do cultivo recente de *Agrobacterium tumefaciens*, que foi diluído em meio para ressuspensão AMM (Anexo 4) até se obter uma densidade ótica de (DO₆₀₀) 0,1. Os calos foram então submersos na solução contendo *Agrobacterium* e homogeneizados por três minutos. Após o contato com a *Agrobacterium* os calos foram colocados sobre papel filtro para drenagem do excesso de bactéria, depois foram dispostos sobre o meio de Co-cultivo contendo papel filtro + 0,5 mL de meio AMM, onde permaneceram por três dias no escuro a 25°C.

Os calos foram retirados do meio de co-cultivo e lavados com água destilada estéril por aproximadamente cinco vezes, para retirada do excesso de *Agrobacterium* e posteriormente lavados por mais três vezes com uma solução contendo 500mg L⁻¹ de carbenicilina para eliminação da *Agrobacterium*. Após essa etapa os calos foram transferidos para o meio de seleção N6DH (Anexo 5), onde permaneceram por duas semanas a 32°C com luz contínua. Além dos nutrientes, ao meio de seleção foram adicionados o antibiótico carbenicilina (400 mg L⁻¹), para a completa eliminação da *Agrobacterium* e Higromicina (50 mg L⁻¹) para eliminar os calos que não possuíam o gene resistente.

Os calos que permaneceram por duas semanas em meio de seleção contendo agente seletivo e apresentaram desenvolvimento foram transferidos para meio de regeneração RE-III (Anexo 6) por 14 dias, onde se regenerou a parte aérea das novas plantas. As plântulas com cerca de 3cm foram transferidas para meio de indução de raízes HF (Anexo 7) onde permaneceram por mais duas semanas antes de serem transferidas para potes contendo solo, onde foram cultivadas até o final do ciclo para obtenção de sementes. As sementes foram secas em estufa a 34 °C por sete dias e depois armazenadas em geladeira a aproximadamente 10 °C para posterior confirmação da transformação e cultivo do próximo ciclo.

Cada plântula regenerada no cultivo *in vitro* representou uma linhagem independente (L1, L2, L3 e L4), sendo que as linhagens obtidas representavam a geração (T1). As linhagens regeneradas foram cultivadas em casa de vegetação para a obtenção das sementes. Ao final do ciclo de cultivo cada linhagem separadamente deu origem às sementes da geração T2, que passaram por processo de confirmação da transformação.

A confirmação foi feita a partir da transferência de 40 plântulas de cada linhagem para uma solução nutritiva contendo higromicina (50mg L⁻¹) por sete dias. A partir daí, foi verificada a proporção de plantas que sobreviveram, aquelas que possuíam o gene (*hyg*) de resistência ao antibiótico e as que morreram. As linhagens cujas plantas sobreviveram e apresentaram segregação 3:1, ou seja, a cada quatro plantas três sobreviveram e uma morreu, possivelmente apresentavam uma única cópia da construção. Entre dez e quinze plantas de cada linhagem, representando a geração T2 foram cultivadas separadamente.

Devido ao curto tempo disponível para o cultivo de mais um ciclo, foram utilizadas para a montagem dos experimentos, sementes obtidas na geração T2, e durante a condução do experimento foi feita a identificação das plantas transformadas, com a aplicação de higromicina no limbo foliar (400mg. L⁻¹), com eliminação das plantas que apresentaram sintomas de necrose na região da aplicação. As duas linhagens selecionadas foram L1 e L4.

As linhagens obtidas durante o processo de transformação, denominadas L1 e L4 foram utilizadas em dois experimentos, no primeiro com o objetivo de determinar os parâmetros cinéticos ($V_{\text{máx}}$ e K_M), e em um segundo experimento para análise da expressão gênica dos transportadores de nitrato e amônio de alta afinidade que mais contribuem para a absorção de N em arroz.

3.5 Avaliação dos Parâmetros Cinéticos Envolvidos na Absorção de NH₄⁺ e NO₃⁻ em Arroz

O primeiro experimento teve como objetivo avaliar parâmetros cinéticos envolvidos na absorção de NH₄⁺ e NO₃⁻ em plantas de arroz da variedade Nipponbare: na planta não transformada (tipo selvagem, WT) e sua respectivas linhagens transformadas (L1 e L4), expressando o fator de transcrição *OsDof25*.

Os parâmetros cinéticos usados para avaliar a absorção de nutrientes nas plantas foram $V_{\text{máx}}$ (μmol g⁻¹ h⁻¹), ou seja, velocidade máxima ou influxo máximo de absorção, quando todos os transportadores estão carregados e K_M (μmol L⁻¹) aparente, que representa a concentração do substrato em que o processo de absorção atinge a metade da sua velocidade máxima. Quanto menor o valor de K_M (constante de Michaelis -Menten) maior a afinidade do transportador pelo íon a ser transportado. Contudo a combinação entre alto valor de $V_{\text{máx}}$ e/ou baixo valor para K_M são características desejáveis, pois podem significar maior eficiência de absorção.

As plantas foram cultivadas em câmera de crescimento no Departamento de Solos da UFRRJ onde foram submetidas à fotoperíodo de 14h/10h (luz/escuro) com luminosidade de 500μmol m⁻².s⁻¹ (fluxo de fótons fotossintéticos), umidade relativa do ar de 50% e temperatura 28°C/26°C (diurna/noturna).

Primeiramente foi feita a desinfestação das sementes de arroz em solução de hipoclorito de sódio 2,5%, por 10 minutos, e posteriormente lavadas com água destilada para a retirada do hipoclorito. Dez dias após germinação, as plantas foram transferidas para vasos com capacidade de 0,7L (quatro plantas por vaso). Parte dos vasos recebeu solução de Hoagland modificada com 1/4 da força iônica total com 1,5mM de N-NO₃⁻ e outra parte com 1,5mM de N-NH₄⁺. Três dias depois as plantas passaram a ser cultivadas em solução de Hoagland modificada a 1/2 força iônica total, com troca de solução a cada três dias. Vinte e um dias após a germinação, todos os vasos receberam solução de Hoagland modificada desprovida de nitrogênio por 72 horas, quando então foram aplicados os ressuprimentos com baixa e alta dose de N-NO₃⁻ (0,2mM e 2,0mM) aos vasos anteriormente com NO₃⁻ e nos demais vasos o ressuprimento com baixa e alta dose de N-NH₄⁺ (0,2mM e 2,0mM).

Durante um período de nove horas, foram feitas coletas a cada 30 minutos nos tratamentos de 0,2mM de NO₃⁻ e 0,2mM de NH₄⁺, nos tratamentos de maior concentração 2,0 mM de NO₃⁻ e 2,0mM de NH₄⁺ as coletas foram efetuadas a cada hora (Figura 6). A cada coleta foi retirada uma alíquota de 1mL de solução com a finalidade de obter as curvas de depleção do íon amônio e nitrato ao longo do período analisado. Decorrido o tempo de amostragem da solução nutritiva, as plantas foram coletas em (folha, bainha e raiz) para posterior análise das frações nitrogenadas e açúcares solúveis.

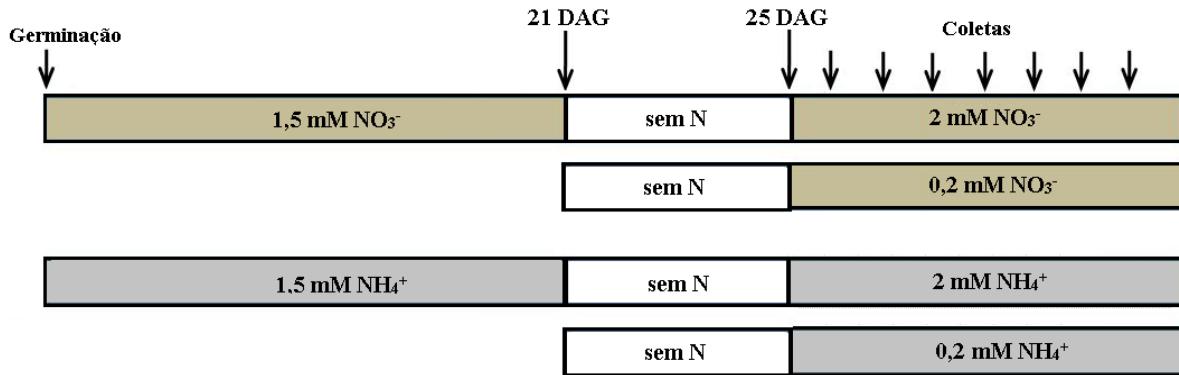


Figura 6. Modelo do experimento I usando plantas de arroz da variedade Nipponbare (duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* e a planta do tipo selvagem =não transformada) para análise dos parâmetros cinéticos ($V_{\text{máx}}$ e K_M) relativos a absorção de NO_3^- e NH_4^+ . Dias Após a Germinação (DAG).

3.5.1 Determinação dos parâmetros cinéticos ($V_{\text{máx}}$ e K_M)

A determinação dos parâmetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ e K_M foram efetuados pelo programa cinética (RUIZ & FERNANDES FILHO, 1992). Utilizou-se o modelo potencial para todos os tratamentos em função do melhor ajuste. A absorção líquida foi determinada proporcionalmente ao peso fresco de raiz, sendo expressa em $\mu\text{moles de N absorvido por grama de peso fresco por hora}$. Os teores de N-NO_3^- foram determinados de acordo com CATALDO et al. (1975) e N-NH_4^+ por FELKER (1977).

Os resultados de $V_{\text{máx}}$, K_M e massa fresca das plantas transformadas e não transformadas foram submetidos à análise de variância, e os valores médios comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio do programa SAEG versão 5.0.

3.6 Análise do Efeito dos Fatores de Transcrição *OsDof25* sobre a Expressão dos Transportadores de NO_3^- e NH_4^+ e Proteínas NAR

As plantas foram cultivadas conforme descrito no primeiro experimento, com algumas modificações (Figura 7). Vinte e oito DAG as plantas foram transferidas para solução sem nitrogênio e 72 horas depois foram aplicados os tratamentos: (i) suprimento constante com 1,5mM de N-NO_3^- ou N-NH_4^+ , (ii) deficiência de N por três dias, (iii) ressuprimento com 2,0 mM de N-NO_3^- ou N-NH_4^+ após três dias de deficiência de N, (iv) ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- ou N-NH_4^+ . As coletas foram feitas nos tempos 3 e 9 h após a aplicação dos tratamentos. Decorrido os tempos estipulados as plantas foram coletadas, divididas em folha, bainha e raiz e congeladas em nitrogênio para posterior extração de RNA total e análise da expressão gênica.

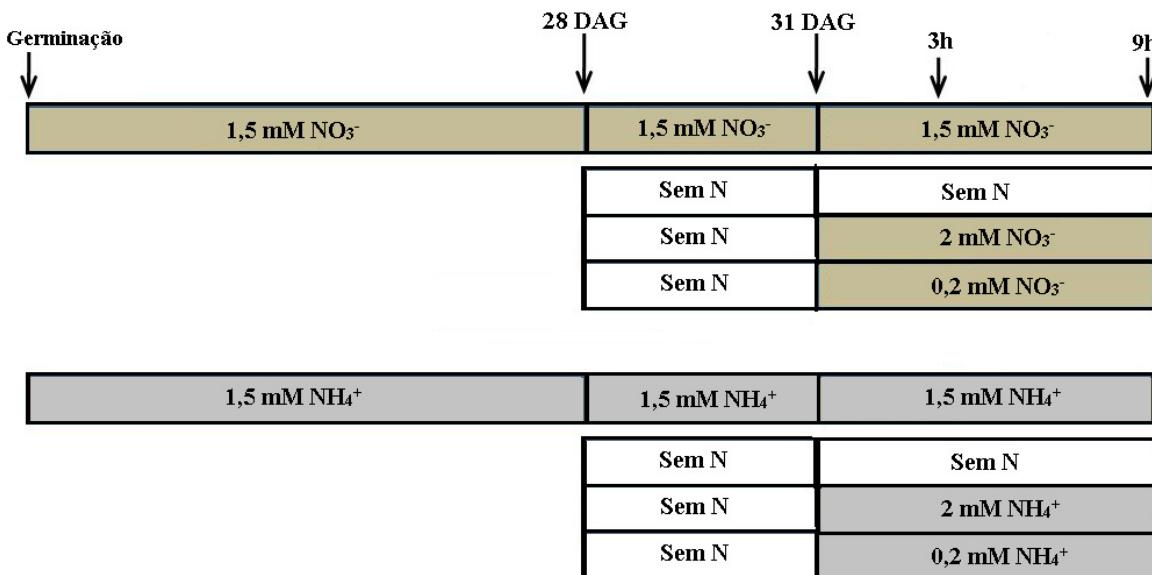


Figura 7. Modelo do experimento II usando plantas de arroz da variedade Nipponbare (duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* e a planta não transformada =tipo selvagem) para análise da expressão dos transportadores de NO₃⁻ e NH₄⁺. Dias Após a Germinação (DAG).

3.6.1 Análise de metabólitos solúveis

Amostras de folhas, raízes e bainhas, foram homogeneizadas em etanol 80%, e posteriormente feita a partição com clorofórmio (FERNANDES, 1984). O extrato obtido foi utilizado para determinação dos teores de açúcares solúveis de acordo com YEMM & WILLIS, 1954, e das frações nitrogenadas, N-NO₃⁻ (CATALDO et al., 1975), N-NH₄⁺ (FELKER, 1997) e N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955).

3.6.2 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído utilizando tampão NTES (0,2M Tris-Cl pH 8,0; 25mM EDTA pH8; 0,3M NaCl; 2% SDS). Amostras de folha e raiz foram maceradas em N₂ e homogeneizadas em uma mistura contendo 600µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e 800µL de tampão NTES por 10 minutos em vortéx. Após centrifugação a 18.000x g por 20 minutos a 4°C o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e novamente centrifugado por 20 minutos com 500µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Após o procedimento, o RNA total foi precipitado pela adição de 1/10 volume de acetato de sódio 3M (NaOAc_{DEPC}) pH 4,8 (70µL) e 1 volume de isopropanol puro (700µL). A seguir a mistura foi mantida a -80°C por 1 hora seguida de centrifugação a 18.000 x g por 20 min. Descartado o sobrenadante o precipitado foi lavado em etanol_{DEPC} 70% e centrifugado a 18.000x g por 10 minutos. O precipitado foi solubilizado em 600µL H₂O_{DEPC} e novamente precipitado com 600µL de cloreto de lítio 4M (LiCl_{DEPC}) pH 4,8 durante 16 horas a 4°C. Decorrido esse período a solução foi centrifugada a 18.000x g por 20 minutos e o precipitado foi novamente solubilizado em 450µL H₂O_{DEPC}. Após a completa dissolução foi adicionado acetato de sódio 3M (NaOAc_{DEPC}) pH 4,8 (50µL) e etanol absoluto (1000µL). A mistura foi mantida por 45 minutos a -80°C e centrifugada a 18.000x g por 20 min. O precipitado foi lavado com etanol 70% e após a secagem do solubilizado com H₂O_{DEPC} (50µL), para armazenamento a -80°C.

O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000c e após a quantificação, foram corridas amostras de cada extração em gel de agarose (1%) com brometo de etídio, para detecção de possíveis sinais de degradação e contaminação com DNA.

3.6.3 Tratamento com DNase I e síntese do cDNA e PCR em tempo real

Amostras de 0,5 μ g de RNA total foram tratadas com DNase (“*DNase I Amplification Grade – InvitrogenTM*”) seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente foi preparada uma solução estoque de 30 μ L com concentração de 0,125 μ g/ μ L, para aumentar a alíquota a ser pipetada. Quatro microlitros de solução representado 0,5 μ g de RNA foram misturados com 0,5 μ L do tampão de reação da DNase I 10X, 0,5 μ L da DNase I. A incubação da reação foi conduzida a 25°C por 15 min, seguida da adição de 0,5 μ L de EDTA 25mM e posterior inativação da DNase I a 70°C por 10 minutos. A reação de síntese do cDNA foi realizada com o kit “*TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents*” (Applied Biosystem) seguindo as instruções do fabricante.

O gene da actina foi utilizado como padrão interno nas reações de PCR. As reações foram feitas no aparelho “*StepOne Real-Time PCR System*” (“*Applied Biosystems*”) utilizando o “*kit Power SYBR[®] Green PCR Master Mix*” (“*Applied Biosystems*”) seguindo as recomendações do fabricante. Todas as reações foram feitas em duplicata. A reação foi montada em placas de PCR da seguinte maneira: 6 μ L do tampão “*Power SYBR Green PCR Master Mix*” 2X, 3 μ L de uma solução de “*primers*” 3,6 μ M cada e 3 μ L do cDNA diluído, com volume final de 12 μ L. A placa foi selada com filme ótico apropriado, agitada por três minutos em vórtex próprio e centrifugada a 3.000g por 3 min a 25°C. Cada reação foi realizada da seguinte maneira: dez minutos a 95°C, quarenta ciclos de amplificação com 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Uma curva de dissociação (“*melting*”) foi adicionada à programação para identificar possíveis amplificações inespecíficas.

