

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

DISSERTAÇÃO

**Caracterização Funcional do Transportador de
Amônio OsAMT1.3 e seu Efeito sobre a Nutrição
Nitrogenada em Plantas de Arroz**

Leandro Martins Ferreira

2013



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

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO TRANSPORTADOR DE
AMÔNIO OsAMT1.3 E SEU EFEITO SOBRE A NUTRIÇÃO
NITROGENADA EM PLANTAS DE ARROZ**

LEANDRO MARTINS FERREIRA

Sob a Orientação do professor
Leandro Azevedo Santos

e Co-orientação da professora
Sonia Regina de Souza

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2013

633.18
F383c
T

Ferreira, Leandro Martins, 1988-

Caracterização funcional do transportador de amônio OsAMT1.3 e seu efeito sobre a nutrição nitrogenada em plantas de arroz / Leandro Martins Ferreira. – 2013.

xv, 55 f.: il.

Orientador: Leandro Azevedo Santos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia, 2013.

Bibliografia: f. 46-52.

1. Arroz – Cultivo – Teses. 2. Arroz – Adubos e fertilizantes - Teses. 3. Expressão gênica – Teses. 4. Amônio – Absorção e adsorção – Teses. I. Santos, Leandro Azevedo, 1981- 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**

LEANDRO MARTINS FERREIRA

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/02/2013.

Leandro Azevedo Santos. Dr. UFRRJ
Orientador

André Marques dos Santos. Dr. UFRRJ

Marcia Soares Vidal. Dr^a. UFRJ

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Fernando Bulhosa Ferreira (in memoriam) e Maria Cristina
Martins Ferreira por todo incentivo e amor.
A Cristiana Maia de Oliveira minha namorada e amiga*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre iluminou o meu caminho e me deu forças para superar todas as barreiras durante essa jornada.

À população brasileira por todo conhecimento científico que adquiri durante a graduação e mestrado nesta instituição pública.

A minha família que sempre acreditou no meu potencial e me incentivou a seguir essa carreira profissional.

À minha linda, Cristiana Maia de Oliveira, pelo incentivo, ajuda nos experimentos, atenção, amor e carinho durante esse período.

Ao Prof. Manlio Silvestre Fernandes pelos ensinamentos científicos que muito contribuíram para minha formação e pela orientação durante a iniciação científica.

Ao professor Leandro Azevedo Santos pela orientação, amizade e apoio durante a execução dos experimentos e análises.

A Prof^a. Sonia Regina de Souza e a Elvia Marian Lis Martinez Stark pela oportunidade de iniciar minha vida científica ainda na graduação, orientação, ensinamentos, amizade e carinho durante esse tempo de convivência.

Ao professor Joecildo Francisco Rocha e ao aluno de doutorado Rafael pela orientação inicial nos procedimentos para obtenção dos cortes anatômicos.

A professora Claudete Santa – Catarina (UENF) por todo o apoio na execução dos cortes histológicos e captura das imagens.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, Vinícius Miranda, Cássia Coelho, Marcus Sperandio, Orlando Huertas, Janiélio Gonçalves, Osmário Araújo, Rafaela Eloi, prof. Carlos Bucher, Luiziene Soares, Rafael Passos, Flávia Caldeira, Marcela Jacques e Leilson Arruda por toda troca de conhecimentos, contribuição na execução deste trabalho e pelos momentos de descontração.

Aos bolsistas de iniciação científica Sara Brasil, Sara Yumi, Andressa Fabiane, Otávio Itacarambi e Michelly pela amizade, apoio na condução dos trabalhos e análises laboratoriais.

Aos amigos Ciro Moraes, José Rodrigo e Maicon Wandermaz pelas conversas científicas, a troca de conhecimentos e os momentos de descontração.

Aos professores e funcionários do Departamento de Solos, pela cordialidade, presteza e amizade.

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

Ao CNPq e a FAPERJ pelo fomento.

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

BIOGRAFIA

Leandro Martins Ferreira nasceu no Rio de Janeiro – RJ, em 03 de janeiro de 1988. Concluiu o ensino fundamental no Centro Educacional Santo Antônio de Pádua e o ensino médio no Colégio Técnico da Universidade Rural (CTUR), onde adquiriu o título de técnico em Agropecuária Orgânica. Iniciou o curso de graduação em Engenharia Agrônômica na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em junho de 2006, diplomando – se em 2011. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica por três anos e meio no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do Departamento de Solos estudando técnicas para aumentar a eficiência de uso de nitrogênio em arroz sob a orientação do professor Manlio Silvestre Fernandes. Em março de 2011 foi aprovado em primeiro lugar para o mestrado no Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo (CPGA-CS), sob a orientação do professor Leandro Azevedo Santos. Em 2012 foi selecionado como aluno FAPERJ nota 10 e recentemente foi aprovado para cursar o doutorado no curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo (CPGA-CS).

RESUMO

FERREIRA, Leandro Martins. **Caracterização funcional do transportador de amônio OsAMT1.3 e seu efeito sobre a nutrição nitrogenada em plantas de arroz.** 2013. 55 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2013.

Este trabalho teve por objetivo identificar a contribuição do transportador OsAMT1.3 para o sistema de alta afinidade de absorção de amônio e caracterizar o seu papel nos mecanismos de adaptação de plantas a ambientes com baixa disponibilidade de nitrogênio. O gene *OsAMT1.3* foi superexpresso em plantas de arroz da variedade Nipponbare e sua localização tecido-específica também foi determinada. Foram realizados três experimentos com o objetivo de identificar os locais de atuação do OsAMT1.3 em plantas sob privação de N e quantificar o nível de atividade do promotor gênico. A atividade do promotor do *OsAMT1.3* foi fortemente induzida na ausência de N e ocorreu, principalmente, nas regiões de emissão de raízes laterais, pontas de raízes e na exoderme. Em outros dois experimentos foram determinados os parâmetros cinéticos $V_{máx}$ e K_M , sob condições de alto e baixo suprimento de N-NH₄⁺, e analisado o perfil de expressão dos transportadores de NH₄⁺ (AMT1.1~1.3) e atividade da Glutamina Sintetase (GS) em duas linhagens transformadas (L#2 e L#8) comparadas com a tipo selvagem (WT). As linhagens transformadas apresentaram menor massa fresca quando submetidas a altas concentrações de amônio (2,0 mM), o que pode ser reflexo de uma maior taxa de absorção de amônio por essas plantas. A L#8 apresentou menor valor de K_M no tratamento de 0,2 mM N-NH₄⁺ em solução. Estes resultados sugerem uma maior eficiência de absorção de amônio que pode ter sido proporcionada pela superexpressão do transportador OsAMT1.3.

Palavras-chave: *Oryza sativa* L. Superexpressão. Cinética de Absorção. PCR em tempo real.

ABSTRACT

FERREIRA, Leandro Martins. **Functional characterization of the ammonium transporter OsAMT1.3 and its effect on nitrogen nutrition in rice plants.** 2013. 55p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The main goal of this study was to identify the contribution of OsAMT1.3 transporter to the ammonium high-affinity uptake system, and to characterize its role in the mechanisms of plant adaptation to environments with low nitrogen availability. The *OsAMT1.3* gene was overexpressed in rice plants of Nipponbare variety and its tissue-specific location was also determined. Three experiments were carried out to identify the sites of OsAMT1.3 action in plants deprived of N and to quantify the promoter gene activity. Promoter activity of *OsAMT1.3* was strongly induced in the absence of N and it occurred, mainly, in the regions of lateral roots emissions, root tips and in the exodermis. Other two experiments were designed to determine the kinetic parameters $V_{\text{máx}}$ and K_M in plants supplied with high and low N-NH_4^+ conditions and to analyze the expression profile of NH_4^+ transporters (AMT1.1 ~ 1.3) and Glutamine Synthetase (GS) activity in two transformed lines (L#2 and L#8) compared to the wild type (WT). The transformed lines showed least fresh weight when subjected to high concentrations of ammonium in solution (2.0 mM), which may reflect a higher rate of ammonium uptake by these plants. The L#8 showed the lowest K_M value in the 0.2 mM N-NH_4^+ treatment. These results suggest that an increase of uptake efficiency in the L#8 may have been provided by the overexpression of OsAMT1.3 ammonium transporter.

Key words: *Oryza sativa* L. Overexpression. Uptake kinetic. Real time PCR.

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 2</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
DAG	Dias Após a Germinação
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
GS	Glutamina sintetase
GUS	Enzima β -glucuronidase
HATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidade (“ <i>High Affinity Transport System</i> ”)
K_M	Constante de Michaelis-Menten
L#2 e L#8	Linhagens transformadas superexpressando o gene <i>OsAMT1.3</i>
LATS	Sistema de Transporte de Baixa Afinidade (“ <i>Low Affinity Transport System</i> ”)
pb	Pares de bases
RNA_m	Ácido Ribonucléico mensageiro (“ <i>Ribonucleic Acid Messenger</i> ”)
TRIS	2-(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol
V_{máx}	Velocidade máxima de absorção
WT	Tipo selvagem (“ <i>wild type</i> ”) ou planta não transformada

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos “ <i>Primers</i> ” para amplificação do gene do transportador de amônio <i>OsAMT1.3</i> com os sítios de recombinação <i>attB1</i> e <i>attB2</i> em duas reações.	9
Tabela 2. Reações de recombinação entre os sítios <i>att</i> do fago λ em <i>E. coli</i>	10
Tabela 3. Vetores doadores e suas funções para a geração de três tipos de clones de entrada.	10
Tabela 4. Sequências dos “ <i>Primers</i> ” para amplificação do gene do promotor do transportador de amônio <i>OsAMT1.3</i> com os sítios de recombinação <i>attB1</i> e <i>attB2</i> em duas reações. ...	17
Tabela 5. Sequências dos “ <i>primers</i> ” para os genes dos transportadores de amônio (<i>OsAMT1.1</i> , <i>OsAMT1.2</i> e <i>OsAMT1.3</i>) e o fator de alongamento 1- α (<i>eEF1-α</i>) como gene controle endógeno usados nas reações de PCR em tempo real.	22
Tabela 6. Segregação das linhagens superexpressando o transportador de amônio <i>OsAMT1.3</i> na 2 ^a geração ($P_{UBIL:OsAMT1.3:3xHA}$).	27
Tabela 7. Segregação das linhagens na 2 ^a geração transformadas com a construção $P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS$	28
Tabela 8. Massa fresca (g planta ⁻¹) e razão raiz: parte aérea (R/PA) de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio <i>OsAMT1.3</i> linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento de N-NH ₄ ⁺ (0,2 e 2,0 mM) após 72 horas de privação de N.	35
Tabela 9. Parâmetros cinéticos ($V_{m\acute{a}x}$ e K_M) da absorção de N-NH ₄ ⁺ de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio <i>OsAMT1.3</i> linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento de N-NH ₄ ⁺ (0,2 e 2,0 mM) após 72 horas de privação de N.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Sequência do gene *OsAMT1.3*. Acesso gblAF289479.11:1441-2928. (<http://www.NCBI.org/blast>). 8
- Figura 2.** Esquema ilustrativo da reação de recombinação BP para criação dos vetores de entrada, necessários para construção do vetor para expressão do *OsAMT1.3*. Ori – origem de replicação; KAN^R- gene de resistência a kanamicina; CM^R – gene de resistência ao cloranfenicol; attB, attP, attL e attR – sítios de recombinação; ccdB – gene que codifica para uma proteína que interfere na atividade da DNA girase de *E. coli*, impedindo o seu crescimento; UBIL – Promotor que dirige a expressão constitutiva em arroz; 3xHA – peptídeo de fusão (adaptado de SANTOS, 2009). 11
- Figura 3.** Esquema ilustrativo da reação LR tripla para obtenção do vetor para superexpressão do *OsAMT1.3*. Neste trabalho foi utilizado o promotor UBIL e um Tag-3XHA fusionado ao gene. 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; UBIL – Promotor que dirige a expressão constitutiva em arroz; 3xHA – peptídeo de fusão (adaptado de SANTOS, 2009.) 11
- Figura 4.** Vetor pENTR-*OsAMT1.3* usado na reação de recombinação LR tripla para formação do clone de expressão. KAN^R – resistência ao antibiótico canamicina; attL1 e attL2 – sítios de recombinação. PstI, Sad, Asel – sítios de cortes por enzimas de restrição. 13
- Figura 5.** Vetor de expressão P_{UBIL}:*OsAMT1.3*:3xHA usado para a transformação das plantas de arroz via *Agrobacterium tumefaciens*. Este vetor leva o gene da higromicina fosfotransferase (*hyg*) que confere resistência a higromicina às plantas transformadas. LB e RB – borda direita e borda esquerda; attB1, attB2, attB3 e attB4 – sítios de recombinação; PstI – sítios de corte por enzimas de restrição. 14
- Figura 6.** Ilustração do sistema de condução do experimento na câmara de crescimento utilizando plantas de arroz da linhagem 4 (L#4) transformadas com a construção P_{*OsAMT1.3*}:GFP:GUS (L#4). As coletas foram realizadas 1, 3, 7 e 14 dias após a aplicação dos tratamentos. 18
- Figura 7.** Ilustração do sistema de condução do experimento na câmara de crescimento utilizando plantas de arroz da linhagem 4 (L#4) transformadas com a construção P_{*OsAMT1.3*}:GFP:GUS (L#4). As Coletas foram realizadas 1, 3, 7 e 14 dias após a aplicação dos tratamentos. 19
- Figura 8.** Ilustração do sistema de condução do experimento na câmara de crescimento utilizando plantas de arroz das linhagens 2 e 8 (L#2 e L#8) transformadas com a construção UBIL: *OsAMT1.3*: 3xHA com diferentes níveis de expressão do transportador *OsAMT 1.3* e plantas tipo selvagem (WT) para obtenção dos dados utilizados nos cálculos dos parâmetros cinéticos. As coletas iniciaram a partir de 30DAG depois de um período de privação de N por 72h. 20
- Figura 9.** Ilustração do sistema de condução do experimento na câmara de crescimento utilizando plantas de arroz das linhagens 2 e 8 (L#2 e L#8) transformadas com a construção UBIL: *OsAMT1.3*: 3xHA com diferentes níveis de expressão do transportador *OsAMT 1.3* e plantas tipo selvagem (WT). As coletas foram realizadas 2 e 6h após a adição dos tratamentos em plantas de 30DAG para análise de expressão gênica e metabolismo de N. 21
- Figura 10.** a) Sementes de arroz da variedade Nipponbare em meio nutritivo (N6D) contendo auxina (2,4D a 2mg L⁻¹) como regulador para indução de calos embriogênicos; b e c) Calos em estágio de desenvolvimento após 14 dias em meio nutritivo, sendo os mais

friáveis (indicado pela seta) utilizados para dar prosseguimento ao protocolo de transformação; d) Calos transferidos para meio nutritivo (N6D) por mais três dias para aumentar o rendimento.	25
Figura 11. a) Detalhe de calo de arroz com pontuações verdes após 1 semana no meio de regeneração (RE III); b) Plântula após 2 semanas com cerca de 3cm no meio de regeneração; c) Linhagens transferidas para o meio de formação de raízes após duas semanas; d) Linhagens na casa de vegetação do Departamento de Solos produzindo sementes.	25
Figura 12. Plântulas de arroz após 14 dias no teste de segregação em placa de Petri contendo higromicina (50 µg mL ⁻¹).	26
Figura 13. Raízes de arroz após processo de infiltração em solução de coloração contendo ácido glucurônico (X-gluc) substrato da β-glucuronidase. O período de incubação foi de cerca de três horas até o aparecimento da coloração.	29
Figura 14. Detalhe da região de emissão de uma raiz lateral nas plantas de arroz transformadas <i>P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS</i> . a e c) Imagem capturada em microscópio ótico com lente de aumento de 20 vezes no campo claro corada de azul devido a atividade da β-glucuronidase; b e d) Imagem capturada no campo escuro excitando a proteína GFP.	29
Figura 15. Cortes anatômicos de raízes de arroz na L#4 transformadas com a construção do <i>P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS</i> , a), c, e) Cortes transversais e g) Corte longitudinal. Setas indicam os locais de atividade do promotor do <i>OsAMT1.3</i> . Imagens capturadas em microscópio ótico coradas de azul devido a atividade da β-glucuronidase em diferentes estádios de desenvolvimento da raiz. b, d, f, e g) Imagens capturadas no campo escuro excitando a proteína GFP. Barra em (a) representa 50 µm.	30
Figura 16. Cortes anatômicos aproximados de raízes de arroz na L#4 transformadas com a construção do <i>P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS</i> , a) Detalhe da região de alongamento e b) Região de diferenciação de uma raiz lateral em lente de aumento de 100 vezes. Barra representa 50 µm.	31
Figura 17. Cortes anatômicos aproximados de raízes de arroz na L#4 transformadas com a construção do <i>P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS</i> , a) Corte transversal evidenciando a alta atividade do <i>pOsAMT1.3</i> na região de emissão de raízes laterais de plantas de arroz; b) Corte longitudinal com detalhe para a ponta da raiz lateral com alta atividade do <i>pOsAMT1.3</i> . Cortes capturados na lente de aumento de 40 vezes. Barra representa 50 µm.	32
Figura 18. Atividade do promotor do transportador de amônio <i>OsAMT1.3</i> em plantas de arroz da variedade Nipponbare transformadas com a construção do <i>P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS</i> , quando submetidas ao tratamento de deficiência de N e suprimento constante com 2,0 mM N-NO ₃ ⁻ ou 2,0 mM N-NH ₄ ⁺ . Barras representam o erro padrão das médias de 4 repetições.	33
Figura 19. Atividade do promotor do transportador de amônio <i>OsAMT1.3</i> em plantas de arroz da variedade Nipponbare transformadas com a construção do <i>P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS</i> quando submetidas ao tratamento constante com N (1,5 mM de N-NO ₃ ⁻ e 0,5 mM de N-NH ₄ ⁺) e deficiência após um período de 7 dias de suplementação com 2,0 mM N-NO ₃ ⁻ ou 2,0 mM N-NH ₄ ⁺ . Barras representam o erro padrão das médias de 4 repetições.	34
Figura 20. Depleção de N-NH ₄ ⁺ na solução nutritiva com o cultivo de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio <i>OsAMT1.3</i> linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento com 0,2 mM de N-NH ₄ ⁺ após 72 horas de privação de N. Barras representam o desvio padrão das médias.	37

- Figura 21.** Depleção de $N-NH_4^+$ na solução nutritiva com o cultivo de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento com 2,0 mM de $N-NH_4^+$ após 72 horas de privação de N. Barras representam o desvio padrão das médias. 37
- Figura 22.** Valor de pH na solução nutritiva de cultivo de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento de 0,2 e 2,0 mM de $N-NH_4^+$ após 72 horas de privação de N. Barras representam o desvio padrão das médias.. 38
- Figura 23.** Expressão relativa de três transportadores de NH_4^+ (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*) na raiz de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* (linhagens L#2 e L#8) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,0 mM de $N-NO_3^-/N-NH_4^+$ e ressuprimento de $N-NH_4^+$ (0,2 e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram efetuadas coletas às 2 e 6 horas após a aplicação dos tratamentos. A linhagem WT no tratamento constante com 1,0 mM de $N-NO_3^-/N-NH_4^+$ foi utilizada como de referência. Barras representam o erro padrão das médias de quatro repetições. 40
- Figura 24.** Teores de $N-NO_3^-$ em folha (a), colmo (b) e raiz (c) de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a tratamento constante com 1,0 mM de $N-NH_4^+$ e ressuprimento de $N-NH_4^+$ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. A coleta foi realizada 6 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das médias de três repetições. 41
- Figura 25.** Teores de $N-NH_4^+$ em folha (a), colmo (b) e raiz (c) de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a tratamento constante com 1,0 mM de $N-NH_4^+$ e ressuprimento de $N-NH_4^+$ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. A coleta foi realizada 6 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das médias de três repetições. 41
- Figura 26.** Teores de N-amino em folha (a), colmo (b) e raiz (c) de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a tratamento constante com 1,0 mM de $N-NH_4^+$ e ressuprimento de $N-NH_4^+$ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. A coleta foi realizada 6 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das médias de três repetições. 42
- Figura 27.** Teores de açúcares solúveis em folha (a), colmo (b) e raiz (c) de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas tratamento constante com 1,0 mM de $N-NH_4^+$ e ressuprimento de $N-NH_4^+$ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. A coleta foi realizada 6 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das médias de três repetições. 42
- Figura 28.** Atividade da Glutamina Sintetase na raiz de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas tratamento constante com 1,0 mM de $N-NH_4^+$ e ressuprimento de $N-NH_4^+$ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram efetuadas coletas às 2 e 6 horas após a aplicação dos tratamentos. Barras representam o erro padrão das médias..... 43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Importância da Cultura do Arroz	3
2.2	Absorção e Assimilação de Amônio.....	4
2.3	Transportadores de Amônio (AMT).....	5
3	MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1	Amplificação do Gene de Interesse	8
3.2	Tecnologia “Gateway®” e Clonagem dos Genes Amplificados	9
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.....	12
3.2.3	Preparo de células competentes para eletroporação (DH5 α).....	13
3.2.4	Reações de LR triplo para obtenção da construção P _{UBIL} : <i>OsAMT1.3</i> :3xHA.....	14
3.2.5	Meio YEB para cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14
3.2.6	Preparo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> competente	15
3.3	Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
3.4	Transformação de Arroz Mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
3.5	Estudo da Região Promotora do Gene <i>OsAMT1.3</i>	17
3.6	Ensaio para Localização e Quantificação do Nível de Atividade do Promotor do <i>OsAMT1.3</i>	17
3.6.1	Ensaio colorimétrico para localização tecido-Específica do promotor do <i>OsAMT1.3</i> em raízes de arroz	17
3.6.2	Quantificação do nível de atividade do promotor do <i>OsAMT1.3</i> em condição de deficiência de N ao longo do tempo.....	18
3.6.3	Quantificação do nível de atividade do promotor do <i>OsAMT1.3</i> em condição de suprimento de N ao longo do tempo	18
3.6.4	Atividade da enzima β -glucuronidase (GUS).....	19
3.7	Avaliação dos Parâmetros Cinéticos Envolvidos na Absorção de NH ₄ ⁺	19
3.7.1	Determinação dos parâmetros cinéticos (V _{máx} e K _M) de absorção	20
3.8	Análise do Efeito da Superexpressão do <i>OsAMT1.3</i> no Metabolismo, Expressão dos Transportadores de Amônio e Atividade da GS	20
3.8.1	Extração de RNA total.....	21
3.8.2	Tratamento com DNase I, síntese do cDNA e PCR em tempo real	22
3.8.3	Desenho dos iniciadores (“primers”) para os estudos de expressão gênica	22
3.8.4	Análise de metabólitos solúveis	22
3.8.5	Extração de proteína	23
3.8.6	Atividade da glutamina sintetase.....	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	Transformação de Plantas para Superexpressão do Gene <i>OsAMT1.3</i>	24
4.2	Testes de Segregação	26
4.3	Localização Tecido-Específica da Atuação do Transportador de Amônio <i>OsAMT1.3</i> em Arroz	28
4.4	Atividade do Promotor do Gene do <i>OsAMT1.3</i> em Arroz.....	32
4.5	Efeito da Superexpressão do Gene <i>OsAMT1.3</i> Sobre os Parâmetros Cinéticos da Absorção de NH ₄ ⁺	34
4.6	Efeito da Superexpressão do Gene <i>OsAMT1.3</i> na Expressão dos Transportadores de Amônio, Metabolismo de N e Atividade da GS.	38

5	CONCLUSÕES	44
6	PERSPECTIVAS	45
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
8	ANEXOS.....	53

1 INTRODUÇÃO

O arroz é considerado um dos mais importantes cereais cultivados do mundo e a alimentação básica de mais da metade da população mundial, sendo considerada a terceira maior cultura cerealífera do mundo, ultrapassada apenas pelo milho e pelo trigo (IBGE, 2012).

