

UFRRJ

INSTITUTO DE AGRONOMIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA-
CIÊNCIA DO SOLO**

TESE

**Influência dos Transportadores de Aminoácidos
OsAAP1 e *OsAAP18* na Remobilização de Nitrogênio
e Acúmulo de Proteínas nos Grãos de Arroz**

Cassia Pereira Coelho

2015



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

**INFLUÊNCIA DOS TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS
OSAAP1 E OSAAP18 NA REMOBILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO E
ACÚMULO DE PROTEÍNAS NOS GRÃOS DE ARROZ**

CASSIA PEREIRA COELHO

Sob a Orientação do Professor
Manlio Silvestre Fernandes

e Co-orientação dos Professores
Leandro Azevedo Santos e
Sonia Regina de Souza

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2015

641.3318

C672i

T

Coelho, Cassia Pereira, 1984-

Influência dos transportes de aminoácidos OSAAP1 OSAAP18 na remobilização de nitrogênio e acúmulo de proteínas nos grãos de arroz / Cássia Pereira Coelho – 2015. 65 f.: il.

Orientador: Manlio Silvestre Fernandes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo.

Bibliografia: f. 65-72.

1. Arroz – Teses. 2. Plantas – Mutação – Teses. 3. Plantas – Efeito do nitrogênio – Teses. 4. Aminoácidos – Teses. I. Fernandes, Manlio Silvestre, 1939-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, 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

CASSIA PEREIRA COELHO

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

TESE APROVADA EM 12/02/2015.

Manlio Silvestre Fernandes. Ph.D. UFRRJ
(Orientador)

Norma Gouvea Rumjanek. Dra. Embrapa Agrobiologia

Stefan Schwab. Dr. Embrapa Agrobiologia

André Marques dos Santos. Dr. UFRRJ

Ricardo Luis Louro Berbara. Ph.D. UFRRJ

DEDICATÓRIA

À minha família

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus;

Às minhas mães Janete Vanda e Maria Augusta por todo o amor, esforço e ajuda, que me possibilitaram concluir este trabalho;

À Kátia, minha irmã e melhor amiga e aos meus irmãos Cassius e Kallynadjá pelo apoio;

Ao meu padrasto Wanderley pelo incentivo;

Aos meus tios Edilson, Edmilson, Gilson, e Juarez pelo apoio;

Ao professor Manlio Silvestre Fernandes pela orientação, ensinamentos que levo para toda a vida e oportunidade de me tornar uma pesquisadora;

A Carlos Alberto Bucher pela ajuda e companheirismo;

À professora Sonia Regina de Souza pela orientação e contribuições para a realização deste trabalho;

Ao professor Leandro Azevedo pela orientação;

À professora Mechthild Tegeder, por conceder a oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pela orientação para realização de trabalhos em leveduras, sem a qual não seria possível o desenvolvimento desses experimentos;

À Andressa Fabiane e Erinaldo Gomes pela ajuda na realização das análises e desenvolvimento dos experimentos;

Aos amigos do laboratório de Nutrição Mineral de Plantas da UFRRJ pela amizade, ajuda e companheirismo;

Ao CPGA-CS e sua coordenação pelo apoio para a realização do trabalho;

A CAPES, FAPERJ e ao CNPq pela concessão das bolsas e financiamento do trabalho de pesquisa;

À Washington State University, por todo o apoio e infra-estrutura concedida para a realização no meu estágio sanduíche no exterior;

À UFRRJ pela infra-estrutura;

Muito obrigada

BIOGRAFIA

Cassia Pereira Coelho nascida em São Luís, Maranhão, concluiu o ensino fundamental na Unidade Integrada Anna Adelaide Bello - SESI e o ensino médio no Centro de Ensino Médio Paulo Freire, ambos em sua cidade de origem. Em 2002, ingressou no curso de graduação em Agronomia da UEMA. Durante a graduação, foi monitora da disciplina de Bioquímica durante os anos de 2006 e 2007 e bolsista por três anos do CNPq, no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas da UEMA, trabalhando com sistemas agroflorestais sob orientação do professor Altamiro Souza de Lima Ferraz Júnior. Obteve o título de Engenheira Agrônoma em 2008. Em março de 2009, ingressou no Mestrado no Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, na UFRRJ, sob orientação do Prof. Manlio Silvestre Fernandes. Foi bolsista CAPES durante o primeiro ano do mestrado e no segundo ano do curso, bolsista nota 10 da FAPERJ. Em março de 2011, ingressou no Doutorado no Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, na UFRRJ, sob orientação do Prof. Manlio Silvestre Fernandes, com estágio sanduíche na Washington State University, sob a orientação da Profa. Mechthild Tegeder.

RESUMO GERAL

COELHO, Cassia Pereira. **Influência dos transportadores de aminoácidos *OSAAP1* e *OSAAP18* na remobilização de nitrogênio e acúmulo de proteínas nos grãos de arroz.** 2015. 72f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

O principal objetivo do trabalho foi elucidar a função dos genes *OsAAP1* e *OsAAP18* e verificar sua influência sobre a remobilização de N para os grãos e formação de proteínas de reserva em plantas de arroz. Para isso, foram realizados experimentos para (1) caracterização fenotípica de plantas de arroz mutantes por inserção de T-DNA da variedade Dong Jin e (2) verificação da afinidade dos transportadores codificados pelos genes *OsAAP1* e *OsAAP18* por diferentes substratos (aminoácidos) através de trabalho de complementação em leveduras mutantes das cepas 22 Δ 8AA, que é incapaz de transportar eficientemente L-prolina, L-citrulina, L-aspartato and L-glutamato, 22 Δ 6AAL, que é incapaz de transportar eficientemente L-lisina e JA248, que é incapaz de transportar eficientemente L-glutamina, carregando a sequência codantados genes *OsAAP1* e *OsAAP18*. A análise fenotípica das plantas mutantes foi realizada através de experimento conduzido em casa de vegetação na UFRRJ utilizando-se as linhagens de plantas mutantes por T-DNA para o gene LOC_Os07g04180 (*OsAAP1*), 3A-00581, e para o gene LOC_Os0636210 (*OsAAP18*), 4A-00262 e plantas tipo selvagem como controle. Testes de complementação com as leveduras mutantes foram realizados na Washington State University, utilizando-se meio livre de N, suplementado com L-prolina, L-citrullina, L-aspartato, L-glutamato, L-lisina ou L-glutamina como única fonte de N. Ao final do estudo verificou-se que os genes *OsAAP1* e *OsAAP18* codificam proteínas de transporte de aminoácidos envolvidas na remobilização de N para os grãos em plantas de arroz e *OsAAP18* influencia o metabolismo de plantas de arroz e a produção de grãos.

Palavras-chave: Plantas mutantes. *Oryza sativa* L. Eficiência de uso de nitrogênio (EUN).

GENERAL ABSTRACT

COELHO, Cassia Pereira. **Influence of the *OSAAP1* and *OSAAP18* amino acid transporters on the crude protein accumulation and N remobilization in rice plants.** 2015. 72p. Thesis (Doctor in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

The main goal of the study was to elucidate the functions of the *OsAAP1* and *OsAAP18* genes and check its influence on the N remobilization to grains filling and storage of proteins in rice plants. To this, were performed experiments to: (1) Phenotypic characterization of T-DNA insertional mutant plants of Dong Jin rice variety and (2) check affinity of transport for amino acids, through functional complementation of yeast mutant strains 22 Δ 8AA, unable to transport efficiently L-proline, L-citrulline, L-aspartate and L-glutamate, 22 Δ 6AAL, unable to transport efficiently L-lysine and JA248, unable to transport efficiently L-glutamine. The phenotypic analyze of the mutant plants was developed through a greenhouse experiment using the T-DNAs insertional mutants lines 3A-00581, mutant for the gene LOC_Os07g04180 (*OsAAP1*), and 4A-00262, mutant for LOC_Os0636210 gene (*OsAAP18*) and wild type plants. Complementation tests with mutants yeasts were performed on nitrogen-free medium supplemented with L-proline, L-citrulline, L-aspartate, L-glutamate, L-lysine or L-glutamine as the sole nitrogen source. From the results it was concluded that genes *OsAAP1* e *OsAAP18* encode to proteins involved in nitrogen remobilization to gains in rice plants and *OsAAP18* influences rice productivity protein content in grains.

Key words: Mutant plants. *Oryza sativa*. Nitrogen use efficiency (NUE).

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Genes de transportadores de aminoácidos de <i>Arabidopsis</i> e <i>Populus trichocarpa</i> utilizados como referência na busca de ortólogos para o estudo de identificação e caracterização de transportadores de aminoácido envolvidos em maior EUN em plantas de arroz.	18
Tabela 2. Iniciadores (primers) utilizados no experimento de perfil de expressão dos transportadores de aminoácidos.....	21
Tabela 3. Identificação das plantas independentes para produção de sementes a partir das linhagens mutantes. Mutantes para os genes <i>OsAAP1</i> e <i>OsAAP18</i> estão destacados em negrito.	22
Tabela 4. Iniciadores (<i>primers</i>) <i>forward</i> e <i>reverse</i> para análises por PCR em tempo real dos genes das isoformas de glutamina sintetase citossólica (<i>OsGS1.1</i> e <i>1.3</i>) e plastidial (<i>OSGS2</i>) de arroz e genes controle da actina 11 (<i>OsActin11</i>) e fator de alongamento (<i>eEF-1α</i>).....	24
Tabela 6. <i>Primers</i> utilizados para amplificação de sítios de recombinação attB1 e attB2 nas sequências de <i>OsAAP1</i> (Os07g04180) e <i>OsAAP18</i> (Os06g36210).....	53
Tabela 7. <i>Primers</i> utilizados para amplificação de <i>OsAAP1</i> e <i>OsAAP18</i> com sítios de corte das enzimas NotI e BamHI.	56
Tabela 8. Meios não seletivos, seletivos para plasmídeo e seletivo para transporte utilizados no experimento.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa da região T-DNA do vetor pGA2715. As barras em cinza, RB e LB, representam, respectivamente, as bordas direita e esquerda do vetor. I, representa o intron 2 de *OsTubA1* carregando 3 putativos sítios aceptores e doadores de “*splicing*”; Tn representa o terminador; Tt representa o terminador *OsTubA1*; hph representa o gene de higromicina fosfotransferase; OsTubA1-1 representa o primeiro íntron de *OsTubA1*; E, representa o elemento “*enhancer*” do promotor CaMV 35S; P representa o sítio de corte de PstI e X o sítio de corte de XhoI (JEONG et al., 2002)..... 21
- Figura 2.** Delineamento experimental utilizado para caracterização fenotípica de plantas mutantes..... 23
- Figura 3.** Árvore filogenética construída a partir da sequência de aminoácidos dos transportadores da família Aminoácido permease (AAP) em arroz, incluindo genes de sorgo, arroz e Arabidopsis. Setas vermelhas indicam os genes escolhidos para o experimento de análise do perfil de expressão.....26
- Figura 4.** Níveis de expressão do gene *OsAAP1* ao longo do ciclo de desenvolvimento das plantas conforme a plataforma GENEVESTIGATOR. Círculos de diferentes cores indicam dados de expressão para o mesmo gene inseridos na plataforma..... 28
- Figura 5.** Níveis de expressão do gene *OsAAP1* em diferentes tecidos das plantas conforme a plataforma GENEVESTIGATOR. Círculos de diferentes cores indicam dados de expressão para o mesmo gene inseridos na plataforma..... 28
- Figura 6.** Níveis de expressão do gene *OsAAP1* no ovário e embrião durante o período inicial de desenvolvimento dos grãos, em diferentes dias após florescimento (DAF), conforme plataforma RiceXpro. Agrupamentos de barras de cores repetidas indicam repetições de dados de expressão para o mesmo gene inseridos na plataforma..... 29
- Figura 7.** Níveis de expressão do gene *OsAAP1* nas inflorescências (Inflor), anteras, páleas, lemas e pistilos coletados de panículas (pan) de diferentes tamanhos em plantas na plataforma RiceXpro. Agrupamentos de barras de cores repetidas indicam repetições de dados de expressão para o mesmo gene inseridos na plataforma..... 29
- Figura 8.** Níveis de expressão do gene *OsAAP1* nos embriões e endospermas durante o período de enchimento dos grãos de arroz, em diferentes dias após florescimento (DAF), na plataforma RiceXpro. Agrupamentos de barras de cores repetidas indicam repetições de dados de expressão para o mesmo gene inseridos na plataforma.....30
- Figura 9.** Níveis de expressão do gene *OsAAP18* ao longo do ciclo de desenvolvimento das plantas conforme a plataforma GENEVESTIGATOR..... 31
- Figura 10.** Níveis de expressão do gene *OsAAP18* nos diferentes tecidos das plantas conforme a plataforma GENEVESTIGATOR..... 31
- Figura 11.** Níveis de expressão do gene *OsAAP18* durante o período inicial de desenvolvimento dos grãos conforme a plataforma RiceXpro. Agrupamentos de barras de cores repetidas indicam repetições de dados de expressão para o mesmo gene inseridos na plataforma..... 32
- Figura 12.** Níveis de expressão do gene em órgãos reprodutivos de plantas de arroz segundo a plataforma RiceXpro. Agrupamentos de barras de cores repetidas indicam repetições de dados de expressão para o mesmo gene inseridos na plataforma..... 32