3.6.4 Desenho dos iniciadores (“*primers*”) para os estudos de expressão gênica

Tabela 5. Sequências dos “*primers*” (“*forward* e *reverse*”) usados nas reações de PCR em tempo real para os genes dos transportadores de nitrato (*OsNRT2.1*, *OsNRT22.1* e *OsNAR2.1*), transportadores de amônio (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*) e actina (*OsAct11*) de arroz, e respectivos acessos nos bancos de dados TIGR e NCBI.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Nº acesso
<i>OsDof25</i>	5'-ACTCGTTCACGGACCTCCT-3'	5'-CTTGGTGATGGACGGGTAGT-3'	LOC_Os08g38220.1
<i>OsNRT2.1</i>	5'- GCGACCGAGACCAGCAATAC-3'	5'- TTCATCACCGTTGCAACAAG-3'	NM_001052193.1
<i>OsNRT2.2</i>	5'- GCCGGAGCACGCCATAAT-3'	5'- AAACGGTAACAAAACGTTCAACAG-3'	NM_001052194.1
<i>OsNAR2.1</i>	5'- ATCCACGCCTCCCTCAAG-3'	5'- ACTTGTCTTCTGCGCTTC-3'	NM_001053852.2
<i>OsAMT1.1</i>	5'-GGTCATCTICGGGTGGTCA-3'	5'-CGTGCCTGTCAGGTCCAT-3'	AF289477
<i>OsAMT1.2</i>	5'-GAAGCACATGCCGAGACA-3'	5'-GACGCCGACTTGAACAGC-3'	AF289478
<i>OsAMT1.3</i>	5'-GCGAACGCGACGGACTA-3'	5'-GACCTGTGGACCTGCTT-3'	AF289479
<i>OsActin</i>	5'-TTATGGTTGGGATGGGACA-3'	5'-AGCACGGCTGAATAGCG-3'	NM_197297

Foram desenhados “*primers*” para os seguintes genes: transportadores de nitrato de alta afinidade que mais contribuem para a absorção de N-NO₃⁻ (*OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e proteína *OsNAR2.1*). Para os genes que codificam os transportadores *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* foram utilizados os “*primers*” desenhados por DUAN et al. (2007). A especificidade dos “*primers*” foi analisada por alinhamento das seqüências nos bancos de dados (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e experimentalmente ao fim da reação de PCR durante a “*curva de melting*”. Todos os “*primers*” apresentaram especificidade para cada gene analisado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Transformação Genética de Arroz Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

A formação de calos embriogênicos nas sementes de arroz colocadas em meio de indução com o regulador 2,4D teve início após cinco dias de cultivo. Aos quatorze dias houve a formação de uma massa celular de coloração amarelo claro e estruturas globulares na superfície do calo, nesta época os calos já estavam aptos para serem transformados através de *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 8).

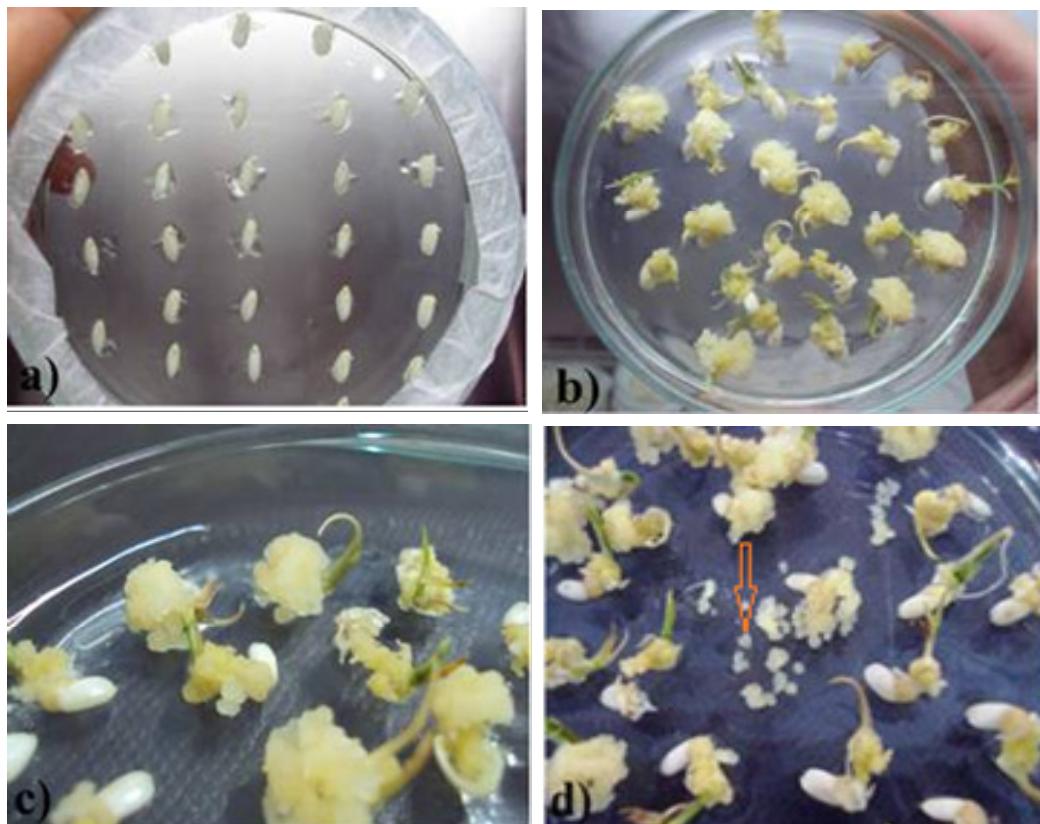


Figura 8. a) Sementes de arroz da variedade Nipponbare em meio nutritivo (N6D) contendo auxina (2,4D a 100mg L⁻¹) como regulador para indução de calos embriogênicos; b), c) e d) Calos em estádio de desenvolvimento após 14 dias em meio nutritivo, alguns com característica friável que ao toque se desagregam facilmente.

O método de cultura de tecidos facilita o processo de transformação de plantas via *Agrobacterium tumefaciens*, propiciando a obtenção de genótipos transformados de arroz. A embriogênese somática é um dos métodos de cultivo de tecidos para a obtenção de embriões onde se utiliza células somáticas (não reprodutivas) obtidas de tecido vegetal que ao passar por processo de diferenciação dão origem a células totipotentes (reprodutivas). Hiei et al. (1994) foram os primeiros autores a demonstrar a eficiência da *Agrobacterium* na transformação de arroz. Esses autores conseguiram um grande número de plantas de arroz transgênico morfologicamente normais e férteis por co-cultivo de tecidos de arroz com *Agrobacterium*. Em particular, observaram que os calos induzidos a partir do escutelo de

sementes de frutos maduros obteve melhores resultados em comparação com os diferentes tecidos que foram utilizados.

Após o período de indução os calos formados e postos em meio líquido na presença de *Agrobacterium* foram posteriormente colocados sobre papel filtro para drenagem do excesso de bactéria onde permaneceram em período de incubação por três dias (Figura 9).

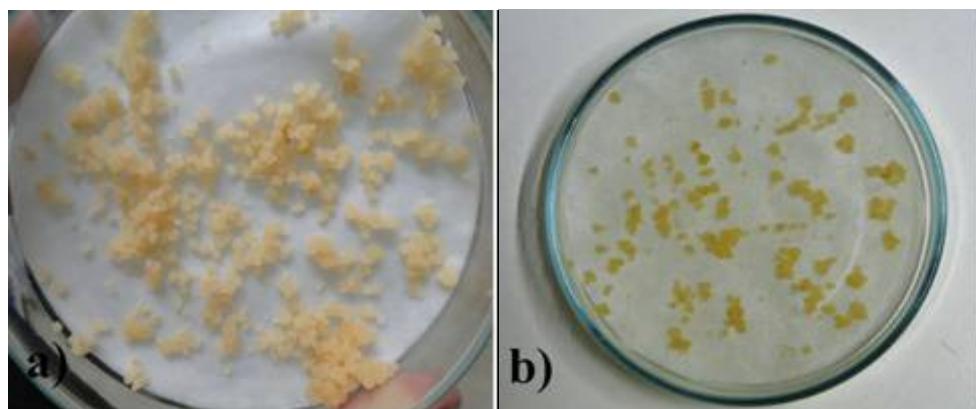


Figura 9. a) Calos embriogênicos oriundos de semente de arroz, colocados sobre papel filtro para drenagem do excesso de solução incubadora contendo *Agrobacterium*; b) Calos inoculados com *Agrobacterium* dispostos em meio de Co-cultivo, onde permaneceram por três dias no escuro a 25 °C.

A transformação gênica de monocotiledôneas e dicotiledôneas mediada por *Agrobacterium* apresenta inúmeras vantagens sobre outros métodos de transformação: 1) pela integração do gene no genoma do hospedeiro ser mais precisa e intacta; 2) a possibilidade de integração de segmentos relativamente grandes de T-DNA nos cromossomos da planta com a ocorrência de rearranjos mínimos; 3) inserção de um pequeno número de cópias do gene; 4) e alta eficiência de transformação com maior nível de expressão do transgene (Hiei et al., 1997; VEGA et al., 2008).

Os calos retirados do meio de Co-cultivo e lavados com água destilada estéril e solução contendo carbenicilina para eliminação da *Agrobacterium* foram transferidos para meio de seleção contendo higromicina para eliminar os calos que não possuíam a construção gênica (Figura 10). Em geral aqueles que apresentaram um escurecimento celular com aspecto marrom claro não apresentavam a construção em estudo.

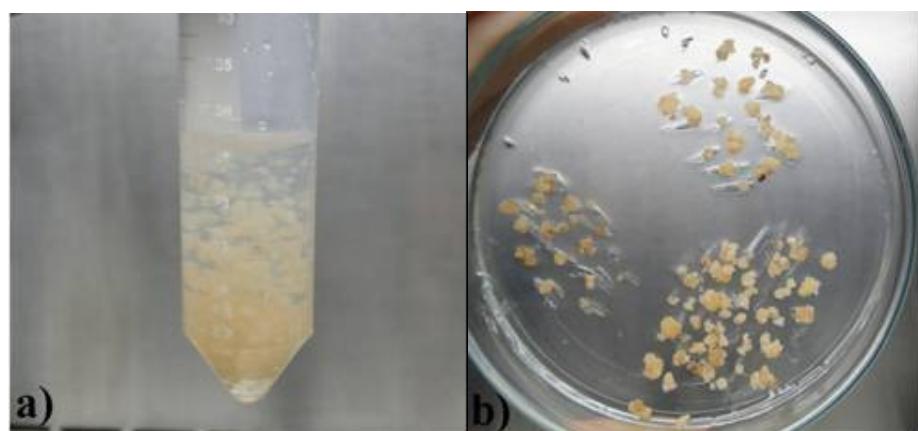


Figura 10. a) Lavagem dos calos em água destilada estéril contendo o antibiótico carbenicillina (500 mg L⁻¹) para eliminação da *Agrobacterium* após o período de incubação; b) Calos em meio de seleção N6D, contendo carbenicilina (400 mg L⁻¹), para a

completa eliminação da *Agrobacterium* e higromicina (50 mg L^{-1}) para eliminar os calos que não possuíam o gene resistente ao antibiótico.

Os calos que permaneceram por duas semanas em meio de seleção contendo agente seletivo e apresentaram desenvolvimento e coloração mais clara foram transferidos para um meio de regeneração por aproximadamente duas semanas, onde alguns apresentaram regeneração de parte aérea. As plântulas com parte aérea regenerada foram transferidas para o meio de indução de raízes. Após a completa regeneração (raiz e parte aérea) as plantas foram cultivadas em casa de vegetação até o final do ciclo (Figura 11).

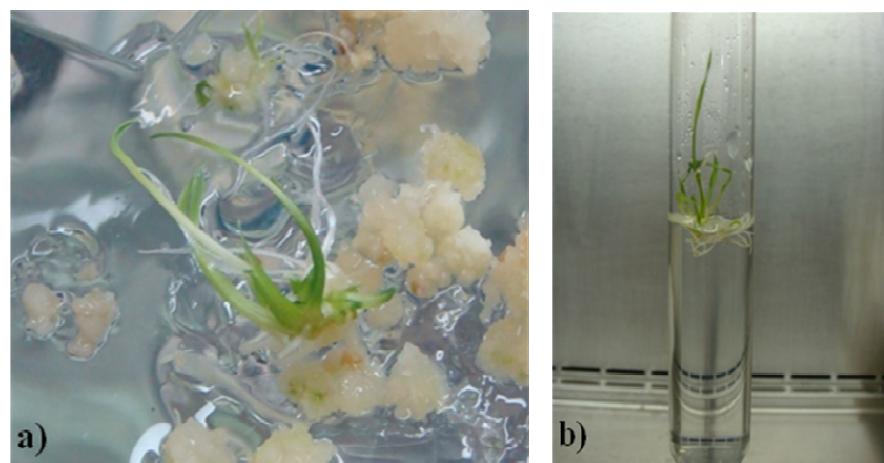


Figura 11. a) Plântulas de arroz expressando o fator de transcrição *OsDof25*, regeneradas a partir de calos embriogênicos cultivados em meio de regeneração de parte aérea (RE-III); b) Planta de arroz completamente regenerada em meio de indução de raízes.

Todas as linhagens transgênicas obtidas passaram por uma avaliação para identificar aquelas que apresentarem segregação 3:1 na geração T2 e possivelmente tinha uma cópia do gene. As plantas que passaram pelo procedimento de transformação foram chamadas de T1, e as sementes das linhagens T1 deram origem à geração T2 onde já foi possível observar a segregação e separar as plantas homozigotas. Devido ao curto período disponível para o cultivo de mais um ciclo da geração T3, foram utilizadas para montagem dos experimentos, sementes obtidas da geração T2, e durante a condução do experimento foi feita a identificação das plantas transformadas a partir do teste com o antibiótico higromicina.

4.2 Análise da Expressão do *OsDof25* em Plantas de Arroz da Variedade Nipponbare Transformadas e Não Transformadas.

Com a finalidade de verificar o nível de expressão do fator de transcrição *OsDof25* nas plantas transformadas e não transformadas, foram realizadas análises nas plantas submetidas ao suprimento constante de N-NO_3^- ou N-NH_4^+ . Considerando que o promotor da Ubiquitina de milho utilizado na construção gênica se caracteriza como um promotor forte e constitutivo, ou seja, possui alta afinidade de ligação dos fatores de transcrição a sequência promotora e direciona a expressão para todos os tecidos da planta durante os vários estádios de desenvolvimento, espera-se que o nível da expressão do gene, sob controle desse promotor, não sofra grandes variações em função do tratamento aplicado.

As análises de expressão gênica mostraram que a L1 apresentou maior expressão, tanto na raiz quanto na parte aérea das plantas nutridas com N-NH_4^+ ou N-NO_3^- (Figura 12). Na parte aérea, o aumento da expressão na L1 se alterou em função do tempo de coleta,

mostrando maior expressão às 9 horas. Já no tecido da raiz a maior expressão do fator de transcrição ocorreu às 3 horas com posterior diminuição às 9 horas (Figura 12).