As altas produtividades alcançadas hoje na cultura de arroz se tornaram possíveis, em parte, graças ao uso intensivo de fertilizantes, sobretudo o nitrogenado. Dentre os elementos essenciais requeridos pelas plantas, o nitrogênio é geralmente o que mais limita a produtividade e os teores de proteína no grão. O nitrogênio está envolvido na construção dos blocos fundamentais da vida, como: nucleotídeos, aminoácidos, enzimas, hormônios entre outros (DECHORGNAT et al., 2011).

O nitrogênio molecular (N_2) presente na atmosfera encontra-se indisponível às plantas, para isso ele precisa ser convertido na forma mineral representado pelo amônio e nitrato (CORDEIRO, 2008). As principais formas de entrada de N no solo podem ocorrer através de descargas elétricas, atividades vulcânicas, deposição de matéria orgânica, fixação biológica de N e, em maior proporção, a utilização de fertilizantes nitrogenados.

Para que seja rompida a ligação tripla entre os dois átomos de nitrogênio na fixação industrial, são necessárias altas temperaturas ($>400^\circ C$) e pressões elevadas ($>10^7$ Pascal), que são obtidas por meio de grande consumo de energia, como a de derivados de petróleo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002), sendo, portanto um processo altamente dispendioso. Dessa forma, a utilização desses fertilizantes elevam os custos de produção e seu excesso ainda está associado a significativos danos ambientais como a contaminação de cursos d'água com nitrato e produção de óxido nitroso (N_2O), gás com capacidade de aquecimento global muitas vezes superior ao CO_2 (GOOD et al., 2004).

A produção de fertilizantes nitrogenados pelo processo de Haber-Bosch é considerada uma das maiores invenções do século XX, por ter permitido o aumento da produção de alimentos para quase metade da população mundial (SMIL, 1999). Entretanto, como até 2025 acredita-se que a população mundial deve chegar a 10 bilhões, será necessária uma mudança para as próximas décadas com o intuito de acomodar as necessidades da população em expansão com o desenvolvimento de uma agricultura altamente produtiva e com responsabilidade socioambiental (DYSON, 1999).

A maior parte do nitrogênio total disponível no solo (maior que 98%) está na forma orgânica, e não prontamente disponível para as plantas. Apenas uma pequena fração desse N é encontrado em formas inorgânicas como amônio, nitrato e nitrito (DECHORGNAT et al., 2011). A eficiência de uso do nitrogênio no campo é em média de 33% e uma proporção substancial, em torno de 67%, é perdida por diversos processos de perda de N no solo, como desnitrificação, volatilização de NH_3 e lixiviação.

Na natureza, amônio e nitrato são raramente disponíveis em iguais proporções e suas concentrações no solo podem variar de micromolar a milimolar. Desse modo, as plantas têm desenvolvido ao longo de milhares de anos mecanismos para conseguir absorver eficientemente o amônio e o nitrato disponíveis em uma larga faixa de concentrações por meio de uma grande gama de transportadores (MARSCHNER, 1995).

O sequenciamento genômico permitiu a identificação de três transportadores de alta afinidade para a absorção de amônio (AMT1) em arroz (*Oryza sativa*), cinco em *Arabidopsis* e seis em *Populus trichocarpa*. Genes *AMT1* são preferencialmente expressos em raízes e muitos deles exibem uma expressão estritamente específica nesse órgão. Em muitos casos, níveis de transcritos de *AMT1* aumentaram durante a privação de N, consistente com uma

melhor função requerida em condições de déficit de nitrogênio (PEARSON & STEWART, 1993; GAZZARINI et al., 1999; RAWAT et al., 1999; VON WIREN et al., 2000a; COUTURIER et al., 2007).

No clima tropical, caracterizado por uma estação que corresponde a um período de seca, seguida de outra com grande intensidade de chuvas, tem-se um fluxo sazonal de nitrogênio. Assim, foi observado por diversos trabalhos do grupo de pesquisas em Nutrição Mineral de Plantas da UFRRJ, que algumas variedades locais de arroz do estado do Maranhão apresentam estratégias para aproveitamento máximo dessa disponibilidade diferencial de N (FERRAZ et al., 1997; SOUZA et al., 1998; SOUZA et al., 1999; BAPTISTA et al., 2000; RODRIGUES et al., 2004; SANTOS et al., 2010). Dentre essas estratégias, foram observados os parâmetros cinéticos mais favoráveis, como maiores valores de velocidade de absorção de N-NO_3^- e N-NH_4^+ ($V_{\text{máx}}$), bem como, menores valores de K_M e $C_{\text{mín}}$.

Associado aos menores valores de K_M , estes estudos revelaram elevada expressão de um dos membros dos transportadores de N-NH_4^+ de alta afinidade, o *OsAMT1.3* (SOUZA, 2010). Este comportamento foi observado quando as plantas foram submetidas a um baixo suprimento de N em solução.

Desta maneira, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a contribuição do transportador *OsAMT1.3* para o aumento da eficiência de absorção de amônio em baixas concentrações e caracterizar o seu papel nos mecanismos de adaptação de plantas a ambientes de baixa disponibilidade de nitrogênio. Construções gênicas para identificação dos tecidos onde atua o *OsAMT1.3*, bem como, para elevar o nível dos transcritos desse gene, foram obtidas e usadas para transformar plantas de arroz (Nipponbare).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da Cultura do Arroz

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO 2012), a produção mundial de arroz esperada para safra 2012/2013 é de aproximadamente 464 milhões de toneladas. O Brasil se destaca como um dos maiores produtores do Ocidente com uma produção prevista de 11,5 milhões de toneladas para 2012. Este valor ainda está relacionado a uma redução na produção devido às condições ambientais adversas e de atraso na sementeira (IBGE, 2012).

A produção de arroz está relacionada às espécies *Oryza sativa* e *Oryza glaberrima*. A primeira se refere ao arroz asiático, cultivado amplamente no mundo, mas distribuído principalmente na Ásia. A segunda refere-se ao arroz africano que tem sido substituído pela espécie *sativa* e apenas pequenos produtores no continente Africano ainda produzem essa espécie. Dentro da espécie *sativa*, encontram-se duas subespécies, *indica* e *japonica*, estima-se que estas tenham divergido há aproximadamente 10.000 anos atrás (MA & BENNETZEN, 2004; PANAUD, 2009).

O Brasil é o nono maior produtor mundial e a principal espécie de arroz cultivada é a *Oryza sativa*. O Rio Grande do Sul se destaca como o maior produtor de arroz irrigado. Já a área plantada com arroz de sequeiro, em terras altas, fica concentrada na região Centro-Oeste (Mato Grosso e Goiás); Nordeste (Piauí e Maranhão) e Norte (Pará e Rondônia) (MAPA, 2012).

Entre 1975 e 2005, o Brasil reduziu a área de plantio em torno de 26% e, mesmo assim, aumentou sua produção de arroz em 69%, graças ao aumento em 128% na produtividade média, devido ao aumento na utilização de fertilizantes NPK e de cultivares melhoradas. O crescimento da produção permitiu ao país tornar-se autossuficiente em arroz na safra 2003/2004. Em 2005, o Brasil chegou a exportar 272 mil toneladas de arroz. Hoje apenas 5% da produção nacional é destinada à exportação (MAPA, 2012).

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o alimento básico de diversos países da América Latina e constitui a fonte responsável pelo suprimento de 27% da energia e 20% da proteína alimentar nos países em desenvolvimento (FAO, 2008).

No Brasil, o arroz é consumido por uma ampla parcela da população, principalmente a menos favorecida, que utiliza este cereal como alimentação básica e diária. A participação do arroz em grande proporção na dieta do brasileiro e o reduzido consumo de proteína "per capita" no país justifica a procura por variedades de arroz com alto teor de proteína nos grãos.

Dentre os elementos requeridos para o desenvolvimento das plantas cultivadas, o nitrogênio (N) é o exigido em maior quantidade e frequentemente limita a produtividade (GLASS et al., 2003).

A duplicação da produção mundial agrícola durante as últimas quatro décadas tem sido associada com um aumento de sete vezes no uso de fertilizantes nitrogenados. Como consequência, a utilização atual e a futura intensificação no uso de fertilizantes nitrogenados na agricultura têm e continuarão tendo um grande impacto na diversidade e função de micro-organismos, animais e plantas (GOOD et al., 2004).

A maior parte desta produção é obtida com a utilização cada vez maior de insumos agrícolas como fertilizantes nitrogenados. A produção mundial desses fertilizantes está prevista para aumentar 1,4% até 2012, o que representa um aumento global de 7,3 milhões de toneladas. Aproximadamente 69% desse crescimento irá ocorrer na Ásia (principal continente produtor de arroz), seguido da América Latina e Leste Europeu (FAO, 2012). Foi estimado

que 10^{11} kg de N são aplicados como fertilizantes ao redor do mundo por ano, um valor vinte vezes maior que há 50 anos, com um custo de 50 bilhões de dólares (GLASS et al., 2003). Além disso, dados experimentais apontam que por volta de 50 a 70% do nitrogênio aplicado no solo é perdido do sistema solo-planta (PEOPLES et al., 1995).

O nitrogênio aplicado no solo na forma de amônio pode ser perdido de diversas formas, como: convertido a nitrato em condições aeróbias e, posteriormente desnitrificado em condições anaeróbias, volatilizado na forma de amônia em pH alcalino e volatilizado quando na presença da enzima urease. Os dois últimos processos são os maiores responsáveis pelas altas perdas de amônio no solo (XU et al., 2012).

2.2 Absorção e Assimilação de Amônio

O nitrogênio é um dos nutrientes mais limitantes ao crescimento das plantas, o que fez com que ao longo da evolução os vegetais desenvolvessem mecanismos para a máxima eficiência no uso do mesmo como, por exemplo: a formação de sistemas de absorção, assimilação e mobilização que evitam o desperdício de N e energia (FERNANDES, 1978).

O nitrogênio representa aproximadamente 2% da massa seca da planta, sendo componente de proteínas, ácidos nucleicos, coenzimas e numerosos produtos secundários. Nos tecidos o nitrogênio é quantitativamente mais abundante do que outros elementos minerais, sendo absorvido, principalmente, na forma de NO_3^- ou NH_4^+ (MILLER & CRAMER, 2004).

A absorção de NO_3^- e NH_4^+ é mediada por proteínas transportadoras existentes na membrana plasmática. A absorção de nitrato é realizada por um mecanismo de simporte com 2H^+ contra um gradiente de potencial eletroquímico, enquanto a absorção de amônio é feita por um uniporte a favor do gradiente de potencial eletroquímico. Após absorvido o nitrogênio pode ser estocado no vacúolo, quando absorvido na forma de nitrato, ou ser assimilado por meio da ação das enzimas Glutamina Sintetase (GS) e Glutamato Sintase (GOGAT) (MARSCHNER, 1995).

A utilização de amônio pelas plantas tem maior eficiência energética que a de nitrato, pois o amônio é prontamente assimilável pelas enzimas GS/GOGAT, diferentemente do que ocorre com o nitrato, que necessita passar por uma etapa de redução até NH_4^+ com uso de poder redutor na forma de NAD(P)H e ferredoxina pelas enzimas Nitrato Redutase (NR) e Nitrito Redutase (NiR) respectivamente. Entretanto, quando absorvido, o amônio precisa ser rapidamente assimilado a esqueletos de carbono na produção de aminoácidos devido a sua toxicidade (BERNARD & HABASH, 2009), fato que pode ser prejudicial à sua absorção em ambientes de baixa luminosidade e alta temperatura.

O processo de assimilação se inicia pela enzima GS, que apresenta alta afinidade pelo substrato, atuando em baixas concentrações do íon amônio em solução. Em plantas, a GS pertence à família GSII, com duas isoformas principais: a GS1 citossólica e GS2 plastidial (HIREL & GODAL, 1980; ISHIYAMA et al., 2004), que possuem funções específicas na assimilação e reciclagem de amônio (LEA & IRELAND, 1999).

Apenas quatro diferentes genes codificam subunidades da proteína ativa da Glutamina Sintetase e diferentes combinações dessas subunidades produzem diferentes isoenzimas (IRELAND & LEA, 1999).

Em arroz, foram identificados três genes que codificam para a glutamina sintetase citossólica (GS1): *OsGS1.1*, *OsGS1.2* e *OsGS1.3*. A *OsGS1.1* apresentou expressão em todos os órgãos testados, já *OsGS1.2* e *OsGS1.3* foram expressos principalmente em raízes e espiguetas, respectivamente (TABUCHI et al., 2005).

Em tecidos verdes com alta taxa fotossintética, a isoforma GS2 encontra-se em maior proporção, além de ser responsável pela maior porcentagem da atividade total da GS,

principalmente no limbo foliar. Estes resultados foram encontrados em milho (BECKER et al., 2000), arroz (ZHAO et al., 2006) e trigo (HABASH et al., 2001), sendo esta enzima responsável, principalmente pela reassimilação de NH_4^+ oriundo da fotorrespiração. Por outro lado, a GS1 apresenta-se em maior proporção em tecidos com menor quantidade de clorofila, como, por exemplo, em bainhas, tecidos jovens não fotossintetizantes e no citossol de células vasculares participando da assimilação de amônio resultante da redução do nitrato, atividade proteolítica e do amônio absorvido do solo (HABASH et al., 2001).

A Glutamina Sintetase incorpora o NH_4^+ ao glutamato formando glutamina, usando energia fornecida pelo ATP. Da glutamina formada, o grupamento amino ($-\text{NH}_2$) é transferido para o α -cetoglutarato, proveniente do ciclo de Krebs, pela ação da segunda enzima, Glutamato sintase, com energia fornecida pela ferredoxina reduzida (Fd) na parte aérea ou NADH na raiz, formando duas moléculas de glutamato (SOUZA & FERNANDES, 2006). Uma dessas moléculas permanece para a manutenção do ciclo, enquanto a outra poderá ser exportada para dar origem a outros aminoácidos por meio da ação de aminotransferases (TISCHNER, 2000).

A eficiência no uso de nitrogênio (EUN) pode ser definida como o rendimento de grãos por unidade de N disponível no solo, sendo dividida em dois processos: eficiência na absorção, que é a capacidade da planta em remover o N do solo normalmente presente nas formas de NO_3^- e NH_4^+ ; e eficiência na utilização, que é a capacidade da planta em transferir o N para o grão, onde predominam as proteínas. Entretanto, as plantas cultivadas são capazes de converter apenas de 30 a 40% do N aplicado ao solo na produção de grãos (LEA & AZEVEDO, 2006).

A melhoria na eficiência de absorção e assimilação de nitrogênio tem sido o alvo de programas de melhoramento e o sucesso depende largamente da descoberta de variações alélicas dos genes envolvidos no metabolismo de N em arroz e no entendimento de seu significado adaptativo.

GAUR et al. (2012b) estudando a expressão dos genes transportadores de amônio e da glutamina sintetase na parte aérea de plantas contrastantes quanto a eficiência de uso de nitrogênio, observou uma regulação diferencial nas cultivares de acordo com a dose de N aplicado. A cultivar adaptada ao baixo suprimento de N quando cultivada em altas doses de N (maior que $120 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) apresentou repressão na expressão e atividade da GS1 e do *OsAMT1.1* que se correlacionou diretamente com a diminuição do conteúdo de proteína nos grãos.

2.3 Transportadores de Amônio (AMT)

A absorção de amônio pelas plantas na faixa de absorção micromolar é realizada pela família de transporte de alta afinidade (AMT1) que faz parte de um grande grupo de Permeases de transporte de amônio/ Permeases de Metilamônio/ Família Rhesus (AMT/MEP/Rh) (VON WIREN & MERRICK 2004).

As proteínas transportadoras de NH_4^+ são codificadas por uma família multigênica e apresenta ampla variação de padrões de cinética de absorção, fato que demonstra a plasticidade das plantas para a aquisição de formas reduzidas de N abundantes durante um grande período da evolução das plantas superiores (LEA & AZEVEDO, 2006). Contudo, da mesma forma que acontece para a absorção de nitrato, a absorção de NH_4^+ é feita por um sistema bifásico. Quando os níveis de NH_4^+ no meio externo (solução nutritiva ou solução do solo) estão abaixo de 1 mM, opera um sistema de absorção de alta afinidade (HATS), e acima desta concentração opera o sistema de absorção de baixa afinidade (LATS) (WANG et al., 1993).

Uma família de cinco genes transportadores de amônio (*AMT1.1* a *AMT1.5*) foi originalmente identificada em *Arabidopsis thaliana*, por similaridade com transportadores de amônio de cianobactéria, enquanto que em tomate somente três genes *AMT1* foram identificados. Em ambas as espécies, uma segunda sequência referente ao *AMT2* mais parecida aos transportadores isolados de *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* foi identificada (LOQUÉ & VON WIRÉN, 2004). Em arroz, 10 diferentes genes foram identificados e podem ser divididos em quatro grupos (SUENAGA et al., 2003).

A proteína do AtAMT1.1 está localizada na membrana plasmática das células do córtex radicular, periciclo, epiderme e pêlos radiculares (MAYER e LUDEWIG, 2006). Estudos com a técnica de inserção de T-DNA para o AMT1.1 produziu linhagens de *A. thaliana* com apenas 30% de decréscimo na habilidade de absorver amônio pelo HATS, indicando que há uma sobreposição de funções das diferentes proteínas AMT (KAISER et al., 2002).

A expressão dos genes que codificam transportadores de amônio em arroz (*OsAMTs*) apresenta distintos perfis. *OsAMT1.1* é um gene constitutivo, expresso tanto na raiz quanto na parte aérea, já os genes *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* tem sua expressão específica em raízes, sendo que o primeiro responde positivamente ao ressuprimento de amônio enquanto o segundo tem sua expressão reprimida ao ressuprimento de amônio e nitrato (SONODA et al., 2003a; TABUCHI et al., 2007).

SONODA et al. (2003b) sugerem que a regulação dos transportadores de NH_4^+ são controlados pelos teores de glutamina no interior das raízes e não pelos teores de amônio em solução. Isso demonstra um controle interno da absorção de amônio indicando uma adaptação das variedades de arroz a diferentes níveis de nitrogênio na solução do solo. A expressão do transportador *OsAMT1.2* foi principalmente detectada no cilindro central das raízes, sugerindo um papel importante desta proteína, como principal transportador de amônio no interior da planta. Sendo assim, o *OsAMT1.2* está envolvido em 2 funções distintas, agir como transportador auxiliar do *OsAMT1.1* na absorção de amônio quando presente na solução do solo, e na absorção e recuperação de amônio no sistema vascular.

Os transportadores *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* são compostos de 499, 497 e 498 aminoácidos com massa molecular de 52,6; 52,2 e 53,1 kDa, respectivamente e, análises de sequências hidrofóbicas de cadeias de aminoácidos indicam que os três transportadores *OsAMT1* provavelmente possuem 11 domínios transmembrana (SONODA et al., 2003a).

Estudando o comportamento dos transportadores através do promotor *GUS*, YAO et al. (2008), verificaram que os transportadores *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* são expressos exclusivamente em raízes durante vários estádios de desenvolvimento da planta, sob suprimento e deficiência de nitrogênio, respectivamente. A expressão desses genes em raízes sugere que ambos estão envolvidos na absorção de nitrogênio. Os resultados encontrados indicam que os transportadores realmente apresentam papéis distintos na absorção de nitrogênio, o *OsAMT1.3* parece atuar como um sensor da presença de amônio, sendo reprimido na sua presença, e o *OsAMT1.2* aumenta a sua expressão na presença de amônio. A proposta de que o transportador *OsAMT1.3* atue como sinalizador da presença de nitrogênio ficou evidenciada devido a repressão ocorrer não só na presença de amônio, mas também na presença de nitrato.

A expressão dos transportadores de amônio *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* foi reprimida em plantas ressupridas com 2,0 mM de N-NH_4^+ em solução, já em condição de deficiência de amônio houve uma alta indução do *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* (SPERANDIO et al., 2011). 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 (principalmente na forma de glutamina) que reprimem a expressão dos transportadores responsáveis pela absorção de NH_4^+ (SONODA et al., 2003b).

Estudo realizado recentemente com dois genótipos de arroz que respondem diferencialmente ao suprimento de nitrogênio, demonstraram uma resposta antagônica em relação à atuação do *OsAMT1.3*. Plantas adaptadas à condição de baixo suprimento de N quando expostas a concentrações crescentes de amônio em solução tiveram a atuação do *OsAMT1.3* reprimida, enquanto que plantas responsivas a altas doses de N aumentaram a expressão do *OsAMT1.3* nessas mesmas condições (GAUR, 2012a).