- Figura 13.** Análises de níveis de expressão do gene durante o período de enchimento dos grãos de plantas de arroz na plataforma RiceXpro. Agrupamentos de barras de cores repetidas indicam repetições de dados de expressão para o mesmo gene inseridos na plataforma..... 33
- Figura 14.** Atividade da Nitrato redutase (NR) nas folhas superiores (FS), Folhas inferiores (Fi) e colmo (C) das plantas da variedade Piauí nas coletas realizadas emborrachamento, antese e aos 7 dias depois da antese (DDA) no experimento para a análise de expressão dos genes candidatos. Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre linhagens pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 34
- Figura 15.** Atividade de protease nas folhas superiores (FS), Folhas inferiores (Fi) e colmo das plantas da variedade Piauí no experimento para a análise de expressão dos genes candidatos.....35
- Figura 16.** Teores de Nitrato, N-amino e amônio nas folhas superiores (FS), folhas inferiores (Fi), colmo (C) e panículas (P) das plantas da variedade Piauí nas coletas realizadas no emborrachamento, antese e aos 7 dias depois da antese (7 DDA) no experimento para análise de expressão dos genes candidatos. Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre coletas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 36
- Figura 17.** Expressão relativa dos genes Os07g04180.1 (*OsAAP1*), Os06g36210 (*OsAAP18*) Os03g37984.1 (*OsAAP3*), Os06g36180.1 (*OSAAP4*), Os01g66010.1 (*OsAAP5*), Os03g37984.1 (*OsAAP6*), Os12g42850.1 (*OsAAP8*), Os11g05690.1 (*OsCAT1*) e Os12g06060.1 (*OsCAT2*) em panículas das plantas de arroz da variedade Piauí no período do emborrachamento (Emb), na antese, aos 7 dias depois da antese (7DDA) e aos 15 dias depois da antese (15 DDA)..... 38
- Figura 18.** Expressão relativa dos genes Os06g36210 (*OsAAP1*) Os03g37984.1 (*OsAAP3*), Os06g36180.1 (*OSAAP4*), Os01g66010.1 (*OsAAP5*), Os03g37984.1 (*OsAAP6*), Os12g42850.1 (*OsAAP8*), Os11g05690.1 (*OsCAT1*) e Os12g06060.1 (*OsCAT2*) em folhas das plantas de arroz da variedade Piauí no período do emborrachamento, na antese, aos 7 dias depois da antese (7DDA) e aos 15 dias depois da antese (15 DDA). Melhorar diferenciação entre as colunas.....39
- Figura 19.** Análise de expressão gênica em plantas *Osaap1* e *Osaap18* nas plantas mutantes *Osaap1* e *Osaap18* e tipo selvagem (WT) nas folhas bandeira (FB), folhas superiores (FS) colmo (C) e grãos (G)..... 40
- Figura 20.** Análise de N-amino nas folhas bandeira (FB), folhas superiores (FS), folhas inferiores (Fi), colmo (C) e panículas (P) das plantas de arroz tipo selvagem e mutantes. Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre linhagens pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....41
- Figura 21.** Análise de N-amônio nas folhas bandeira (FB), folhas superiores (FS), folhas inferiores (FI), colmo (C) e panículas (P) das plantas de arroz tipo selvagem e mutantes. Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre linhagens pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....42
- Figura 22.** Análise de açúcares solúveis nas folhas bandeira (FB), folhas superiores (FS), folhas inferiores (FI), colmo (C) e panículas (P) das plantas de arroz tipo selvagem e mutantes. Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre linhagens pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 42

Figura 23. Produção de perfilhos e panículas e altura das plantas. Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre linhagens pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	43
Figura 24. Produção de grãos total, cheios e chochos em plantas <i>Osaap1</i> e <i>Osaap18</i> . Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre linhagens pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	44
Figura 25. Produção de massa das plantas mutantes e tipo selvagem. Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre linhagens pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	44
Figura 26. Teores de N-total na parte aérea (PA) e proteínas nos grãos das plantas tipo selvagem e mutantes. Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre linhagens pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	45
Figura 27. N-total na parte aérea a grãos em plantas de arroz <i>Osaap1</i> , <i>Osaap1</i> e tipo selvagem. Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre linhagens pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	45
Figura 28. Vetor pDR195 abrigando sequência codante de <i>OsAAP1</i>	55
Figura 29. Vetor pDR195 abrigando a sequência codante de <i>OsAAP18</i>	55
Figura 30. Resumo esquemático das construções do vetor pDR195 abrigando a região codante de <i>OsAAP1</i> e <i>OsAAP18</i>	58
Figura 31. Teste de afinidade dos transportadores <i>OsAAP1</i> , <i>OsAAP6</i> e <i>OsAAP18</i> por substrato a 1mM (aminoácidos arginina, aspartato, citrulina, GABA, glutamato e prolina) com colônias das leveduras 22Δ8AA. O meio BA enriquecido com 10mM de (NH ₄) ₂ SO ₄ foi utilizado como controle positivo para cultivo. Leveduras da cepa 22Δ8AA carregando vetor vazio (pDR195) foram utilizadas como controle negativo para o teste. Leveduras 22Δ8AA carregando a sequência dos genes <i>AtAAP3</i> e <i>AtAAP6</i> foram utilizadas como controle positivo.....	61
Figura 32. Teste de afinidade de <i>OsAAP1</i> , <i>OsAAP6</i> e <i>OsAAP18</i> por substrato (lisina) em meio BA com concentrações de 10, 30 e 50 μM utilizando colônias das leveduras 22Δ6AAL. O meio BA enriquecido com 0,5g/l de uréia + 1mM de lisina foi utilizado como controle positivo. Leveduras da cepa 22Δ6AAL carregando vetor vazio (pDR195) foram utilizadas como controle negativo para o teste. Leveduras 22Δ6AAL carregando a sequência dos genes <i>AtAAP3</i> e <i>AtLHT2</i> foram utilizadas como controle positivo.....	62
Figura 33. Teste de afinidade de <i>OsAAP1</i> e <i>OsAAP6</i> por susbtrato (glutamina) em meio BA com 0,5 e 1mM de glutamina utilizando cepas das leveduras mutantes JA248. O meio BA enriquecido com 10mM de (NH ₄) ₂ SO ₄ foi utilizado como controle positivo para cultivo. Leveduras da cepa JA248 carregando vetor vazio (pDR195) foram utilizadas como controle negativo para o teste. Leveduras JA248 carregando a sequência dos genes <i>AtAAP3</i> e <i>AtLHT2</i> foram utilizadas como controle positivo.....	62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Importância da Caracterização de Genes em Arroz	3
2.2. Uso de Plantas Mutantes para a Caracterização de Genes	5
2.3. Uso do Processo de Transferência de T-DNA de <i>Agrobacterium</i> em Transformação de Plantas e sua Importância	8
2.4. A Importância das Leveduras para Estudos Genômicos	9
2.5. Uso de Leveduras em Experimentos de Complementação de Mutantes para Análise Funcional de Genes que Codificam para Transportadores de Aminoácidos.....	10
3. CAPÍTULO I - SELEÇÃO E ESCOLHA DE GENES QUE CODIFICAM PARA TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS E ESTUDO DA SUA INFLUÊNCIA SOBRE A REMOBILIZAÇÃO DE N E ACÚMULO DE PROTEÍNAS NOS GRÃOS EM PLANTAS DE ARROZ.	14
3.1. RESUMO	15
3.2. ABSTRACT	16
3.3. INTRODUÇÃO.....	17
3.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.4.1. Seleção de genes para o estudo	18
3.4.2. Obtenção de plantas de arroz mutantes para estudos dos genes selecionados a partir das análises de filogenia e caracterização de expressão.....	21
3.4.3. Caracterização fenotípica e análises metabólicas e de expressão em plantas mutantes <i>Osaap1</i> e <i>Osaap18</i>	23
3.4.4. Análises estatísticas.....	25
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
3.5.1. Análises filogenéticas	26
3.5.2. Prováveis locais e épocas de expressão dos genes <i>OsAAP1</i> e <i>OsAAP18</i> determinados nas plataformas Genevestigator e RiceXpro	27
3.5.3. Análise de caracterização de expressão gênica em plantas da variedade Piauí.....	33
3.5.4. Análise de plantas mutantes <i>Osaap1</i> e <i>Osaap18</i>	39
3.6. CONCLUSÕES	46
4. CAPÍTULO II - AFINIDADE DOS TRANSPORTADORES OSAAP1 E OSAAP18 POR DIFERENTES AMINOÁCIDOS EM EXPERIMENTOS DE COMPLEMENTAÇÃO COM LEVEDURAS MUTANTES.....	47
4.1. RESUMO	48
4.2. ABSTRACT	49
4.3. INTRODUÇÃO.....	50
4.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	52

4.4.1. Leveduras utilizadas nos experimentos para determinar especificidade do <i>OsAAP1</i> e <i>OsAAP18</i> por diferentes aminoácidos	52
4.4.2. Obtenção das construções plasmidiais para clonagem em leveduras	52
4.4.3. Preparo de células competentes e transformação de leveduras com as construções.....	58
4.4.4. Ensaio de transporte e afinidade por aminoácidos.....	59
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.6. CONCLUSÕES	63
5. CONCLUSÕES GERAIS	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO GERAL

O arroz é um cereal de extrema importância na alimentação humana, especialmente para populações de baixa renda, por ser uma fonte de calorias acessível e conter como proteína de reserva a glutelina, uma proteína de alto valor nutricional.