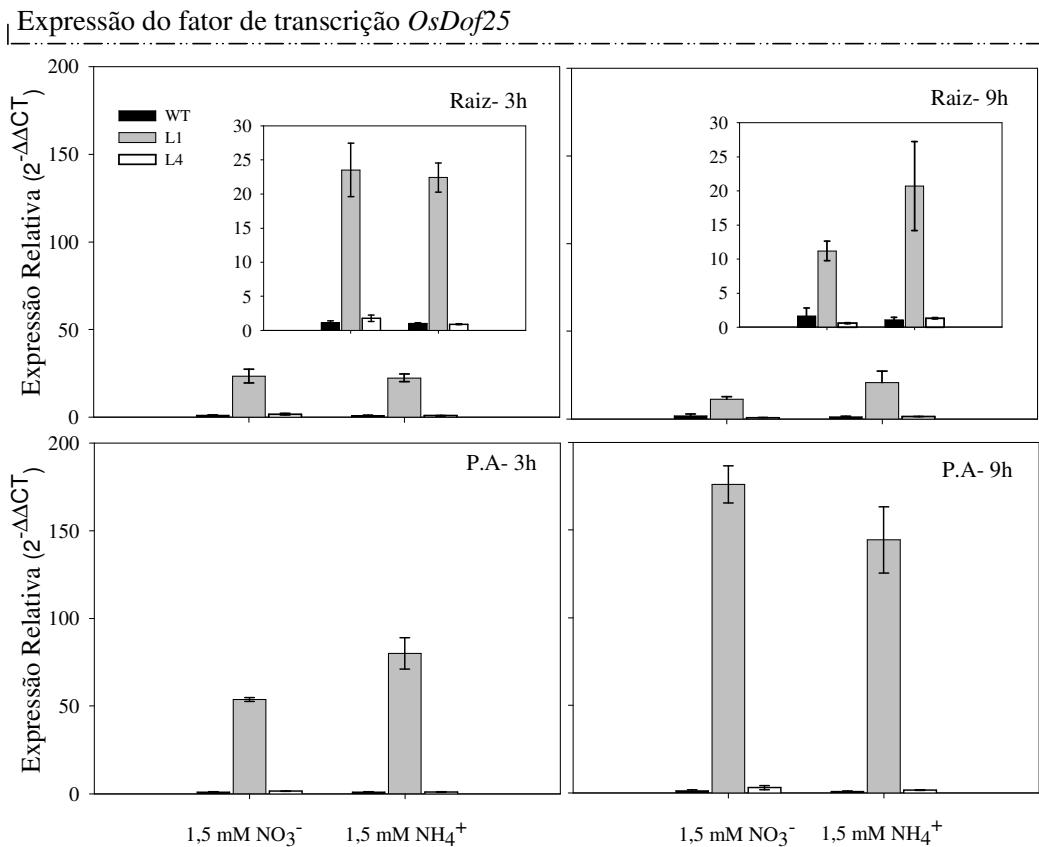


Figura 12. Efeito do suprimento constante de 1,5 mM de N-NO₃⁻ ou N-NH₄⁺ sobre a expressão relativa do fator de transcrição *OsDof25* na parte aérea (P.A) e na raiz de plantas de arroz da variedade Nipponbare: transformadas (L1 e L4) e não transformada (tipo selvagem, WT), coletadas às 3 e 9h após a aplicação do tratamento. O gene da *Actina* foi utilizado como padrão interno nas reações de PCR. Barras representam erro padrão da média.

4.3 Avaliação dos Parâmetros Cinéticos Envolvidos na Absorção de NH₄⁺ e NO₃⁻ em Arroz

Independente da fonte de N utilizada, as plantas não transformadas se desenvolveram melhor que as linhagens transformadas (L1 e L4) e consequentemente apresentaram maior massa fresca total em ambos os tratamentos com N-NO₃⁻ ou N-NH₄⁺ (Tabela 6). A linhagem não transformada se desenvolveu melhor quanto a massa fresca de parte aérea e raiz, porém as linhagens transformadas se diferem quanto à massa de parte aérea e não quanto a raiz o que resultou em diferenças na razão raiz:parte aérea (Tabela 6). Com isso, a L1 mostrou maior razão raiz:parte aérea comparada a L4 (Tabela 6).

No ressuprimento com 0,2mM de N-NH₄⁺ as plantas da linhagem L1 apresentaram menor massa fresca total e menor massa da parte aérea, porém em massa fresca de raiz foi semelhante a L4. Com isso, L1 mesmo com menor desenvolvimento apresentou maior razão raiz:parte (Tabela 6). As linhagens transformadas sob ressuprimento com 2,0mM de N-NH₄⁺ não diferiram quanto à massa fresca total, parte aérea e raiz, apenas na razão raiz:parte aérea onde L1 foi maior que L4 (Tabela 6).

Tabela 6. Massa fresca (g planta⁻¹) de raiz e parte aérea de duas linhagens transformadas de arroz (L1 e L4), expressando o fator de transcrição *OsDof25*, comparadas ao tipo selvagem (WT) da variedade Nipponbare, submetidas ao ressuprimento de N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺ (0,2 e 2,0 mmoles.L⁻¹) após 72 horas de privação de N.

Plantas cultivadas com N-NO ₃ ⁻						
Tratamento	Linhagem					
	WT	L1	L4	WT	L1	L4
	Massa fresca total (g planta ⁻¹)					
Ress. 0,2 mM	5,20a	2,92b	3,86b	3,18a	1,76c	2,44b
Ress. 2,0 mM	5,25a	3,65b	4,11b	3,22a	2,18c	2,66b
Raiz (g planta ⁻¹)						
Ress. 0,2 mM	2,02 a	1,16 b	1,42 b	0,64ab	0,66a	0,58b
Ress. 2,0 mM	2,03 a	1,47 b	1,45 b	0,63a	0,67a	0,55b
Razão raiz:Parte aérea						
Plantas cultivadas com N-NH ₄ ⁺						
Tratamento	WT	L1	L4	WT	L1	L4
	Massa fresca total (g planta ⁻¹)					
	8,14a	4,46c	6,29b	5,07a	2,66c	4,06b
Ress. 2,0 mM	7,95a	5,99b	6,44b	4,91a	3,59b	4,18ab
Raiz (g planta ⁻¹)						
Ress. 0,2 mM	3,07 a	1,80 b	2,23 b	0,61b	0,68a	0,55b
Ress. 2,0 mM	3,04 a	2,40 b	2,26 b	0,62a	0,67a	0,54b
Razão raiz:Parte aérea						

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

As propriedades cinéticas do sistema de transporte na planta são altamente variáveis, e afetadas por fatores ambientais como luz, temperatura e disponibilidade do nutriente (WÍREN et al., 2000). Em diversas espécies de plantas, a variação nos parâmetros cinéticos é ampla e está relacionada à morfologia, fisiologia e desenvolvimento do sistema radicular em resposta a diferenças genotípicas de adaptação as condições do ambiente (BAPTISTA et al., 2000).

De acordo com CRAWFORD & GLASS (1998), os valores de V_{máx} e K_M para a absorção de N-NO₃⁻ pelo sistema de alta afinidade induzível (iHATS) varia em torno de 3-8 µmol g⁻¹ h⁻¹ e 20-100 µmol L⁻¹, respectivamente. Os resultados mostrados na Tabela 7, estão dentro da faixa de valores indicada por estes autores.

Os valores de V_{máx} não diferiram entre as plantas transformadas e não transformadas no ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ (Tabela 7). A L4 apresentou menor valor de K_M, seguida da L1 e das plantas não transformadas, entretanto as duas últimas não diferiram entre si (Tabela 7). Estudos realizados na variedade de arroz Piauí, tradicionalmente cultivada no Estado do Maranhão e adaptada a baixo suprimento de nitrogênio mostrou a combinação de maior V_{máx} e menor K_M quando comparado à variedade IAC (melhorada) sob ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻, o que resulta em maior eficiência de absorção da variedade tradicional (SANTOS et al., 2011). Nos resultados mostrados aqui, as linhagens transformadas e não transformadas não diferiram quanto a V_{máx} quando submetidas ao baixo ressuprimento de N-NO₃⁻ e o K_M foi menor apenas na L4 (Tabela 7). Com isso não é possível afirmar uma possível melhor eficiência de absorção entre as linhagens L1 e L4.

A determinação dos parâmetros cinéticos das plantas cultivadas no tratamento com 2,0 mM de N-NO₃⁻ não foi possível, pois o tempo de coleta da solução nutritiva não foi suficiente para ocorrer uma queda acentuada na concentração do íon, necessária para estimar a velocidade máxima de absorção.

Como pode ser observado na Tabela 7 houve diferenças nos parâmetros cinéticos V_{máx} e K_M entre as linhagens transformadas e o tipo selvagem com o ressuprimento de 0,2 mM de N-NH₄⁺. Os valores de V_{máx} para L4 foram maiores, enquanto a L1 e tipo selvagem não diferiram entre si (Tabela 7). A linhagem não transformada mostrou maior K_M em relação a L1 e L4, porém as linhagens transformadas foram semelhantes entre si (Tabela 7).

No sistema de absorção de baixa afinidade de NH₄⁺ (2,0 mM) os parâmetros cinéticos analisados não apresentaram diferenças entre as plantas transformadas e não transformadas (Tabela 7). Em condições de cultivo semelhante, BAPTISTA et al. (2000) observaram em duas variedade de arroz (Agulha e Bico Ganga) sob ressuprimento com 20 mg L⁻¹ de N-NH₄⁺, valores de V_{máx} de 16,27 e 22,1 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ e K_M de 513 e 577 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 7. Parâmetros cinéticos (V_{máx} e K_M) da absorção de N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺ de duas linhagens transformadas de arroz (L1 e L4), expressando o fator de transcrição *OsDof25*, comparadas ao tipo selvagem (WT) da variedade Nipponbare, submetidas ao ressuprimento de NO₃⁻ e NH₄⁺ (0,2 e 2,0 mmoles.L⁻¹) após 72 horas de privação de N.

Plantas cultivadas com N-NO ₃						
Linhagem						
	WT	L1	L4	WT	L1	L4
Tratamento	V _{máx} ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)				K _M ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
Ress. 0,2 mM	6,17a	7,03a	6,57a	44,14a	40,27ab	37,17b
Ress. 2,0 mM	*	*	*	*	*	*
Plantas cultivadas com N-NH ₄ ⁺						
Tratamento	V _{máx} ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)			K _M ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		
Ress. 0,2 mM	5,9b	6,98b	8,29a	42,76ab	30,67 b	43,53a
Ress. 2,0 mM	9,95a	10,04a	10,61a	742,99a	842,83a	796,50a

Médias seguidas da mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.*Tempo de amostragem da solução nutritiva foi insuficiente para determinar os parâmetros cinéticos.

Devido ao tempo necessário para indução do transporte de alta afinidade (iHATS), somente duas horas após o início do tratamento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ houve uma queda acentuada deste íon na solução, com o aumento de influxo de N-NO₃⁻ principalmente nas plantas tipo selvagem (Figura 13). Isso se deve em parte aos valores de massa fresca de raíz e parte aérea serem significativamente maiores nas plantas não transformadas comparado as linhagens transformadas (L1 e L4) (Tabela 6). O esgotamento do nitrato na solução de 0,2 mM ocorreu cerca de 8 e 9 horas após o início do tratamento para as plantas não transformadas e linhagens transformadas respectivamente.

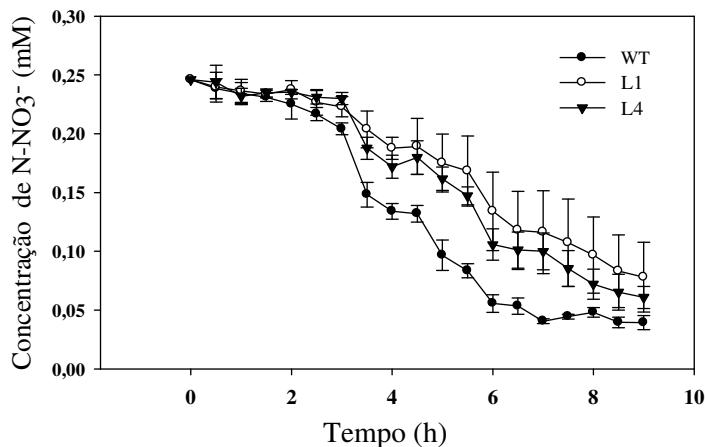


Figura 13. Depleção de N-NO₃⁻ na solução nutritiva com o cultivo de variedades de arroz Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento com 0,2 mM de N-NO₃⁻ depois de 72 horas de privação de N. Barras representam o desvio padrão das médias.

Quando se observa a depleção do N-NO₃⁻ na solução com o cultivo das plantas transformadas e a tipo selvagem no tratamento com 2,0 mM de N-NO₃⁻, percebe-se que ao decorrer do tempo de coleta não houve uma queda acentuada na concentração desse elemento na solução (Figura 14).

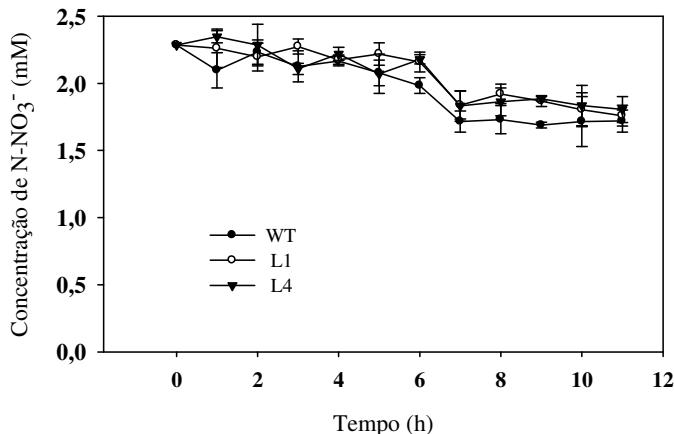


Figura 14. Depleção de N-NO₃⁻ na solução nutritiva com o cultivo de variedades de arroz Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento com 2,0 mM de N-NO₃⁻ depois de 72 horas de privação de N. Barras representam o desvio padrão das médias.

A queda acentuada demonstrada na curva de depleção de NH₄⁺ pode ser atribuída à baixa concentração desse íon na solução, que em pequenas quantidades pode ser facilmente absorvido e assimilado (Figura 15). O comportamento de absorção da linhagem L4 e da planta não transformada foi similar, enquanto que a absorção da L1 foi um pouco mais lenta, entre três e cinco horas, mas igualando ao final do período de avaliação (Tabela 6). Isso pode ser devido ao menor desenvolvimento da L1.

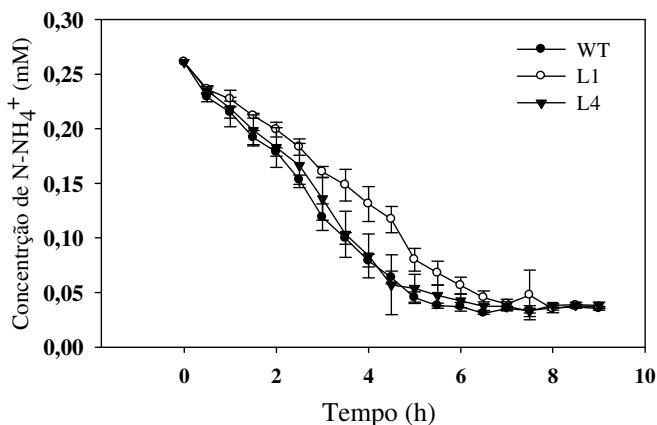


Figura 15. Depleção de N-NH₄⁺ na solução nutritiva com o cultivo de variedades de arroz Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento com 0,2 mM de N-NH₄⁺ depois de 72 horas de privação de N. Barras representam o desvio padrão das médias.

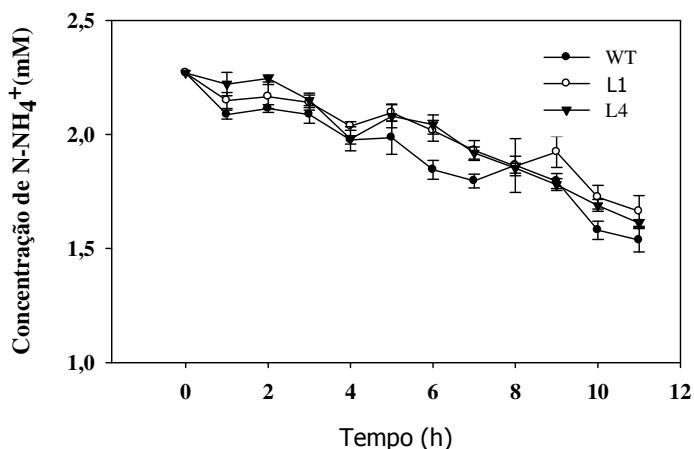


Figura 16. Depleção de N-NH₄⁺ na solução nutritiva com o cultivo de variedades de arroz Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento com 2,0 mM de N-NH₄⁺ depois 72 horas de privação de N. Barras representam o desvio padrão das médias.

A curva de depleção de N-NH₄⁺ das linhagens para o tratamento com 2,0 mM apresentou pequenas oscilações na concentração ao longo dos tempos de coleta (Figura 16). Isso pode ser decorrente do efluxo de NH₄⁺ pelas raízes, como um mecanismo de defesa para evitar a toxidez em altas concentrações desse íon no meio externo, resultando em um ciclo fútil com gasto de energia, ou seja, o NH₄⁺ transportado para fora da célula tende a voltar ao interior em função de um potencial de membrana mais eletronegativo proporcionado pelas bombas iônicas de extrusão de prótons (BRITTO et al., 2001; BRITTO & KRONZUCKER, 2006). De acordo com esses autores, o arroz ao contrário de outras plantas mostra um eficiente sistema de controle do potencial da membrana (potencial menos negativo), e consequentemente acumula menos NH₄⁺ no citosol, fazendo com que o gasto de energia no ciclo fútil seja menor.