HOQUE et al. (2006) obtiveram duas linhagens transgênicas de arroz com a superexpressão do cDNA do AMT1.1 sobre o controle do promotor da ubiquitina de milho. Estes autores verificaram que as plantas transgênicas exibiram aumento nas taxas de absorção de amônio comparado com as plantas selvagens, e que a biomassa da parte aérea e sistema radicular foram menores durante a germinação e nos estágios iniciais de crescimento das plantas crescidas com alto suprimento de amônio (2,0 mM). Dessa forma, a superexpressão de genes *AMT1* aumenta a capacidade de absorção de amônio pelas plantas, no entanto esse íon causa um efeito tóxico resultado da incapacidade da planta em assimilar o alto influxo de amônio.

A seleção de variedades que promovam um melhor mecanismo na absorção do nitrogênio em solos com baixas concentrações desse nutriente é essencial para a sustentabilidade da agricultura mundial (GLASS et al., 2002), para isso é necessário um profundo entendimento das respostas moleculares e fisiológicas, de plantas submetidas a baixas concentrações de nitrogênio. Alguns pesquisadores sugerem que o transportador *OsAMT1.3* pode funcionar como gene sinalizador da presença de N no solo, bem como, transportador potencialmente envolvido na absorção de $N-NH_4^+$ sob níveis muito reduzidos no solo (SONODA et al., 2003a).

Apesar dessas sugestões, ainda não foram realizados estudos para identificar a real contribuição desse gene para absorção de amônio ou seu envolvimento para adaptação das plantas ao baixo suprimento de N, objetivo do presente trabalho.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para viabilizar a caracterização funcional do transportador de amônio *OsAMT1.3*, foram feitas duas construções gênicas: a primeira foi desenvolvida com o objetivo de elevar os níveis dos transcritos do *OsAMT1.3*, colocando-o sobre o controle do promotor da ubiquitina 1 de milho (UBIL:*OsAMT1.3*:3xHA) para avaliar a contribuição dessa superexpressão para o sistema de alta afinidade de absorção de amônio. Na segunda construção gênica, o promotor do *OsAMT1.3* foi fusionado às proteínas repórteres GFP e GUS (*P_{OsAMT1.3}*:GFP:GUS) com o objetivo de localizar e quantificar o nível de atividade desse promotor em diferentes regimes de nutrição amoniacal.

3.1 Amplificação do Gene de Interesse

O gene *OsAMT1.3* foi amplificado diretamente do genoma nuclear pelo fato de não apresentar íntrons (Figura 1). Para isso foram desenhados iniciadores (“*primers*”) específicos para amplificação do gene inteiro com os sítios de recombinação necessários para clonagem nos vetores “*Gateway*” (Tabela 1).

```
cattgctcctccctctcctctacagtctgtgttgagcgcgcgtcgaggcggcgaggatggcaacgtgcgcggat  
accctcggcccgcctgctgggcacggcggcggcgaacgcgacggactacctgtgcaaccagttcgcggacaccacg  
tcggccgtggactcgacgtacctgctctctcggcgtacctcgtgttcgcatgcagctcggcttcgcatgctc  
tgcgccgggtccgtccgcgccaagaacaccatgaacatcatgcttaccaacgtgctcgacgccgccggcgcg  
ctcttctactacctcttcggcttcgccttcgccttcggggcgccgtccaacggcttcatcggaagcacttcttc  
ggcctcaagcaggtcccacaggtcggcttcgactacagcttcttctcttccagtgggccttcgcatcgccgcc  
gcgggcatcacgtccggctccatcgccgagcggaccagttcgtggcgtacctcatctactcgccttctcacc  
ggcttcgtctaccgggtggtgtcccactggatctggtccgccgacgggtgggctcggcttcccggacgtcgggg  
tcgctgctcttcgggtccggcgtcatcgacttcgccgggtcaggggttgtccacatggtggggcggcgtggccgga  
ctctggggcgccctcatcgaggcccccgcatggggcgggttcgaccacgccggcgcctcggtgccgctgcgcggc  
cacagcgcctcgtcgtcgtcggcagcttctcgtgtggttcgggtggtacgggtttaacccggctcgttc  
ctcaccatcctcaaatacctacggcccccggtagcatccacgggcagtggtcggcgggtgggacgcaccgccgtg  
accaccacctcgcggcagcagcggcggcgtcacgacgctcttcgggaagaggctccagacggggcactggaac  
gtgatcgacgtctgcaacggcctcctcggcggcttcgcgccgatcaccgccggttgcctcgtcgtcgaccggtg  
gccgcgatcatctcgggggtcgtctcggcgtgggtgctcatcgccctcaacgcgctggcggcgaggctcaagttc  
gacgaccgcctcgaggcggcgcagctgcacggcgggtgcccgcgctgggggggtcatcttcacggcgtgttcg  
cgcaaggagtacgtggaccagatcttcggccagcccggggcggcctacgggctgttcatggggcggcggcggc  
ctgctcggggcgcacatagtggtcatcctggtcatcggcggcgtgggtgagcttcaccatggcggcgcgtgttc  
gtgctcaacaagctgggcttgcctgcgcatctcggccgaggacgagatggccggcatggaccagacgcgccacggc  
gggttcgcgtacgcgtaccacgacgacgacgcgagcggcaagccggaccgcagcgtcggcgggttcatgctcaag  
tcggcgcacggcagcaggtcgcgcggcagatgggaggccatgtctagtgaaccggaggagctgagctagtagt  
acatacatgcagcataatcgatcgaacgaaatgcatataagcgtttttcaaggttgatctgatgctgcaagttc  
gtgattgtataataagaagaaaa
```

Figura 1. Sequência do gene *OsAMT1.3*. Acesso gblAF289479.1:1441-2928. (<http://www.NCBI.org/blast>).

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 (0,3 mM) cada, MgSO₄ (1,0 mM), “*primers*” (0,3 μM), *Pfx* DNA polimerase 1U e 200 ng 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 reação de PCR

prosseguiu com a seguinte programação: desnaturação a 94°C por 2 min. e 45seg e 35 ciclos de 15 seg. de desnaturação a 94°C, 30 seg. de anelamento a 57°C e 2 min. de extensão a 68°C.

As construções gênicas foram realizadas utilizando a tecnologia “MultiSite Gateway” de clonagem desenvolvida pela Invitrogen. Depois da amplificação do gene foram feitas mais duas reações de PCR com “primers” híbridos para a construção dos sítios de recombinação *attB1* e *attB2* (Tabela 1). 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 1). A primeira reação foi realizada com uma desnaturação inicial de 2 min. e 45 seg. e 25 ciclos de 15 seg. de desnaturação a 94°C, 30 seg. de anelamento a 58°C e 2 min. 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 1. Sequências dos “Primers” para amplificação do gene do transportador de amônio *OsAMT1.3* com os sítios de recombinação *attB1* e *attB2* em duas reações.

Gene	Reação	“Primers”	Sequência
<i>OsAMT1.3</i>	1ª	<i>OsAMT1.3attB1</i>	5'-AAAAAGCAGGCTGGATGGCAACGTGCGCGGA-3'
		<i>OsAMT1.3attB2</i>	5'-AGAAAGCTGGGCTAGACATGGCCTCCCATCTC-3'
Adaptador	2ª	Adapt. <i>attB1</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGG-3'
		Adapt. <i>attB2</i>	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG-3'

Nota: Sublinhado representa o códon de iniciação

3.2 Tecnologia “Gateway®” e Clonagem dos Genes Amplificados

A tecnologia Gateway desenvolvida pela Invitrogen é baseada na reação de recombinação sítio-específica mediada pelo fago lambda (λ) em *E. coli*, onde fragmentos de DNA flanqueado por sítios de recombinação (*att*), podem ser transferidos em vetores que contêm sítios de recombinação compatíveis (*attB* × *attP* ou *attL* × *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 2).

Tabela 2. Reações de recombinação entre os sítios *att* do fago λ em *E. coli*.

Rota	Reação	Catalisada por...
Lisogênica	$attB \times attP \rightarrow attL \times attR$	(Int e IHF) BP Clonase™ II
Lítica	$attL \times attR \rightarrow attB \times attP$	(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 2).

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 3). Exemplo da reação BP é mostrada na Figura 2.

Tabela 3. 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> .

Depois da obtenção de todos os vetores de entrada nas reações BP, é necessário o uso de um vetor de destino, ou seja, aquele que vai permitir a recombinação coordenada dos três vetores de entrada na reação de recombinação múltipla, também chamada de reação LR, pois envolve a recombinação dos sítios *attL* e *attR* entre os vetores doadores e o vetor de destino (Figura 3). O vetor de destino utilizado foi o pH7m34GW, que leva como agente de seleção, o gene da higromicina fosfotransferase, conferindo às plantas transformadas, resistência a higromicina.

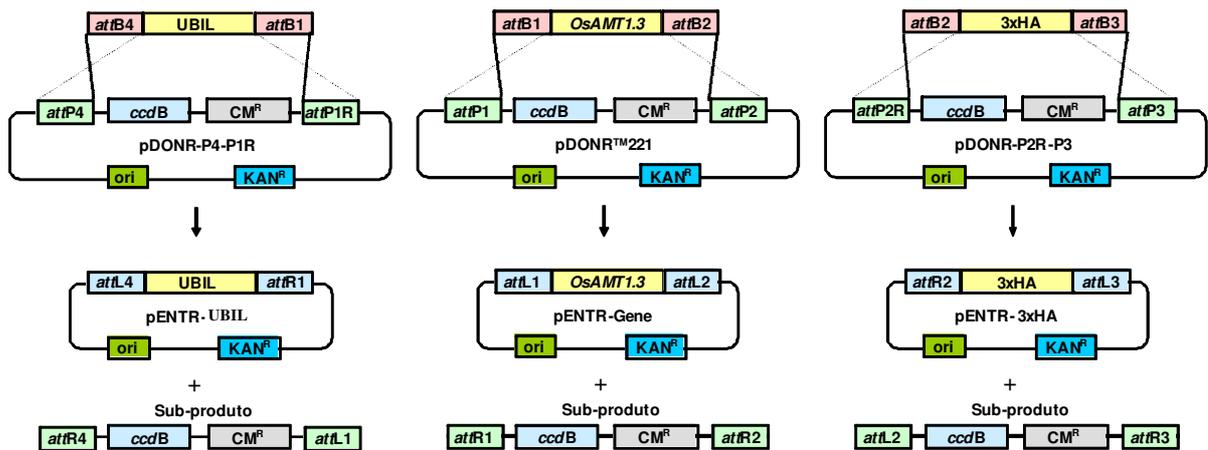


Figura 2. Esquema ilustrativo da reação de recombinação BP para criação dos vetores de entrada, necessários para construção do vetor para expressão do *OsAMT1.3*. Ori – origem de replicação; KAN^R – gene de resistência a kanamicina; CM^R – gene de resistência ao cloranfenicol; attB, attP, attL e attR – sítios de recombinação; ccdB – gene que codifica para uma proteína que interfere na atividade da DNA girase de *E. coli*, impedindo o seu crescimento; UBIL – Promotor que dirige a expressão constitutiva em arroz; 3xHA – peptídeo de fusão (adaptado de SANTOS, 2009).

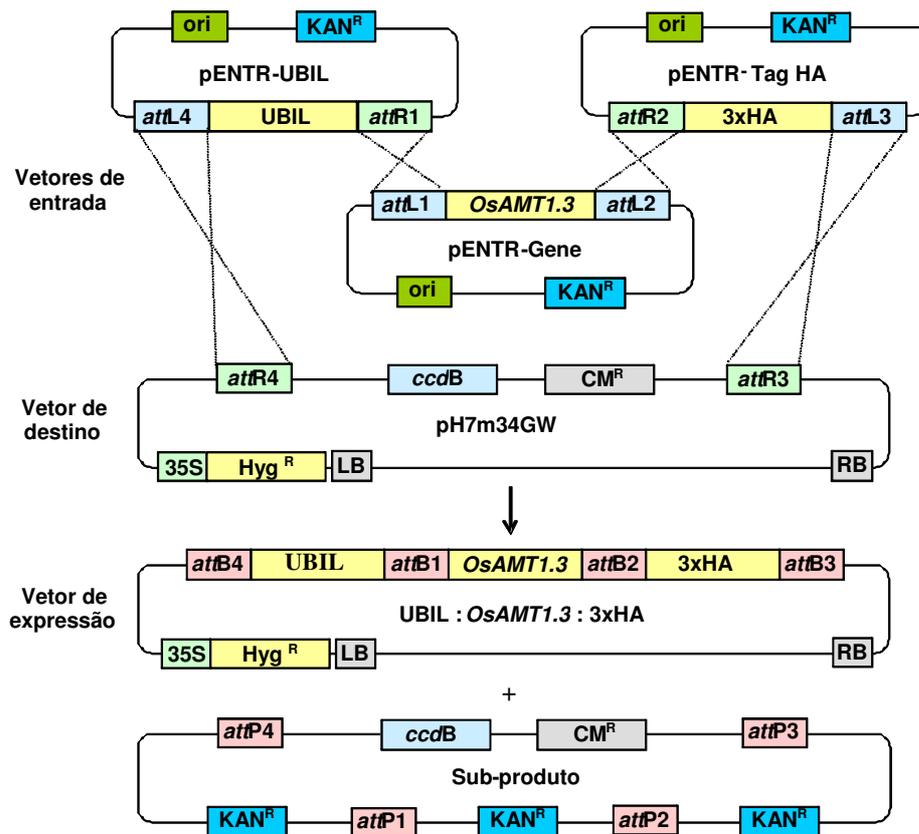


Figura 3. Esquema ilustrativo da reação LR tripla para obtenção do vetor para superexpressão do *OsAMT1.3*. Neste trabalho foi utilizado o promotor UBIL e um Tag-3XHA fusionado ao gene. Ori – origem de replicação; Hyg^R – gene de resistência a higromicina; attB, attP, attL e attR – sítios de recombinação; LB – borda esquerda; RB – borda direita;

UBIL – Promotor que dirige a expressão constitutiva em arroz; 3xHA – peptídeo de fusão (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*.

Deve ser destacado que 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 100 pb e não remove eficientemente os dímeros de “*primers*”. Dessa forma foi utilizado o PEG 8000/MgCl₂ para purificação, que pode remover fragmentos de até 300 pb.

A purificação foi feita com cerca de 90 µL de reação da PCR, para aumentar a quantidade de produto de PCR recuperado. Aos 90 µL do produto amplificado contendo os sítios *attB* foram adicionados 270 µL de Tris-HCl-EDTA (TE) pH 8,0 e 180 µL de PEG (8000) contendo MgCl₂ (30 mM). 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 µL 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 pDONR211 para criação do vetor de entrada pENTR-*OsAMT1.3* (Figura 4).

O pENTR-*OsAMT1.3* 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 (peptídeo de fusão com o gene). As reações BP foram realizadas utilizando o kit “*Gateway® BP Clonase II Enzyme Mix*” (Invitrogen). Em um microtubo de 1,5 mL, foram adicionados: 5 µL do produto amplificado e purificado (gene), contendo os sítios *attB*, 1 µL do vetor pDONR211, 2 µL do tampão de reação BP e 2 µL 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 µL de Proteinase K a 37°C durante 10 min.

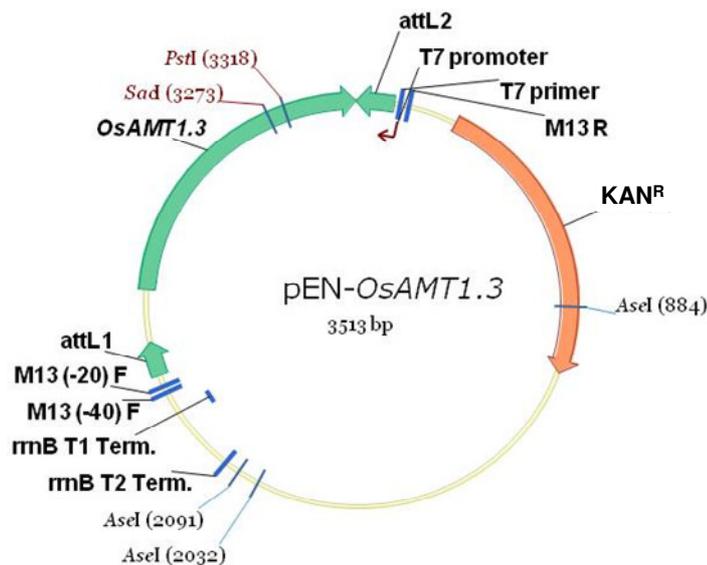


Figura 4. Vetor pENTR-*OsAMT1.3* usado na reação de recombinação LR tripla para formação do clone de expressão. KAN^R – resistência ao antibiótico canamicina; attL1 e attL2 – sítios de recombinação. PstI, Sad, AseI – sítios de cortes por enzimas de restrição.

Antes de proceder à transformação foi realizada uma diálise por três horas em papel de filtro de 0,025 µm colocado sobre água ultrapura autoclavada dentro de uma placa de Petri estéril. O volume de reação foi reduzido para 5 µL em centrífuga a vácuo e utilizado para transformação de células competentes de *E. coli* (DH5α). Misturou-se a reação BP (5 µL), com 40 µL 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 µL de meio SOC. As bactérias, agora transformadas foram cultivadas por 1h a 37°C em agitador orbital a 150 rpm. Para seleção das bactérias transformadas, 100 µL do caldo bacteriano foi riscado em meio LB contendo 50 µg. mL⁻¹ de canamicina.

3.2.3 Preparo de células competentes para eletroporação (DH5α)

O estoque de *E. coli* DH5α foi riscado em meio LB sólido e incubado durante a noite a 37°C. Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB sólido e mantida sob agitação constante a 150 rpm durante a noite. No dia seguinte, 3 mL da cultura fresca foram inoculados em 300 mL de meio LB líquido acondicionado em erlenmeyer de 2 L e transferido para agitador orbital constante a 200 rpm a 37°C até a cultura atingir uma DO₆₀₀ entre 0,5 a 0,8. De 3 e 4 horas de cultivo foram suficientes para alcançar uma DO₆₀₀ entre esses valores. Depois de atingida a DO₆₀₀, alíquotas de 50 mL 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 4.000 x g. por 15 min. a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram cuidadosamente solubilizadas em 50 mL de água destilada estéril gelada, para retirada do excesso de sais. As células foram novamente precipitadas como descrito acima e solubilizadas em 25 mL de água destilada estéril gelada. As células foram então acondicionadas em três tubos falcon de 50 mL e novamente precipitadas como já descrito. O precipitado de cada tubo foi solubilizado em 2 mL de glicerol (10%) gelado e as células transferidas para um único tubo. Finalmente, as células foram precipitadas e solubilizadas em 550 µL de glicerol (10%) gelado. A suspensão de células foi dividida em alíquotas de 50 µL, acondicionadas em microtubos de 1,5 mL e mantidas em freezer -80°C para uso posterior.

3.2.6 Preparo de *Agrobacterium tumefaciens* competente

O estoque de *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) foi riscado em meio YEB sólido (item 3.2.5) contendo Rifamicina (Rf) 100 µg. mL⁻¹ e Gentamicina (Gm) 40 µg. mL⁻¹, e incubado a 28°C por 24 horas. Com o auxílio de uma alça flambada apenas uma colônia isolada foi transferida para um tubo falcon de 50 mL contendo 3 mL de meio YEB (Rf/Gm) que foi incubado a 28°C em agitador orbital a 150 rpm por 48 horas. Apenas 2 mL da cultura fresca foram inoculados em 50 mL de meio YEB contendo Rf e Gm em erlenmeyer de 250 mL. A incubação foi realizada a 28°C sob agitação constante de 150 rpm, até atingir uma DO₆₀₀ de aproximadamente 0,6. A cultura foi então dividida em dois tubos falcon de 50 mL e incubada no gelo por 20 minutos. A seguir, as células foram precipitadas a 1.000 x g. por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado solubilizado em 500 µL de uma solução contendo CaCl₂ (20 mM) e glicerol (10%). As células foram divididas em alíquotas de 100 µL acondicionadas em microtubos estéreis de 1,5 mL e mantidas em freezer a -80°C para uso posterior.

3.3 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Depois de confirmadas por restrição as construções gênicas foram inseridas em *Agrobacterium tumefaciens* estirpe LBA4404 como descrito a seguir.

Foi adicionado 1 µg de plasmídio a 100 µL de *Agrobacterium* competente (item 3.2.6), 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 1 mL de meio YEB, e as células foram mantidas a 28°C, em agitador orbital a 150 rpm durante duas horas. A transformação (1 mL) foi plaqueada em meio YEB sólido com os antibióticos correspondentes a construção (Sp/Sm) mais Rifamicina (Rf) a 100 µg. mL⁻¹ e Gentamicina (Gm) a 40 µg. mL⁻¹. As placas foram incubadas a 28°C até o aparecimento de colônias (dois a três dias). A transformação foi confirmada por reação de PCR.

3.4 Transformação de Arroz Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação de plantas de arroz foi realizada com base no protocolo de TOKI et al. (2006) com modificações. Foram descascadas e desinfestadas 300 sementes de arroz da variedade Nipponbare. As sementes foram lavadas em 40 mL de etanol (70%), por um minuto. Em seguida, foram realizadas duas lavagens de 15 min. cada, com hipoclorito de sódio (2,5%), onde a primeira recebeu Tween 20 (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 durante um 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 item 1) contendo 2,4D (2 mg. L⁻¹) onde foram mantidas a 32°C por duas semanas para obtenção dos calos.

Após este período, foi realizada uma repicagem dos calos para novas placas contendo meio de cultivo N6D por três dias com o objetivo de aumentar a quantidade e a atividade dos calos embriogênicos.