O aumento da produção dos cultivos nos últimos 50 anos, durante a “revolução verde”, foi alcançado com o uso de variedades modernas de alta produtividade, fertilizantes químicos, em especial os nitrogenados, e controle de pragas e doenças através do uso de agrotóxicos. O nitrogênio (N) é o nutriente de maior demanda metabólica pelas plantas e um fator limitante da produtividade, devido à sua baixa disponibilidade no solo (TABUCHI et al., 2007) exigindo a aplicação de grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados. No entanto, seu uso excessivo gera riscos ambientais, principalmente contaminação de cursos d'água e lençol freático, além de aumento dos custos de produção.

O aumento da eficiência de uso de nitrogênio (EUN) pode ser a melhor forma de conciliar segurança alimentar global, respeito às políticas ambientais e necessidade de produção de biocombustíveis (CHARDON et al., 2012). Essa eficiência pode ser alcançada com o desenvolvimento de variedades com capacidade de absorver e utilizar o N de forma mais eficiente.

KANT et al. (2011) afirmam que a EUN depende de dois fatores, sendo o primeiro a eficiência de assimilação, que envolve absorção e assimilação do N e o segundo a eficiência de utilização, que envolve remobilização do N. A remobilização de N no período de enchimento de grãos é de extrema importância nas culturas de arroz e trigo, onde estima-se que cerca de 80% do conteúdo de N nos grãos é derivado de remobilização das folhas nessas culturas (KICHEY et al., 2007; TABUCHI et al., 2007). Este N é remobilizado para as sementes em desenvolvimento, principalmente na forma de aminoácidos (XU et al., 2012). Desta maneira, nas diversas partes da planta, transportadores de aminoácidos são requeridos, por exemplo, para carregamento do floema em folhas, carregamento do xilema em raízes, transferência de aminoácidos entre os dois sistemas vasculares e para o descarregamento em sementes em desenvolvimento (OKUMOTO et al., 2002).

Transportadores de aminoácidos foram identificados como membros de pelo menos cinco famílias de genes e estas proteínas de transporte mostram diferentes seletividades e afinidades com substratos assim como diferentes localizações subcelulares (RENTSH et al., 2007). Esta diversidade de transportadores de aminoácidos sugere múltiplos papéis, fundamentais no crescimento e desenvolvimento da planta (LIU e BUSH, 2006), podendo também atuar no controle da utilização de N pela planta. Dessa forma, a identificação e caracterização do sistema de transporte que direciona o fluxo de metabolitos de N entre compartimentos celulares, em tecidos e órgãos, e ao longo da planta é crucial para o entendimento do transporte e distribuição desse elemento (RENTSH et al., 2007).

Sendo assim, torna-se importante o estudo de genes que codificam proteínas envolvidas na remobilização de N, em especial os transportadores de aminoácidos, que são os principais transportadores envolvidos na remobilização de N orgânico nas plantas durante o período de enchimento de grãos. Além disso, decifrar as funções de genes de plantas de arroz é um passo importante para a identificação de genes-chave de importância agrônômica para o melhoramento do próprio arroz ou de outros cereais como milho, trigo e cevada, em termos de produção e valor nutricional (GRECO et al., 2003).

Em plantas de arroz, os genes *OsAAP1* (LOC_Os07g04180) e *OsAAP18* (LOC_Os06g36210) podem estar associados a funções de transporte de aminoácidos para os grãos durante o período reprodutivo.

A caracterização desses genes pode ajudar a entender os mecanismos envolvidos na remobilização de N na forma de aminoácidos em plantas de arroz e contribuir para futuros estudos visando o aumento da EUN por plantas de arroz ou produção de grãos com maiores teores de proteína.

Neste trabalho, a elucidação da função dos genes *OsAAP1* e *OsAAP18* e determinação do seu envolvimento no processo de remobilização de N em plantas de arroz foi realizada através de (1) caracterização fenotípica de plantas mutantes de arroz da variedade Dong Jin, utilizando plantas *wildtype* como controle e (2) verificação da afinidade dos transportadores codificados pelos genes *OsAAP1* e *OsAAP18* por diferentes substratos (aminoácidos) através de estudos de complementação com o uso de leveduras mutantes.

Capítulo I e II? Título e objetivos de cada um?

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância da Caracterização de Genes em Arroz

O arroz é um cereal de grande importância na dieta de populações de baixa renda, constituindo uma importante fonte de proteína. Segundo BRITTO e KRONZUCHER (2004) esse cereal é fonte de alimento para cerca de 70% da população humana mundial e sua produção deve ser aumentada cerca de 60% nos próximos 30 anos ou a segurança alimentar global estará em risco. Cerca de 90% do grão de arroz é constituído de amido e proteínas (FITZGERALD et al., 2009; TIAN et al., 2009) e a composição de proteínas nos grão é dividida em albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas (SHEWRY, 1995). O aumento no teor de proteína em arroz é desejável devido a importância dessa cultura na alimentação da população de baixa renda e por se tratar de uma grão com uma proteína de qualidade; pois a maior parte da proteína de arroz é constituída por glutelina, e a preços mais acessíveis que fontes proteicas de origem animal.

O nitrogênio é o nutriente de maior demanda metabólica pelas plantas e um fator limitante muito importante da produtividade. A utilização de mutantes ou plantas geneticamente modificadas é uma ferramenta adequada para o estudo de caracterização funcional de genes associados ao metabolismo desse nutriente (TABUCHI et al., 2007). Conhecimentos obtidos a partir de estudos de caracterização desses genes podem contribuir para a identificação de genes chave associados à eficiência de uso de N (EUN) em plantas

Aumentar a EUN é essencial para reduzir os custos com fertilizantes na agricultura e evitar danos ambientais decorrentes do uso excessivo de fertilizantes nitrogenados e consequente poluição e/ou eutrofização dos cursos d'água, ocasionados pela lixiviação do nitrato (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2008). Além disso, a diminuição do uso de fertilizantes nitrogenados pode reduzir a emissão de N₂O proveniente das transformações do N no solo. O uso de variedades com maior EUN pode ser uma estratégia economicamente positiva para a produção de cultivos de baixo valor econômico como os cereais e, além disso, deve-se levar em consideração o benefício ambiental gerado pela diminuição do uso de fertilizantes nitrogenados para o cultivo dessas plantas. Segundo CHARDON et al. (2012), após a estagnação da produção obtida na revolução verde os produtores tem o desafio de driblar o aumento dos custos de produção e, ao mesmo tempo, otimizar os cultivos de forma a suprir o aumento da demanda da população mundial por alimentos e a necessidade de fornecer matéria-prima para a produção de biocombustíveis, o que leva o aumento da EUN a ser a melhor forma de conciliar segurança alimentar global, em respeito às políticas ambientais e necessidade de produção de biocombustíveis (CHARDON et al, 2012).

O desenvolvimento de variedades de arroz com capacidade de absorver e utilizar N mais eficientemente torna-se uma alternativa para o aumento da produção e para a diminuição do uso de fertilizantes nitrogenados em sistemas onde o seu uso é intensivo, o que levaria a diminuição dos custos de produção e riscos ambientais. BEATTY et al. (2010), em trabalho com cevada, afirmaram que o aumento da EUN de cultivos de cereais pode ser alcançado através de estratégias de manejo de N, métodos tradicionais de melhoramento de plantas ou biotecnologia, sendo que ferramentas moleculares como transcriptoma, proteômica e metabolômica podem ajudar a determinar um “*background*” genético de genótipos particulares para identificação de genes e/ou características para uma maior adaptação a condições limitantes de N. O estudo de variedades locais de arroz, adaptadas a condições de cultivo em locais com solos de baixa fertilidade natural e baixo uso de fertilizantes nitrogenados, pode contribuir para o entendimento de mecanismos associados a essa adaptação a condições limitantes de N, a tolerância a estresses ambientais (como déficit

hídrico e Al^{+3}) e à eficiência de uso de nutrientes apresentada por essas plantas (SOUZA et al., 1998).

Segundo CHARDON et al. (2010) a EUN em cultivos de cereais é definida como a produção de grãos por unidade de N disponível no solo, incluindo fertilizantes nitrogenados. Grande parte da EUN está ligada à eficiência de remobilização de N no período reprodutivo da cultura. Segundo KANT et al. (2011) o uso de N ocorre de forma distinta em dois estágios do ciclo de vida das plantas, sendo o primeiro o estágio vegetativo, onde ocorre a formação de biomassa e estoque do N, e o segundo o estágio reprodutivo, onde a maioria da remobilização ocorre, quando o N é transportado para as sementes, principalmente na forma de aminoácidos. Há dois pontos a serem levados em consideração para o aumento da EUN em cultivos: (1) A identificação de genes e análise de seus padrões de expressão pode permitir aos pesquisadores identificar com mais rapidez genes alvo para melhorar a EUN e (2) o uso de transgênicos para EUN deve ser integrado ao melhoramento clássico e seleção por marcadores assistidos, uma vez que um transgênico específico pode ser mais efetivo de acordo com o seu ambiente (GOOD et al., 2004).

Até o momento a superexpressão de enzimas de transporte de N não levou a resultados relevantes para o aumento da EUN, o que pode estar associado ao funcionamento do sistema de regulação por “*feedback*” que atua sobre essas enzimas, sendo assim, talvez os aspectos mais desafiadores do aumento da eficiência de uso de nitrogênio em plantas através de análises de genômica funcional são a identificação e manipulação de genes que coordenam interações entre o metabolismo de carbono e nitrogênio (C-N) (BRITTO and KRONZUCHER, 2004). Apesar do enorme progresso feito por pesquisadores de arroz, principalmente no que diz respeito ao seqüenciamento do genoma e construção de bancos de mutantes no intuito de alcançar a saturação de mutação de todos os genes, ainda há uma enorme lacuna de conhecimento a ser preenchida para entender o genótipo e fenótipo, o que é essencial para criar novas variedades de elite adequadas para a agricultura sustentável (ZHANG et al., 2008).