4.4 Efeito do *OsDof25* na Expressão dos Transportadores de NH_4^+ , NO_3^- e Proteínas NAR em Resposta a Nutrição Nítrica e Amoniacal

A massa fresca total das plantas não transformadas foi significativamente maior em todos os tratamentos aplicados (Tabela 8). Ao longo do experimento foi observado maior crescimento das plantas não transformadas quando comparadas as linhagens transformadas (L1 e L4), tanto da raiz quanto da parte aérea.

A L1 apresentou menor massa fresca da parte aérea quando submetida ao suprimento constante com ambas as fontes de N (NO_3^- e NH_4^+) e na raiz quando recebeu tratamento constante com 1,5 mM de N- NH_4^+ em relação às demais linhagens (Tabela 8). Na razão raiz:parte aérea as plantas da L1 cultivadas com N- NO_3^- foi semelhante à planta selvagem, mesmo ao apresentar menor massa fresca total, porém quando comparada a L4, mostrou maior razão raiz:parte aérea nos tratamentos de deficiência de N e ressuprimento com 2,0 mM de N- NO_3^- (Tabela 8). Quando cultivadas com N- NH_4^+ as linhagens transformadas foram diferentes das não transformadas na razão raiz:parte aérea em todos os tratamentos, com exceção da L1 no ressuprimento com 2,0 mM de N- NH_4^+ onde ela não diferiu da tipo selvagem (Tabela 8).

Em termos de massa fresca a expressão do *OsDof25* afetou o crescimento das plantas transformadas. Entretanto, houve uma resposta positiva da transformação na linhagem L1 como pode ser observado nos tratamentos com deficiência e ressuprimento com alta e baixa concentração de N, em todos os parâmetros avaliados quando comparados à linhagem L4 e a planta não transformada (Tabela 8).

As raízes das plantas transformadas e não transformadas mostraram diferenças morfológicas quando supridas com N- NO_3^- ou N- NH_4^+ . As plantas não transformadas cultivadas com N- NO_3^- apresentaram maior proporção de raízes grossas em relação às linhagens transformadas. Em ambas as fontes de N, a L1 foi à linhagem com menor massa de raiz em relação a L4 e a planta não transformada. Quando submetidas ao tratamento constante com 1,5 mM de N- NH_4^+ , as plantas não transformadas também apresentaram maior proporção de raízes grossas e o mesmo se refletiu na massa fresca de raiz (Tabela 8).

Foi avaliada por PCR em tempo real, a expressão dos principais transportadores envolvidos na absorção de NO_3^- em baixas concentrações, o *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e também a proteína reguladora *OsNAR2.1*. Para o transporte de NH_4^+ , foi avaliada a expressão das isoformas *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*. Esses genes foram estudados devido a sua importância na absorção de NO_3^- e NH_4^+ em plantas de arroz (ARAKI & HASEGAWA, 2006; SONODA, 2003).

As linhagens transformadas apresentaram na raiz baixo nível de expressão do *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* comparadas a planta não transformada, quando submetidas ao suprimento constante de N- NO_3^- , principalmente no tempo de 3 horas (Figura 17). No entanto, como pode ser observado na Figura 12, a diferença no nível de expressão do fator de transcrição *OsDof25* entre as linhagens transformadas, parece não ter influenciado a expressão dos transportadores nas raízes das plantas sob tratamento constante com 1,5 mM de N- NO_3^- (Figura 17).

Tabela 8. Massa fresca (g planta⁻¹) de raiz e parte aérea de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺, deficiência de N-NO₃⁻ ou N-NH₄⁺ (sem N), ressuprimento de N-NO₃⁻ ou NH₄⁺ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N.

Plantas cultivadas com N-NO ₃ ⁻						
Tratamento	Linhagem					
	WT	L1	L4	WT	L1	L4
	Massa fresca total (g planta ⁻¹)			Parte aérea (g planta ⁻¹)		
Constante	5,64Aa	2,27Ab	3,01Ab	3,00Aa	1,39Ac	1,92Ab
Deficiência	5,11Aa	2,93Ab	3,14Ab	2,79Aa	1,55Ab	1,85Ab
Ress. 0,2 mM	5,07Aa	2,93Ab	3,33Ab	2,68Aa	1,63Ab	1,93Ab
Ress. 2,0 mM	4,84Aa	3,05Ab	2,75Ab	2,59Aa	1,58Ab	1,68Ab
Raiz (g planta ⁻¹)						
Constante	2,64Aa	0,88Ab	1,09Ab	0,88Aa	0,63Ba	0,56Aa
Deficiência	2,32Aa	1,39Ab	1,29Ab	0,84Aa	0,91Aa	0,70Ab
Ress. 0,2 mM	2,39Aa	1,30Ab	1,40Ab	0,90Aa	0,78ABA	0,73Aa
Ress. 2,0 mM	2,25Aa	1,47Ab	1,06Ab	0,87Aa	0,92Aa	0,63Ab
Razão raiz:Parte Aérea						
Plantas cultivadas com N-NH ₄ ⁺						
Tratamento	WT	L1	L4	WT	L1	L4
	Massa fresca total (g planta ⁻¹)			Parte aérea (g planta ⁻¹)		
	6,00ABA	3,07Bc	4,56Ab	3,48Aa	1,90Ac	2,86Ab
Constante	6,35Aa	3,31ABb	3,85Ab	3,30ABA	1,89Ab	2,23Bb
Deficiência	5,56ABA	4,04Ab	4,54Aab	2,80ABA	2,23Ab	2,54ABb
Ress. 2,0 mM	5,50Ba	3,73ABb	3,55Bb	2,85Ba	1,99Ab	2,06Bb
Raiz (g planta ⁻¹)						
Constante	2,52Ba	1,17Bc	1,69ABb	0,72Ba	0,61Cb	0,59Bb
Deficiência	3,05Aa	1,42ABb	1,62ABb	0,93Aa	0,75Bb	0,73Ab
Ress. 0,2 mM	2,76ABA	1,80Ab	2,00Ab	0,99Aa	0,82ABb	0,80Ab
Ress. 2,0 mM	2,65ABA	1,74Ab	1,49Bb	0,93Aa	0,88Aa	0,72Ab
Razão raiz:Parte Aérea						

Médias seguidas de mesma letra maiúsculas na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

No tratamento sob deficiência de N-NO₃⁻ as linhagens transformadas e não transformadas mostraram baixa expressão dos transportadores tanto na raiz quanto na parte aérea das plantas (Figura 17 e Figura 18). Estudos já mostraram que as proteínas envolvidas na absorção de NO₃⁻ pelo sistema de alta afinidade em plantas superiores são rapidamente induzidas pela presença externa de nitrato (CRAWFORD & GLASS, 1998; ZHOU et al., 2000). Os genes *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* são ambos induzíveis na presença de NO₃⁻ tanto na raiz quanto na parte aérea (OKAMOTO et al., 2003). Contudo a expressão do *OsNAR2.1* parece ser simultânea à expressão do transportador *OsNRT2.1* (ARAKI & HASEGAWA, 2006; OKAMOTO et al., 2006). De acordo com os dados citados, pode ser observado na Figura 17 (a,c,e) que os transportadores de nitrato: *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1*

mostraram aumento da expressão com o ressuprimento de N-NO_3^- (0,2 mM e 2,0 mM) na raiz às 3 horas após aplicação dos tratamentos.

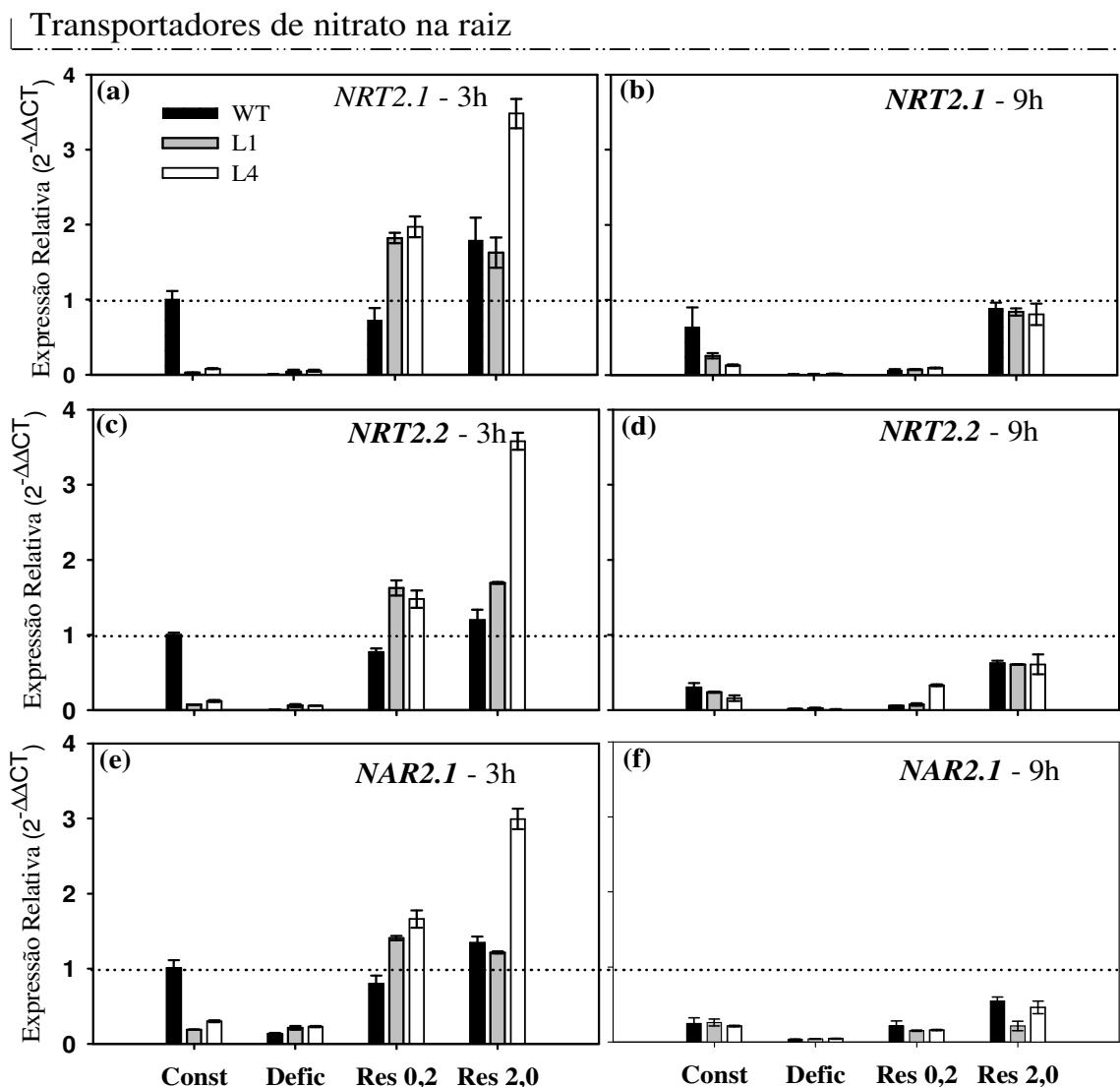


Figura 17. Expressão relativa de três transportadores de NO_3^- (*OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1*) na raiz de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NO_3^- , deficiência de N-NO_3^- (sem N), ressuprimento de N-NO_3^- (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram efetuadas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. A linhagem WT no tratamento constante com 1,5 mM de N-NO_3^- foi assumida como tratamento de referência. Barras representam o erro padrão das médias.

No suprimento constante com N-NO_3^- , a expressão dos genes *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* nas plantas superexpressando o *OsDof25*, é bem inferior ao das plantas não transformadas (Figura 17). Entretanto, no ressuprimento com 0,2 mM de N-NO_3^- a expressão desses genes é maior nas linhagens transformadas, L1 e L4 (Figura 17). Aparentemente, o suprimento constante de N-NO_3^- nas plantas transformadas cria uma condição para repressão desses transportadores. Sabe-se que os genes desses transportadores de alta afinidade para nitrato sofrem regulação negativa pelos produtos da redução do NO_3^- (NAZOA et al., 2003).

Assim, é provável que esse fator de transcrição possa estar envolvido primariamente no controle das enzimas do metabolismo de nitrogênio e/ou carbono. Além disso, é importante também, que os trabalhos futuros com esse fator de transcrição, incluam o estudo dos transportadores de NO_3^- de baixa afinidade, pois é sabido hoje que transportadores de baixa afinidade para nitrato apresentam efeito regulatório sobre os transportadores de alta afinidade deste nutriente (HO et al., 2009).

Não houve correlação positiva entre os níveis de expressão dos *NRT2* e o acúmulo de NO_3^- nas plantas submetidas ao suprimento constante com N-NO_3^- (Figura 17 e Figura 19 e,f). Neste tratamento, as linhagens expressando o *OsDof25* acumularam mais NO_3^- que as plantas não transformadas, entretanto, apresentaram expressão dos *NRT2* bem inferior (Figura 17 e Figura 19). O acúmulo de NO_3^- nas plantas transformadas se deu predominantemente nas raízes e bainhas (Figura 19 a,b,e,f). Entretanto, ainda não está claro se o aumento da absorção de NO_3^- pelo sistema de alta afinidade em *Arabidopsis* é predominantemente devido ao aumento da transcrição do *A1NRT2.1* (GOJON et al., 2009). Há evidências de que os transportadores *NRT2* são também regulados pós-transcricionalmente em várias espécies de plantas (FRAISIER et al., 2000; WIRTH et al., 2007). Em *Arabidopsis* foi verificado que o aumento de RNAm de *NRT2.1* não resulta em aumento proporcional na quantidade de proteínas transportadoras na membrana plasmática (LEJAY, 2011).

No tratamento com baixo ressuprimento de N-NO_3^- (0,2 mM) ocorreu maior expressão dos *NRTs* nas linhagens transformadas (L1 e L4) em relação a planta não transformada no tempo de 3 horas (Figura 17 a,c,e). No entanto, semelhante ao relatado no parágrafo anterior, no tratamento com ressuprimento de 0,2 mM de N-NO_3^- também não houve correlação positiva da expressão dos transportadores de nitrato com os teores de NO_3^- . As plantas transformadas mostraram alta expressão dos *NRTs* e baixo acúmulo de nitrato (Figura 17 e Figura 19 e,f).

Quando as plantas da L4 receberam ressuprimento com 2,0 mM de N-NO_3^- apresentaram o dobro de expressão do *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* em comparação com L1 e a planta não transformada (Figura 17 a,c,e), porém isto também não resultou em maior teor de NO_3^- na raiz (Figura 19). Às 9 horas após a aplicação dos tratamentos, ocorreu redução na expressão dos transportadores *NRT2* e *NAR2.1* nas linhagens transformadas e não transformadas (Figura 17 b,d,f).

A expressão dos *NRT2* nas plantas sob deficiência de N-NO_3^- foi baixo nas linhagens transformadas e não transformada tanto na raiz quanto na parte aérea (Figura 17 e Figura 18).

Quanto a expressão do *NRT2.1* e *NAR2.1* na parte aérea, verificamos comportamento oposto entre as linhagens expressando o *OsDof25* comparado as plantas não transformadas. Tomando como referência as plantas não transformadas, após 3h e 9h do ressuprimento com 0,2 ou 2 mM de N-NO_3^- , a linhagem L1 apresentou menores níveis de expressão do *NRT2.1* e *NAR2.1*, enquanto a L4 níveis bem maiores (Figura 18). Sob suprimento constante e deficiência de N-NO_3^- os níveis de expressão dos *NRT2* e *NAR2.1* foram bastante reduzidos para todas as plantas (Figura 18).

O *OsNRT2.1* mostrou pequeno incremento na expressão em ambos os tratamentos com ressuprimento de N-NO_3^- (0,2 e 2,0 mM), onde o nível de expressão das plantas transformadas e não transformadas foram semelhante, exceto pela menor expressão de L1 no tratamento de baixo ressuprimento de N-NO_3^- .

O comportamento distinto entre as linhagens transformadas, pode ser devido a diferenças nos níveis de expressão do *OsDof25* (Figura 12) ou outro fator desconhecido. Uma melhor caracterização dessas linhagens, incluindo a detecção da proteína *OsDof25* será realizada para elucidação deste comportamento.