Após o período de indução, os calos devem ser transferidos para o meio de co-cultivo N6-As (ANEXO, item 2), onde calo e a *Agrobacterium* são cultivados juntos. Três dias antes dos calos serem transferidos para esse novo meio, a *Agrobacterium* transformada contendo a

construção de interesse, foi colocada para crescer em meio AB (ANEXO, item 3). Uma solução foi preparada a partir do cultivo recente de *Agrobacterium tumefaciens*, que foi diluído em meio para solubilização AMM (ANEXO, item 4) até se obter uma densidade ótica de (DO₆₀₀) 0,1. Os calos foram então submersos na solução contendo *Agrobacterium* e homogeneizados por inversão durante 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 quatro 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 timentim (150 mg. L⁻¹) para eliminação da *Agrobacterium*. Após essa etapa os calos foram transferidos para o meio de seleção N6DH (ANEXO, item 5), onde permaneceram por duas semanas a 32°C com luz contínua. Além dos nutrientes, ao meio de seleção foram adicionados o antibiótico timentim (150 mg. L⁻¹), para a completa eliminação da *Agrobacterium* e Higromicina (50 mg. L⁻¹) para eliminar os calos não transformados.

Os calos que permaneceram por duas semanas em meio de seleção contendo agente seletivo e apresentaram desenvolvimento vigoroso foram transferidos para meio de regeneração RE-III (ANEXO, item 6) por 14 dias, onde foi possível obter plântulas transformadas com poucas raízes. As plântulas com cerca de 3 cm. foram transferidas para meio de indução de raízes HF (ANEXO, item 7) onde permaneceram por mais duas semanas antes de serem transferidas para potes contendo terra do horizonte A de um Chernossolo. As plantas transformadas foram cultivadas em casa de vegetação até o final do ciclo para obtenção de sementes.

Cada plântula regenerada no cultivo *in vitro* representou uma linhagem independente (L#1, L#2, L#3 e assim por diante), essas primeiras linhagens obtidas são denominadas geração (T1). A geração T1 foi então cultivada 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 (seleção pela resistência a higromicina). As sementes foram secas em estufa a 37°C por sete dias e depois conservadas em geladeira a aproximadamente 10°C.

Para estimar o número de cópias da construção inserida no genoma das plantas transformadas, foi realizada uma análise da segregação. Sementes da geração T2 das linhagens transformadas foram colocadas para germinar em placas de Petri com algodão embebido em água destilada. Após a germinação essas plântulas foram transferidas para novas placas contendo o antibiótico higromicina (50 mg. L⁻¹) por 14 dias. Depois desse período foi realizada a contagem das plantas vivas e mortas e construída uma tabela de segregação. As linhagens cujas plantas apresentaram uma segregação próxima a 3:1 possivelmente apresentam uma só cópia do gene de interesse.

Devido ao curto tempo disponível para o cultivo de mais um ciclo, foram utilizadas para os 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 (100 mg. mL⁻¹), com eliminação das plantas que apresentaram sintomas de necrose na região da aplicação. As duas linhagens selecionadas baseadas no teste de segregação e no nível de expressão do *OsAMT1.3* foram a L#2 e L#8.

Essas linhagens foram então utilizadas em dois experimentos, tendo o primeiro o objetivo de determinar os parâmetros cinéticos de absorção ($V_{\text{máx}}$ e K_M) de absorção e o segundo analisar o efeito da superexpressão na expressão dos transportadores de amônio (*OsAMT1.1-1.3*) e metabolismo de N.

3.5 Estudo da Região Promotora do Gene *OsAMT1.3*

Com o objetivo de avaliar como e quais fatores regulam a expressão do *OsAMT1.3*, 1500 pb *upstream* do sítio de iniciação da tradução (inclusive a região 5'-UTR) foi amplificado do genoma nuclear em duas reações de PCR subsequentes com primers híbridos para adição dos sítios de recombinação attB1 e attB2 (Tabela 4). O fragmento do promotor com os sítios de recombinação attB1 e attB2 foi clonado no vetor pDONR221 (Invitrogen) e depois, por meio de uma reação LR o promotor foi clonado no vetor de destino pHFS7GW para fusão com a GFP e GUS, dando origem a construção $P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS$. Esse vetor foi posteriormente inserido em *Agrobacterium tumefaciens* e utilizado para transformação de plantas de arroz variedade Nipponbare. As plantas $P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS$ foram utilizadas para os experimentos de localização tecido-específica da atuação do *OsAMT1.3* e quantificação da atividade do promotor em diferentes regimes de N.

Tabela 4. Sequências dos “Primers” para amplificação do gene do promotor do transportador de amônio *OsAMT1.3* com os sítios de recombinação attB1 e attB2 em duas reações.

Gene	Reação	“Primers”	Sequência
<i>OsAMT1.3</i>	1ª	<i>p_{OsAMT1.3}attB1</i>	5'-AAAAAGCAGGCTGGTTCAATTCGTAGCCCTGT-3'
		<i>p_{OsAMT1.3}attB2</i>	5'-AGAAAGCTGGGTCGCTCAACACAGACTGTAGAG-3'
Adaptador	2ª	Adapt. <i>attB1</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCC-3'
		Adapt. <i>attB2</i>	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC-3'

3.6 Ensaios para Localização e Quantificação do Nível de Atividade do Promotor do *OsAMT1.3*

3.6.1 Ensaio colorimétrico para localização tecido-específica do promotor do *OsAMT1.3* em raízes de arroz

Com o objetivo de identificar em que tecido o transportador de amônio estaria atuando, sementes da Linhagem 4 (L#4) transformadas com a construção $P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS$ foram inicialmente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (2%) durante 10 minutos e depois lavadas repetidas vezes em água destilada. Essas sementes foram então acondicionadas sobre gaze em potes de 700 mL e colocadas para germinar em água destilada em câmara de crescimento.

Cinco dias após a germinação, as plântulas tiveram suas sementes destacadas e foram transferidas para solução nutritiva de HOAGLAND & ARNON (1950) modificada a ¼ de FI, sem N, por 10 dias. Após este período as plantas foram coletadas e seu sistema radicular foi mergulhado na solução de coloração de GUS composta por 0,5 mg. mL⁻¹ de X-gluc (ácido glucurônico); tampão fosfato (50 mM) pH 7,2; ferrocianeto de potássio (1 mM), ferricianeto de potássio (1 mM), Triton X-100 (0,05%) e água ultrapura.

Após infiltrar a solução a vácuo no tecido com o auxílio de uma seringa, as raízes foram incubadas no escuro a 37°C por 3 horas. O material foi então retirado da estufa e lavado com água destilada. A raiz foi cortada em fragmentos de 30 mm. compreendendo regiões não completamente diferenciadas, bem como regiões já maduras e mergulhadas em

solução fixadora de glutaraldeído onde permaneceram até a realização do emblocamento para obtenção dos cortes histológicos.

3.6.2 Quantificação do nível de atividade do promotor do *OsAMT1.3* em condição de deficiência de N ao longo do tempo

Sementes de arroz da linhagem 4 (L#4) transformadas com a construção $P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS$ foram inicialmente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (2%) durante 10 minutos e depois lavadas repetidas vezes em água destilada. Essas sementes foram então acondicionadas sobre gaze em potes de 1,7 L e colocadas para germinar em água destilada na câmara de crescimento. Cinco dias após a germinação as plantas foram transferidas para potes de 700 mL em sistema hidropônico com solução de HOAGLAND & ARNON (1950) modificada a ¼ força iônica com os tratamentos de 2,0 mM de N (1,5 mM $N-NO_3^-$ e 0,5 mM $N-NH_4^+$); 2,0 mM de $N-NO_3^-$ e 2,0 mM de $N-NH_4^+$. Aos 10 dias após a germinação (DAG) as plantas que estavam em solução com 2,0 mM de $N-NO_3^-$ e 2,0 mM de $N-NH_4^+$ passaram para uma solução nutritiva sem N (Deficiência) e o grupo de plantas que estava em solução contendo 1,5 mM $N-NO_3^-/0,5$ mM $N-NH_4^+$ permaneceram como controle. Coletas foram realizadas 1, 3, 7 e 14 dias após a transferência das plantas para o tratamento constante e sem N (Figura 6).

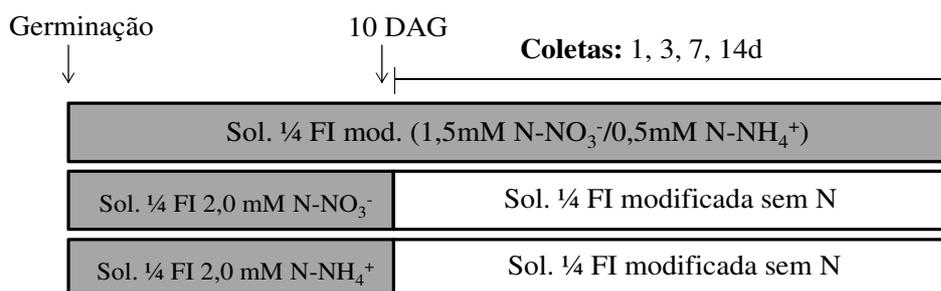


Figura 6. Ilustração do sistema de condução do experimento na câmara de crescimento utilizando plantas de arroz da linhagem 4 (L#4) transformadas com a construção $P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS$ (L#4). As coletas foram realizadas 1, 3, 7 e 14 dias após a aplicação dos tratamentos.

As plantas foram separadas em parte-aérea e raiz e congeladas em N líquido para extração de proteína e quantificação do nível de atividade da β -glucuronidase (GUS).

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento no Departamento de Solos da UFRRJ. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições. As plantas foram submetidas a um fotoperíodo de 12h/12h (luz/escuro) com aproximadamente $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fótons fotossinteticamente ativo, umidade relativa do ar de 70% e temperatura de 28°C/26°C (dia/noite).

3.6.3 Quantificação do nível de atividade do promotor do *OsAMT1.3* em condição de suprimento de N ao longo do tempo

Sementes de arroz da linhagem 4 (L#4) transformadas com a construção $P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS$ foram inicialmente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (2%) durante 10 minutos e depois lavadas repetidas vezes em água destilada. Essas sementes foram

então acondicionadas sobre gaze em potes de 1,7 L e colocadas para germinar em água destilada na câmara de crescimento. Cinco dias após a germinação as plantas foram transferidas para potes de 700 mL em sistema hidropônico com solução de HOAGLAND & ARNON (1950) modificada a ¼ força iônica sem N. Aos 10 Dias Após a Germinação (DAG), as plantas foram separadas em três grupos, o primeiro grupo foi mantido sem N até o final do experimento como controle, o segundo recebeu solução de Hoagland a ¼ FI com 2,0 mM de N-NH₄⁺ e o terceiro recebeu solução de Hoagland a ¼ FI com 2,0 mM de N-NO₃⁻. As coletas foram realizadas 1, 3, 7 e 14 dias após a transferência das plantas para os tratamentos (Figura 7).

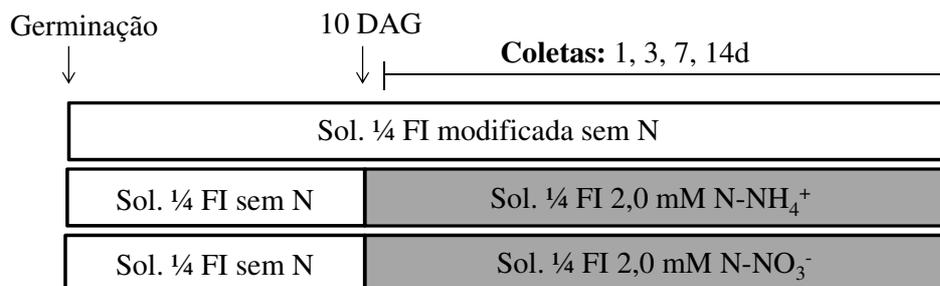


Figura 7. Ilustração do sistema de condução do experimento na câmara de crescimento utilizando plantas de arroz da linhagem 4 (L#4) transformadas com a construção *P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS* (L#4). As Coletas foram realizadas 1, 3, 7 e 14 dias após a aplicação dos tratamentos.

As plantas foram separadas em parte-aérea e raiz e congeladas em N líquido para extração de proteína e quantificação do nível de atividade β-glucuronidase (GUS).

O experimento foi conduzido câmara de crescimento no Departamento de Solos da UFRRJ nas mesmas condições que o anterior.

3.6.4 Atividade da enzima β-glucuronidase (GUS)

O extrato proteico obtido de acordo com o item 3.8.5 foi solubilizado em tampão fosfato (20 mM) pH 7,4 e β – mercaptoetanol (10 mM). A seguir foi adicionado o substrato da enzima, o p-Nitrophenil-β-D-glucuronidido (PNPG) para disparar a reação. A quantificação do produto da reação foi determinado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405nm. O cálculo da atividade foi obtido pela diferença da leitura final pela inicial por miligrama de proteína por hora.

3.7 Avaliação dos Parâmetros Cinéticos Envolvidos na Absorção de NH₄⁺

As sementes de arroz das linhagens transformadas superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* (L#2 e L#8) e tipo selvagem (WT) foram inicialmente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (2%) durante 10 minutos e depois lavadas repetidas vezes em água destilada. Essas sementes foram então acondicionadas sobre gaze em potes de 1,7 L e colocadas para germinar em água destilada na câmara de crescimento. Cinco dias após a germinação as plantas foram transferidas para potes de 700 mL e conduzidas em sistema hidropônico com solução de HOAGLAND & ARNON (1950) modificada a ½ FI com 0,5 mM de N-NO₃⁻. Trocas de solução nutritiva foram realizadas a cada três dias.

Aos 27 dias após a germinação (DAG), as plantas foram submetidas a uma solução sem N por 72 horas e então divididas em dois grupos: onde o primeiro recebeu uma solução com 0,2 mM de N-NH₄⁺ e o segundo 2,0 mM de N-NH₄⁺ contemplando os dois sistemas de

absorção de amônio (HATS e LATS, respectivamente) (Figura 8).

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento no Departamento de Solos da UFRRJ. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições. As plantas foram submetidas a um fotoperíodo de 12h/12h (luz/escuro) com aproximadamente $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fótons fotossinteticamente ativo, umidade relativa do ar de 70% e temperatura de 28°C/26°C (dia/noite).

Para a obtenção dos parâmetros cinéticos, os níveis de N-NH_4^+ na solução foram monitorados em intervalos de 30 minutos para o tratamento de baixa concentração e em intervalos de 1 hora para o tratamento de alta concentração de N-NH_4^+ durante dois dias. As amostras de solução nutritiva foram armazenadas em microtubos de 1,5 mL e o conteúdo de amônio determinado pelo método proposto por FELKER (1977). Ao final do experimento o volume final da solução bem como a massa do sistema radicular foram determinados para o cálculo dos parâmetros cinéticos. Os valores de $V_{\text{máx}}$ e K_M foram estimados utilizando um processo gráfico-matemático proposto por RUIZ & FERNANDES FILHO (1992) com o software cineticawin1.0 desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa e disponível no site (<ftp://solos.ufv.br/cinetica>).

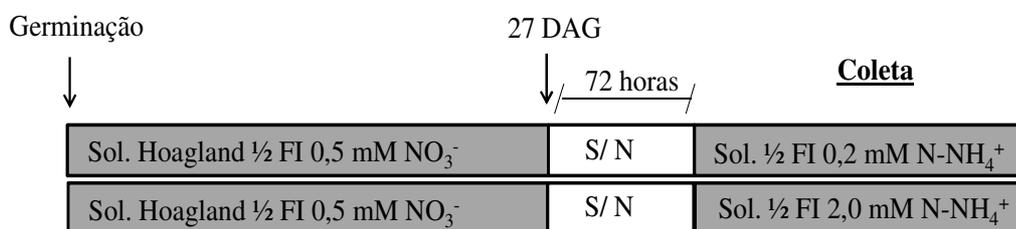


Figura 8. Ilustração do sistema de condução do experimento na câmara de crescimento utilizando plantas de arroz das linhagens 2 e 8 (L#2 e L#8) transformadas com a construção UBIL: *OsAMT1.3*: 3xHA com diferentes níveis de expressão do transportador *OsAMT 1.3* e plantas tipo selvagem (WT) para obtenção dos dados utilizados nos cálculos dos parâmetros cinéticos. As coletas iniciaram a partir de 30DAG depois de um período de privação de N por 72h.

3.7.1 Determinação dos parâmetros cinéticos ($V_{\text{máx}}$ e K_M) de absorção

A determinação dos parâmetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ e K_M foram efetuados pelo programa cinética (RUIZ & FERNANDES FILHO, 1992). Foi verificada a função de melhor ajuste para todos os tratamentos. Os teores de N-NH_4^+ foram determinados de acordo com 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, no programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

3.8 Análise do Efeito da Superexpressão do *OsAMT1.3* no Metabolismo, Expressão dos Transportadores de Amônio e Atividade da GS

Além dos efeitos sobre a absorção de amônio, a superexpressão do *OsAMT1.3* pode possivelmente afetar mecanismos de sinalização provocados pelo NH_4^+ e portanto foram alvos de avaliações.

As sementes de arroz das linhagens transformadas (L#2 e L#8) e tipo selvagem (WT) foram inicialmente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (2%) durante 10 minutos e depois lavadas repetidas vezes em água destilada. Essas sementes foram então acondicionadas sobre gaze em potes de 1,7 L e colocadas para germinar em água destilada na

câmara de crescimento. Cinco dias após a germinação as plantas foram transferidas para potes de 700 mL e conduzidas em sistema hidropônico com solução de HOAGLAND & ARNON (1950) modificada a ½ FI com 1,0 mM de N-NO₃⁻. As trocas de solução nutritiva foram realizadas a cada três dias. Aos 27 dias após a germinação (DAG), 1/3 das plantas permaneceu com o tratamento constante de 1,0 mM N-NO₃⁻ enquanto os outros 2/3 das plantas foram transferidos para uma solução nutritiva sem N por 72 horas. Após esse período as plantas foram separadas em tratamento constante com 1,0 mM de N-NH₄⁺ e ressurgimento com 0,2 e 2,0 mM de N-NH₄⁺ (Figura 9). Os tratamentos foram aplicados 3 horas após o início do período luminoso e as coletas realizadas 2 e 6 horas após a aplicação dos tratamentos. Amostras de raízes foram armazenadas em nitrogênio líquido para estudo da expressão gênica de transportadores de amônio e atividade de GS.

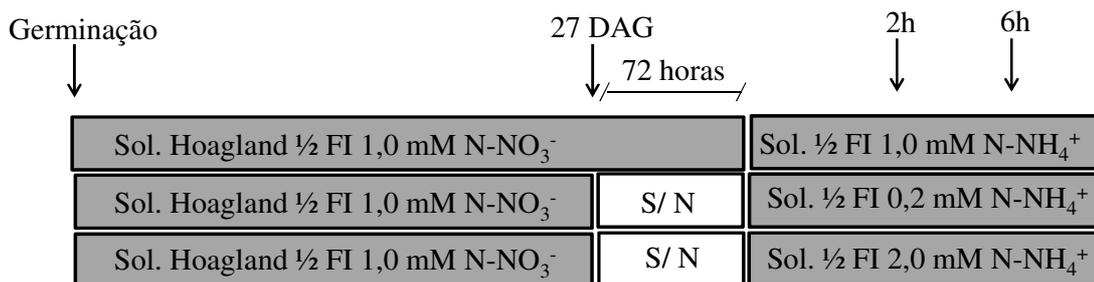


Figura 9. Ilustração do sistema de condução do experimento na câmara de crescimento utilizando plantas de arroz das linhagens 2 e 8 (L#2 e L#8) transformadas com a construção UBIL: *OsAMT1.3*: 3xHA com diferentes níveis de expressão do transportador *OsAMT 1.3* e plantas tipo selvagem (WT). As coletas foram realizadas 2 e 6h após a adição dos tratamentos em plantas de 30DAG para análise de expressão gênica e metabolismo de N.

3.8.1 Extração de RNA total

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

O RNA total foi quantificado com uso de fluoróforo específico para RNA no fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen). 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 do RNA.

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

Amostras de 0,5 µg de RNA total foram tratadas com DNase (“*DNase I Amplification Grade – Invitrogen™*”) seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente foi preparada uma solução estoque de 30 µL com concentração de 0,125 µg. µL⁻¹, para aumentar a alíquota a ser pipetada. Quatro microlitros de solução representado 0,5 µg de RNA foram misturados com 0,5 µL do tampão de reação da DNase I (10X), 0,5 µL da DNase I. A incubação da reação foi conduzida a 25°C por 15 min., seguida da adição de 0,5 µL de EDTA (25 mM) e posterior inativação da DNase I a 70°C por 10 minutos. A reação de síntese do cDNA foi realizada com o kit “*High Capacity RNA-to-cDNA*” (*Life Technologies*) seguindo as instruções do fabricante.

O gene do fator de alongamento 1-α de arroz (*eEF1-α*) foi utilizado como controle endógeno para normalização da expressão gênica (JAIN, 2009). As reações foram feitas no aparelho “*StepOne Plus 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 µL do tampão “*Power SYBR Green PCR Master Mix*” (2X), 3 µL de uma solução de “*primers*” (3,6 µM) cada e 3 µL do cDNA diluído, com volume final de 12 µL. 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.

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

Foram utilizados “*primers*” desenhados por DUAN et al. (2007) para os transportadores de amônio *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* (Tabela 5). A especificidade dos “*primers*” foi analisada por alinhamento das sequências 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.

Tabela 5. Sequências dos “*primers*” para os genes dos transportadores de amônio (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*) e o fator de alongamento 1-α (*eEF1-α*) como gene controle endógeno usados nas reações de PCR em tempo real.

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
<i>OsAMT1.1</i>	5'-GGTCATCTTCGGGTGGGTCA-3'	5'-CGTGCCGTGTCAGGTCCAT-3'
<i>OsAMT1.2</i>	5'-GAAGCACATGCCGCAGACA-3'	5'-GACGCCCGACTTGAACAGC-3'
<i>OsAMT1.3</i>	5'-GCGAACGCGACGGACTA-3'	5'-GACCTGTGGGACCTGCTTG-3'
<i>eEF1-α</i>	5'-TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT-3'	5'-GACTTCCTTCACGATTTCATCGTAA-3'

3.8.4 Análise de metabólitos solúveis

Amostras de folhas, raízes e bainhas do experimento 3.8 foram homogeneizadas em etanol (80%), e após partição com clorofórmio (FERNANDES, 1984) a fração solúvel em água foi utilizada para determinação dos teores de açúcares solúveis de acordo com YEMM &

WILLIS (1954), e das frações nitrogenadas, $N\text{-NO}_3^-$ (MIRANDA et al., 2001), $N\text{-NH}_4^+$ (FELKER, 1977) e N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955).