Decifrar a função dos genes de arroz é um passo inicial para a identificação de genes-chave de importância agrônômica para o melhoramento do próprio arroz ou de outros cereais como milho, trigo e cevada em termos de produção e valor nutricional e, portanto, há a necessidade de um esforço concentrado de diferentes laboratórios no intuito de prover genótipos e informações ao público, facilitando os trabalhos dos diferentes grupos de pesquisa (GRECO et al., 2003). O arroz é uma planta modelo para pesquisa genômica de espécies de monocotiledôneas e após ter sido o primeiro planta cultivada a ter seu genoma sequenciado, devido ao seu genoma de tamanho pequeno, abundante recurso genômico, e um estabelecido processo para transformação, houve a construção e disponibilização ao público de um grande número de mutantes, que foram obtidos por diferentes formas de mutação, entre elas *transferred DNA* (T-DNA), transposons, retrotransposons e mutações químicas e físicas (WANG et al., 2013). Esse sequenciamento facilitou trabalhos de caracterização gênica da cultura e busca por genes de interesse para a agricultura.

A maior tarefa para caracterizar a função dos genes é examinar possíveis mudanças no fenótipo associadas a mutações com perda de função do gene, possível graças a construção de bibliotecas de mutantes, cujo objetivo é alcançar a caracterização funcional de todos os genes (ZHANG et al., 2008). Todas as ferramentas para identificar funções de genes são baseadas na análise de variações fenotípicas entre plantas tipo selvagem e seus mutantes e, portanto, a coleção e geração de mutantes a nível de genoma forma a plataforma tecnológica da genômica funcional (JIANG e RAMACHANDRAN, 2010).

Além de seu uso na caracterização de genes relacionados a importantes traços agrônômicos, alguns mutantes podem ser utilizados em programas de melhoramento. Segundo JIANG e RAMACHANDRAN (2010) linhagens mutantes que apresentem maior

potencial de produção de sementes ou mostrem maior tolerância a estresse abiótico podem ser utilizadas para melhoramento de arroz por combinação de retrocruzamento e seleção assistida por marcadores.

JIANG e RAMACHANDRAN (2010) revisaram sete diferentes métodos para mutagênese incluindo natural, física, química, cultura de tecidos, T-DNA, transposon e mutagênese por silenciamento de genes. Cada método para mutagênese tem sua vantagem e desvantagem e diferentes métodos podem ser combinados para produzir uma população de mutantes saturada, entretanto, deve-se levar em consideração que a escolha do tipo de mutação pode influenciar nos resultados obtidos em trabalhos de caracterização gênica como, por exemplo, mutações que inserem o sistema “*gene-trap*” são mais adequadas em estudos de genes que funcionam em múltiplos estágios de desenvolvimento das plantas, para permitir um melhor monitoramento dos padrões de expressão (JIANG e RAMACHANDRAN, 2010).

Para confirmação de funções de genes, devem ser alcançados dois objetivos, sendo o primeiro a fenotipagem sistemática e caracterização dos mutantes, onde um conjunto de linhagens de mutantes não redundantes representantes de todos os genes anotados podem ser identificados e sujeitos à experimentos de fenotipagem, e o segundo a caracterização sistemática de famílias gênicas (ZHANG et al., 2008).

ZHANG et al. (2008) propuseram um projeto internacional de estudos de genômica funcional de arroz (International Rice Functional Genomics Project (IRFGP), que tem como meta determinar a função de cada gene do genoma de arroz até o ano de 2020 no intuito de avaliar a diversidade funcional de alelos para genes úteis na agricultura a partir do conjunto primário de genes e posteriormente aplicar as descobertas da pesquisa de genômica funcional para o melhoramento genético da cultura de arroz e outras. Através da caracterização de mutantes por inserção de T-DNA, as funções de muitos genes têm sido identificadas nos anos recentes (WANG et al., 2013).

2.2. Uso de Plantas Mutantes para a Caracterização de Genes

Variedades de arroz podem ser consideradas plantas geradas por polinização natural, tendo sido obtidas pela simples seleção de plantas com características desejáveis, já plantas de arroz com expressão reduzida ou interrompida de genes de interesse podem ser chamados mutantes, e têm uma aplicação de grande importância no campo da ciência para estudos funcionais de genes de arroz, que por sua vez é de extrema importância para programas de melhoramento vegetal.

Plantas possuem muitos genes responsáveis por desenvolver funções essenciais que são comuns a diferentes espécies. Portanto, o estudo do genoma de plantas modelo como *Arabidopsis* e arroz pode ajudar a entender as funções de genes correspondentes em diversas plantas cultivadas, como milho, trigo e cevada.

O silenciamento é uma ferramenta de extrema importância para caracterização funcional de genes e há várias formas de inativar genes em plantas. Uma das ferramentas mais utilizadas para provocar mutações em plantas é a inserção de fragmentos de DNA na sequência do gene de interesse, o que é possível pela inserção de um T-DNA. A técnica mais utilizada para a transformação de plantas por inserção de T-DNA é através do uso de *Agrobacterium*.

Além da inserção do T-DNA há diversas formas de causar mutações em plantas visando interromper ou reduzir a expressão de genes de interesse. Entre elas pode-se citar mutagênese insercional por uso de transposons e retrotransposons, silenciamento gênico através do uso de microRNAs, siRNAs, mutagênese química e mutagênese física.

A mutagênese insercional, por T-DNA, transposons, retrotransposons ou “*retrotransposonstaging*”, tem sido amplamente utilizada na criação de bancos de mutantes

de arroz e tem uma ampla aplicação, uma vez que os sítios de inserção são de fácil identificação e foi estabelecida de uma eficiente tecnologia de transformação baseada em *Agrobacterium* (WANG et al., 2013). Em todo o mundo, grandes populações de linhagens com inserção de T-DNA tem sido geradas usando as cultivares de arroz Dong Jin, Hwayoung, Nipponbare, Zhonghua 11, Zhonghua 15 e Tainung 67 (WANG et al., 2013).

Comparando com outras técnicas de identificação, a mutagênese insercional tem a vantagem do elemento insercional atuar como marcação através do uso de genes repórteres, principalmente *GUS* e *gfp*, que são empregados nas construções para auxiliar a identificação das inserções em genes funcionais, sendo que este sistema é conveniente para observação de fenótipos mutantes, devido a ativação do repórter indicar a localização, condição e tempo de expressão do gene silenciado (RYU et al., 2004).

“*Gene trap*”, “*promoter trap*” ou “*enhancertrap*” são sistemas que permitem que a atividade do gene seja monitorada por fusão do gene com um gene repórter, o que ajuda a monitorar os padrões de expressão e entender melhor as funções dos genes (JIANG e RAMACHANDRAN, 2010). As diferenças entre esses sistemas são que: (1) no “*enhancertrap*” um gene repórter tem um promotor mínimo que é expresso somente quando inserido próximo a elementos *cis* de *enhancers* cromossômicos e (2) nos sistemas “*gene trap*” e “*promoter trap*” os genes repórteres não tem promotor, de modo que sua expressão pode ocorrer somente quando o gene repórter é inserido dentro de um gene cromossomal transcrito, criando uma fusão transcricional (JIANG e RAMACHANDRAN, 2010).

A inativação de genes por inserção de um transposon tem sido empregada para estudos funcionais em diversas espécies de plantas (JEON et al., 2000). Um exemplo são as linhagens mutantes Ac/Ds, formadas a partir da ação de elementos de transposição autônomo (Ac) e não autônomo (Ds). Para obtenção de linhagens Ac/Ds de inserção estável duas diferentes linhagens parentais transgênicas são utilizadas para cruzamento sexual, uma linhagem parental contendo o elemento Ac e a outra linhagem parental transgênica Ds, na qual os transposons não podem ser mobilizados por si mesmos (JIANG and RAMACHANDRAN, 2010). Então, após cruzamento entre plantas Ac e Ds os elementos Ds podem ser mobilizados e inseridos em diferentes posições no genoma devido à presença da transposase Ac (JIANG e RAMACHANDRAN, 2010). Após obtenção das plantas linhagens estáveis contendo o elemento Ds sem a transposase Ac são obtidas por cruzamento.

Segundo Wanget al. (2013) além do sistema Ac/Ds dois outros transposons têm sido utilizados em arroz, que são os primeirostransposons ativos de DNA identificado em arroz, o “*miniature ping*” (*mPing*), e o elemento de transposon ativo de DNA de arroz não autônomo (nDART1).

Diferentemente dos transposons, os retrotransposons são elementos genéticos móveis que transpõem por transcrição reversa de um RNA intermediário e alguns desses elementos, como o Tos 17 de arroz, podem ser utilizados para gerar linhagens por mutantes por inserção estáveis (JIANG e RAMACHANDRAN, 2010). Tos17 é um retrotransposon endógeno de arroz e tem sido utilizado como outra importante inserção mutagênica, apresentando a vantagem de que as cópias integradas são permanentes em plantas regeneradas, portanto produzindo inserção imobilizada em uma planta (WANG et al., 2013).

Apesar de todas as vantagens já apresentadas, as mutações por nocaute nem sempre permitem uma análise funcional efetiva de (1) genes redundantes devido a perda de sua função pode não levar a uma variação morfológica óbvia; (2) genes requeridos somente em condições específicas como estresses bióticos e abióticos; (3) genes críticos envolvidos no crescimento e desenvolvimento das plantas (WANG et al., 2013).

RNA interferente (RNAi) é um método amplamente utilizado para silenciamento de genes. RNAi tem sido utilizado com sucesso na caracterização funcional de genes em plantas, e o silenciamento do gene ocorre após a formação de RNAs de dupla fita (dsRNAs), que são

processados em pequenos RNAs interferentes (siRNAs) e micro RNAs (miRNAs) por enzimas chamadas Dicers1, e esses siRNAs e miRNAs guiam os complexos de silenciamento induzido por RNA (RISCs) para suprimir a expressão do gene em nível transcricional, interferir na estabilidade de RNA ou tradução (JIANG e RAMACHANDRAN, 2010).

Além de métodos de transformação química e física outros métodos diretos de interferência de genes, como silenciamento por amiRNAs e uso de genes de expressão ectópica, têm sido utilizados para estudar funções de genes (WANG et al., 2013). A coleção de linhagens transgênicas de amiRNAs pode também ser usada como um importante complemento de pesquisa.

Para todos os genes de arroz sem mutantes por inserção de T-DNA ou com fenótipo letal, linhas transgênicas de amiRNAs podem ser utilizadas para prover informações que não podem ser obtidas a partir de linhagens de mutantes insercionais únicas, sendo que uma das vantagens do método é a possibilidade de silenciamento com uma única construção de todos os genes de uma família ao mesmo tempo, geralmente aplicado a pequenas famílias gênicas, ou de múltiplos genes não homólogos (ZHANG et al, 2008).

Quanto ao uso de transformação química, JIANG e RAMACHANDRAN (2010) afirmam que não é difícil produzir uma população transformada quimicamente desde que muitas sementes possam ser utilizadas para tratamento com etilmetanosulfonato(EMS), sendo que, a dificuldade é detectar os polimorfismos ou substituições em nucleotídeos únicos nessas linhagens mutantes em larga escala.