Transportadores de NO_3^- parte aérea

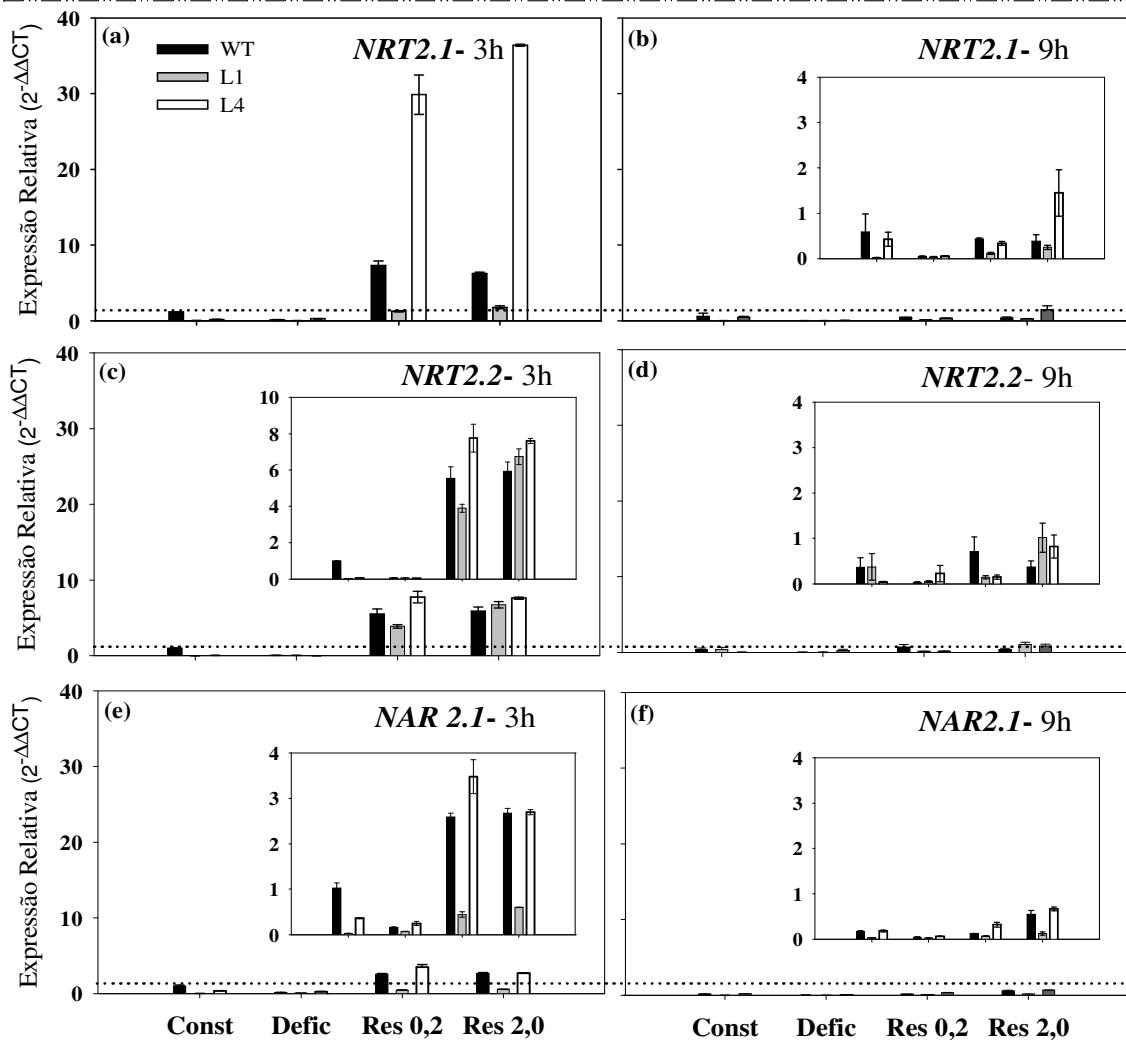


Figura 18. Expressão relativa de três transportadores de NO_3^- (*OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1*) na parte aérea de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N- NO_3^- , deficiência de N- NO_3^- (sem N), ressuprimento de N- NO_3^- (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram efetuadas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. A linhagem WT no tratamento constante com 1,5 mM de N- NO_3^- foi assumida como tratamento de referência. Barras representam o erro padrão das médias.

De modo geral, as linhagens transformadas apresentaram teores similares de NO_3^- nos tecidos da folha, bainha e raiz em todos os tratamentos, exceto no suprimento de N constante (Figura 19). Nas plantas cultivadas constantemente com 1,5 mM de N- NO_3^- as linhagens L1 e L4 apresentaram maiores teores de NO_3^- nas três partes da planta, em ambos tempos de coleta, comparadas à planta não transformada, exceto na folha às 9 horas (Figura 19b). Contudo para o mesmo tratamento, a linhagem L1 acumulou mais NO_3^- em relação a L4 e a planta não transformada na folha e bainha às 3 horas (Figura 19 a,c). Por outro lado, a L4 mostrou maior teor de N- NO_3^- na raiz e bainha às 3 e 9 horas, respectivamente (Figura 19d,e).

Nos tratamentos com deficiência e ressuprimento com 0,2 mM de N- NO_3^- , as linhagens transformadas não diferiram de forma significativa quanto aos teores de N- NO_3^- ,

para todos os tecidos em ambos os tempos de coleta (Figura 19). Nas bainhas às 3h e nas raízes às 3h e 9h, as linhagens transformadas mostram maiores acúmulos de NO_3^- comparado às plantas não transformadas (Figura 21). O acúmulo também foi menor nestes tratamentos, pois na ausência ou em baixas concentrações do íon a planta utiliza o pouco N disponível para a manutenção do metabolismo. O tecido da raiz nas três linhagens analisadas acumulou mais NO_3^- no tratamento com ressuprimento a 2,0 mM de N- NO_3^- , em relação as demais partes da planta, nas coletas as 3 e 9 horas (Figura 19 e,f). Apenas nesse tratamento, o maior teor de N- NO_3^- foi o das plantas não transformadas em relação a L1 e L4 (Figura 19 e, f).

Em geral, sobretudo em suprimento constante com N- NO_3^- , as plantas transformadas apresentaram maiores acúmulos de N. O acúmulo de NO_3^- durante o período vegetativo como observado é uma importante característica para a eficiência de uso de N, pois pode ser remobilizado nos períodos de deficiência de N e amenizar os efeitos negativos da falta desse nutriente (SOUZA et al., 1998). A linhagem L1 quando submetida a altas concentrações de N- NO_3^- (suprimento constante e ressuprimento de 2,0 mM) apresentou maior teor de NH_4^+ nas folhas as 3 horas do início do tratamento (Figura 20a). Indicando maior redução de NO_3^- no tecido da folha desta linhagem comparada a L4 e a planta selvagem. Nos tratamentos sob deficiência e ressuprimento com 0,2 mM de N- NO_3^- as plantas transformadas e não transformadas mantiveram níveis semelhantes de NH_4^+ na folha, bainha e raiz (Figura 20).

Como pode ser observado na Figura 20, os teores de NH_4^+ foram similares entre os diferentes tratamentos, possivelmente por causa da habilidade das plantas em armazenar o excesso de NO_3^- , evitando que esse nutriente fosse rapidamente reduzido a NH_4^+ e tivesse que ser assimilado com gasto excessivo de energia e esqueletos de carbono. De modo geral os teores de N-amino (Figura 21) seguem o mesmo padrão do teores de N- NH_4^+ (Figura 20).

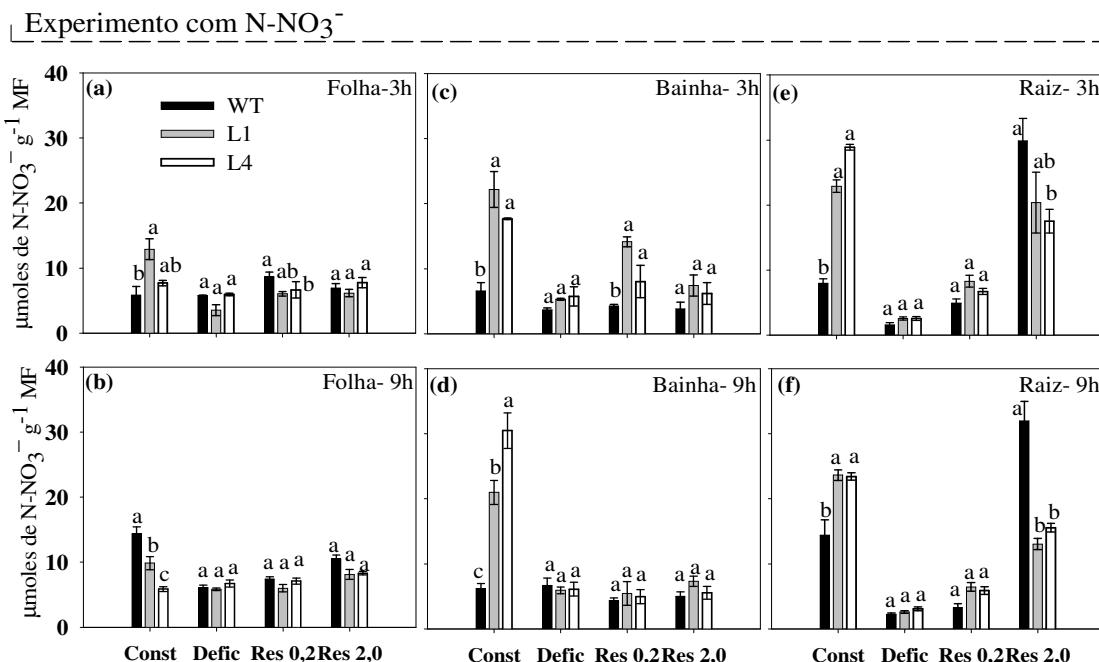


Figura 19. Teores de N- NO_3^- em folha (a, b), bainha (c, d) e raiz (e, f) de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N- NO_3^- , deficiência de N- NO_3^- (sem N), ressuprimento de N- NO_3^- (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram feitas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das medias de três repetições. * Indica diferença entre as linhagens dentro de cada tratamento, Tukey a 5% de significância.

Experimento com N-NO₃⁻

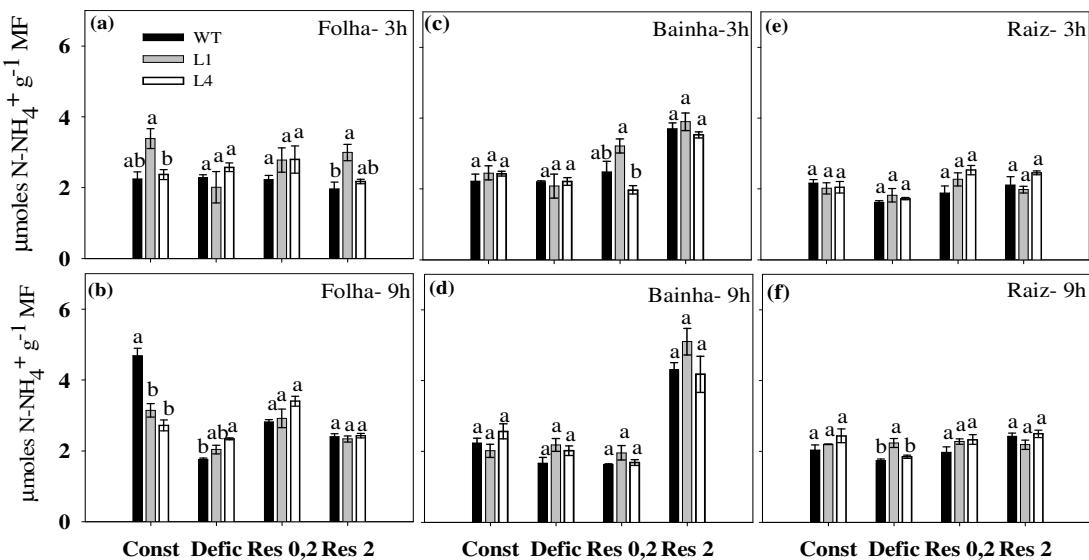


Figura 20. Teores de N-NH₄⁺ em folha (a, b), bainha (c, d) e raiz (e, f) de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NO₃⁻, deficiência de N-NO₃⁻ (sem N), ressuprimento de N-NO₃⁻ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram feitas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das medias de três repetições. * Indica diferença entre as linhagens dentro de cada tratamento, Tukey a 5% de significância.

Os teores de N-amino livre nas linhagens transformadas e não transformadas foram similares dentro de cada tratamento, diferindo apenas na folha das plantas cultivadas com o fornecimento constante às 9 horas após a aplicação do tratamento, quando a planta selvagem apresentou maiores teores de N-amino em relação a L1 e L4 (Figura 21b). A elevada concentração de 2,0mM de N-NO₃⁻ na solução nutritiva à que as plantas foram submetidas, contribuiu para o aumento do fluxo interno deste nutriente no interior da planta, que a partir da ação de enzimas de assimilação de N elevou os teores de N-amino livre em relação aos demais tratamentos em ambos os tempos de coleta (Figura 21 a, b, c, d).

Nas bainhas das plantas sob deficiência, os teores de N-amino não reduziram como nas folhas e raízes, indicando que as plantas deviam estar remobilizando o NO₃⁻ acumulado nos vacúolos, para manter a homeostase metabólica (Figura 21 c, d). Na raiz, ao contrário do observado para nitrato, os teores de N-amino foram baixos, indicando que o NO₃⁻ absorvido ao invés da pronta redução e assimilação foi armazenado no vacúolo deste tecido e também enviado a outras partes da planta para redução e posterior incorporação e/ou armazenamento (Figura 21 e, f). O acúmulo de nitrato nas raízes ocorre principalmente nas linhagens transformadas sob suprimento constante (Figura 19 e, f), tratamento onde não há diferença nos teores de N-amino entre as plantas transformadas e não transformadas (Figura 21 e, f).

A redução dos teores de açúcares solúveis principalmente na bainha e raiz de plantas cultivadas sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NO₃⁻ evidenciado na Figura 22, ocorre ao mesmo tempo em que aumenta os teores de NO₃⁻ nestes tecidos (Figura 19), possivelmente esta ocorrendo maior redução de NO₃⁻ decorrente da maior concentração. Na raiz das plantas submetidas ao suprimento constante com 1,5 mM de N-NO₃⁻ e ressuprimento com 2,0 mM N-NO₃⁻ pode se observar redução nos teores de açúcares solúveis (Figura 22), ao mesmo tempo em que há aumento dos teores de N-amino (Figura 19). Esse resultado se

deve, em parte, à utilização destes açúcares como fonte de esqueletos de carbono e energia para assimilação de N (FERNANDES, 1990).

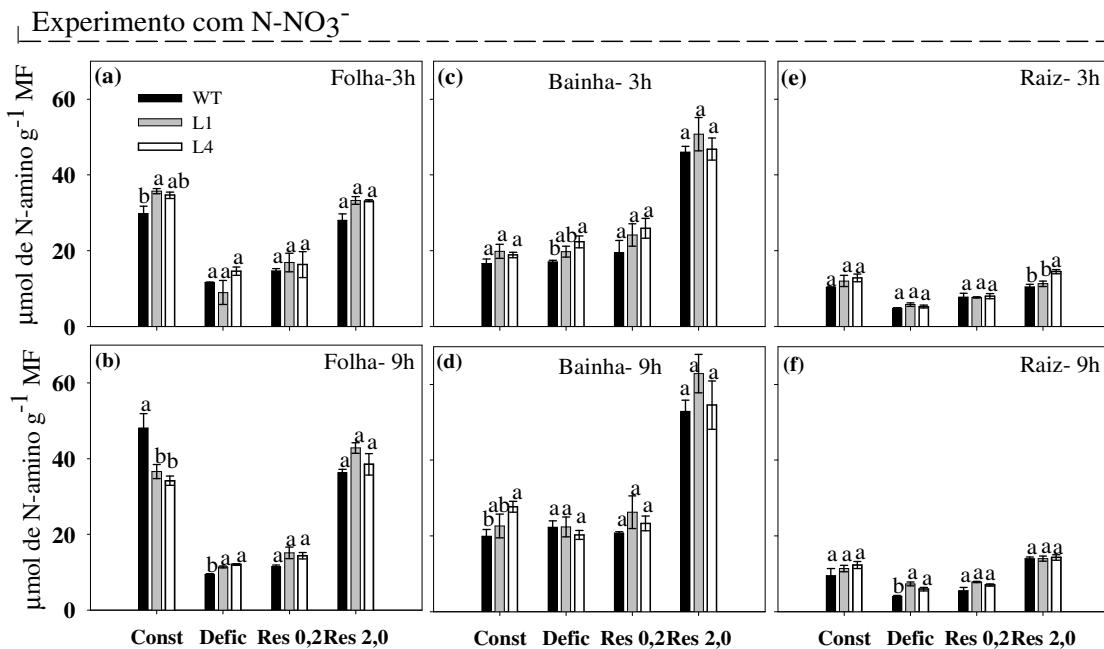


Figura 21. Teores de N-amino livre em folha (a, b), bainha (c, d) e raiz (e, f) de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NO₃⁻, deficiência de N-NO₃⁻ (sem N), ressuprimento de N-NO₃⁻ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram feitas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das medias de três repetições. * Indica diferença entre as linhagens dentro de cada tratamento, Tukey a 5% de significância.