3.8.5 Extração de proteína

As amostras obtidas no experimento do item 3.8 foram maceradas em N-líquido e homogeneizadas em tampão de extração na proporção 3:1 (tampão: amostra). O tampão de extração foi composto por Tris-HCl (50 mM) pH 8,0; EDTA (1,0 mM), polivinilpolipirrolidona (PVPP) (1,5%), dithiothreitol (DTT) (10 mM), glicerol (30%) e phenilmethylsulfonil fluoridídeo (PMSF) (1 mM). O homogenato foi centrifugado a 14.000 x g. durante 30 min. e o sobrenadante (extrato proteico) armazenado no freezer - 80°C para posterior uso. O conteúdo de proteína foi determinado como descrito por BRADFORD (1976), usando albumina de soro bovino como padrão.

3.8.6 Atividade da glutamina sintetase

A atividade da Glutamina Sintetase (GS) foi realizada como descrito por FARDEN e ROBERTSEN (1980). A atividade foi determinada em 500 μL de uma solução contendo Imidazol-HCl (50 mM) pH 7,5; hidroxilamina neutralizada com Tris (5 mM), MgCl_2 (20 mM), L-glutamato (25 mM), β -mercaptoetanol (5 mM) e ATP (5 mM). O controle da reação foi realizado sem a adição de ATP no meio de reação. A reação foi iniciada pela adição de 50 μg de proteína já incluída nos 500 μL da reação e conduzida a 30°C durante 30 min. A reação foi paralizada pela adição de 350 μL de uma solução composta por ácido tricloroacético (4%) p/v e cloreto férrico anidro (3,2%) p/v preparada em 0,5 N de HCl. O produto da reação foi colorimetricamente determinado em $\lambda=540$ nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Transformação de Plantas para Superexpressão do Gene *OsAMT1.3*.

A transformação gênica mediada por *Agrobacterium tumefaciens* apresenta inúmeras vantagens em relação aos outros meios de transformação utilizados, dentre as principais pode-se citar 1) a integração do gene no genoma do hospedeiro de maneira mais precisa e intacta; 2) possibilidade de inserção de T-DNA relativamente grandes; 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).

Para aumentar o rendimento de calos, o tempo de indução foi aumentado para 14 dias. Houve pouca formação de calos embriogênicos nos primeiros cinco dias. Após esse período de indução, uma repicagem para o meio N6D, contendo o dobro da dose recomendada de ferro, por três dias foi realizada, a fim de aumentar a atividade de divisão dos calos (Figura 10b), condição considerada muito importante para uma eficiente transformação mediada pela *Agrobacterium*.

Trabalhos realizados por HIEI et al. (1994, 1997), verificaram que calos com 2 a 3 semanas em meio de indução estão competentes para transformação mediada por *Agrobacterium*. Com este período de indução longo também foi possível obter plantas transgênicas morfológicamente normais e férteis após o processo de transformação *in vitro*.

Os calos embriogênicos utilizados para dar prosseguimento ao processo de transformação foram aqueles que apresentaram a característica de se soltarem com facilidade quando tocados (friáveis) e de coloração amarelo-claro. Estes calos foram os selecionados para repicagem em novo meio de indução por mais três dias (Figura 10c, d).

A *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe LBA4404, contendo as construções gênicas de interesse foram crescidas por três dias a 28°C em meio AAM com os antibióticos de seleção para as construções.

Após um período de quatro dias em co-cultivo (N6D-As) foram realizadas lavagens dos calos com solução de timentim (150 mg L⁻¹) para eliminar a *Agrobacterium*, não mais necessária a partir desse ponto. Os calos transferidos para o meio de seleção e que apresentaram resistência ao antibiótico higromicina aumentaram em tamanho e quantidade após duas semanas nessa condição.

Cada planta regenerada a partir de um calo isolado foi considerada uma linhagem. Foram obtidas cerca de 10 linhagens, das quais sete foram selecionadas por apresentar fenótipo parecido com a tipo selvagem e transferidas para a casa de vegetação para a produção de sementes da segunda geração (T2) (Figura 11).

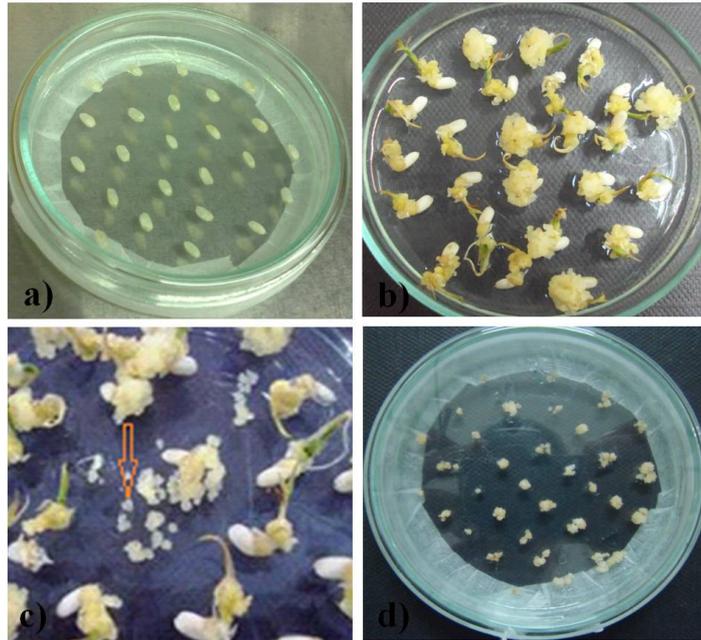


Figura 10. a) Sementes de arroz da variedade Nipponbare em meio nutritivo (N6D) contendo auxina (2,4D a 2mg L^{-1}) como regulador para indução de calos embriogênicos; b e c) Calos em estágio de desenvolvimento após 14 dias em meio nutritivo, sendo os mais friáveis (indicado pela seta) utilizados para dar prosseguimento ao protocolo de transformação; d) Calos transferidos para meio nutritivo (N6D) por mais três dias para aumentar o rendimento.

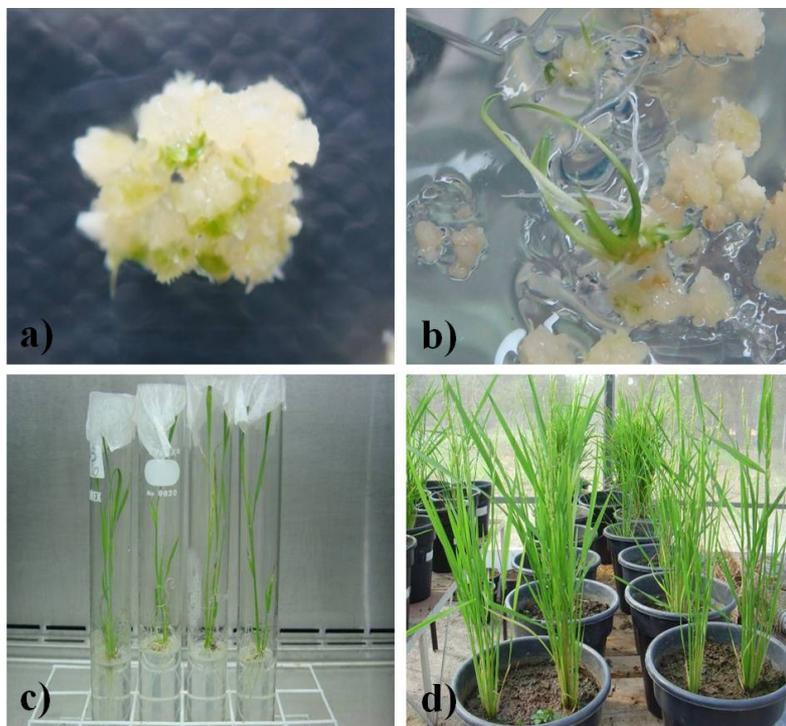


Figura 11. a) Detalhe de calo de arroz com pontuações verdes após 1 semana no meio de regeneração (RE III); b) Plântula após 2 semanas com cerca de 3cm no meio de regeneração; c) Linhagens transferidas para o meio de formação de raízes após duas semanas; d) Linhagens na casa de vegetação do Departamento de Solos produzindo sementes.

O processo de transformação genética de arroz utilizado tem duração média de 2 meses. Períodos prolongados de cultivo *in vitro* podem trazer consequências para as plantas regeneradas como variações somaclonais e problemas na fertilização (HIEI & KOMARI, 2008).

A primeira geração de plantas regeneradas apresentou alto perfilhamento e emissão de panículas, mas baixa quantidade de sementes cheias. Este fato pode ser atribuído ao cultivo do arroz em condição de fotoperíodo curto, condição que estimula a macho esterilidade (LU et al., 2005). Diante desse fato, foi necessário cultivar as sementes da primeira geração por mais um ciclo a fim de obter as sementes da segunda geração para realização dos testes de segregação e montagem dos experimentos.

4.2 Testes de Segregação

As sementes de arroz das diferentes linhagens com as construções $P_{UBIL}:OsAMT1.3:3xHA$ e $P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS$ foram utilizadas para a realização de testes de segregação a fim de identificar possíveis homozigotas entre as plantas obtidas.

A relação entre plantas vivas e mortas (segregação) desejada deve ficar em torno de 3:1, o que indica a inserção de apenas uma cópia do gene no genoma vegetal. Isso significa que de cada 4 plantas colocadas para germinar na higromicina, apenas uma não deve apresentar resistência a higromicina, seguindo a segregação mendeliana esperada para a segunda geração. As plantas consideradas mortas apresentaram, principalmente, necrose na região de emissão da parte aérea (Figura 12).

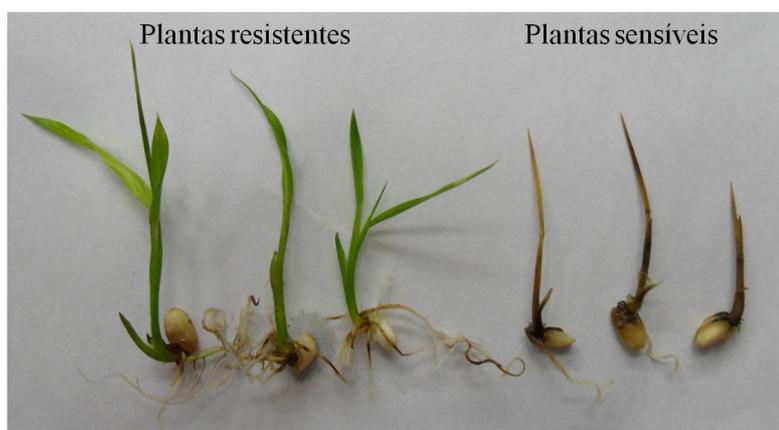


Figura 12. Plântulas de arroz após 14 dias no teste de segregação em placa de Petri contendo higromicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Dentre as 7 linhagens obtidas transformadas com a construção $P_{UBIL}:OsAMT1.3:3xHA$ foram selecionadas a L#2 (homozigota) e a L#8 (heterozigota) que possivelmente recebeu mais de uma cópia do gene de interesse, devido as altas taxas de segregação encontradas em sua progênie (Tabela 6).

Na L#3 foram encontradas em sua progênie (L#3.1, L#3.2 e L#3.5) plantas que não sobreviveram quando em contato com a higromicina (Tabela 6). Pelo fato dessas plantas serem sementes da segunda geração, espera-se uma relação de 3 plantas vivas para 1 planta morta. As plantas que não sobreviveram não levam mais o gene de interesse que confere resistência a higromicina, portanto foram utilizadas como tipo selvagem (WT).

Tabela 6. Segregação das linhagens superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* na 2ª geração (P_{UBIL}:*OsAMT1.3*:3xHA).

Linhagens T1	Linhagens T2	Vivas	Mortas	Segregação	X ²
L#1	L#1.1	73	16	4,56	2,34
	L#1.2	52	29	1,79	5,04
L#2	L#2.1	53	38	1,39	13,63
	L#2.2	35	13	2,69	0,11
	L#2.3	48	20	2,40	0,71
	L#2.4	52	23	2,26	1,28
	L#2.5	37	0	0,00	12,33
L#3	L#3.1	0	90	0,00	270,00
	L#3.2	0	110	0,00	330,00
	L#3.3	24	9	2,67	0,09
	L#3.4	53	15	3,53	0,31
	L#3.5	0	20	0,00	60,00
	L#3.6	52	30	1,73	5,87
	L#3.7	50	23	2,17	1,65
	L#3.8	55	12	4,58	1,80
	L#3.9	51	10	5,10	2,41
	L#3.10	67	22	3,05	0,00
L#6	L#6.1	27	13	2,08	1,20
	L#6.2	72	17	4,24	1,65
	L#6.4	61	11	5,55	3,63
	L#6.5	42	18	2,33	0,80
L#8	L#8.1	30	4	7,50	3,18
	L#8.2	79	6	13,17	14,59
	L#8.3	65	11	5,91	4,49
	L#8.4	57	17	3,35	0,16
L#9	L#9.1	39	3	13,00	7,14
L#10	L#10.1	28	12	2,33	0,53
	L#10.2	61	21	2,90	0,02

Nota: Valor de X² tabelado a 5% de significância igual a 3,841.

A primeira geração de plantas transformadas com a construção P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS foi multiplicada na Casa de vegetação e a segunda geração foi utilizada para realização dos testes de segregação e experimentos de localização e quantificação do nível de expressão do promotor do *OsAMT1.3*. As duas linhagens obtidas após o processo de transformação (L#3 e L#4) apresentaram uma alta taxa de segregação na segunda geração o que pode indicar que estas plantas receberam mais de cópia do gene (Tabela 7).

Tabela 7. Segregação das linhagens na 2^a geração transformadas com a construção $P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS$.

Linhagens T1	Linhagens T2	Vivas	Mortas	Segregação	X ²
L#3	L#3.1	12	4	3,00	0,00
	L#3.2	28	0	0,00	9,33
	L#3.3	23	0	0,00	7,67
	L#3.4	71	10	7,10	6,92
	L#3.5	47	0	0,00	15,67
	L#3.6	19	0	0,00	6,33
L#4	L#4.1	25	6	4,17	0,53
	L#4.2	6	0	0,00	2,00
	L#4.3	33	4	8,25	3,97
	L#4.4	50	8	6,25	3,89
	L#4.5	20	0	0,00	6,67
	L#4.6	18	5	3,60	0,13
	L#4.7	11	0	0,00	3,67

Nota: Valor de X² tabelado a 5% de significância igual a 3,841.

4.3 Localização Tecido-Específica da Atuação do Transportador de Amônio OsAMT1.3 em Arroz

Com o objetivo de identificar os locais de atuação do transportador OsAMT1.3 e seu possível envolvimento na sinalização para emissão de raízes laterais quando em deficiência de N, sementes de arroz da linhagem L#4 para a construção $P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS$ foram cultivadas durante 14 dias em solução nutritiva sem N (Item 3.6). Após a coleta essas plantas foram infiltradas em solução de coloração contendo o substrato da β -glucuronidase (X-gluc) e mantidas a 37°C no escuro até o aparecimento da coloração.

Nota-se que as raízes coram de azul devido a atividade do promotor do *OsAMT1.3*, principalmente na metade inferior das raízes (Figura 13). Isso ocorreu principalmente nas regiões de crescimento se estendendo até o início da zona de maturação. Para uma melhor percepção dos locais de atuação desse transportador, as raízes intactas foram utilizadas para visualização em microscópio ótico no campo claro e no campo escuro excitando a proteína GFP (Figura 14).



Figura 13. Raízes de arroz após processo de infiltração em solução de coloração contendo ácido glucurônico (X-gluc) substrato da β -glucuronidase. O período de incubação foi de cerca de três horas até o aparecimento da coloração.

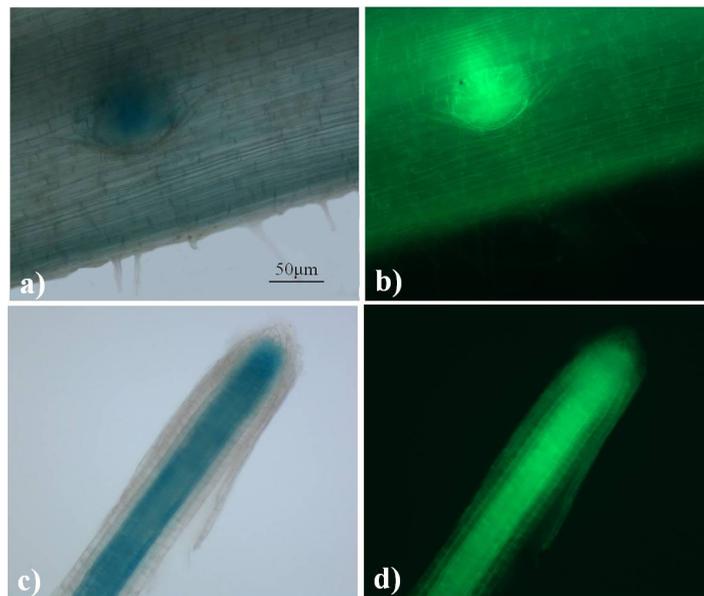


Figura 14. Detalhe da região de emissão de uma raiz lateral nas plantas de arroz transformadas $P_{OsAMT1.3}:GFP::GUS$. a e c) Imagem capturada em microscópio ótico com lente de aumento de 20 vezes no campo claro corada de azul devido a atividade da β -glucuronidase; b e d) Imagem capturada no campo escuro excitando a proteína GFP.

A atividade do promotor foi mais forte nos pontos de emissão de raízes laterais e próximo à epiderme. Também foi verificado que o sinal permanecia forte nas pontas das raízes laterais já formadas (Figura 14). Foi necessário a realização de cortes histológicos transversais e longitudinais nas regiões não diferenciadas (sem a formação de aerênquimas) e diferenciadas do sistema radicular para uma localização mais precisa do tecido celular em que o *OsAMT1.3* estava sendo mais atuante (Figura 15).

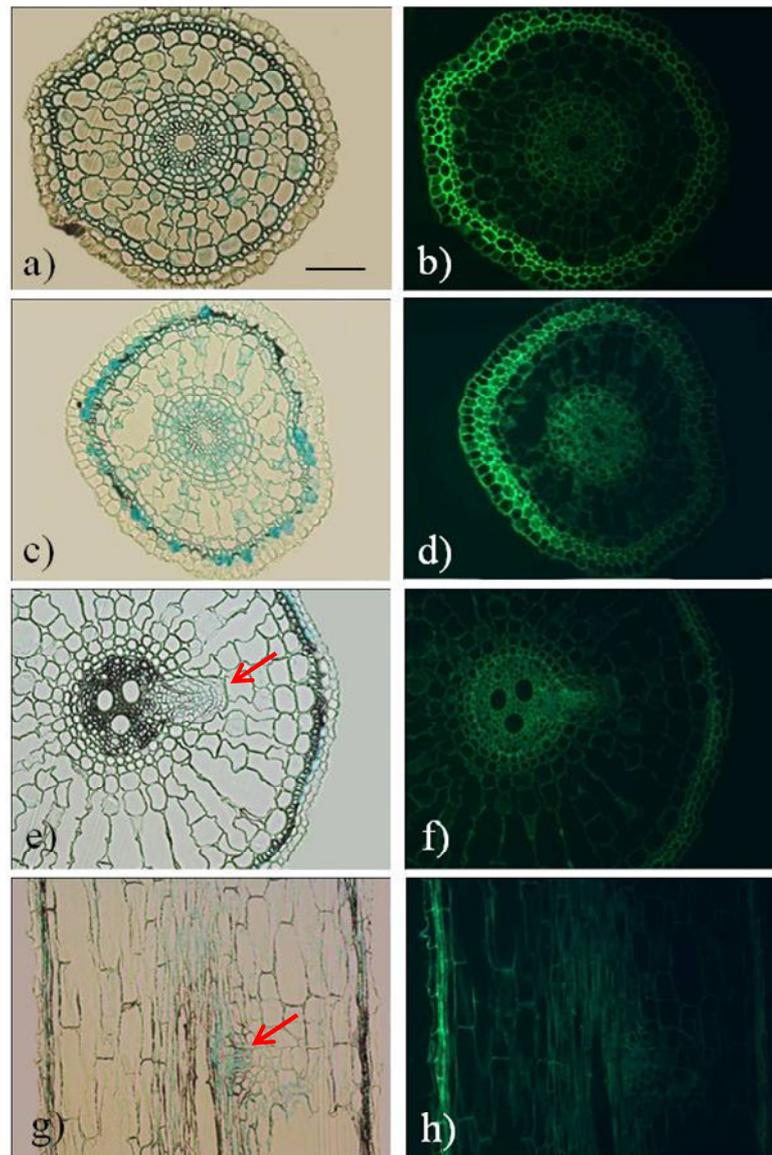


Figura 15. Cortes anatómicos de raízes de arroz na L#4 transformadas com a construção do $P_{OsAMT1.3}:GFP::GUS$, a), c, e) Cortes transversais e g) Corte longitudinal. Setas indicam os locais de atividade do promotor do *OsAMT1.3*. Imagens capturadas em microscópio ótico coradas de azul devido a atividade da β -glucuronidase em diferentes estádios de desenvolvimento da raiz. b, d, f, e g) Imagens capturadas no campo escuro excitando a proteína GFP. Barra em (a) representa 50 μ m.

A atividade do promotor do *OsAMT1.3* apresentou diferenças nos locais de atuação de acordo com o grau de maturidade do tecido analisado (Figura 15). Cortes transversais de raízes pouco ou ainda não diferenciadas (sem a formação de aerênquimas e raízes laterais) apresentaram forte coloração no córtex (Figura 15a, b). Raízes em estágio inicial de diferenciação também apresentaram coloração no córtex e numa fina camada de células abaixo da epiderme que de acordo com HOSHIKAWA, (1975) apud GUIMARÃES et al. (2002), pode ser considerada a exoderme (Figura 15c, d). Cortes realizados em regiões mais diferenciadas possuíam coloração principalmente nas regiões de emissão de raízes laterais e

na exoderme (Figura 15e, f). Cortes longitudinais também confirmaram essa maior coloração na região do cilindro central em pontos de emissão de raízes laterais e na exoderme em raízes já diferenciadas.