Todas as formas de mutação já citadas podem contribuir para os estudos de genética funcional em arroz. ZHANG et al. (2008) propuseram um projeto de estudos de genômica funcional de arroz, no qual, entre seus objetivos, está o desenvolvimento de ferramentas eficazes e pesquisas genéticas para uma comunidade internacional de cientistas conduzir pesquisas de genômica funcional de arroz. Segundo ZHANG et al. (2008) esse objetivo será alcançado com a formação de (1) uma coleção de mutantes insercionais; (2) coleção de cDNA com sequência completa e (3) coleção de amiRNAs. Grande progresso tem sido alcançado no cumprimento da meta de uma inserção para cada gene.

Em estudos de caracterização funcional de genes primeiramente devem ser obtidas as plantas mutantes para o trabalho, e então devem ser desenhados experimentos onde as plantas sejam cultivadas em condições controladas e dêem comparação com plantas que não passaram por nenhum processo de transformação para a inativação dos genes, que são chamadas “*wildtype*” ou tipo selvagem. O uso de plantas “*wildtype*” é essencial como controle em experimentos para verificar a função de genes, pois possibilita uma comparação de características físicas e fisiológicas entre essas plantas e as mutantes, o que constitui uma caracterização fenotípica.

A mutação de uma planta para a inativação de genes específicos pode interferir ou modificar várias características fenotípicas. Vários parâmetros biológicos de interesse agrônomo são avaliados para realizar essa caracterização, entre eles: época de florescimento, comprimento do colmo, comprimento da panícula, número de panículas por perfilho, número de espiguetas por panícula, taxa de enchimento de grãos (%), número de grãos cheios, peso total do grão (g) e peso de 1000 grãos (g).

É essencial seguir abordagens sistemáticas principalmente para possibilitar o uso de todos os genes conhecidos na análise, relacionando o gene com as mudanças fenotípicas e, deste modo, eventualmente assinalar uma função biológica a cada gene (ZHANG et al, 2008).

Identificar genes associados a EUN pode contribuir para o desenvolvimento de variedades que consigam produzir satisfatoriamente em condições de baixa suplementação nitrogenada, o que pode resultar não só em uma diminuição dos custos com fertilizantes por parte dos produtores mas também pode contribuir para evitar problemas ambientais decorrentes de excesso de uso de fertilizantes.

O aumento da EUN é importante não só para grandes produtores mas também para agricultores familiares que têm seus cultivos instalados em solos de baixa fertilidade natural e, ao mesmo tempo, usam sistemas de plantio com baixo uso de fertilizantes. O aumento da qualidade nutricional do arroz, em termos de teor de proteína, é importante especialmente no que diz respeito à alimentação de populações de baixa renda, que tem nesse alimento uma importante fonte de proteína.

2.3. Uso do Processo de Transferência de T-DNA de *Agrobacterium* em Transformação de Plantas e sua Importância

O silenciamento gênico é uma ferramenta de extrema importância para caracterização funcional de genes e há várias formas de inativar genes em plantas. Segundo WANG et al. (2013) o estudo de funções gênicas através do uso de mutantes, que tiveram a estrutura do gene de interesse rompida ou sua expressão eliminada, é possível devido à existência de uma relação causal direta entre a sequência do gene e sua função biológica, o que influencia nas características fenotípicas dos indivíduos que passaram pelo processo de transformação.

Um das ferramentas mais utilizadas para provocar mutações em plantas é a inserção de fragmentos de DNA na sequência do gene de interesse, o que é possível pela transferência de um T-DNA, que é o segmento de um plasmídeo indutor de tumor de *Agrobacteriumtumefaciens*, conforme comentado anteriormente. Devido a efeitos causados pelos genes de virulência da bactéria quando introduzidos na planta hospedeira, basicamente ocorre a formação de tumores para a produção de opinas que são utilizadas como fonte de alimento pelas bactérias. Para o seu uso em engenharia genética, foi necessária a manipulação do T-DNA de forma a torná-lo desarmado, ou seja, sem os oncogenes, e ao mesmo tempo conservar a presença dos genes *vir* e extremidades do T-DNA, o que possibilita a transferência e replicação do plasmídeo (ANDRADE, 2003)

A capacidade de transferência de genes para plantas tem sido utilizada para desenvolver *Agrobacteriumtumefaciens* como um vetor para manipulação genética a partir da engenharia de fragmentos de DNA de interesse, que são primeiramente clonados na região T-DNA de “plasmídeos desarmados” e depois introduzidos em *Agrobacterium* e subsequentemente transferidos para as plantas (PITZSCHKE e HIRT, 2010)

Após a descoberta de que um T-DNA pode ser transferido a partir da *Agrobacterium* para células de plantas, iniciaram-se pesquisas para introdução de genes de interesse no T-DNA. No entanto, havia várias características que dificultaram esse trabalho, como o grande tamanho dos plasmídeos Ti e a existência de diversos sítios para endonucleases de restrição na região do T-DNA, o que levou ao desenvolvimento de diferentes estratégias de clonagem no intuito de resolver os problemas associados aos plasmídeos, entre elas o sistema binário de clonagem (GELVIN, 2003).

Segundo GELVIN (2003) a base molecular da transformação genética de células de plantas por *Agrobacterium* é a transferência e integração no genoma nuclear da planta de uma região do plasmídeo da bactéria de indução de tumor Ti, que carrega dois componentes necessários para a transformação genética: a região T-DNA e *vir*. A região *vir* codifica a maioria das proteínas bacterianas necessárias para processamento, transporte e importação do T-DNA para o núcleo da célula hospedeira e o T-DNA por sua vez não carrega nenhum sinal de direcionamento específico e não codifica qualquer proteína para transporte ou funções de integração (TZFIRA et al., 2004).

Genes de interesse são clonados entre as bordas, esquerda e direita, do T-DNA, que são sequências reconhecidas pela maquinaria de processamento do T-DNA. A *Agrobacterium* transfere o T-DNA com o gene de interesse. Ou seja, o mecanismo de transferência horizontal de genes mediado por *Agrobacterium*, único na natureza, constitui um

eficaz processo de engenharia genética que os biólogos vegetais, após caracterização do mecanismo de infecção, aproveitaram para a transferência de genes de interesse para as células vegetais (CANHOTO, 2010). GELVIN et al. (2003) já citavam que em alguns países desenvolvidos, um alto percentual de área com culturas economicamente importantes como milho, soja, algodão, canola, batata e tomate é de transgênicos e que um aumento no número dessas variedades transgênicas é ou será em breve gerada por transformação mediada por *Agrobacterium*, em oposição a transformação mediada por bombardeamento de partículas.

Considerando a eficiência de transformação global, avanços desde meados da década de 1980 no entendimento sobre o processo de transferência de DNA mediado por *Agrobacterium* tem levado a tremendos aumentos na eficiência e uso desse vetor de transformação, e entre esses avanços pode-se citar o uso dos vetores binários, que apresentam dois plasmídeos envolvidos em todo o processo de transformação, onde muitas das funções de transferência são retidas em um plasmídeo Ti modificado com o T-DNA removido enquanto o segundo vetor binário carrega o T-DNA (STEWART JR, 2008).

O uso do sistema de vetor binário revolucionou o uso de *Agrobacterium* para introdução de genes em plantas, pois permite que cientistas sem treinamento especializado em genética microbiana consigam manipular facilmente *Agrobacterium* e *E. coli* para criar plantas transgênicas, uma vez que os plasmídeos têm um tamanho menor e são fáceis de manipular (GELVIN et al., 2003).

Depois que a *Agrobacterium* é inoculada nos tecidos apropriados da planta a bactéria pode reconhecer o tecido alvo como um hospedeiro adequado, pois esses tecidos de planta feridos produzem acetoseringona, que ativa os genes de virulência da bactéria (*vir*) e iniciam a maquinaria de transferência de T-DNA (STEWART JR, 2008). Produtos de diferentes genes *vir* são responsáveis por: (1) excisão do T-DNA do plastídio primário, na forma de DNA de fita simples, (2) proteção do fragmento de DNA contra degradação no citossol da célula, (3) direcionamento do DNA para o núcleo celular da planta e (4) produção de um “*pilus*”, que serve como canal de passagem do DNA da bactéria para a planta (STEWART JR, 2008).

Portanto, uma das principais contribuições da *Agrobacterium* para a pesquisa de plantas tem sido o uso de T-DNA como agente mutagênico, permitindo não só facilitar estudos de caracterização de genes através do uso de mutantes como também facilitar a produção de bancos de mutantes, que são de extrema importância em trabalhos de identificação de genes de interesse agrônomo em espécies cultivadas.

2.4. A Importância das Leveduras para Estudos Genômicos

O organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* tem contribuído amplamente com o atual conhecimento sobre os genes eucarióticos, seus produtos e suas funções, sendo um organismo adequado para estudos de processos celulares básicos devido ao grande conhecimento adquirido ao longo de décadas de estudos sobre sua fisiologia, genética, funções moleculares e proteínas e, além disso, pode ser uma boa escolha para análise *in vivo* de proteínas de outros eucariotos (DURAND et al., 2012). Segundo MELL e BURGESS (2003) o uso de leveduras facilita análises de funções de genes e estudos de resolução de problemas genéticos devido ao seu curto tempo de geração e as características de seu genoma, como: (1) pequeno número e tamanho de genes, (2) alta densidade de genes, (3) poucos íntrons e regiões intergênicas, (4) baixa redundância genética no genoma e (5) a presença de diversos genes em leveduras que são relacionados evolutivamente e funcionalmente com genes de eucariotos superiores.

Segundo BOTSTEIN e FINK (2011) nos últimos 23 anos as leveduras, devido a serem os seres vivos que mais facilitam os estudos de relação genótipo/fenótipo em células eucarióticas, chegaram ao patamar de organismo pioneiro no estabelecimento de campos de

estudo inteiramente novos, como a “genômica funcional” e a “biologia de sistemas”, que permitem entender além das funções de genes e proteínas individualmente, pois revelam como eles interagem e trabalham juntos para determinar as propriedades de células e organismos vivos.

Segundo CASTRILLO e OLIVER (2011) a levedura *S. cerevisiae* além de ser um organismo de vida livre e com rápido crescimento sob condições de cultivo definidas, apresenta mecanismos moleculares, redes biológicas e organização subcelular conservados quando comparados aos demais eucariotos, o que faz dessa espécie um modelo adequado para estudos biológicos. Além de *S. cerevisiae* a levedura *Pichia pastoris* é considerada uma ferramenta valiosa para rendimento elevado de expressão heteróloga de várias proteínas, e é preferida quando comparada a *S. cerevisiae* devido a seus promotores fortemente regulados, fácil integração de DNA heterólogo em seus cromossomos e a sua capacidade de fazer modificações pós traducionais (YESILIRMAK e SAYERS, 2009).

Segundo BOTSTEIN e FINK (2011) o entendimento do papel de diversos genes pôde ser alcançado por mutações em leveduras, que são avaliadas em diversos ensaios biológicos, pois a facilidade de introduzir mutações nesses organismos viabiliza estudos funcionais dos genes e das características bioquímicas de seus produtos, levando à conexão entre genes e funções de suas proteínas nas células. Essa pode ser a maior contribuição das leveduras (como *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*) para a pesquisa científica.