Diferentes padrões de expressão foram encontrados entre as isoformas de AMT1 em função da concentração de N a que as plantas foram submetidas. A isoforma *OsAMT1.1* mostrou-se constitutiva na raiz e parte aérea, enquanto a *OsAMT1.2* específica de raiz é induzida por amônio, e a *OsAMT1.3* também específica de raiz é reprimida na presença do íon (SONODA et al., 2003). No entanto, KUMAR et al. (2003) ao transferir plantas de arroz cultivadas em 10 mM para uma solução de 10 μM de N-NH₄⁺ verificou o aumento de expressão dos três AMT1.

As linhagens transformadas (L1 e L4), no geral mostraram diferenças na expressão dos AMTs dentro dos tratamentos analisados, tanto na raiz quanto na parte aérea (Figura 23 e Figura 24). Na raiz das plantas cultivadas constantemente com 1,5 mM de N-NH₄⁺, a linhagem L1 apresentou menor expressão dos *AMT1* quando comparada a L4 e a planta selvagem (Figura 23 a, c, e).

A expressão do *OsAMT1.1* não foi influenciada pelo tratamento com privação de N-NH₄⁺, mas em ambos os ressuprimentos com N-NH₄⁺ ocorreu aumento na expressão deste transportador nas duas linhagens (L1 e L4) e na planta não transformada, sendo que na maior concentração de N-NH₄⁺ (2 mM) a L4 apresentou maior expressão (Figura 23 c).

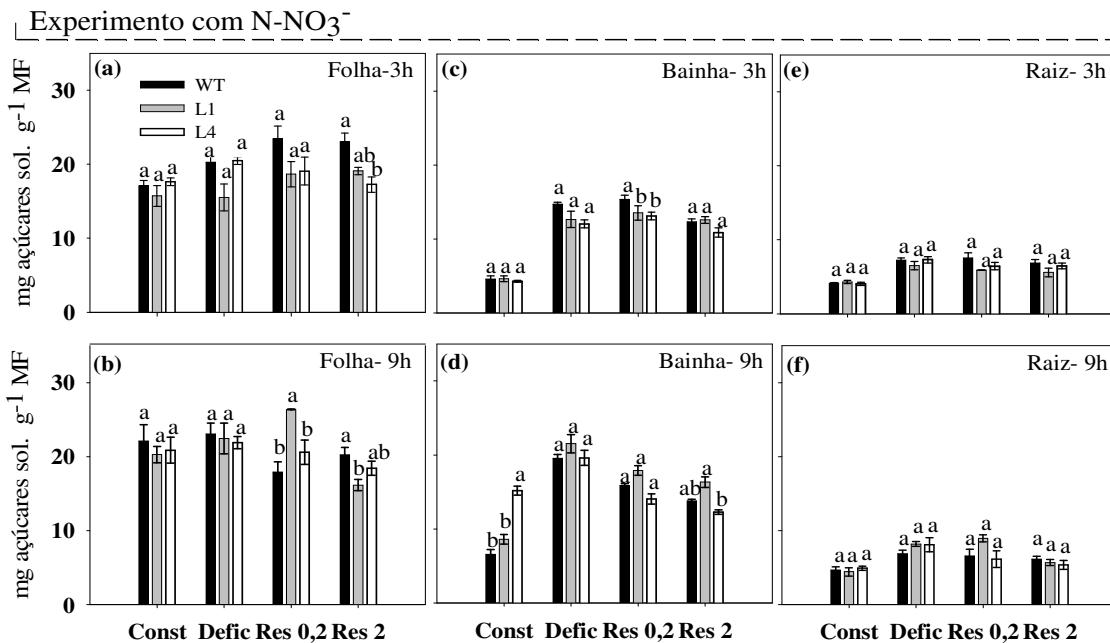


Figura 22. Teores de açúcares em folha (a, b), bainha (c, d) e raiz (e, f) de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NO₃⁻, deficiência de N-NO₃⁻ (sem N), ressuprimento de N-NO₃⁻ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram feitas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das medias de três repetições. * Indica diferença entre as linhagens dentro de cada tratamento, Tukey a 5% de significância.

SPERANDIO et al. (2011) avaliando plantas de arroz da variedade Nipponbare, verificou que nas raízes, todos os AMT1 apresentaram repressão no tratamento com ressuprimento de 2,0 mM N-NH₄⁺ e alta indução sob deficiência deste íon, sendo *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* os mais induzidos na deficiência (cerca de 32 e 15 vezes, respectivamente). Os resultados aqui demonstrados em parte, coincidem com os do trabalho citado, pois os níveis de expressão de *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* foram baixos no tratamento de ressuprimento com 2 mM de N-NH₄⁺, porém na deficiência apenas *OsAMT1.2* mostrou aumento de expressão nas linhagens transformadas e não transformadas (Figura 23 c, e).

Quando submetidas ao tratamento com ressuprimento a 0,2 mM de N-NH₄⁺ as plantas apresentaram pequeno aumento na expressão de *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*, com exceção da planta não transformada que teve alta expressão do *OsAMT1.2* quando submetida ao ressuprimento (Figura 23 c,e).

Como já mencionado, o *OsAMT1.3* é um gene específico de raiz e altamente induzido na deficiência de N-NH₄⁺, no entanto, ao contrário do que se esperava o nível de expressão deste transportador na raiz foi bem reduzido nas plantas submetidas à deficiência de N-NH₄⁺ (Figura 23 e,f). Isso pode ter ocorrido devido ao curto período de privação de N, uma vez que há relatos consistentes de que períodos prolongados de deficiência de N provocam indução do *OsAMT1.3*.

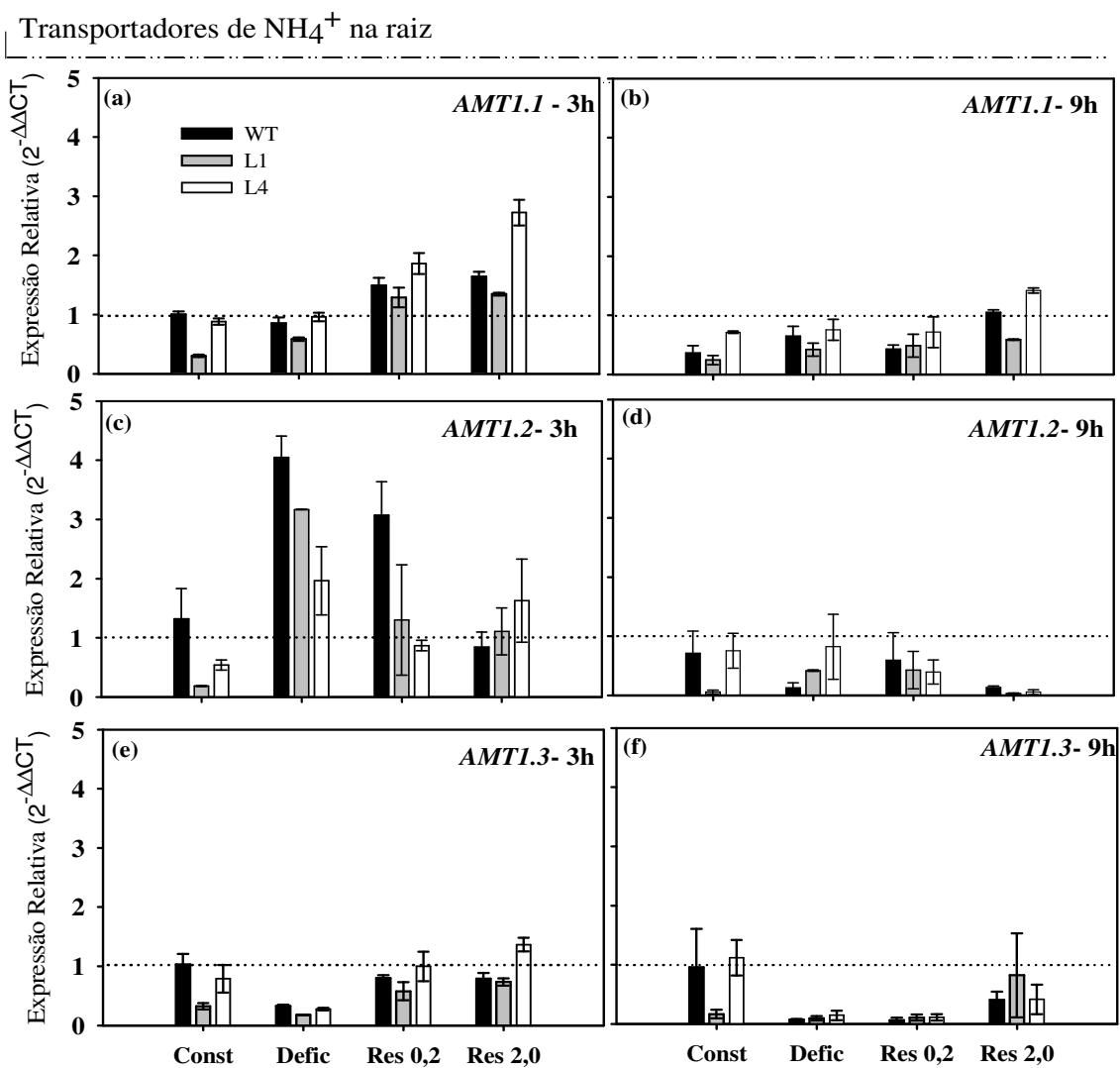


Figura 23. Expressão relativa de três transportadores de NH₄⁺ (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*) na raiz de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NH₄⁺, deficiência de N-NH₄⁺ (sem N), ressuprimento de N-NH₄⁺ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram efetuadas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. A linhagem WT no tratamento constante com 1,5 mM de N-NO₃⁻ foi assumida como tratamento de referência. Barras representam o erro padrão das médias.

A expressão dos *AMT1* na parte aérea foi similar nas plantas submetidas ao suprimento constante de N-NH₄⁺ no tempo de 3 horas (Figura 24 a, c, e). Quando submetidas a deficiência de N-NH₄⁺ as plantas transformadas e não transformadas apresentaram aumento acentuado na expressão do *OsAMT1.1*, com posterior redução às 9 horas após o início do tratamento (Figura 24 a,b). Contudo para o *OsAMT1.3* este aumento ocorreu apenas no tempo de 9 horas após a aplicação do tratamento (Figura 24 f). De acordo com LOQUÉ & WIRÉN, (2004) a expressão de alguns genes AMT aumenta rapidamente logo no início da deficiência de N, enquanto outros podem aumentar só após uma deficiência muito prolongada, em particular o *AtAMT1.3*.

Na parte aérea o *OsAMT1.2* se manteve sem grandes alterações ao longo dos tempos de coleta em todas as plantas, independente dos tratamentos aplicados, com exceção da L1 que mostrou menor nível de expressão às 3 horas (Figura 24 c,d). De acordo com os dados de

SPERANDIO et al. (2011), na parte aérea não ocorreram mudanças de expressão dos *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2* entre os diferentes tratamentos utilizados (constante a 2,0 mM, deficiência e ressuprimento a 2,0 mM de N-NH₄⁺), sendo que a expressão do *OsAMT1.3* não foi detectada na parte aérea.

Nas plantas cultivadas sob ressuprimento de N-NH₄⁺ houve aumento diferenciado na expressão do *OsAMT1.1* e *OsAMT1.3*. Quando submetidas ao ressuprimento de baixa concentração as plantas mostraram similar expressão do *OsAMT1.1*, já o *OsAMT1.3* foi mais expresso na linhagem L4 para o mesmo tratamento (Figura 24 a,e). No ressuprimento com 2,0 mM de N-NH₄⁺ a L4 apresentou aumento na expressão do *OsAMT1.1* e *OsAMT1.3*. Os teores de NH₄⁺ tanto na raiz quanto na parte aérea não mostraram relação com a expressão dos transportadores de NH₄⁺ nas linhagens transformadas e não transformadas (Figura 25).

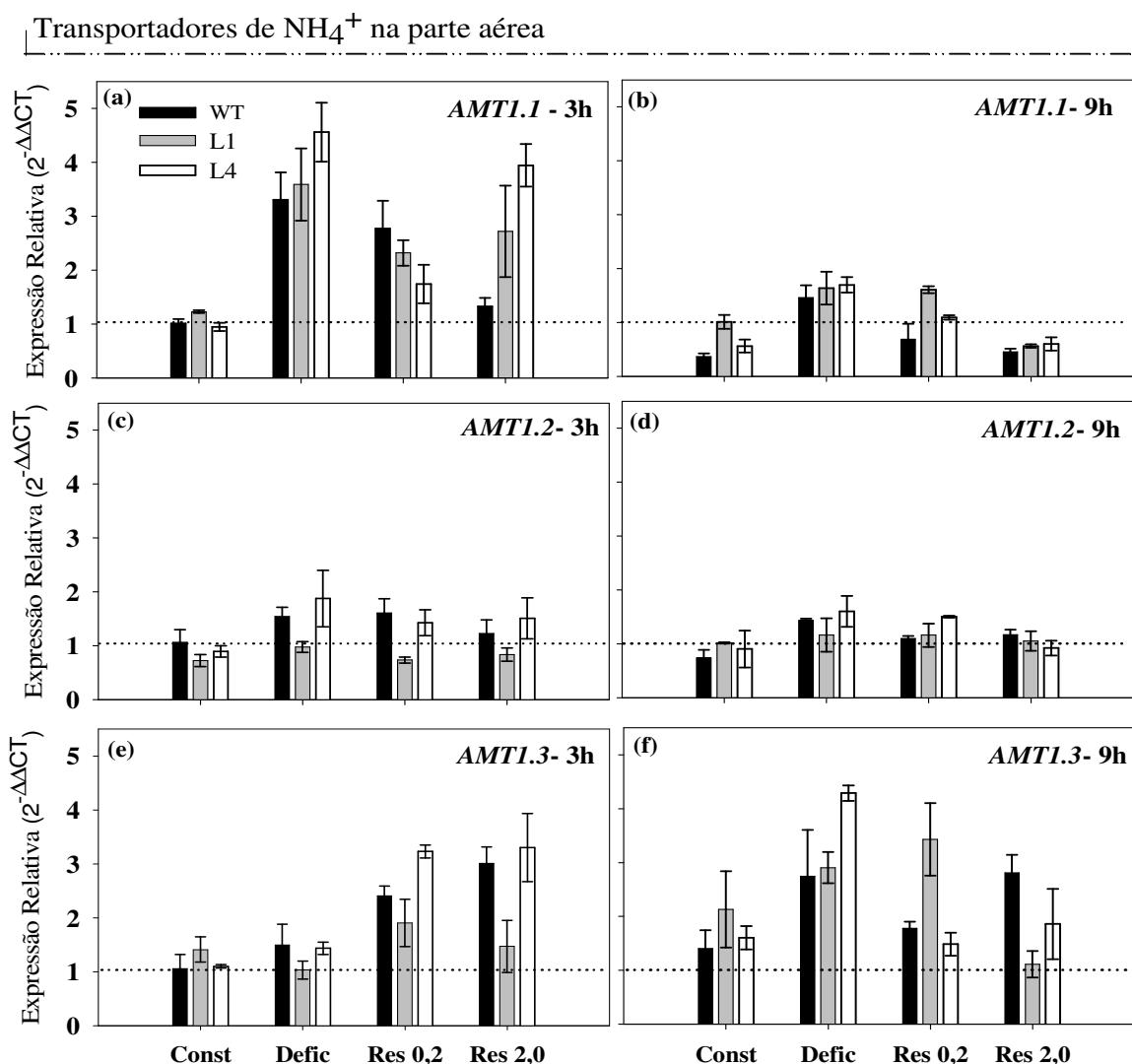


Figura 24. Expressão relativa de três transportadores de NH₄⁺ (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*) na parte aérea de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT). Os tratamentos consistiram em suprimento constante com 1,5 mM de NH₄⁺, deficiência, e ressuprimento de NH₄⁺ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas na ausência de N. A linhagem WT no tratamento controle com 1,5 mM de NH₄⁺ constante foi assumido como tratamento de referência. Barras representam o erro padrão das médias.

Não houve grande alteração dos teores de N-NH_4^+ entre as linhagens transformadas e não transformadas dentro dos tratamentos com fornecimento constante, na deficiência e ressuprimento com 0,2 mM N-NH_4^+ (Figura 25). Por outro lado, nas plantas com ressuprimento de 2,0 mM N-NH_4^+ a L1 mostrou maior acúmulo de NH_4^+ nas folhas e bainha no tempo de 3 horas quando comparada a L4 e a planta selvagem (Figura 25 a, c, e). Nota-se que na raiz mesmo com teores elevados de N-NH_4^+ nas plantas cultivadas com fornecimento constante de 1,5 mM e ressuprimento com 2,0 mM de N-NH_4^+ , as concentrações de N-amino não seguem a mesma tendência (Figura 25 e,f e Figura 26).