YAO et al. (2008), observaram que a expressão do gene do *OsAMT1.3* é reprimido na presença de nitrogênio e aumentada em condições de deficiência deste nutriente. Estes autores estudaram os locais de atuação desse transportador de amônio em condição de deficiência de N, já que em plantas crescendo em solução contendo baixos níveis de N, nenhuma coloração foi observada. A presença do *OsAMT1.3* na região do córtex indica o envolvimento desse transportador no processo de absorção/transporte de amônio, enquanto que o seu aparecimento em regiões de emissão de raízes laterais indica uma participação dessa proteína de transporte na sinalização para emissão de raízes laterais sob condições de deficiência de N (Figura 15e, f). Algumas proteínas de membrana são capazes de transportar determinado nutriente e também funcionam como verdadeiros sensores desse nutriente no solo, levando a grandes alterações no metabolismo vegetal através da ativação de vias de transdução de sinais. Essas proteínas são conhecidas como "transceptors" (GOJON et al., 2011). O aparecimento do *OsAMT1.3* em regiões de emissão de raízes laterais indica uma outra função dessa proteína além da absorção do amônio.

Detalhe aproximado de uma raiz lateral em processo inicial de diferenciação mostra a forte presença da coloração em células corticais, já em raízes diferenciadas a coloração permanece apenas na região da exoderme que começa a se tornar funcional à medida que a epiderme é perdida (Figura 16).

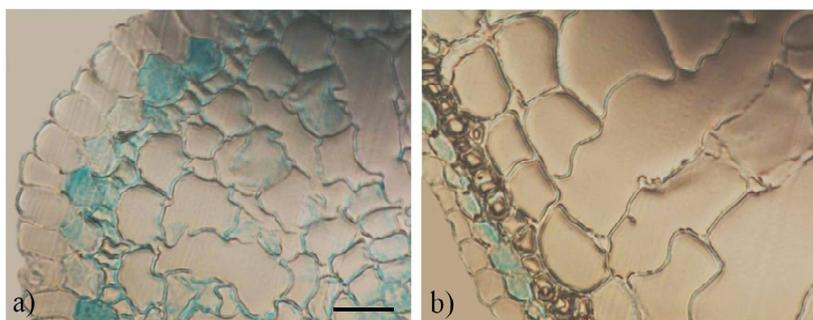


Figura 16. Cortes anatômicos aproximados de raízes de arroz na L#4 transformadas com a construção do $P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS$, a) Detalhe da região de alongamento e b) Região de diferenciação de uma raiz lateral em lente de aumento de 100 vezes. Barra representa 50 μ m.

Até o momento não foi feita a caracterização dos locais de atuação do *OsAMT1.3* em outros trabalhos. SONODA et al. (2003a), verificaram por meio de hibridização *in situ* que o transportador de amônio *OsAMT1.2* é expresso em células corticais da raiz podendo estar envolvido na absorção e assimilação do NH_4^+ em conjunto com a NADH-GOGAT e no cilindro central, sugerindo um papel na absorção e recuperação do amônio do sistema vascular.

Trabalho realizado com plantas de *Arabidopsis* silenciando quatro transportadores de amônio (*AtAMT1.1*, *AtAMT1.2*, *AtAMT1.3* e *AtAMT 2.1*) demonstrou que o surgimento de raízes laterais foi ausente nessas linhagens e significativamente baixo em um mutante silenciando apenas o gene *AtAMT1.3* em condição de baixo suprimento de N na forma nítrica e amoniacal (LIMA et al., 2010). Esses autores sugerem um envolvimento particular do *AtAMT1.3* no desencadeamento da formação de raízes laterais em *Arabidopsis*.

O transportador de amônio *AtAMT1.3* não possui similaridade genética com o *OsAMT1.3* (BAO-ZHEN, 2009), mas é possível que esse transportador também possa estar

atuando como sinalizador na emissão de raízes laterais em condição de deficiência de N em arroz como mostrado na Figura 19e.

Diante dessa perspectiva a superexpressão de membros da família AMT1 pode ser útil para melhorar a aquisição de N em solos com baixas concentrações de amônio. No entanto, deve ser notado que alguns membros da família AMT1 (ex, *OsAMT1.3*) podem não estar envolvidos diretamente na aquisição de amônio da solução externa, e sim, com um sensor do estatus intracelular de amônio (HOQUE et al., 2006).

Raízes laterais em formação apresentaram forte coloração azul, devido a atividade do promotor do *OsAMT1.3* nessa região, acredita-se que em situações de déficit de nitrogênio este transportador estaria sinalizando para o aumento da emissão de raízes laterais a fim de aumentar a área de captação de nutrientes. Corte longitudinal da zona de alongamento celular de uma raiz lateral evidencia uma alta atividade do promotor do *OsAMT1.3* (Figura 17).

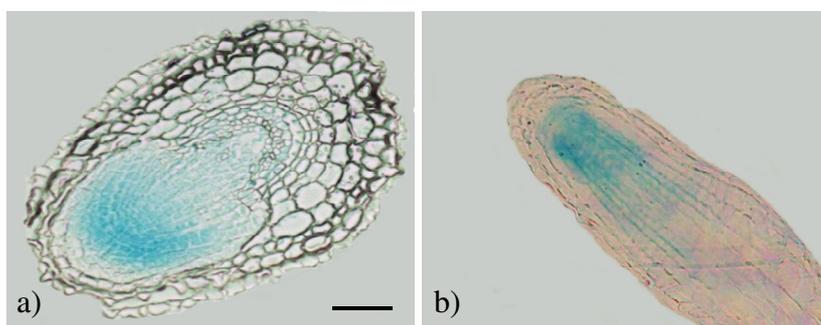


Figura 17. Cortes anômicos aproximados de raízes de arroz na L#4 transformadas com a construção do $P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS$, a) Corte transversal evidenciando a alta atividade do $pOsAMT1.3$ na região de emissão de raízes laterais de plantas de arroz; b) Corte longitudinal com detalhe para a ponta da raiz lateral com alta atividade do $pOsAMT1.3$. Cortes capturados na lente de aumento de 40 vezes. Barra representa 50 μm .

4.4 Atividade do Promotor do Gene do *OsAMT1.3* em Arroz

A atividade do promotor do *OsAMT1.3* sofreu alterações de acordo com a nutrição nitrogenada a que essas plantas foram expostas. Plantas que permaneceram em uma solução sem nitrogênio por 3 dias apresentaram alta atividade de GUS (Figura 18). Essa forte atividade ainda foi verificada 7 dias após a aplicação dos tratamentos com um decréscimo aos 14 dias. Não houve alterações nos níveis de atividade da β -Glucuronidase nas plantas que foram mantidas sob suprimento constante de N (2,0 mM N- NO_3^- ou NH_4^+). Estes resultados indicam que o transportador de amônio *OsAMT1.3* foi fortemente induzido pela deficiência de N em solução, sendo reprimido em condição de suprimento de N na forma nítrica ou amoniacal (Figura 22). Dados semelhantes foram encontrados por SONODA et al. (2003a), onde plântulas de arroz foram cultivadas em solução nutritiva sem N por três semanas e após serem transferidas para os tratamentos sem N, 0,15 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou 0,3 mM de KNO_3^- verificou-se que a expressão do *OsAMT1.3* era induzida no tratamento sem N e reprimida nos tratamentos em que foram adicionadas fontes nitrogenadas.

Dados recentes mostram que a repressão do *OsAMT1.3* com o aumento do suprimento de nitrogênio pode não ser um mecanismo universal, mas sim dependente do genótipo e do nível de nitrogênio requerido por esta (GAUR et al., 2012a). Esses autores mostraram que a cultivar de arroz Kalanamak 3119 apresentou repressão do *OsAMT1.3* em doses crescentes de amônio em solução até 1,0 mM, enquanto que a cultivar Pusa Basmati apresentou comportamento oposto aumentando a expressão do *OsAMT1.3* nas maiores doses de N- NH_4^+ .

Interessantemente, o genótipo de arroz Nipponbare, utilizado nesse trabalho, requer baixo suprimento de N e também apresenta esse comportamento de alta expressão do *OsAMT1.3* apenas em deficiência e baixas doses de N (Figura 22).

Desse modo acredita-se que a atuação do *OsAMT1.3* pode ser utilizada como um biomarcador para determinar doses ótimas de nitrogênio em variedades de arroz adaptadas ao baixo e alto suprimento de N (GAUR et al., 2012a). Essas diferenças na indução de genes de *AMT* de alta afinidade podem ser devido a diferenças na percepção e sinalização do N.

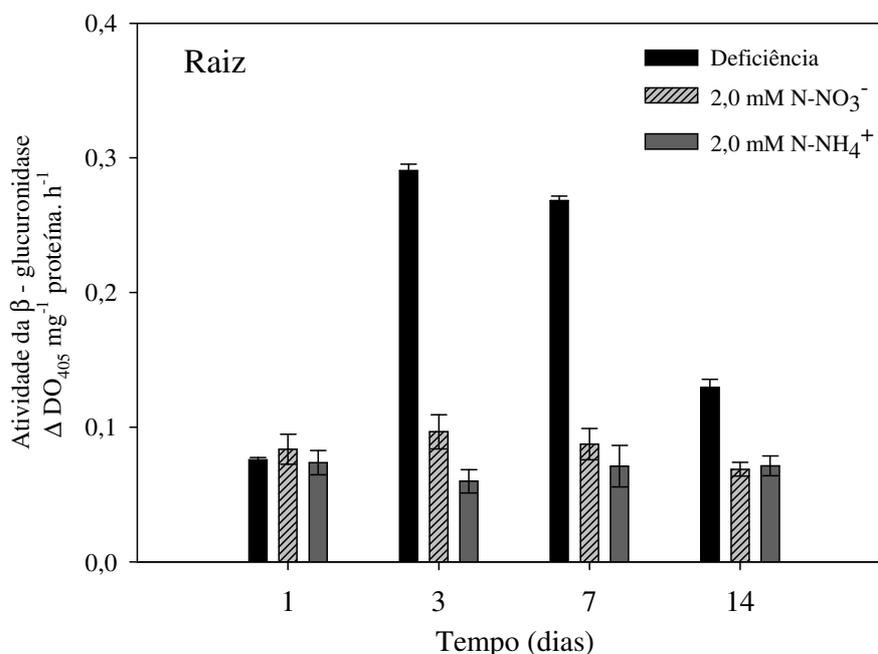


Figura 18. Atividade do promotor do transportador de amônio *OsAMT1.3* em plantas de arroz da variedade Nipponbare transformadas com a construção do $P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS$, quando submetidas ao tratamento de deficiência de N e suprimento constante com 2,0 mM N-NO₃⁻ ou 2,0 mM N-NH₄⁺. Barras representam o erro padrão das médias de 4 repetições.

Em outro experimento, quando as plantas foram mantidas sob suprimento constante de N não houve alterações nos padrões de atividade de GUS ao longo dos tempos de coleta. Plantas que passaram por um período de suprimento de N (2,0 mM de N-NO₃⁻ ou NH₄⁺) e, depois transferidas para soluções sem N (Deficiência) apresentaram um leve aumento na atividade do promotor do *OsAMT1.3* (Figura 19). Esse aumento foi menos significativo do que quando as plantas foram mantidas sem N durante 14 dias, como mostrado no primeiro ensaio (Figura 22). A nutrição nitrogenada fornecida a essas plantas durante o período inicial do experimento pode ter sido capaz de manter alto os níveis de N-amino no citosol, em especial a glutamina, regulando negativamente a atuação do *OsAMT1.3* (SONODA et al., 2003b).

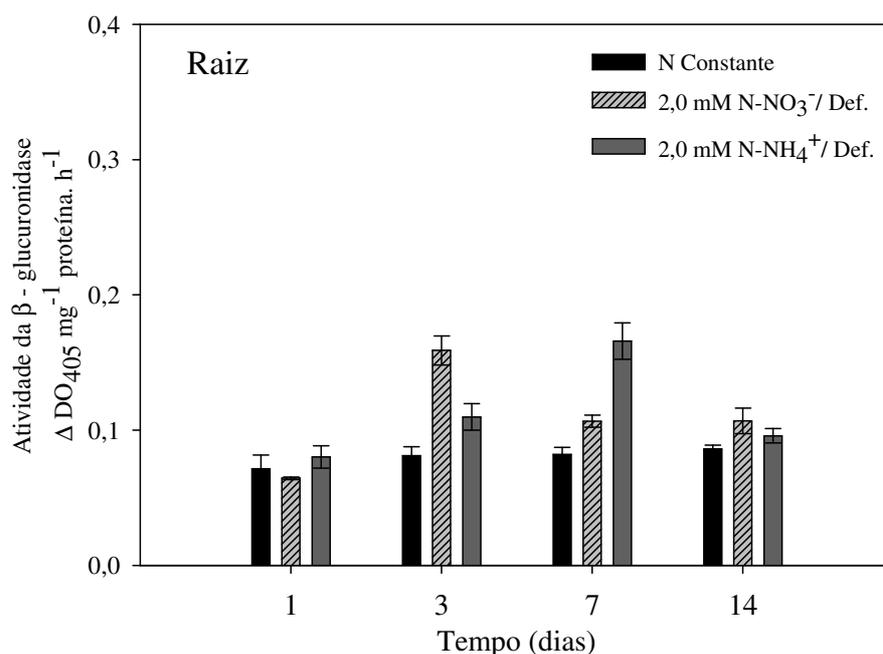


Figura 19. Atividade do promotor do transportador de amônio *OsAMT1.3* em plantas de arroz da variedade Nipponbare transformadas com a construção do $P_{OsAMT1.3}:GFP:GUS$ quando submetidas ao tratamento constante com N (1,5 mM de $N-NO_3^-$ e 0,5 mM de $N-NH_4^+$) e deficiência após um período de 7 dias de suplementação com 2,0 mM $N-NO_3^-$ ou 2,0 mM $N-NH_4^+$. Barras representam o erro padrão das médias de 4 repetições.

4.5 Efeito da Superexpressão do Gene *OsAMT1.3* Sobre os Parâmetros Cinéticos da Absorção de NH_4^+

Plantas transformadas para expressão do *OsAMT1.3* sob controle do promotor da ubiquitina 1 de milho ($P_{UBIL}:OsAMT1.3:3xHA$) foram obtidas para avaliar o efeito de maiores níveis de expressão do *OsAMT1.3* sobre a absorção de $N-NH_4^+$.

Dentre as várias linhagens $P_{UBIL}:OsAMT1.3:3xHA$ obtidas, apenas as linhagens L#2 e L#8 foram selecionadas para a condução dos experimentos por apresentarem níveis elevados de expressão do *OsAMT1.3* e se aproximarem fenotipicamente da tipo selvagem (WT) (dados não mostrados). No tratamento de 0,2 mM $N-NH_4^+$, não houve grandes variações na biomassa total e parte aérea entre as linhagens transformadas e plantas não transformadas (Tabela 8). Entretanto, quando sob alto suprimento de N, as plantas WT apresentaram maior biomassa em todas as partes analisadas. O menor crescimento vegetativo das linhagens transformadas pode ser devido ao maior influxo de $N-NH_4^+$ nessas plantas, o que resulta em desvio de energia para assimilação do NH_4^+ absorvido e por consequência há menor crescimento vegetativo. Apesar da menor biomassa das plantas transformadas no tratamento com maior dose de $N-NH_4^+$, não houve alterações significativas na razão raiz:parte aérea (Tabela 8).

Tabela 8. Massa fresca (g planta⁻¹) e razão raiz: parte aérea (R/PA) de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento de N-NH₄⁺ (0,2 e 2,0 mM) após 72 horas de privação de N.

Tratamento	WT	L#2	L#8	WT	L#2	L#8
	Massa fresca total (g. planta ⁻¹)			Massa fresca Parte aérea (g. planta ⁻¹)		
0,2 mM	6,71a*	5,80a	7,45a	3,43a	3,10a	3,75a
2,0 mM	7,73a	5,08b	6,04ab	4,16a	2,67b	3,20ab
	Massa fresca Raiz (g. planta ⁻¹)			Razão R/PA		
0,2 mM	3,28a	2,71a	3,70a	0,95a	0,88a	1,00a
2,0 mM	3,57a	2,40b	2,83ab	0,86a	0,89a	0,88a

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

A $V_{m\acute{a}x}$ representa a máxima capacidade de transporte de determinado nutriente pelo sistema de transporte atuante no momento, ou seja, é o máximo de transporte possível, quando todos os sítios encontram-se preenchidos. Dessa maneira, plantas que apresentam maior valor de $V_{m\acute{a}x}$ possuem maior capacidade de transporte de nutrientes em um determinado tempo.

Para $V_{m\acute{a}x}$, as linhagens transformadas apresentam comportamento distinto comparado às plantas WT. A L#8 apresentou maior valor de $V_{m\acute{a}x}$ no tratamento com 0,2 mM de N-NH₄⁺ e valores levemente menores no tratamento com maior dose de N-NH₄⁺ (Tabela 9). A L#2 apresentou $V_{m\acute{a}x}$ menor no tratamento com 0,2 mM de N-NH₄⁺, já no tratamento com 2,0 mM de N-NH₄⁺ houve um aumento na velocidade de absorção.

Sistemas de transporte de alta afinidade e de baixa afinidade são distintos pelos seus valores de K_M aparente. Como K_M representa a concentração de substrato na qual o processo de transporte atingiu a metade da velocidade máxima, a afinidade pelo substrato é o parâmetro mais relevante na descrição dos sistemas de transporte (FERNANDES & SOUZA, 2006).

As linhagens transformadas apresentam valores de K_M marcadamente inferiores comparadas às plantas WT quando submetidas a 0,2 mM de N-NH₄⁺, indicando que a expressão do *OsAMT1.3* pode reduzir o K_M do sistema de alta afinidade para eficiência de absorção de N-NH₄⁺.

Em *Arabidopsis thaliana* foi verificado que os transportadores de amônio da família de alta afinidade apresentam valor de K_M distintos. *AtAMT1.2* e *1.3* possuem K_M variando entre 25 e 40 μ M, enquanto que o K_M do *AtAMT1.1* foi menor que 0,5 μ M (GAZZARRINI et al., 1999). É possível que os *OsAMTs* também apresentem um perfil distinto de K_M atuando em diferentes concentrações de amônio na faixa micromolar. Dessa forma, a superexpressão do *OsAMT1.3* pode ter contribuído, principalmente, para a maior eficiência na absorção da L#8 no tratamento de 0,2 mM N-NH₄⁺.

Trabalhos pioneiros utilizando ¹³NH₄⁺ em pinus determinaram os parâmetros cinéticos para o sistema de alta afinidade em plantas privadas de N por três semanas. A $V_{m\acute{a}x}$ variou de 1,9-2,4 μ mol.g⁻¹.h⁻¹ e o K_M de 20-40 μ M (KRONZUCKER et al., 1996). Este valor de K_M está de acordo com o encontrado neste trabalho, no entanto deve se levar em consideração que a espécie vegetal é diferente e o delineamento experimental utilizado manteve as plantas privadas de N apenas por um período de três dias (Tabela 9).

Além de apresentar os menores valores de K_M , a L#8 se destacou por apresentar maior produção de raízes, indicando que o *OsAMT1.3* pode contribuir para o aumento da emissão de raízes laterais nessas plantas como já apontado no experimento anterior de localização do transportador (Figura 14 e Figura 17).

SANTOS et al. (2011) demonstraram que plantas de arroz tradicionalmente cultivadas no Maranhão e adaptadas a condição de baixo suprimento de nitrogênio apresentam a combinação de maior $V_{máx}$ e menor K_M , o que resultaria em maior eficiência de absorção. Foi verificado no presente estudo, que sob baixo suprimento de N, não houve grandes alterações de $V_{máx}$, mas fortes alterações de K_M em benefício das linhagens transformadas (Tabela 9).

Resultado semelhante foi encontrado por BAPTISTA et al. (2000), onde plantas de arroz adaptadas a baixo suprimento de N, apresentavam menores valores de K_M e $C_{mín}$, indicando influxo de amônio mesmo em baixíssimas concentrações deste cátion na solução.

Trabalho realizado por SOUZA (2010) demonstrou que plantas da variedade Manteiga conduzidas em uma solução contendo 0,2 mM N-NH₄⁺ apresentaram menor valor de $C_{mín}$ e alta expressão do transportador *OsAMT1.3*, sugerindo que este gene poderia estar envolvido no aumento da capacidade da planta para absorver o amônio em baixíssimas concentrações. Esse mesmo autor verificou que a variedade Manteiga apresentava sistema radicular mais fasciculado comparado as outras variedades estudadas, e atribui o menor valor do $C_{mín}$ em parte também à arquitetura do sistema radicular.

Tabela 9. Parâmetros cinéticos ($V_{máx}$ e K_M) da absorção de N-NH₄⁺ de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressurgimento de N-NH₄⁺ (0,2 e 2,0 mM) após 72 horas de privação de N.

Tratamento	WT	L#2	L#8	WT	L#2	L#8
	$V_{máx}$ ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)			K_M ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		
0,2 mM	9,28ab*	7,68b	9,39a	24,52a	18,04ab	11,68b
2,0 mM	27,14ab	35,60a	20,17b	1385,11a	1397,45a	1063,05b

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

Uma vez obtida a concentração do nutriente em solução a cada tempo de coleta, foram construídas curvas de depleção para os tratamentos estudados (0,2 e 2,0 mM de N-NH₄⁺) (Figura 20/Figura 21). Deve ser ressaltado que as curvas de depleção não têm reflexo direto nos parâmetros cinéticos, pois não considera a biomassa do sistema radicular e outras variáveis utilizadas nos cálculos dos parâmetros cinéticos.

A curva de depleção no tratamento de 0,2 mM de N-NH₄⁺ demonstra que a absorção se deu de forma contínua do início ao final do experimento (Figura 20). As menores taxas de decréscimo na concentração de N-NH₄⁺ em solução observados para a L#2 é reflexo da menor biomassa das plantas dessa linhagem (Tabela 8).