A maioria das informações sobre funções de genes eucarióticos e suas interações é derivada de experimentos com leveduras, não só devido às vantagens da utilização desses organismos, mas também à possibilidade de realização de experimentos em escala genômica, que podem ter como objetivo a identificação de funções de proteínas e genes, podendo ser visualizadas em uma rede (BOTSTEIN e FINK, 2011).

O que influencia a escolha do hospedeiro a ser utilizado em sistemas heterólogos é o propósito do trabalho, que em geral é a produção em grande escala da proteína de interesse ou investigação funcional das características da proteína codificada por um gene clonado, sendo que *S. cerevisiae* é um bom sistema a ser escolhido para investigação funcional e tem sido extensivamente utilizada para caracterização bioquímica, eletrofisiológica e para complementação funcional de proteínas de membrana e proteínas de transporte de plantas (YESILIRMAK e SAYERS, 2009).

2.5. Uso de Leveduras em Experimentos de Complementação de Mutantes para Análise Funcional de Genes que Codificam para Transportadores de Aminoácidos

Nas diversas partes da planta, transportadores de aminoácidos são requeridos, por exemplo, para carregamento do floema em folhas, carregamento do xilema em raízes, transferência de aminoácidos entre os dois sistemas vasculares e para o descarregamento em sementes em desenvolvimento (OKUMOTO et al., 2002). Transportadores de aminoácidos foram identificados como membros de pelo menos cinco famílias de genes, mostrando diferentes localizações na planta e na célula, bem como, seletividades e afinidades distintas com variados aminoácidos (RENTSH et al., 2007).

Embora muito da pesquisa inicial sobre os aspectos moleculares do transporte de N orgânico tenha sido realizada usando *Arabidopsis thaliana*, alguns transportadores homólogos foram identificados e analisados em outros modelos ou plantas cultivadas, incluindo tomate, fava, mamona, ervilha, cevada e arroz (LIU e BUSH, 2006; TEGEDER e WEBER, 2006; WATERWORTH e BRAY, 2006; LUBKOWITZ, 2006).

A maioria dos transportadores de aminoácidos de plantas já caracterizados funcionalmente estão incluídos na superfamília ATF (Família de transportadores de aminoácido), sendo a subfamília aminoácido permease (AAP) a mais estudada. Entre os

diferentes genes de transportadores de aminoácidos identificados em *Arabidopsis* até agora, *AAP1* e *AAP2* foram os mais expressos em silículas em desenvolvimento, indicando um papel no abastecimento com nitrogênio orgânico das sementes em desenvolvimento, além disso, a sincronização da expressão de *AAP8* também indica um papel na suplementação de sementes com N orgânico (OKUMOTO et al., 2002). Em seus trabalhos, ZHANG et al. (2010) verificaram que mutantes por inserção de T-DNA mostraram um decréscimo no conteúdo de N das sementes e que o *AtAAP2* tem papel na translocação fonte-dreno de aminoácidos.

Transporte de alta afinidade para todos os aminoácidos disponíveis é um pré-requisito essencial para o desenvolvimento da semente, visto que o acúmulo de proteínas de reserva é precedido pela importação de aminoácidos (OKUMOTO et al., 2002). Segundo HIRNER et al. (1998), a expressão de transportadores de aminoácidos em sementes precedeu a expressão de proteínas de reserva em *Arabidopsis*. Os transportadores LHT1, AAP1 e AAP5 além da função de captar aminoácidos na raiz, estão envolvidos na redistribuição de aminoácidos em células do mesófilo (CHEN e BUSH, 1997; HIRNER et al., 2006), transporte de aminoácidos para o desenvolvimento e acúmulo de proteínas de reserva (FROMMER et al., 1993; KWART et al., 1993; FISCHER et al., 1995; HIRNER et al., 1998) e carregamento de aminoácidos no floema em folhas maduras (FISCHER et al., 1995).

A síntese de proteínas de reserva é dependente da disponibilidade de nitrogênio na semente. Desta maneira, o acúmulo de proteína pode ser controlado pela capacidade da própria semente em importar aminoácidos via transportadores específicos (ROLLESTECHECK et al., 2005).

Em arroz até o momento não foram caracterizados funcionalmente genes que codificam transportadores de aminoácidos. LU et al. (2012) identificaram 79 prováveis genes únicos de proteínas de transporte de aminoácidos expressos e verificaram, através de análises funcionais e de perfil de expressão em 13 mutantes por nocaute, que genes de transportadores de aminoácidos em arroz (*OsAATs*) podem apresentar diversos papéis na produção de biomassa, metabolismo de C e N e distribuição de N durante o desenvolvimento do arroz. Em estudos mais recentes ZHAO et al. (2012) identificaram um total de 85 genes AAT no genoma de arroz e os classificaram em 11 diferentes subfamílias com base em suas relações filogenéticas e composição de sequências.

ZHAO et al. (2012) identificaram que os genes *OsAAP6* (LOC_Os01g65670), *OsAAP8* (LOC_Os01g66010) e *OsAAP15* (LOC_Os12g08130) parecem desempenhar papel crítico para o transporte de nutrientes durante o desenvolvimento de sementes. O *OsAAP6* foi expresso principalmente em panículas em estágios iniciais do desenvolvimento e *OsAAP8* e *OsAAP15* foram predominantemente ou especificamente expressos nos feixes vasculares e parecem participar na absorção e transporte de aminoácidos a longa distância.

LU et al. (2012) também observaram que o gene LOC_Os01g65670, nomeado pelos autores como *OsAAT14*, apresentou expressão específica no endosperma e que o gene LOC_Os01g65660.1, nomeado como *OsAAT12*, mostrou padrão de expressão específico em sementes, sugerindo um papel desses genes na aquisição de aminoácidos por sementes em desenvolvimento. Além disso, esses autores também observaram mudanças significativas na produção, biomassa e conteúdo de C e N de mutantes *osaat5*, *osaat7*, *osaat24*, *osaat49* e *osaat60*, o que sugere importantes papéis dos respectivos genes para esses parâmetros, pelo menos no estágio de maturação.

Dentre os aminoácidos essenciais encontrados nas plantas a glutamina tem sido considerada de grande importância no uso de N, visto que é o primeiro a ser formado durante a assimilação primária de N e constitui a principal forma de N reduzido durante a remobilização, sendo o precursor de diversos aminoácidos e moléculas nitrogenadas. Além disso, os teores de glutamina nos tecidos das plantas afetam a expressão de genes e atividade de enzimas chave no processo de utilização desse nutriente. A glutamina sintetase (GS) é uma

enzima de grande importância para a EUN pelas plantas, principalmente por seu envolvimento na síntese de glutamina durante a assimilação, remobilização e reciclagem de nitrogênio. Estudos têm demonstrado que isoformas de GS citossólica (GS1) apresentam aumento de atividade no estágio reprodutivo do ciclo de desenvolvimento, estando envolvidas na remobilização de nitrogênio durante a senescência, e enfatizado um papel na produção de sementes em espécies de cultivo com grãos pequenos (SWARBRECK et al., 2011). Assim, torna-se importante identificar transportadores que tenham maior afinidade com esse aminoácido e sua ação em plantas no período reprodutivo do ciclo da cultura de arroz.

Sistemas de expressão heteróloga permitem a produção em larga escala de proteínas de plantas em microorganismos para estudar suas características bioquímicas e biofísicas (YESILIRMAK e SAYERS, 2009). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos organismos modelo de eucariotos mais utilizados para esse fim e tem sido útil para estudos sobre regulação da expressão de genes, vias de transdução de sinais, ciclo celular, metabolismo e outros processos biológicos.

Há muitos trabalhos nos quais leveduras mutantes foram utilizadas para caracterizar afinidade de transportadores por diferentes aminoácidos. As cepas de levedura 22Δ8AA (MATa, *ura3-1*, *gap1-1*, *put4-1*, *uga4-1*, *can1::HisG*, *lyp1/alp1::HisG*, *hip1::HisG*, *dip5::HisG*) (FISCHER et al., 2002) e JA248 (MATa *ura3Δ gap1Δ gnp1Δ agp1Δ*) (VELASCO et al., 2004) foram utilizadas em diversos trabalhos para verificar capacidade de transporte de aminoácidos específicos por diferentes transportadores. A cepa 22Δ8AA é incapaz de utilizar eficientemente como única fonte de N os aminoácidos arginina, aspartato, citrulina, ácido γ-aminobutírico, glutamato e prolina e a cepa JA248 é incapaz de utilizar glutamina eficientemente como única fonte de N no meio.

COUTURIER et al. (2010) verificaram, através do uso das linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* 22Δ8AA e JA248, que o *PtAAP11* é um transportador de aminoácidos de *Populus trichocarpa* de alta afinidade, mais particularmente para prolina, através de análises de complementação desse gene nas leveduras que foram posteriormente crescidas em meios com concentrações de 1, 3 e 6 mM de L-prolina, L-citrulina, L-aspartato, e L-glutamato, para a cepa 22Δ8AA, e 0,5, 1, 2 e 5 mM de glutamina, para a cepa JA248.

OKUMOTO et al. (2002) transformaram a cepa de levedura mutante 22Δ8AA com cDNA dos transportadores de *Arabidopsis* AAP1, AAP5, AAP6, AAP7, AAP8 e um vetor, pFL61, vazio como controle e cresceram os transformantes em diferentes meios com ausência de uracila e contendo 1, 3 e 6 mM dos aminoácidos aspartato, glutamato, prolina e citrulina como única fonte de N e caracterizaram o transportador AAP8 como um transportador universal, uma vez que possibilitou o crescimento de células sob glutamina, arginina, prolina e citrulina a 1 e 3 mM, com alta afinidade para aspartato e responsável por entrega de aminoácidos para sementes em desenvolvimento e o AAP6 como responsável por absorção de aminoácidos a partir do xilema com alta afinidade.

Em trabalhos posteriores OKUMOTO et al. (2004) transformaram cepas do mutantes 22Δ8AA com cDNA de *AtAAP3*, que é expresso no floema de raízes de *Arabidopsis*, e fizeram testes de crescimento em meio com 3mM de L-Prolina como única fonte de N, demonstrando que trata-se de um transportador funcional.

TAN et al. (2008) demonstraram através de trabalhos de complementação que o transportador *PvAAP1*, de *Phaseolus vulgaris*, além de transportar histidina regula o crescimento de leveduras mutantes 22Δ8AA em meio com aminoácidos ácidos (glutamato) e neutros (prolina, citrulina e GABA), indicando que esse transportador reconhece amplo espectro de aminoácidos. Esses autores também citaram que o *PvAAP1* apresenta similaridade com os AAPs de *Vicia faba* *VfAAP1* e *VfAAP3* e de *Medicago truncatula* *MtAAPc* e *MtAAPb*,

KOCH et al. (2003) demonstraram que o gene *StAAP1*, de *Solanum tuberosum* L., é um transportador funcional de aminoácidos para distribuição de nutrientes a longas distâncias nas

plantas através de complementação em cepas de levedura mutante JT16, a qual depende da absorção de histidina para o seu crescimento. Essa levedura foi utilizada em trabalhos anteriores para isolar transportadores funcionais de Arabidopsis (HSU et al., 1993; FROMMER et al., 1994; FROMMER et al., 1995; CHEN et al., 2001; DÜNDAR E BUSH, 2009; LADWIG et al., 2012).