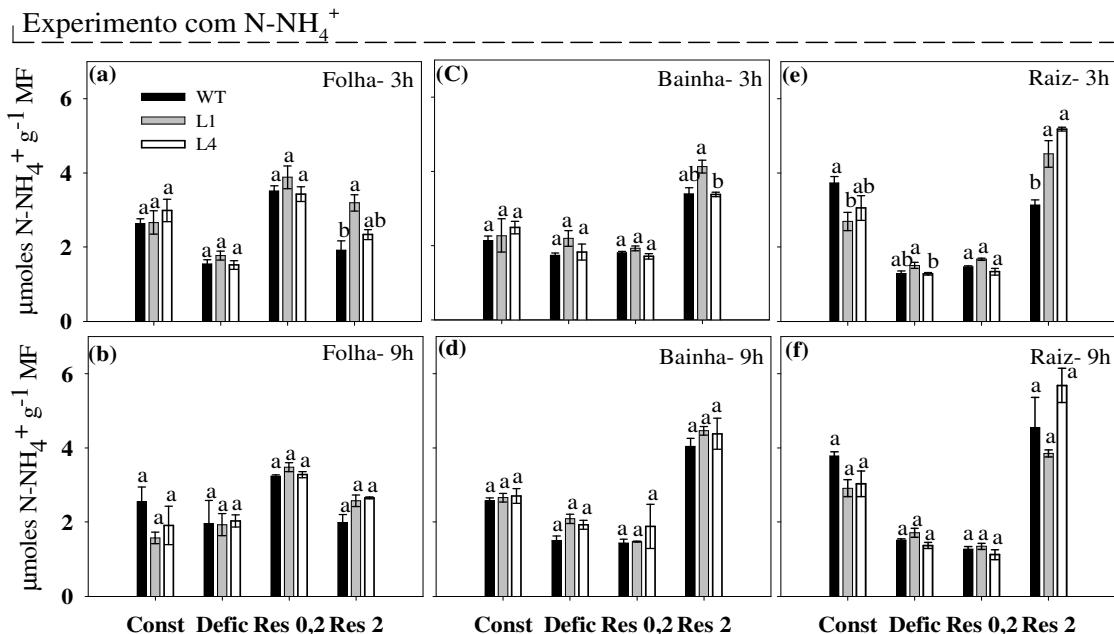


Figura 25. Teores de N-NH_4^+ em folha (a, b), bainha (c, d) e raiz (e, f) de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NH_4^+ , deficiência de N-NH_4^+ (sem N), ressuprimento de N-NH_4^+ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram feitas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das medias de três repetições. * Indica diferença entre as linhagens dentro de cada tratamento, Tukey a 5% de significância.

As plantas cultivadas em alta concentração de N-NH_4^+ acumularam maiores teores de N-amino livre (Figura 26). Este processo indica uma intensa mobilização de esqueletos de carbono, para que a planta possa evitar os efeitos tóxicos do NH_4^+ (FERNANDES, 1990). Isto fica evidente no tratamento constante com 1,5 mM e no ressuprimento com 2,0 mM de N-NH_4^+ , quando L1, L4 e a planta selvagem apresentaram aumento nos teores de N-amino nas folhas, bainha e raiz (Figura 26).

Nos tratamentos com maior concentração de N-NH_4^+ (constante e ressuprimento com 2,0 mM), as plantas transformadas mostraram maiores teores de N-amino na bainha e raiz às 3 horas (Figura 26).

Experimento com N-NH_4^+

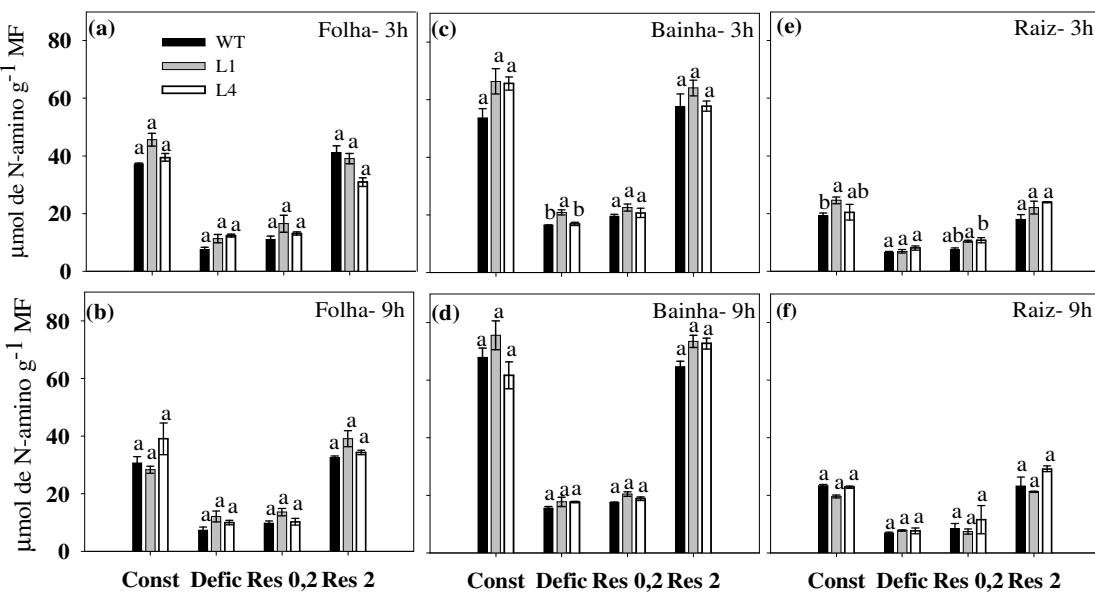


Figura 26. Teores de N-amino livre em folha (a, b), bainha (c, d) e raiz (e, f) de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NH_4^+ , deficiência de N-NH_4^+ (sem N), ressuprimento de N-NH_4^+ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram feitas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das medias de três repetições. * Indica diferença entre as linhagens dentro de cada tratamento, Tukey a 5% de significância.

Experimento com N-NH_4^+

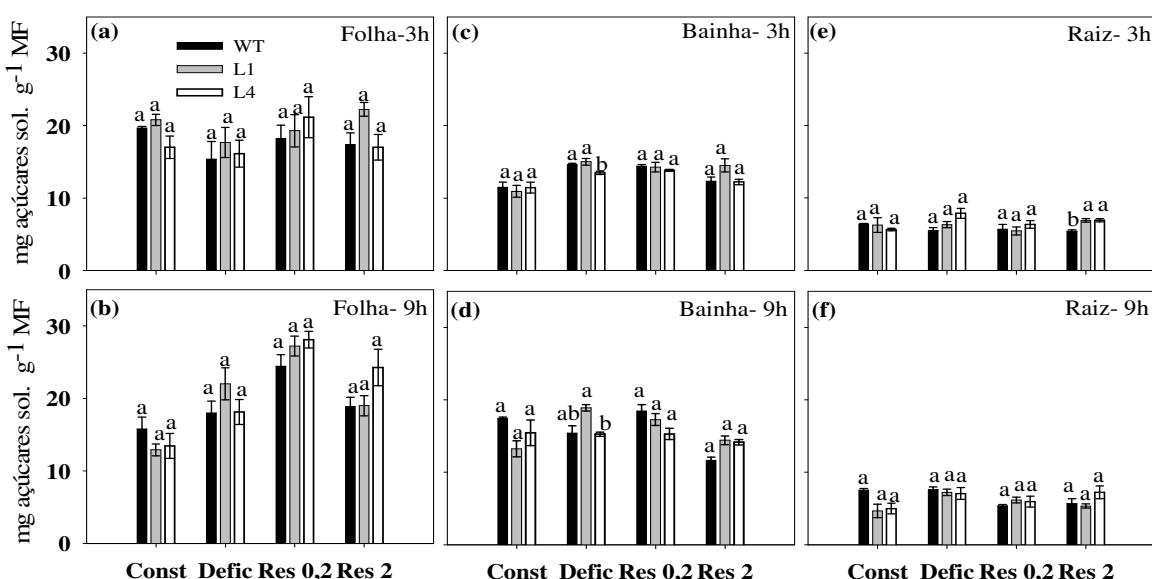


Figura 27. Teores de açúcares solúveis em folha (a, b), bainha (c, d) e raiz (e, f) de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* (L1 e L4) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,5 mM de N-NH_4^+ , deficiência de N-NH_4^+ (sem N), ressuprimento de N-NH_4^+ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram feitas coletas nos tempos 3 e 9 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das medias de três repetições. * Indica diferença entre as linhagens dentro de cada tratamento, Tukey a 5% de significância.

Como pode ser observado na Figura 27 quando as plantas foram submetidas ao suprimento constante de N-NH₄⁺, os teores de açúcares solúveis na raiz e bainha às 3 horas após a aplicação do tratamento foram similares entre as linhagens transformadas e não transformadas, porém na coleta das 9 horas houve redução dos teores de açúcares nas plantas transformadas em relação a planta selvagem. No ressuprimento com 2,0 mM de N-NH₄⁺, os teores de açúcares solúveis também foram maiores nas linhagens transformadas na coleta feita as 3 horas tanto nas folhas, como na bainha e raiz.

5 CONCLUSÕES

As plantas expressando o *OsDof25* apresentaram menor crescimento em relação as plantas não transformadas, entretanto, nas linhagens transformadas houve maior incremento de biomassa sob condições de estresse nutricional (deficiência ou ressuprimento de N), sendo o efeito mais acentuado na L1.

As plantas transformadas para expressão do *OsDof25* quando submetidas a ressuprimento com baixos teores de nitrato e amônio apresentaram melhor resposta dos parâmetros $V_{máx}$ e K_M em relação as plantas não transformadas.

Nas plantas transformadas expressando o *OsDof25*, o ressuprimento com nitrato em baixa concentração resultou em maior expressão dos transportadores *OsNTR2.1~2.2* e da proteína *OsNAR2.1* e o tratamento com suprimento constante proporcionou maior acúmulo de nitrato nestas plantas.

Os resultados tanto dos parâmetros cinéticos quanto do acúmulo de matéria fresca sugerem que as plantas transformadas para expressão do *OsDof25* apresentam maior tolerância ao estresse nutricional.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMAGRO, A.; LIN, S.H.; TSAY, Y.F. Characterization of the *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.6 reveals a role of nitrate in early embryo development. **The Plant Cell**, v.20, p.3289–3299, 2008.
- ARAKI, R.; HASEGAWA H. Expression of rice (*Oryza sativa* L.) genes involved in high-affinity nitrate transport during the period of nitrate induction. **Breeding Science**, v.56, p.295-302, 2006.
- ASLAM, M.; TRAVIS, R.; HUFFAKER, R.C. Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in Roots of uninduced and induced Barley (*Hordeum vulgare* L.) Seedlings. **Plant Physiol**, v.99, p.1124-1133, 1992.
- BAPTISTA, A DE J.; FERNANDES, M.S.; SOUZA S.R. Cinética de absorção de amônio e crescimento radicular das cultivares de arroz Agulha e Bico Ganga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.1325–1330, 2000.
- BARBIER-BRYGOO, H.; ANGELI, A. DE.; FILLEUR, S.; FRACHISSE, J-M, GAMBALE, F.; THOMINE, S.; WEGE, S. Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks. **Annual Review of Plant Biology**, v.62, p.25–51, 2011.
- BEEK, C.L.V.; MEERBURG, B.G.; SCHILS, R.L.M.; VERHAGEN, J.; KUIKMAN, P.J. Feeding the world's increasing population while limiting climate change impacts: linking N₂O and CH₄ emissions from agriculture to population growth. **Environmental Science & Policy**, v.13, p.89–96, 2010.
- BRITTO, D.T & KRONZUCKER, H.J. Futile cycling at the plasma membrane: a hallmark of low-affinity nutrient transport. **TRENDS in Plant Science**, v.11, n.11, p.529-534, 2006.
- BRITTO, D.T.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M.; KRONZUCKER, H.J. Futile transmembrane NH₄⁺ cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. **PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)**, v.98, p.4255-4258, 2001.
- CATALDO, D.; HARRON, M.; SCHARADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v.6, p.853-855, 1975.
- CENTURY, K.; REUBER, T.L.; RATCLIFFE, O.J. Regulating the regulators: the future prospects for transcription-factor-based agricultural biotechnology products. **Plant Physiology**, v.147, p.20-29, 2008.
- CEREZO, M.; TILLARD, P.; FILLEUR, S.; MUÑOS, S, DANIEL-VEDELE, F.; GOJON, A. Major alterations of the regulation of root NO₃⁻ uptake are associated with the mutation of *Nrt2.1* and *Nrt2.2* genes in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.127, p.262–271, 2001.
- CHIU, C-C.; LIN, C-S.; HSIA, A-P.; SU, R-C.; LIN, H-L.; TSAY, Y-F. Mutation of a nitrate transporter, *AtNRT1:4*, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. **Plant Cell Physiol**, v.45, n.9, p.1139–1148, 2004.
- CHOPIN, F.; ORSEL, M.; DORBE, M-F.; CHARDON, F.; TRUONG, H-N.; MILLER, A. J.; KRAPP, A.; DANIEL-VEDELE, F. The *Arabidopsis ATNRT2.7* nitrate transporter controls nitrate content in seeds. **The Plant Cell**, v.19, p.1590–1602, 2007.

- CRAWFORD, N.M & GLASS, A.D.M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science**, v.3, n.10, p.389-395, 1998.
- DECHORGNAT, J.; NGUYEN, C.T.; ARMENGAUD, P.; JOSSIER, M.; DIATLOFF, E.; FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, F. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.4, p.1349-1359, 2011.
- DUAN, Y. H., ZHANG, Y. L., YE, L. T., FAN, X. R., XU, G. H., SHEN, Q. R. Responses of rice cultivars with different nitrogen use efficiency to partial nitrate nutrition. **Annals of Botany**, v.99, p.1153-1160, 2007.
- FAN, S-C.; LIN, C-S.; HSEU, P-K.; LIN, S-H.; TSAY, Y-F. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. **The Plant Cell**, v.21, n.9, p.2750-2761, 2009.
- FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts. **Analitical Chemical**, v.49, p.1980, 1977.
- FERNANDES, M.S. Efeitos de fontes e níveis de nitrogênio sobre a absorção e assimilação de n em arroz. **Rev. Bras. Fisiol. Vegetal**, v.2, n.1, p.1-6, 1990.
- FERNANDES, M.S. N-Carriers, light and temperature influences on the free amino acid pool composition of rice plants. **Turrialba**, v.33, n.3, p.297-301, 1984.
- FORDE, B.G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1465, p.219-235, 2000.
- FRAISIER, V.; GOJON, A.; TILLARD, P.; DANIEL-VEDELE, F. Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. **The Plant Journal**, v.23, n.4, p.489-496, 2000.
- GAUR, V.S.; SINGH, U.S.; KUMAR, A.L. Transcriptional profiling and *in silico* analysis of Dof transcription factor gene family for understanding their regulation during seed development of rice *Oryza sativa* L. **Mol Biol Rep**, v.38, p.2827-2848, 2011.
- GLASS, A.D.M.; SHAFF, J.E.; KOCHIAN, L.V. Studies of the uptake of nitrate in Barley. **Plant Physiol**, v.99, p.456-463, 1992.
- GOJON, A.; NACRY, P.; DAVIDIAN, J-C. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, p.328-338, 2009.
- GROTEWOLD, E. Transcription factors for predictive plant metabolic engineering: are we there yet? **Current Opinion in Biotechnology**, v.9, p.138-144, 2008.
- GUO, A.; HE, K.; LIU D.; BAI, S.; GU, X.; WEI, L.; LUO, J. DATF: a database of *Arabidopsis* transcription factors. **Bioinformatics**, v.21, p.2568-2569, 2005.
- HIEI, Y. & KOMARI, T. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. **Nature Protocol**, v.3, n.5, p.824-834, 2008.
- HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUBO, T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology**, v.35, p.205-218, 1997.
- HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **The Plant Journal**, v.6, n.2, p.271-282, 1994.
- HIREL, B.; GOUIS, J.L.; NEY, B.; GALLAIS, A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal of Experimental Botany**, p.1-19, 2007.