Para o tratamento de 2,0 mM de N-NH₄⁺ é observada uma queda inicial da concentração de N-NH₄⁺ em solução nas primeiras 10h do ensaio, uma estabilização a partir de então até às 26 h e novamente uma queda até o final do ensaio (Figura 21). No tratamento com 2,0 mM de N-NH₄⁺ deve haver uma forte repressão dos transportadores de amônio pelos produtos de sua assimilação no início do ensaio, o que explica essa estabilização das concentrações de N-NH₄⁺ em solução entre 10 h e 26 h. A retomada da absorção a partir das 26 h ocorre provavelmente devido a queda nos teores dos produtos da assimilação do N, principalmente glutamina. Teores elevados de glutamina nas raízes reprimem a expressão dos transportadores de amônio (SONODA et al., 2003b).

Novamente, as menores taxas de decréscimo na concentração de N-NH_4^+ para a L#2 no tratamento com 2,0 mM de N-NH_4^+ pode ser decorrente da menor biomassa dessa linhagem (Tabela 8).

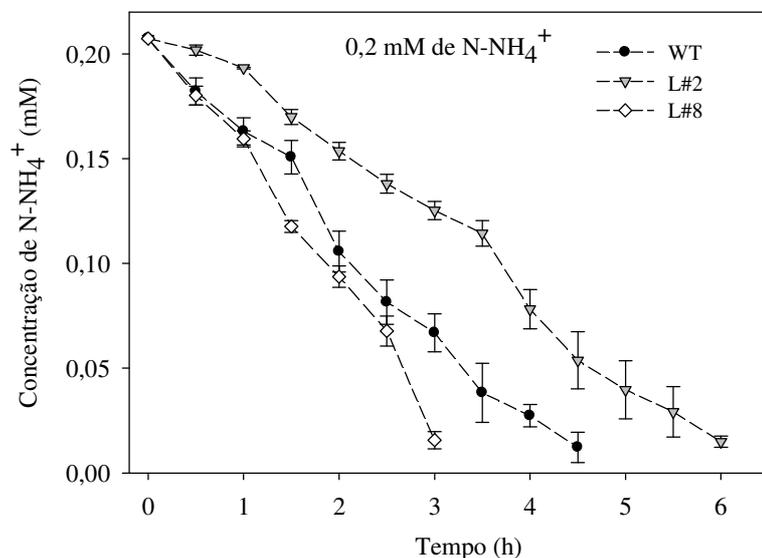


Figura 20. Depleção de N-NH_4^+ na solução nutritiva com o cultivo de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento com 0,2 mM de N-NH_4^+ após 72 horas de privação de N. Barras representam o desvio padrão das médias.

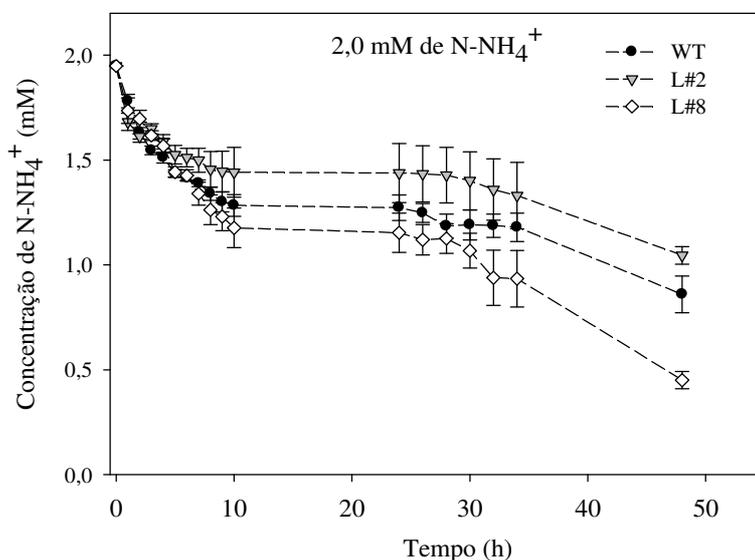


Figura 21. Depleção de N-NH_4^+ na solução nutritiva com o cultivo de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento com 2,0 mM de N-NH_4^+ após 72 horas de privação de N. Barras representam o desvio padrão das médias.

O pH da solução nutritiva foi monitorado a partir do momento em que foram aplicados os tratamentos.

As plantas absorvem o NH_4^+ em um processo dependente de energia. As bombas de prótons PM-H^+ -ATPases, hidrolisam o ATP bombeando H^+ para fora da célula, o que cria um

ambiente eletrogênico no interior das células necessário para absorção de cátions via canal iônico e transportadores. À medida que a planta absorve o amônio, de forma passiva, a favor do seu gradiente de potencial eletroquímico, uma quantidade proporcional de prótons sofrem extrusão pelas bombas de prótons para manutenção do equilíbrio de cargas, fazendo com que haja decréscimo do pH na solução nutritiva (FERNANDES & SOUZA, 2006).

Dessa forma, espera-se que a queda no valor de pH seja proporcional ao influxo de N-NH_4^+ . De fato foi o que ocorreu, onde apenas uma leve queda de pH foi observado no tratamento com 0,2 mM de N-NH_4^+ , e quedas mais acentuadas no tratamento com 2,0 mM de N-NH_4^+ (Figura 22), acompanhando o mesmo comportamento da depleção de N-NH_4^+ (Figura 20 e Figura 21).

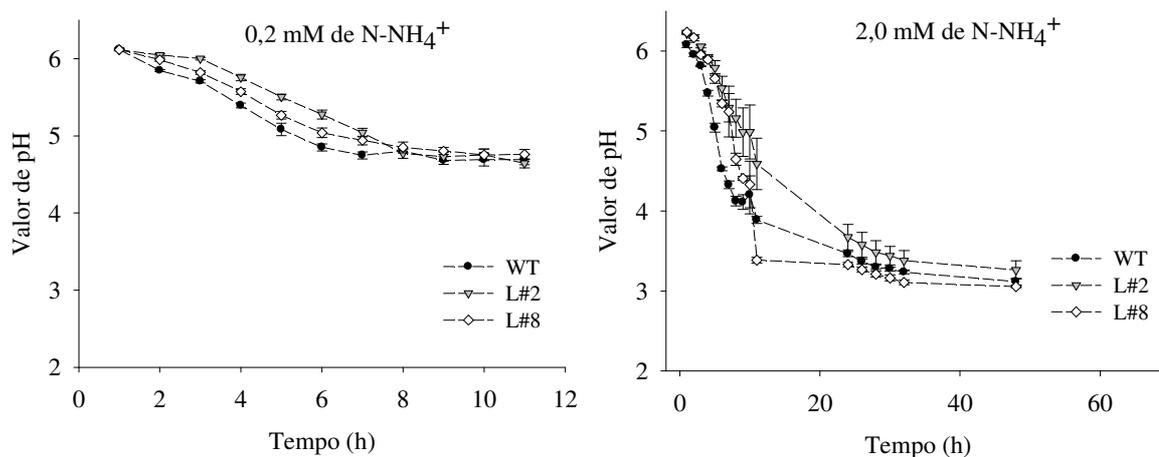


Figura 22. Valor de pH na solução nutritiva de cultivo de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento de 0,2 e 2,0 mM de N-NH_4^+ após 72 horas de privação de N. Barras representam o desvio padrão das médias.

4.6 Efeito da Superexpressão do Gene *OsAMT1.3* na Expressão dos Transportadores de Amônio, Metabolismo de N e Atividade da GS.

Como já esperado, as plantas UBIL:*OsAMT1.3*:3xHA apresentaram maiores níveis de expressão do *OsAMT1.3* em condições de cultivo constante com N (Figura 23e, f), entretanto, mesmo sob controle de um promotor forte e constitutivo, como o promotor da ubiquitina 1 de milho (UBIL), a expressão do *OsAMT1.3* nas linhagens transformadas sofreram alterações nos ressuprimentos com 0,2 e 2,0 mM de N-NH_4^+ e nos tempos de 2 e 6 h (Figura 23e, f). É importante ressaltar que o valor de expressão observado para o gene *OsAMT1.3* nas linhagens transformadas é reflexo da expressão sobre o controle do promotor UBIL, somado a expressão natural, que está sujeita a muita regulação. É possível também, que a expressão constitutiva do *OsAMT1.3* nas linhagens transformadas resulte em alterações no metabolismo de N que sabidamente refletirá na expressão dos genes da família AMT1, inclusive do próprio *OsAMT1.3*. Dessa forma, para efeito comparativo entre a expressão das plantas UBIL:*OsAMT1.3*:3xHA com as plantas WT, deve-se considerar o tratamento com suprimento constante, onde as plantas WT estarão sujeitas a uma regulação negativa para a expressão do *OsAMT1.3*, enquanto nas linhagens transformadas haverá influência da indução da expressão do *OsAMT1.3* pelo promotor UBIL.

OsAMT1.1 é um gene constitutivo, expresso tanto na raiz quanto na parte aérea. As linhagens UBIL:*OsAMT1.3*:3xHA, não sofreram alterações nos níveis de expressão do *OsAMT1.1* nos diferentes tratamentos às 2h (Figura 23a), entretanto, às 6h, a L#8 apresentou níveis mais elevados de expressão do *OsAMT1.1* no suprimento constante com N e no ressuprimento com 2,0 mM de N-NH₄⁺ (Figura 23b). De maneira geral, não é evidente um efeito do *OsAMT1.3* sobre a expressão do *OsAMT1.1*, reforçando o seu caráter constitutivo (GLASS et al., 2002).

A expressão do *OsAMT1.2* é específica nas raízes e responde positivamente ao suprimento de amônio (TABUCHI et al., 2007). Nos tratamentos com suprimento constante com N-NO₃⁻/N-NH₄⁺ e ressuprimento com 0,2 mM de N-NH₄⁺, a expressão do *OsAMT1.2* seguiu o mesmo padrão de expressão do *OsAMT1.3*, indicando um possível efeito do *OsAMT1.3* sobre a expressão do *OsAMT1.2* nesses tratamentos (Figura 23c-e). Para o tratamento onde houve ressuprimento com 2,0 mM N-NH₄⁺, não se observa essa relação entre a expressão do *OsAMT1.3* e *OsAMT1.2* (Figura 23c-e). Nota-se também que os níveis de expressão do *OsAMT1.2* as 2h foi superior em todos os tratamentos aos níveis de expressão as 6h, indicando um efeito repressor do amônio sobre a expressão do *OsAMT1.2* em todas as plantas (Figura 23c-d). A expressão do *OsAMT1.2* pode ser induzido pela adição de N-NH₄⁺ em pequenas quantidades (SONODA et al., 2003a), mas logo observa-se uma repressão que ocorre devido aos produtos da assimilação do amônio (SONODA et al., 2003b), corroborando com os dados apresentados nesse trabalho.

Em todas as partes das plantas os teores de N-NO₃⁻ encontrados foram muito baixos (Figura 24) comparados aos teores de nitrato encontrados em plantas de arroz com a mesma idade crescendo sob nutrição nítrica regular, que gira em torno de 20 a 30 μmol N-NO₃⁻ g⁻¹ de massa fresca (SILVA, 2012). Isso se deve ao fato dessas plantas terem sido cultivadas com uma solução com baixa concentração de N-NO₃⁻ (1,0 mM) e/ou serem submetidas a um período de privação de N de três dias.

De maneira não esperada, os teores de N-NH₄⁺ nas raízes das plantas UBIL:*OsAMT1.3*:3xHA no tratamento com ressuprimento de 0,2 mM de N-NH₄⁺ foram menores que nas plantas WT (Figura 25c). É provável que esse resultado seja devido a uma maior assimilação do N-NH₄⁺ nas plantas transformadas comparado com as plantas WT, uma vez que no ressuprimento com 2,0 mM os teores de N-NH₄⁺ nas linhagens transformadas foram significativamente mais elevados que nas plantas WT (Figura 25c).

O amônio não deve ser acumulado no tecido vegetal, pois é responsável por sintomas de toxidez, que se expressam principalmente pelo baixo crescimento (BRITO et al., 2001), dessa forma esse íon precisa ser rapidamente assimilado em esqueletos de carbono sendo transportado na forma de aminoácidos, predominantemente na forma de glutamina, para a parte aérea da planta, principalmente, para as folhas, onde atua como matéria prima para a síntese de outros aminoácidos e outras moléculas como proteínas, enzimas e ácidos nucleicos.

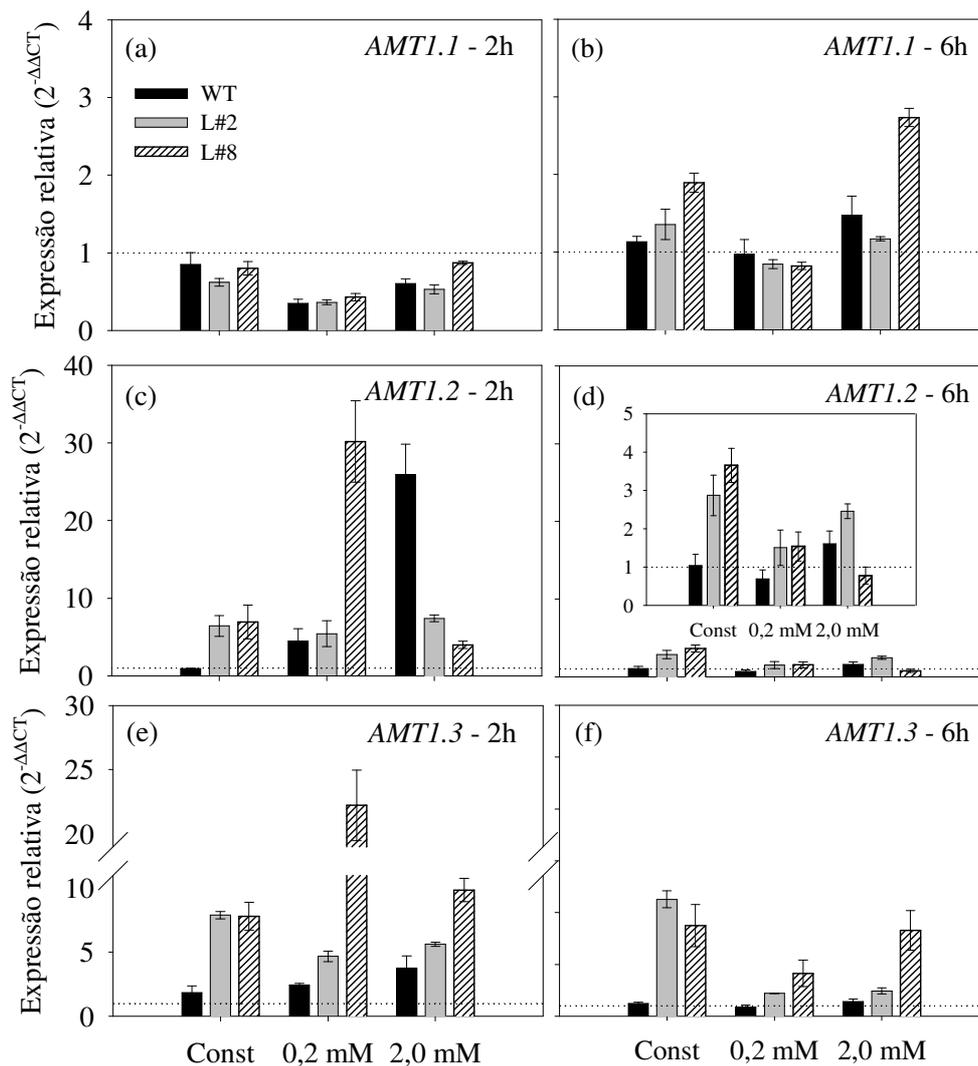


Figura 23. Expressão relativa de três transportadores de NH_4^+ (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*) na raiz de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* (linhagens L#2 e L#8) e a planta do tipo selvagem (WT), sob suprimento constante com 1,0 mM de $\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4^+$ e ressuprimento de N-NH_4^+ (0,2 e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram efetuadas coletas às 2 e 6 horas após a aplicação dos tratamentos. A linhagem WT no tratamento constante com 1,0 mM de $\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4^+$ foi utilizada como de referência. Barras representam o erro padrão das médias de quatro repetições.

Deste modo foi observado um leve aumento nos teores de N-amino encontrados nas folhas das linhagens transformadas no ressuprimento com baixa concentração de N-NH_4^+ (Figura 26).

No ressuprimento com alta concentração de amônio, a taxa de assimilação desse nutriente tem um reflexo menos significativo sobre o teor de N-NH_4^+ que se encontra no tecido, fruto da absorção. No ressuprimento com 2,0 mM de amônio, as plantas UBIL:*OsAMT1.3*:3xHA apresentaram teores de N-NH_4^+ mais elevados em todos os tecidos comparado as plantas WT (Figura 25c).

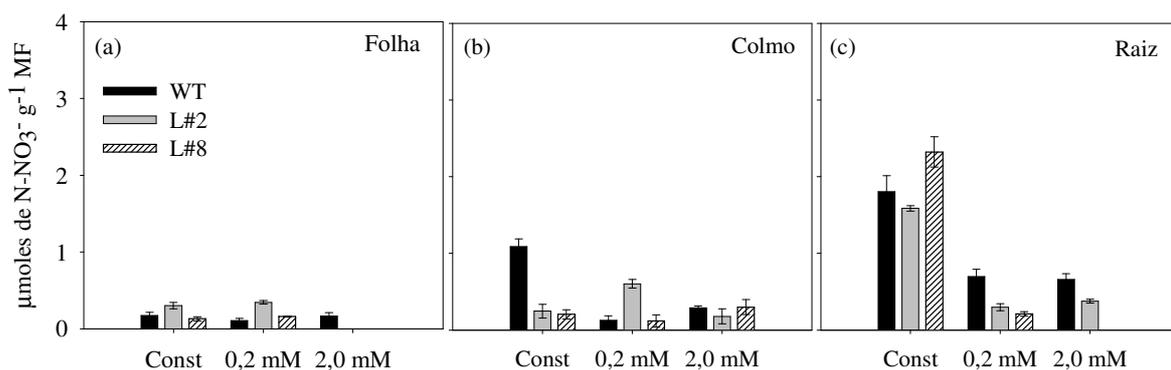


Figura 24. Teores de N-NO_3^- em folha (a), colmo (b) e raiz (c) de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a tratamento constante com 1,0 mM de N-NH_4^+ e ressuprimento de N-NH_4^+ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. A coleta foi realizada 6 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das médias de três repetições.

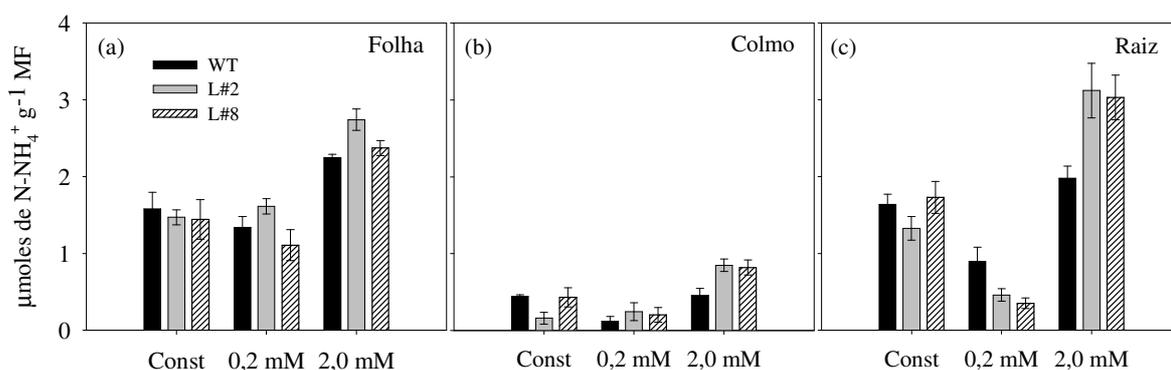


Figura 25. Teores de N-NH_4^+ em folha (a), colmo (b) e raiz (c) de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a tratamento constante com 1,0 mM de N-NH_4^+ e ressuprimento de N-NH_4^+ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. A coleta foi realizada 6 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das médias de três repetições.

Os teores de açúcares solúveis nos vegetais são indicadores de energia prontamente disponível para o metabolismo celular (SOUZA et al., 1999). Além de fonte de energia, os açúcares solúveis são fontes de esqueletos de carbono utilizados na síntese de ácidos orgânicos para assimilação do nitrogênio absorvido (BUCHER, 2007).

No tratamento com suprimento constante com N ($\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4^+$) as plantas UBIL:*OsAMT1.3:3xHA* apresentaram teores de açúcares solúveis sempre um pouco inferiores comparado com as plantas WT (Figura 27). No tratamento constante, as plantas não passaram por privação de N, período em que geralmente as plantas acumulam açúcares solúveis, portanto, após a troca de suprimento nítrico para amoniacal, é possível que as plantas UBIL:*OsAMT1.3:3xHA* apresentaram maior influxo de N-NH_4^+ e conseqüentemente menores teores de açúcares solúveis (Figura 27).

Nos ressuprimentos com 0,2 e 2,0 mM de N-NH_4^+ não foi observado uma clara relação inversa entre os teores de N-amino e açúcares solúveis (Figura 26 e Figura 27).

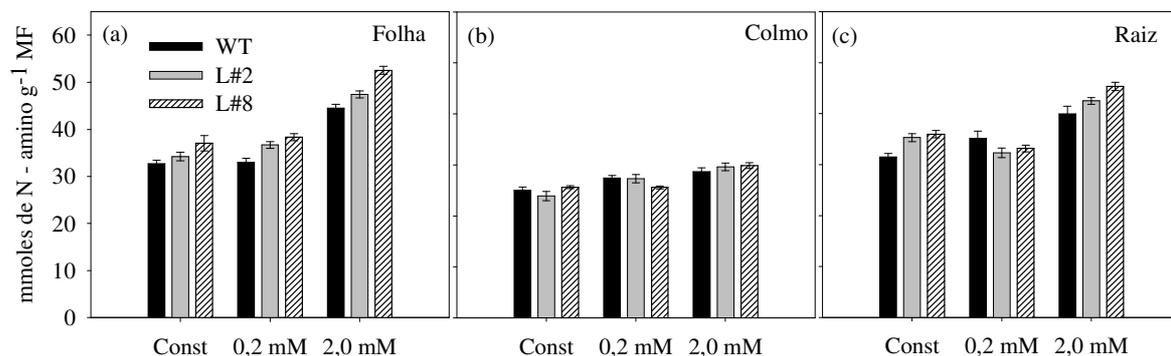


Figura 26. Teores de N-amino em folha (a), colmo (b) e raiz (c) de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas a tratamento constante com 1,0 mM de N-NH₄⁺ e ressuprimento de N-NH₄⁺ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. A coleta foi realizada 6 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das médias de três repetições.