Como visto, o uso de leveduras é de fundamental importância na caracterização de transportadores de aminoácidos em plantas, uma vez que permite o conhecimento sobre a afinidade do transportador pelos diferentes tipos de aminoácidos transportados nas plantas.

3. CAPÍTULO I

**SELEÇÃO E ESCOLHA DE GENES QUE CODIFICAM PARA
TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS E ESTUDO DA SUA
INFLUÊNCIA SOBRE A REMOBILIZAÇÃO DE N E ACÚMULO DE
PROTEÍNAS NOS GRÃOS EM PLANTAS DE ARROZ**

3.1. RESUMO

Os transportadores de aminoácidos são componentes essenciais para a remobilização de nitrogênio (N). O N é remobilizado a partir das folhas na forma de aminoácidos, que são carregados no floema para transporte de longa distância para os grãos. O objetivo deste estudo foi identificar genes de arroz associados à remobilização de N para os grãos e fazer a caracterização fenotípica de plantas mutantes para os genes escolhidos, além de verificar a influência da mutação sobre os parâmetros de produtividade, proteínas dos grãos e metabólitos nas plantas. A identificação de genes para o estudo foi realizada através de análises de filogenia e de perfil de expressão dos genes. A partir desses resultados foram selecionados os genes *OsAAP1* e *OsAAP18* para os estudos de caracterização de plantas mutantes. Para a caracterização fenotípica foi implantado um experimento em casa de vegetação da UFRRJ. Foram utilizadas plantas tipo selvagem e plantas mutantes da linhagem 3A-00581, mutante por T-DNA para o gene LOC_Os07g04180 (*OsAAP1*) e 4A-00262, mutante para o gene LOC_Os06g36210 (*OsAAP18*). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 4 (plantas x coletas) com quatro repetições. Foram realizadas quatro coletas durante o ciclo das plantas: no período do "emborrachamento", na antese, aos 10 dias depois da antese (DDA) e a última coleta ao final do ciclo. Foram analisados os teores de N total nas plantas e de proteínas nos grãos, parâmetros agronômicos, frações nitrogenadas e expressão de genes que codificam para transportadores de aminoácidos em plantas. Os resultados obtidos sugerem a provável participação dos genes *OsAAP1* e *OsAAP18* no transporte de aminoácidos para os grãos em desenvolvimento, sendo que *OsAAP18* afeta a produção de sementes férteis, podendo estar mais relacionado ao transporte de aminoácidos para a formação do embrião.

Palavras chave: Caracterização fenotípica. T-DNA. Parâmetros de produção.

3.2. ABSTRACT

The amino acid transporters are essential components for the nitrogen remobilization (N). N is remobilized from leaves as amino acids, which are loaded into the phloem for long distance transport to grains. The goal of this study was to identify rice genes associated with nitrogen remobilization to grains and perform the phenotypic characterization of mutant plants for this genes to investigate the influence of the mutation on productivity parameters, grains proteins and metabolites concentration in plants. The identification of genes for the study was performed using phylogenetic and expression analysis. Based on the results were selected for the study *OsAAP1* and *OsAAP18* genes. For phenotypic characterization was implemented an experiment in the UFRRJ greenhouse. Were used 3A-00581 mutant plants, insercional T-DNA mutant line for *OsAAP1* gene, 4A-00262, mutant line for gene *OsAAP18* and wild type plants. The experimental design was completely randomized in a factorial 3 x 4 (plants x harvest) with four replications. Four harvests were performed during the plant cycle: at "booting" period, at anthesis and 10DAA (days after anthesis). The last harvest was performed at the end of the cycle. Were analyzed the total N content in plants and grains, content of proteins en grains, agronomic parameters, soluble fractions and expression of genes. The results suggest a possible involvement of *OsAAP1* and *OsAAP18* genes in amino acid transport to developing grains. Furtherore, *OsAAP18* affects the production of fertile seeds, which may be related to the transport of amino acids for formation of embryo.

Key-words: Phenotypic characterization. T-DNA. Production parameters.

3.3. INTRODUÇÃO

O arroz é um cereal consumido por mais de 1/3 da população mundial e é parte significativa da ingestão diária de energia e proteína da população de menor poder aquisitivo. Sendo assim, o aumento conteúdo de proteína nos grãos (CPG) é um fator-chave para melhorar a qualidade nutricional do arroz (UFAZ et al., 2008). A produtividade dessa cultura geralmente é maior em sistema de produção inundado com grande uso de insumos, sobretudo de fertilizantes nitrogenados. O uso de grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados geralmente está associado a perdas significativas desse nutriente que, além de aumentar os custos de produção, causa problemas ambientais como contaminação de cursos d'água, lençol freático e emissão de gases de efeito estufa, como o óxido nítrico.

Portanto, é imperativa a busca por variedades cultivadas com maior eficiência de uso do nitrogênio (N), o que pode levar a uma redução do uso intensivo de fertilizantes, e também produzir grãos de maior valor nutricional, já que a proteína de reserva do arroz é de alto valor biológico, a glutelina.

Grande parte da Eficiência de Uso de N (EUN) está ligada à eficiência de remobilização de N (ERN) no período reprodutivo das culturas, incluindo o arroz. Estima-se que até 80% do N presente no grão dos cereais é proveniente do processo de remobilização. Portanto, é essencial a identificação e caracterização de genes-chave para a remobilização de nitrogênio durante o período reprodutivo das plantas.

Os transportadores de aminoácidos são componentes essenciais para a remobilização de nitrogênio. O N é remobilizado a partir das folhas na forma de aminoácidos, que são carregados para o floema para transporte de longa distância para as panículas, e posteriormente para os grãos. Recentemente foi demonstrado que o locus de características quantitativas (QTL) *qPCI*, que contém um putativo transportador de aminoácido OsAAP6, controla o CPG através da regulação da síntese e acúmulo de glutelinas, prolaminas, globulinas, albuminas e amido (PENG et al., 2014).

Em plantas de arroz, os transportadores de aminoácido codificados pelos genes *OsAAP1* (LOC_Os07g04180) e *OsAAP18* (LOC_Os06g36210) podem estar associados com funções de transporte de N orgânico durante a fase reprodutiva. A caracterização funcional desses transportadores poderá esclarecer o papel dessas proteínas no transporte de aminoácidos de órgãos fonte para grãos e sua importância para a ERN em plantas de arroz.

A elucidação das funções de OsAAP1 e OsAAP18 foi realizada através de estudos de complementação com leveduras mutantes (*Saccharomyces cerevisiae*), para determinar a especificidade por substrato, e através de estudos com plantas mutantes de arroz por inserção de T-DNA e plantas tipos selvagem para verificar as funções fisiológicas desses transportadores em plantas e seu papel na remobilização de N. Os resultados desta pesquisa podem contribuir com informações relevantes para programas de melhoramento que visam não só aumento de produção associado a uma maior eficiência de uso de N mas também a qualidade nutricional do arroz em termos de aumento de teor de proteína.

3.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1. Seleção de genes para o estudo

Como plantas de arroz apresentam uma grande variedade de transportadores de aminoácidos, com diferentes funções, iniciou-se o trabalho com a busca de genes que codificam transportadores que provavelmente teriam um maior envolvimento no processo de remobilização de N para a formação de grãos. Para isso, foram buscados prováveis ortólogos de genes já caracterizados como responsáveis pelo transporte de N para sementes em outras plantas (Tabela 1), como os de *Arabidopsis*, com destaque para os genes *AtAAP1* e *AtAAP8*. A identificação dos ortólogos dos genes de interesse para o estudo nas plantas de arroz foi realizada através da construção de árvores filogenéticas contendo os genes de *Arabidopsis* e sorgo e seus prováveis ortólogos em plantas de arroz.

Tabela 1. Genes de transportadores de aminoácidos de *Arabidopsis* e *Populus trichocarpa* utilizados como referência na busca de ortólogos para o estudo de identificação e caracterização de transportadores de aminoácido envolvidos em maior EUN em plantas de arroz.

Gene	Locus	Função do gene na planta (motivo pelo qual o gene foi escolhido para busca de ortólogos em arroz)	Referências
<i>AtAAP8</i>	At1g10010	<i>AtAAP8</i> tem papel importante no desenvolvimento inicial das sementes, suprimindo o crescimento do embrião e endosperma. Além disso, contribui para a formação do estoque de proteínas nas sementes. Em estudos de Schimidt et al., (2007) o conteúdo de aminoácidos totais em silículas de mutantes <i>aap8</i> de <i>Arabidopsis</i> foi reduzido cerca de 18% comparando com WT	SCHMIDT et al. (2007)
<i>AtAAP1</i>	At1g58360	Atua como o principal sistema de transporte de aminoácidos necessários para a biossíntese de proteínas de estoque durante o amadurecimento	SANDERS et al. (2009)
<i>AtAAP2</i>	At5g09220	Juntamente com o <i>AAP1</i> é o transportador de aminoácido mais expresso em silículas de <i>Arabidopsis</i> . Candidato envolvido na recuperação de aminoácidos liberados a partir da seiva do floema e na transferência xilema-floema ao longo das vias de carregamento de folhas para frutos	ZHANG et al. (2010)
<i>PtCAT10</i>		Transportador induzido durante a senescência em folhas de poplar juntamente com o <i>CAT11</i>	COUTURIER et al. (2010)
<i>PtCAT11</i>		Tem maior afinidade para o transporte de glutamina. Transportador induzido durante a senescência em folhas de poplar. Fortemente expresso em tecidos do floema.	COUTURIER et al. (2010)

Para assegurar que os genes podem estar envolvidos na remobilização em plantas de arroz foi realizada a análise do provável local de expressão e fase do ciclo da planta em que os genes são mais expressos nas bases de dados de experimentos de microarranjo GENEVESTIGATOR (<https://genevestigator.com/gv/>) e

RiceXpro(<http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>). Após a escolha dos genes, OsAAP1 e OsAAP18, foi realizado um experimento para confirmar sua expressão na época de remobilização de N em plantas de arroz. Para isso, foi implantado um experimento de verificação do perfil de expressão dos genes candidatos em plantas de arroz da variedade Piauí.

a)Análise filogenética

Para a construção das árvores filogenéticas, as seqüências de aminoácidos das proteínas codificadas foram identificadas, colocadas em forma de texto (formato fasta) e procuradas por “BLASTP e BLASTN” nos bancos de dados das diferentes espécies: banco de dados de *A. thaliana* (<http://www.arabidopsis.org/>), *Oryza sativa* (arroz) (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) e *Sorghum bicolor* (sorgo) (<http://genome.jgi-psf.org/Sorbi1/Sorbi1.home.html>). As seqüências de aminoácidos similares encontradas foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal-X e posteriormente importadas para o programa Molecular EvolutionaryGeneticsAnalysis (MEGA), versão 4.1 (TAMURA et al.,2007). As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando-se o método implementado no MEGA, *Neighbor-Joining* (NJ), com a opção de manipulação de falhas no alinhamento e com modelo de correção de Poisson para o cálculo de distância.