- HO, C.; LIN, S-H.; HU, H-C.; TSA, Y-F. CHL1 Functions as a nitrate sensor in plants. **Cell**, v.138, p.1184–1194, 2009.
- HU, H.C., WANG, Y.Y., TSAY, Y.F. AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. **The Plant Journal**, v.57, p.264–278, 2009.
- HUANG, N.C.; LIU, K.H.; LO, H.J.; TSAY, Y.F. Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. **The Plant Cell**, v.11, p.1381–1392, 1999.
- IBGE. Produção e área plantada de cereais, leguminosas e oleaginosas 2011. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtml>. Acesso em: 12 de janeiro de 2012.
- IIDA, K.; SEKI, M.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; AKIYAMA, K.; TOYODA, T.; KONAGAYA, A.; SHINOZAKI, K. RARTF: database and tools for complete sets of *Arabidopsis* transcription factors. **DNA Research**, v.12, p.247–256, 2005.
- KAISER, B.N.; RAWAT, S.R.; SIDDIQI, M.Y.; MASLE, J.; GLASS, A.D.M. Functional analysis of an *Arabidopsis* T-DNA ‘Knockout’ of the high-affinity NH₄⁺ transporter *AtAMT1.1*. **Plant Physiology**, v.130, p.1263–1275, 2002.
- KANT, S.; BI, Y-M.; ROTHSTEIN, S.J. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.4, p.1499-1509, 2011.
- KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. Gateway- vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Trends in Plant Science**, v.7, n.5, p. 193-195, 2002.
- KUMAR, A.; SILIM, S. N.; OKAMOTO, M.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. Differential expression of three members of the *AMT1* gene family encoding putative high-affinity NH₄⁺ transporters in roots of *Oryza sativa* subspecies indica. **Plant Cell and Environment**, v.26, p.907–914, 2003.
- LEA, P.J. & AZEVEDO, R.A. Nitrogen use efficiency. Uptake of nitrogen from the soil. **Annals of Applied Biology**, v.149, n.3, p.243-247, 2006.
- LEJAY, L. Running head: NRT2.1 post-transcriptional regulation in *Arabidopsis*. **Plant Physiology Preview**, v.146, p.1-35, 2011.
- LI, J.-Y.; FU, Y.-L.; PIKE, S.M.; BAO, J.; TIAN, W.; ZHANG, Y.; CHEN, C.-Z.; ZHANG, Y.; LI, H.-M. HUANG, J.; LI, L.-G.; SCHROEDER, J.I.; GASSMANN, W.; GONG, J.-M. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. **The Plant Cell**, v.22, n.5, p.1633-1646, 2010.
- LIAN, X.; XING, Y.; XU, H.Y.C.; LI, X.; ZHANG, Q. QTLs for low nitrogen tolerance at seedling stage identified using a recombinant inbred line population derived from an elite rice hybrid. **Theor Appl Genet**, v.112, p.85–96, 2005.
- LIJAVETZKY, D.; CARBONERO, P.; VICENTE-CARBAJOSA, J. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and *Arabidopsis* Dof gene families. **BMC Evolutionary Biology**, v.23, p.3-17, 2003.
- LIN, S.H.; KUO, H.F.; CANIVENC, G.; LIN, C-S.; LEPETIT, M.; HSU, P-K.; TILLARD, P.; LIN, H-L.; WANG, Y-Y.; TSAI, C-B.; GOJON, A.; TSAY, Y-F. Mutation of the *Arabidopsis* NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. **The Plant Cell**, v.20, p.2514–2528, 2008.

- LIU, K-H. & TSAY, Y.F. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. **The EMBO Journal**, v.22, p.1005–1013, 2003.
- LIU, K-H.; HUANG, C-Y.; TSAY, Y-F. CHL1 Is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. **The Plant Cell**, v.11, p.865–874, 1999.
- LOQUÉ, D & WIRÉN, N.V. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.401, p.1293–1305, 2004.
- LUDEWIG, U.; NEUHAUSER, B.; DYNOWSKI, M. Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. **FEBS Letters**, v.581, p.2301–2308, 2007.
- MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany**, v.105, p.1–17, 2009.
- MILLER, A.J & CRAMER, M.D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, v.274, p.1–36, 2004.
- IMITSUDA, N. & TAKAGI, M.O. Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. **Plant Cell Physiol**, v.50, n.7, p.1232–1248, 2009.
- NAZOA, P.; VIDMAR, J.J.; TRANBARGER, T.J.; MOULINE, K.; DAMIANI, I. TILLARD, P.; ZHUO, D.; GLASS, A.D.M.; TOURAIN, B. Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2.1 in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. **Plant Molecular Biology**, v.52, p.689–703, 2003.
- OKAMOTO, M.; KUMAR, A.; LI, W.; WANG, Y.; SIDDIQI, M.Y.; CRAWFORD, N.M.; GLASS, A.D.M. High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the NAR2-like gene AtNRT3.1. **Plant Physiology**, v.140, p.1036–1046, 2006.
- OKAMOTO, M.; VIDMAR, J.J.; GLASS, A.D. Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. **Plant Cell Physiology**, v.44, p.304–317, 2003.
- ORSEL, M.; KRAPPA, A.; DANIEL-VEDELE, F. Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*: structure and gene expression. **Plant Physiology**, v.129, p.886–896, 2002.
- QU, L-J. & ZHU, Y-X. Transcription factor families in *Arabidopsis*: major progress and outstanding issues for future research. **Current Opinion on Plant Biology**, v.9, p.544–549, 2006.
- RAWAT, S.R.; SILIM, S.N.; KRONZUCKER, H.J.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M. AtAMT1 gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. **The Plant Journal**, v.19, p.143–152, 1999.
- RUEDA-LÓPEZ, M.; CRESPILO, R.; CÁNOVAS, F. M.; ÁVILA, C. Differential regulation of two glutamine synthetase genes by a single Dof transcription factor. **The Plant Journal**, v.56, p.73–85, 2008.
- RUIZ, H. A.; FERNANDES FILHO, E. I. Cinética: software para estimar as constantes $V_{\text{máx}}$ e K_M da equação de Michaelis-Menten. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, n.10, 1992, Piracicaba. Anais. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.124–125. 1992.

- SANTOS A.M.; BUCHER , C.A.; STARK. E.M.L. M.; FERNANDES, M.S.; SOUZA, S. R. Efeito da disponibilidade de nitrato em solução nutritiva sobre a absorção de nitrogênio e atividade enzimática de duas cultivares de arroz. **Bragantia**, v.68, n.1, p.215-220, 2009.
- SANTOS A.M.; SANTOSA, W.A.; Sperandio, M.V.L.; BUCHER, C.A.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M.S. Nitrate uptake kinetics and metabolic parameters intwo rice varieties grown in high and low nitrate. **Journal of Plant Nutrition**, v.34, p.988–1002, 2011.
- SANTOS, L.A. **Efeito da Superexpressão dos Fatores de Transcrição *ZmDof1* e *OsDof25* sobre a Eficiência de Uso de Nitrogênio em *Arabidopsis thaliana* L.** 2009. 81f. (Tese de Doutorado em Ciência do Solo) Seropédica-RJ: UFRJ.
- SHANAHAN, J.F.; KITCHEN, N.R.; RAUN, W.R.; SCHEPERS, J.S. Responsive in-season nitrogen management for cereals. **Computers and Electronics in Agriculture**, v.61, n.1, p.51-62, 2008.
- SILVA, M.R. de. **Embriogênese somática, melhoramento da resposta in vitro e transformação de milho (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*.** 2009. 196f. (Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal), Passo Fundo: UPF. 2009
- SONODA, Y.; IKEDA, A.; SAIKI, S.; VON WIRÉN, N.; YAMAYA, T.; YAMAGUCHI, J. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1.1–1.3*) in rice. **Plant Cell Physiology**, v.44, p.726–734, 2003.
- SOUZA & FERNANDES. Nitrogênio. In: FERNANDES, M.S. **Nutrição de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 215-252.
- SOUZA, S.R.; STARK, E.M.L.M.; FERNANDES, M.S. Nitrogen remobilization during the reproductive period in two Brazilian rice varieties. **Journal of Plant Nutrition**, v.21, n.10, p. 2049-2063, 1998.
- SOUZA, V.M. **Avaliação dos parâmetros cinéticos de absorção de amônio entre variedades locais e melhorada de arroz (*Oryza sativa* L.) e expressão em real-time RT-PCR dos transportadores *OsAMT1*.** 2010. 57f. (Dissertação de Mestrado em Fitotecnia) Seropédica: UFRJ. 2010.
- SPERANDIO, M.V.L.; SANTOS, L.A.; BUCHER, C.A.; FERNANDES, M.S.; SOUZA, S.R. Isoforms of plasma membrane H⁺-ATPase in rice root and shoot are differentially induced by starvation and resupply of NO₃⁻ or NH₄⁺. **Plant Science**, v.180, p. 251–258, 2011.
- SUENAGA, A.; MORIYA, K.; SONODA, Y.; IKEDA, A.; VON WIRÉN, N.; HAYAKAWA, T.; YAMAGUCHI, J.; YAMAYA, T. Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter *OsAMT2* in rice plants. **Plant and Cell Physiology**, v.44, p.206–211, 2003.
- TOKI, S.; HARA, N.; ONO, K.; ONODERA, H.; TAGIRI, A.; OKA, S.; TANAKA, H. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. **The Plant Journal**, v.47, p.969–976, 2006.
- TSAY, Y.F.; CHIU, C.C.; TSAI, C.B.; HO, C.H.; HSU, P.K. Nitrate transporters and peptide transporters. **FEBS Letters**, v.581, p.2290–2300, 2007.
- UDVARDI, M.K; KAKAR, K.; WANDREY, M.; MONTANARI, O.; MURRAY, J.; ANDRIANKAJA, A.; ZHANG, J.-Y.; BENEDITO, V.; HOFER, J.M.I.; CHUENG, F.; TOWN, C.D. Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. **Plant Physiology**, v.144, p.538-549, 2007.

- VEGA, J.M.; YU, W.; KENNON, A.R.; CHEN, X.; ZHANG, Z.J. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays* L.) using standard binary vectors. **Plant Cell Rep.**, v.27, p.297–305, 2008.
- VIDAL, E.A. & GUTIÉRREZ, R.A. A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in *Arabidopsis*. **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, p.521-529, 2008.
- WALCH-LIU, P & FORDE, B.G. Nitrate signaling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonizes L-glutamate-induced changes in root architecture. **The Plant Journal**, v.54, p.820–828, 2008.
- WANG, Y-Y & TSAY, Y-F. *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.9 is important in phloem nitrate transport. **The Plant Cell**, p.1-13, 2011.
- WHITE, P.J. & BROWN, P.H. Plant nutrition for sustainable development and global health. **Annals of Botany**, v.105, p.1073–1080, 2010.
- WÍREN, N.V; GAZZIRRINI, S; GOJON, A; FROMMER, W.B. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, p.254-261, 2000.
- WIRTH J.; CHOPIN F.; SANTONI V.; VIENNOIS G.; TILLARD P.; KRAPP A.; LEJAY L.; DANIEL-VEDELE, F.; GOJON A. Regulation of root nitrate uptake at the NRT2.1 protein level in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**. v.282, p.23541-23552, 2007.
- YAMASAKI, K.; KIGAWA, T.; INOUE, M.; WATANABE, S.; TATENO, M.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YOKOYAMA, S. Structures and evolutionary origins of plant-specific transcription factor DNA-binding domains. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.46, n.3, p.394-401, 2008.
- YANAGISAWA, S. & SHEEN, J. Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. **The Plant Cell**, v.10, p.75-89, 1998.
- YANAGISAWA, S. Dof domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. **Plant Cell Physiol**, v.45, n.4, p.386-391, 2004.
- YANAGISAWA, S. The Dof family of plant transcription factors. **TRENDS in Plant Science**, v.7 n.12, p.555-560, 2002.
- YANAGISAWA, S.; AKIYAMA, A.; KISAKA, H.; UCHIMIYA, H.; MIWA, H. Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. **PNAS**, v.101, n.20, p.7833-7838, 2004.
- YANAGISAWA, S.; IZUI, K. Molecular cloning two DNA-binding proteins of maize that are structurally different but interact with the same sequence motif. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268, n.21, p.16028-16036, 1993.
- YEMM, E.W. & COCKING, E. C. The determination of amino-acid with ninhydrin. **Analytical Biochemistry**, v.80, p.209-213, 1955.
- YEMM, E.W. & WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plants extracts by anthrone. **Biochemistry**, v.57, p.508-514, 1954.
- YONG, Z.; KOTUR, Z.; GLASS, A.D.M. Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from *Arabidopsis* roots. **The Plant Journal**, v.63, p.739–748, 2010.
- ZHOU, J.-J.; FERNÁNDEZ, E.; GALVÁN, A.; MILLER, A.J. A high affinity nitrate transport system from Chamydomonas requires two gene products. **FEBS Letter**, v.446, p.225-227, 2000.

7 ANEXOS

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

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

- 50 mL N6 Macro (10X)
- 5 mL N6 Micro (100X)
- 10 mL Fe-EDTA (100X)
- 5mL de N6-vitaminas (100X)
- 0,050 g Mio-inositol
- 10 mL de 2,4D a 100 mg L⁻¹
- 0,15 g Casaminoácidos
- 1,439 g Prolina
- 15 g Sacarose
- Ajustar pH para 5,8 com KOH 1M
- Avolumar para 500 mL com H₂O destilada
- 2 g de gelrite
- Autoclavar a 121 °C por 15min

Obs.: A estocagem pode ser feita a 25 °C no escuro, por não mais que 5 dias.

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

- 50 mL N6 Macro (10X)
- 5 mL N6 Micro (100X)
- 5 mL Fe-EDTA (100X)
- 5 mL de N6-vitaminas (100X)
- 0,050 g Mio-inositol
- 10 mL de 2,4D a 100 mg L⁻¹
- 0,15 g Casaminoácidos
- 15 g Sacarose
- 5 g Glicose
- Ajustar pH para 5,2 com KOH 1M
- Avolumar para 500 mL com H₂O destilada
- 2 g de gelrite
- Autoclavar a 121 °C por 15 minutos

Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar 0,5 mL de acetoseringona a 19,2 mg mL⁻¹ (conc. final de 19,2 mg L⁻¹).

Obs.: A estocagem pode ser feita a 25 °C no escuro, por não mais que 5 dias.

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

- 1 g Glicose
- 3 g Bacto-Agar
- 10 mL de Sais AB (20X)
- 10 mL de Tampão AB (20X)
- Avolumar para 200 mL com H₂O destilada

- Autoclavar a 121 °C por 15 min

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

Obs.: As placas poderão ser armazenadas na geladeira a 4 °C por não mais que 5 dias.

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

- 10 mL AA Macro (20X)
- 2 mL Fe-EDTA - Sigma (100X)
- 2 mL B5 Micro (100X)
- B5-vitaminas (100X)
- 20 mL de AA aminoácidos (10X)
- 0,1 g Casaminoácidos
- 13,7 g Sacarose
- 7,2 g Glicose
- Ajustar pH para 5,2 com KOH 1M
- Avolumar para 200 mL com H₂O destilada
- Autoclavar a 121 °C por 15 min

Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar 0,2 mL de acetoseringona a 19,2 mg mL⁻¹ (conc. final de 19,2 mg L⁻¹).

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

- 50 mL N6 Macro (10X)
- 5 mL N6 Micro (100X)
- 5 mL Fe-EDTA (100X)
- 5 mL de N6-vitaminas (100X)
- 0,050 g Mio-inositol
- 10 mL de 2,4D a 100 mg L⁻¹
- 0,15 g Casaminoácidos
- 1,439 g Prolina
- 15 g Sacarose
- Ajustar pH para 5,8 com KOH 1M
- Avolumar para 500 mL com H₂O destilada
- 2 g de gelrite
- Autoclavar a 121 °C por 15min

Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar 0,5 mL de Higromicina 1000X (conc. final de 50 mg L⁻¹), 1mL de carbenicilina 500X (conc. final 400 mg L⁻¹).

Obs.: A estocagem pode ser feira a 25 °C no escuro, por não mais que 5 dias.

6-Meio de Regeneração de parte aérea (RE-III) – 500 mL

- 50 mL de MS Macro (10X)
- 5 mL Fe-EDTA (100X)
- 0,5 mL MS Micro (1000X)
- 5 mL de MS vitaminas modificado
- 1,0 g Casaminoácidos
- 15g Sacarose
- 15 g Sorbitol

- Ajustar pH para 5,8 com KOH
- Avolumar para 500 mL com H₂O destilada
- 2 g gelrite
- Autoclavar 121 °C por 15 mim
- Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar 0,5 mL de cinetina 1000X (conc. final de 2 mg L⁻¹), 0,5 mL de ANA 1000X (conc. final de 0,02 mg L⁻¹), 0,5 mL de Higromicina 1000X (conc. final de 50µg L⁻¹).

Obs.: A estocagem pode ser feira a 25 °C no escuro, por não mais que 5 dias.

7-Meio de Regeneração de raiz (HF) – 500 mL

- 50 mL de MS Macro (10X)
- 5 mL Fe-EDTA (100X)
- 0,5 mL MS Micro (1000X)
- 5 mL de MS vitaminas modificado
- 15g Sacarose
- Ajustar pH para 5,8 com KOH
- Avolumar para 500 mL com H₂O destilada
- 2g de gelrite

Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar 0,5 mL de Higromicina 1000X (conc. final de 50µg L⁻¹).

Obs.: A estocagem pode ser feira a 25 °C no escuro, por não mais que 5 dias.