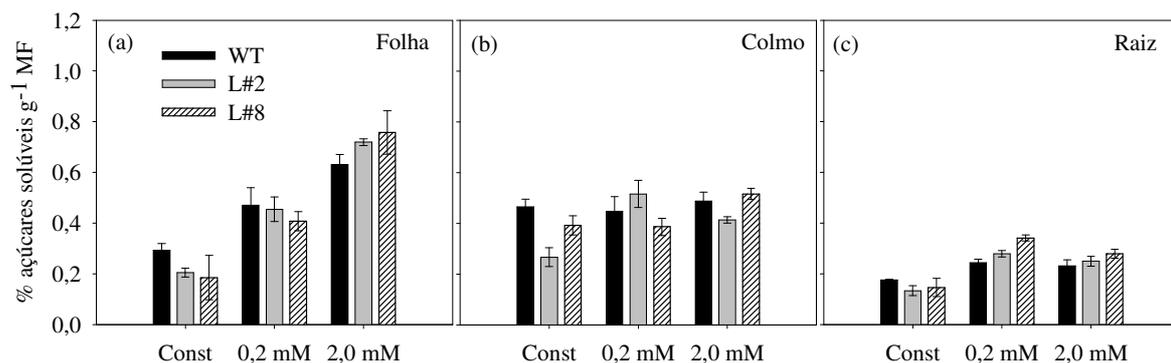


Figura 27. Teores de açúcares solúveis em folha (a), colmo (b) e raiz (c) de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas tratamento constante com 1,0 mM de N-NH₄⁺ e ressuprimento de N-NH₄⁺ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. A coleta foi realizada 6 horas após a aplicação dos tratamentos. As barras representam erro padrão das médias de três repetições.

A Glutamina sintetase é a enzima responsável por incorporar o NH₄⁺ ao glutamato, usando energia fornecida pelo ATP para formar glutamina.

Como pode ser observado na Figura 28 as plantas selvagens WT apresentam aumento da atividade da GS com o ressuprimento, em relação ao tratamento constante, no tempo 2h, já que na coleta feita às 6h, o comportamento é inverso. O mesmo foi observado para as linhagens transformadas às 6h.

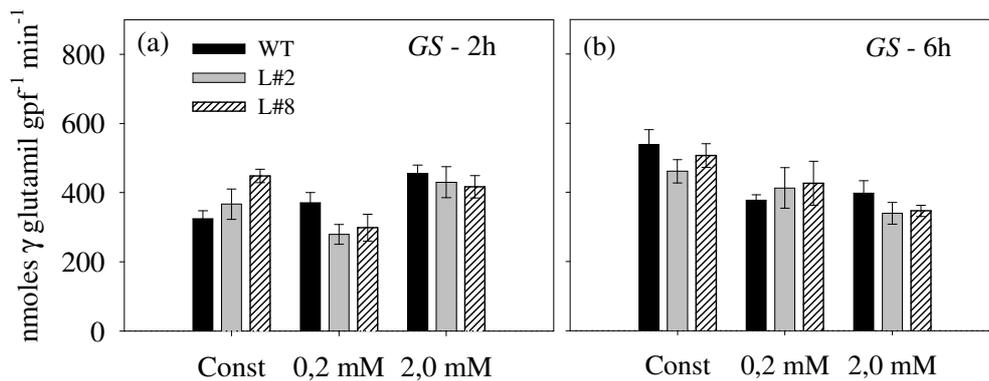


Figura 28. Atividade da Glutamina Sintetase na raiz de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas tratamento constante com 1,0 mM de N-NH_4^+ e ressuprimento de N-NH_4^+ (0,2 mM e 2,0 mM) após 72 horas sem N. Foram efetuadas coletas às 2 e 6 horas após a aplicação dos tratamentos. Barras representam o erro padrão das médias.

Por outro lado as L#2 e L#8 sofreram diminuição da atividade da GS às 2h após o ressuprimento com 0,2 mM em comparação com a WT. Os resultados indicam que o incremento no influxo de amônio resultante da superexpressão do *OsAMT1.3* alterou o padrão de atividade da GS das linhagens transformadas, de modo antagônico, em relação à WT, apenas no tempo 2h, no tratamento constante e após o ressuprimento com baixo teor de N (0,2 mM). Comparando as figuras Figura 26, Figura 27 e Figura 28 pode-se observar que o reflexo da maior atividade da GS nas raízes das linhagens transformadas, na coleta das 2h, com tratamento constante, pode ser relacionado aos maiores teores de N-amino e menores de açúcares, indicando o consumo de energia para a atividade da GS incorporando o amônio.

O conjunto de dados obtidos nos leva a crer que o *OsAMT1.3* de fato está envolvido na sinalização quando em deficiência de N, o que pode contribuir para o aumento da área radicular e, conseqüentemente, a área de captação de nutrientes. A superexpressão do *OsAMT1.3* pode alterar os padrões de absorção nas linhagens transformadas, aumentando a eficiência de absorção de N em condição de baixo suprimento de amônio e regular a expressão do *OsAMT1.2*. As alterações encontradas nos teores de amônio e N-amino mostram que a superexpressão do *OsAMT1.3* pode ter aumentado o influxo de amônio nas linhagens transformadas.

5 CONCLUSÕES

A atividade do promotor do *OsAMT1.3* é induzida na ausência de N e ocorre, principalmente nas regiões meristemáticas das raízes, indicando seu envolvimento no controle da arquitetura do sistema radicular e emissão de raízes laterais. O aparecimento de coloração na exoderme radicular também indica um possível envolvimento do *OsAMT1.3* na absorção de N-NH_4^+ .

As linhagens transformadas superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* apresentaram menor massa fresca quando submetida a altas concentrações de amônio em solução, o que pode ser reflexo de uma maior taxa de absorção de amônio por essas plantas.

As linhagens transformadas apresentaram menor valor de K_M quando sob baixo suprimento de nitrogênio. Este parâmetro indica uma maior eficiência de absorção que pode ter sido proporcionada pela superexpressão do transportador de amônio *OsAMT1.3*.

A superexpressão do transportador de amônio *OsAMT1.3* afetou a regulação do *OsAMT1.2* o que pode ter contribuído para o maior influxo de amônio, principalmente na L#8, uma vez que esse gene está envolvido diretamente na absorção.

6 PERSPECTIVAS

Ainda são necessários outros estudos para determinar a contribuição do *OsAMT1.3* na absorção de N-NH_4^+ e na sinalização para emissão de raízes laterais quando em deficiência de N. Plantas de arroz silenciando o gene do *OsAMT1.3* podem ser de fundamental importância para esclarecer a real contribuição desse transportador para o sistema de alta afinidade de absorção de amônio.

Entre os objetivos desse trabalho, será proposta a localização subcelular do transportador de amônio *OsAMT1.3* em plantas de arroz transformadas com esse gene fusionado à GFP, a fim de identificar de forma inequívoca os locais de atuação dessa proteína e uma avaliação dos componentes de produtividade nas linhagens transformadas para superexpressão desse gene em casa de vegetação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABROL, Y. P.; RAGHURAM, N. & SACHDEV, M. S. Agricultural Nitrogen Use and its Environmental Implications. **IK Inter-national**, New Delhi, v.2, p.552, 2007.
- BAO-ZHEN, L.; MERRICK, M.; SU-MEI, L.; HONG-YING, L.; SHU-WEN, Z.; WEI-MING, S.; YAN-HUA, S. Molecular basis and regulation of ammonium transporter in rice. **Rice Science**. v.16, n.4, p.314-322, 2009.
- 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, n.7, p.1325-1330, 2000.
- BECKER, T.W.; CARRAYOL, E. HIREL, B. Glutamine synthetase and glutamate de hydrogenase isoforms in maize leaves: localization, relative proportion, and their role in ammonium assimilation or nitrogen transport. **Planta**. v.211, p.800-806, 2000.
- BERNARD, S.M. & HABASH, D.Z. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. **The New phytologist**. v.182, p.608-20, 2009.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRITTO, D.T.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M.; KRONZUCKER, H.J. Futile transmembrane NH_4^+ 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.
- BUCHER, Carlos Alberto. **Avaliação através de RT-PCR da expressão dos genes que codificam para enzimas de assimilação de nitrogênio em variedades de arroz**. 2007. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.
- COMETTI, N. N.; FURLANI, P. R.; RUIZ, H. A.; FILHO, E. I. F. Soluções Nutritivas: Formulações e Aplicações. In: **Nutrição Mineral de Plantas**, ed. M. S. Fernandes, Viçosa, MG: SBCS, p.89-144, 2006.
- CORDEIRO, L. Fixação do nitrogênio. In: KERBAUY, G.B. (Org.) **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. p.51-64, 2008.
- COUTURIER, J.; MONTANINI, B.; MARTIN, F.; BRUN, A.; BLAUDEZ, D.; CHALOT, M. The expanded family of ammonium transporters in the perennial poplar plant. **New Phytology** v.174, p.137-150, 2007.
- DECHORGNAT, J.; NGUYEN, C.T.; ARMENGAUD, P.; JOSSIER, M.; DIATLOFF, E.; FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, F. X. From the soil to the seeds : the long journey of nitrate in plants. **Journal of Experimental Botany**. v.62, p.1349-1359, 2011.
- DING, Z.; WANG, C.; CHEN, S.; YU, S. Diversity and selective sweep in the OsAMT1 ; 1 genomic region of rice. **BMC Evolutionary Biology**. v.11, p.61, 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.

DUBOIS, E.; GRENSON, M. Methylamine/ammonia uptake system in *Saccharomyces cerevisiae*. Multiplicity and regulation. **Mol. Gen. Genet.** v.175, p.67-76, 1979.

DYSON T. World food trends and prospects to 2025. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA v.96, p.5929–5936. 1999.

FAO. FAO raises estimate of 2010 global rice production. Disponível em : <http://www.nationmultimedia.com/2011/02/04/business/FAO-raises-estimate-of-2010-global-rice-production-30147900.html>. Acessado em: 17/01/2013

FAO. **International year of rice 2004: Rice and nutrition**. Disponível em: <http://www.fao.org/rice2004/es/rice2.htm>. Acessado em: 17/01/2013

FARNDEN, K. J. S.; ROBERTSON, J. G. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogen. In: BERGSEN, F. J. ed. *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*, Chichester: **John Wiley**, p.265-314, 1980.

FELKER, P. Micro determination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v.49, 1977.

FERNANDES, M.S. Absorção e Metabolismo de Nitrogênio em Plantas. **Boletim técnico**, n.1, UFRRJ, Itaguaí, p.50, 1978.

FERNANDES, M.S. N-carriers, light and temperature influences on uptake and assimilation of nitrogen by rice. **Turrialba**. San Jose, v.34, p.9-18, 1984.

FERNANDES, M.S.; SOUZA, S.R. ABSORÇÃO DE NUTRIENTES. In: FERNANDES, M.S. (Org.) **Nutrição Mineral de Plantas**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2006.

FERRAZ, A. S. D.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S.; ROSSIELLO, R. O. P. Nitrogen use efficiency for grain and protein production by rice genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n.4, p.435-442, 1997.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In. REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA. **Anais**. São Carlos: UFSCar, p. 255-258, 2000.

GAO, J.; LIU, J.; LI, B.; LI, Z. Isolation and purification of functional total RNA from blue-grained wheat endosperm tissues containing high levels of starches and flavonoids, **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.185a-185i, 2001.

GAUR, V. S.; SINGH, U. S.; GUPTA, A.K. & KUMAR, A. Influence of different nitrogen inputs on the members of ammonium transporter and glutamine synthetase genes in two rice genotypes having differential responsiveness to nitrogen. **Molecular Biology Reports**. p.8035-8044, 2012b.

GAUR, V. S.; SINGH, U. S.; GUPTA, A.K. & KUMAR, A. Understanding the differential nitrogen sensing mechanism in rice genotypes through expression analysis of high and low affinity ammonium transporter genes. **Molecular Biology Reports**. p.2233-2241, 2012a.

GAZZARINI, S.; LEJAY, L.; GOJON, A.; NINNEMANN, O.; FROMMER, W. B.; VON WIREN, N. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. **Plant Cell**. v.11, p.937–948, 1999.

GLASS A. D. M. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, p.453–470, 2003.

GLASS A. D. M.; BRITTO, D. T.; KAISER, B. N.; KINGHORN, J. R.; KRONZUCKER, H. J.; KUMAR, A.; OKAMOTO, M.; RAWAT, S.; SIDDIQI, M. Y.; UNKLES, S. E.;

- VIDMAR, J. J. The regulation of nitrate and ammonium transport system in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.855-864, 2002.
- GOJON, A.; KROUK, G.; PERRINE-WALKER, F.; LAUGIER, E. Nitrate transceptor in plants. **Journal of Experimental Botany**. v. 62, n.7, p.2299-2308, 2011.
- GOOD, A. G.; SHRAWAT, A. K.; MUENCH, D. G. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? **Trends in Plant Science**, v.9, n.12, p.597-605, 2004.
- GUIMARÃES, C.M.; FAGERIA, N.K.; FILHO, M.P.B. Como a planta de arroz se desenvolve. Arquivo do Agrônomo. **Potafos**. n.13, 2002.
- HABASH, D. Z.; MASSIAH, A. J.; RONG, H. L.; WALLSGROVE, R. M.; LEIGH, R. A. The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. **Annals of Applied Biology**, v.138, n.1, p.83-89, 2001.
- 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. & GODAL, P. Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzymes from roots and leaves. **Plant Physiology**, v.66, p.619-623, 1980.
- 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**. v. 58, p.2369-2387, 2007.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural of Experimental Station Bull**, v.347, p.1-32, 1950.
- HOQUE, M. S.; MASLE, J.; UDVARDI, M. K.; RYAN, P. R.; UPADHYAYA, N. M. Over-expression of the rice OsAMT1-1 gene increases ammonium uptake and content, but impairs growth and development of plants under high ammonium nutrition. **Functional Plant Biology**, v.33, p.153-163, 2006.
- HOSHIKAWA, K. **Growth of the rice plant**. Tokyo: Nosan Gyoson Bunka Kyokai, 317p. 1975.
- HOWITT S. M.; UDVARDI, M.K. Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. **Biochimica and Biophysica Acta** v.1465, p.152-170, 2000.
- IBGE. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/>. Acessado em 17/01/2013.
- IRELAND, R.J.; LEA, P.J. **Plant Amino Acids**, Marcel Dekker, New York. p.49-110, 1999.
- ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; TABUCHI, M.; YAMAHA, T.; TAKAHASHI, H. Biochemical background and compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots. **Plant and Cell Physiology**. v.45, n.11, p.1640-1647, 2004.

- JAIN, M. Genome-wide identification of novel internal control genes for normalization of gene expression during various stages of development in rice. **Plant Science**. v.176, p.702-706, 2009.
- 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 NH_4^+ transporter AtAMT1;1. **Plant Physiology**, v.130, p.1263–1275, 2002.
- 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.
- KRONZUCKER, H.J.; SIDDIQI, M.Y. & GLASS, A.D.M. Kinetics of NH_4^+ influx in spruce. **Plant physiology**. v.2, p.773-779, 1996.
- 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.
- LEA, P.J. AND IRELAND, R.J. Nitrogen metabolism in higher plants. In *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology*. Singh, B.K, p. 1–47, 1999.
- LIMA, J.E.; KOJIMA, S.; TAKAHASHI, H. & VON WÍREN, N. Ammonium Triggers Lateral Root Branching in Arabidopsis in an AMMONIUM TRANSPORTER1 ; 3-Dependent Manner. **The plant cell. Society** 22, p.3621-3633, 2010.
- LOQUÉ, D.; Von WIRÉN, N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.1293–1305, 2004.
- LU, Q.; LI, X.H.; GUO, D.; XU, C.G.; ZHANG, Q. Localization of pms3, a gene for photoperiod-sensitive genic male sterility. **Mol Gen Genomics**. p.507-511, 2005.
- LUDEWIG, U., VON WIREN N. & FROMMER, W.B. Uniport of NH_4^+ by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. **Journal of Biological Chemistry** v. 277, p. 13548–13555, 2002.
- LUDEWIG, U., WILKEN, S., WU, B. Homo- and hetero-oligomerization of ammonium transporter-1 NH_4^+ uniporters. **Journal of Biological Chemistry**. v.278, p.45603–45610, 2003.
- MA J.; BENNETZEN J.L. Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.101. p.12404-12410, 2004.
- MAPA. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz/>. Acessado em 17/01/2013.
- MARINI, A. S.; VISSERS, S.; URRESTARAZU, A.; ANDRE, B.; **Embo Journal**. v.13 p.3456-3463, 1994.
- MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**, 2nd ed., Academic Press, Cambridge, 1995.
- MAYER, M.; LUDEWIG, U. Role of AMT1;1 in NH_4^+ acquisition in Arabidopsis thaliana. **Plant Biology**, v.8, p.522–528, 2006.
- MILLER, A. J. & CRAMER, M.D. Root Nitrogen Acquisition and Assimilation. **Plant and Soil**. v. 274, p. 1-36, 2004.
- MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide** v.5, p.62–71, 2001.

- MOREIRA, F.M.S & SIQUEIRA, J.S. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 626p. 2002.
- NINNEMANN, O.; JAUNIAUX, J.C.; FROMMER, W.B. Identification of a high affinity NH_4^+ transporter from plants. **Embo Journal**. v.13, p.464-3471, 1994.
- PANAUD C. R. The molecular bases of cereal domestication and the history of rice. **Biologies**. v.332, p.267-272, 2009.
- PEARSON, J.; STEWART, G. R. The deposition of atmospheric ammonia and its effects on plants. **New Phytology**. v.125, p.283–305, 1993.
- PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F.; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? **Plant Soil**, v.174, p.3–28, 1995.
- RAWAT, S. R.; SILIM, S. N.; KRONZUCKER, H.J.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D. AtAMT1 gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. **Plant Journal**. v.19, p.143–152, 1999.
- RODRIGUES, F. de S.; SOUZA, S. R.; RODRIGUES, F. de S.; FERNANDES, M. S. Nitrogen metabolism in rice cultivated under seasonal flush of nitrate. **Journal of Plant Nutrition**, v.27, n.3, p.395-409, 2004.
- 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, L. A.; SANTOS, W. A.; SPERANDIO, M. V. L.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrate Uptake Kinetics and Metabolic Parameters in Two 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: UFRRJ.
- 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 Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.
- SMIL V. Nitrogen in crop production; an account of global flows. **Global Biogeochemical Cycles**. v.13, p.647–662, 2006.
- SONODA, Y., IKEDA, A., SAIKI, S., YAMAYA, T. AND YAMAGUCHI, J. Feedback regulation of the ammonium transporter gene family AMT1 by glutamine in rice. **Plant Cell Physiology**. v.44, p.1396-1402, 2003b.
- 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, 2003a.
- SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L.; 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, S. R.; STARK, E. M. L.; FERNANDES, M. S.; MAGALHÃES, J. R. Effects of supplemental nitrogen on nitrogen-assimilation enzymes, free amino nitrogen, soluble sugars

and crude protein of rice. **Communication Soil Science and Plant Analyses**, v.30, n.5, p.711-724, 1999.

SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. NITROGÊNIO. In: FERNANDES, M.S. (Org.) **Nutrição Mineral de Plantas. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. 2006.

SOUZA, Vinícius Miranda. **Parâmetros cinéticos da absorção de amônio e expressão gênica dos transportadores OsAMT1 em variedades de arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2010. 60f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 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.

TABUCHI, M.; ABIKO, T.; YAMAYA, T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.9, p.2319–2327, 2007.

TABUCHI, M.; SUGIYAMA, K.; ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; SATO, T.; TAKAHASHI, H.; YAMAYA, T. Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking OsGS1;1, a cytosolic glutamine synthetase1;1. **The Plant Journal**, v.42, p.641–651, 2005.

TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment**. v.23, p.1005-1024, 2000.

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.

TURANO, F. J.; DASHNER, R.; UPADHYAYA, A.; CALDWELL, C. R. Purification of mitochondrial glutamate dehydrogenase from dark-grown soybean seedlings. **Plant Physiology**, v.112, p.1357-1364, 1996.

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.

VON WÍREN, N. & MERRICK, M. Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi and plants. **Molecular mechanisms controlling transmembrane transport**. v.9, p. 95-120, 2004.

VON WÍREN, N.; GAZZARRINI, 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.

WANG M.Y.; GLASS A.D.M.; SHAFF J.E. & KOCHIAN L.V. Ammonium uptake by rice roots. **Plant Physiology**. v.104, p.899–906, 1994.

WANG M.Y.; SIDDIQI M. Y.; RUTH, T.J. & GLASS A.D.M. Ammonium uptake by rice roots. Kinetics of ¹³NH₄⁺ across plasmalemma. **Plant Physiology**. v.103, p.1259–1267, 1993.

XU, G.; FAN, X. & MILLER, A.J. Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. **Annual Review of Plant Biology**. v.63, p.5.1-5.30, 2012.

YAO, S.; SONODA, Y.; TSUTSUI, T.; NAKAMURA, H.; ICHIKAWA, H.; IKEDA, A.; YAMAGUSHI, J. Promoter analysis of OsAMT1;2 and 1;3 implies their distinct roles in nitrogen utilization in rice. **Breeding Science**. v.58, p.201-207, 2008.

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.

ZHAO, X.Q. & SHI, W.M. Expression analysis of the glutamine synthetase and glutamate synthase gene families in young rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Plant Science**. v.170. p.748-754, 2006.

8 ANEXOS

Meios de cultivo utilizados para transformação de arroz de acordo com o protocolo de 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 timentim (conc. final 150 mg L⁻¹).

Obs.: A estocagem pode ser feita 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 min
- 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 50 mg L⁻¹).

Obs.: A estocagem pode ser feita 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 50 mg L⁻¹).

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