b)Análise de prováveis locais de expressão dos genes *OsAAP1* e *OsAAP18* em bancos de dados de experimentos de transcriptômica

Foram realizadas análises em duas plataformas de dados de experimentos com microarranjo, o GENEVESTIGATOR (<https://www.genevestigator.com/>) e a RiceXpro (<http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>). Os genes *OsAAP1* e *OsAAP18* foram buscados por pesquisa por cromossomo (*OsAAP1*-LOC_Os07g04180 e *OsAAP18* - LOC_Os06g36210)) nas bases de dados. O GENEVESTIGATOR contém dados de microarranjo com qualidade controlada e anotação provenientes de experimentos que contém tratamentos com patologia, nutrição de plantas, estresses abióticos e tratamentos com hormônios, além de apresentar dados de diferentes genótipos e análises espaciais ou temporais de expressão dos genes (ZIMMERMANN et al., 2008). O RiceXpro (SATO et al., 2010) é uma base de dados que contém informações referentes ao perfil de expressão de genes espaço-temporal em diferentes órgãos e tecidos e perfil de expressão contínua em folhas desde o transplante até à colheita de plantas de arroz cultivadas em condições naturais de campo. Segundo os autores, os dados incluídos na plataforma RiceXpro foram gerados por análises de expressão em microarranjos desenvolvidas por hibridização com o “rice 4x44 *Microarray RAP-DB*(Agilent Technologies, USA;G2519F#15241),” utilizando-se o Agilent Gene Expression Hybridization kit[®].

c) Confirmação de expressão de *OsAAP1* e *OsAAP18* em plantas de arroz da variedade Piauí

Sementes da variedade de arroz Piauí foram semeadas em vasos plásticos com capacidade de 10 litros que receberam 8 kg de terra fina seca ao ar (TFSA). A umidade do solo foi mantida entre 80 a 90% da capacidade de campo. Foi utilizada terra do horizonte A de um Chernossolo (0-20 cm), que foi peneirada, em peneira de 2mm. As plantas receberam adubação nitrogenada equivalente a 60 kg ha⁻¹ de N na forma de (NH₄)₂SO₄. As doses de outros nutrientes necessários ao desenvolvimento das plantas, como P e K, foram determinadas de acordo com análise de solo, seguindo as recomendações para atender as necessidades da cultura. Foram realizadas coletas aos 15 dias antes do emborrachamento (DAE), no emborrachamento, na antese e aos 7 e 15 dias depois da antese (DDA). Amostras de folhas e panículas foram retiradas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e armazenadas a -80°C. O RNA foi extraído e análises de expressão por RT-PCR foram realizadas. Foram realizadas ainda análises de atividade da enzima nitrato redutase (NR)

durante as coletas realizadas no emborrachamento, na antese e após antese, segundo JAWORSKI (1971), e deatividade proteolítica durante a coleta realizada aos 7 DDA. Amostras de material coletado foram homogeneizadas em etanol 80%, e após partição com clorofórmio (FERNANDES, 1984), a fração solúvel obtida foi utilizada para a determinação dos teores de N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955), N-NO₃⁻ (CATALDO et al., 1975) e açúcares solúveis (YEMM & WILLIS, 1957).

d) Extração do RNA

O RNA total foi extraído utilizando tampão NTES (0,2 M Tris-Cl pH 8,0; 25 mM EDTA; 0,3 M NaCl; 2% SDS). As amostras foram maceradas em líquido e homogeneizadas em uma mistura contendo 1 mL de tampão NTES e 700 µL de solução fenol:clorofórmio (1:1). Após centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O RNA total foi precipitado pela adição de 1/10 volume de 2 M acetato de sódio pH 4,8 (NaOAc_{DEPC}) e 1 volume de isopropanol puro gelado. A seguir a mistura foi mantida a -80 °C por 1 hora seguida de centrifugação a 12.000 x g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi solubilizado em 0,5 mL de H₂O_{DEPC} e precipitado novamente pela adição de 0,5 mL de 4 M cloreto de lítio (LiCl_{DEPC}). Após centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 70% e dissolvido em 30 µL de H₂O_{DEPC}. A qualidade do RNA extraído foi verificada espectrofotometricamente utilizando-se o NanoDrop 2000c spectrophotometer (ThermoScientific) por meio das relações A₂₆₀/A₂₃₀ e A₂₆₀/A₂₈₀ e posteriormente por visualização em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio.

e) Quantificação do RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi quantificado em duplicata no espectrofotômetro NanoDrop 2000c (ThermoScientific). Três microgramas de RNA total foram tratados com DNase (DNase I Amplification Grade – SigmaAldrich™) seguindo as instruções do fabricante. Para isso, três microgramas de RNA foram misturados com 3 µL do tampão de reação da DNase I 10X, 3 µL da DNase I num volume total de 30 µL. A reação foi conduzida a 25°C por 15 minutos, seguida da adição de 3 µL de EDTA 50mM e posterior inativação da DNase I a 65°C por 10 minutos. Após a digestão com DNase a qualidade do RNA e a presença de DNA nas amostras foi verificada através de eletroforese em gel de agarose. A reação de síntese do cDNA foi realizada com o kit “TaqMan® Reverse Transcription Reagents” (Applied Biosystem) seguindo as instruções do fabricante.

f) PCR em tempo real

As análises de RT-PCR semi-quantitativa em tempo real foram realizadas utilizando iniciadores (“*primers*”) específicos para os genes estudados (Tabela 2). Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa Primer Express 3.0. A especificidade de cada *primer* foi analisada por alinhamento das seqüências no banco de dados (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e experimentalmente no fim da reação de PCR durante a curva de desnaturação (*melting*). As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, utilizando o kit “SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. A 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 e finalmente a “curva de *melting*” com aumento de temperatura de 0,3°C, de 60°C até 95°C, para verificar a especificidade da reação.

O gene da actina 11 foi utilizado como controle endógeno para o cálculo da expressão gênica relativa (JAIN et al., 2006).

Tabela 2. Iniciadores (primers) utilizados no experimento de perfil de expressão dos transportadores de aminoácidos.

Família AAP			
Gene	Foward Primer	Reverse Primer	Transportador
LOC_Os06g36210.1	CGGCTATCAACAAGTCCAAGTCTG	GATGTAGGCGCTCGTGTCTG	OsAAP1
LOC_Os03g25869.1	CGGAGGCGTGGGAGAAC	TTGAGATTCTCACAAGCTTCGT	OsAAP2
LOC_Os03g37984.1	TGGGCACTATGTTTCCTGAGAA	GGCCCAAGGGCTGAAGAG	OsAAP3
LOC_Os06g36180.1	GCTTGCGCGAACAATATCAG	CCAACCTCAACGCCAGTCA	OsAAP4
LOC_Os01g66010	GCGTCGCCGAGGTCTTC	TGGAGAGCCAGGAGATCTGATC	OsAAP5
LOC_Os03g37984	CAATGCTGGTTGGGTTTCGT	CACCGTCTCTTCTCCACGTACA	OsAAP6
LOC_Os07g04180	CACGACGCAGCTGCTT	TTGGATGCCAGCAAATATGATC	OsAAP7
LOC_Os12g42850	CAAACAGGATGGGTCGGCTAT	CCGTTCCGCCCCATAAGG	OsAAP8
Família CAT			
Gene	Foward Primer	Reverse Primer	Transportador
LOC_Os11g05690	TCGACGTGCTGCTCAACCT	CGTTGGCGACCATGTAGAAGA	OsCAT1
LOC_Os12g06060	TGCACGTGTGTTTCATCATGTT	CGTCAGATTCCGGGTGTCA	OsCAT2

3.4.2. Obtenção de plantas de arroz mutantes para estudos dos genes selecionados a partir das análises de filogenia e caracterização de expressão

Após pesquisa em bancos de dados de mutantes de arroz foram encontradas sementes de plantas mutantes formadas a partir de inserção de T-DNA nos genes *OsAAP1* (LOC_Os07g04180) e *OsAAP18* (LOC_Os06g36210), que foram escolhidos para o experimento.

Foram utilizadas as linhagens mutantes 4A-00262 para as plantas *osaap1* e 3A-00581 para as plantas *osaap18*, ambas da variedade Dong Jin que receberam o vetor pGA2715 (Figura 1), construídas como descrito por JEON et al. (2000). Plantas tipo selvagem da variedade Dong Jin foram utilizadas como controle nos experimentos.

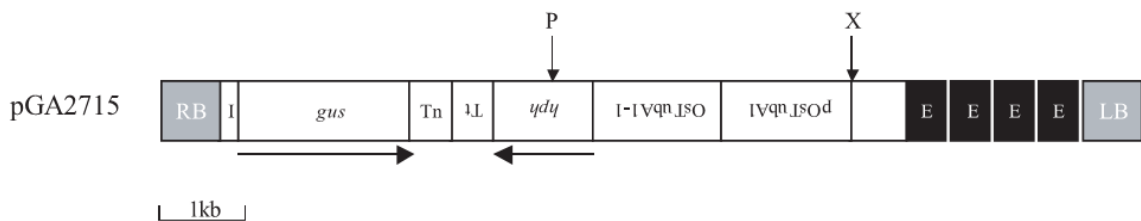


Figura 1. Mapa da região T-DNA do vetor pGA2715. As barras em cinza, RB e LB, representam, respectivamente, as bordas direita e esquerda do vetor. I, representa o intron2 de *OsTubA1* carregando 3 putativos sítios aceptores e doadores de “*splicing*”; Tn representa o terminador; Tt representa o terminador *OsTubA1*; hph representa o gene de higromicinafosfotransferase; *OsTubA1-1* representa o primeiro íntron de *OsTubA1*; E, representa o elemento “*enhancer*” do promotor CaMV 35S; P representa o sítio de corte de PstI e X o sítio de corte de XhoI (JEONG et al., 2002).

Foram adquiridas sementes de plantas mutantes para diversos transportadores de aminoácidos (Tabela 3), no entanto, para este experimento, foram utilizadas somente as referentes à mutação para *OsAAP1* e *OsAAP18*, por terem sido os genes selecionados para o estudo. Foram cultivadas 10 plantas para cada mutante obtido a partir dos bancos de mutantes, ou seja, para cada gene a ser avaliado e 10 plantas tipo selvagem (wildtype) da variedade

Dong Jin (Tabela 3). A partir desse cultivo cada planta foi considerada como uma linhagem isolada.

Para a confirmação da inserção do T-DNA nas linhagens mutantes foram realizadas análises por PCR, com verificação dos produtos em gel de agarose a 1%, para confirmar a presença ou ausência do gene *HPTII(hph)* nas plantas. Esse gene é um marcador que confere resistência a higromicina e está presente nas plantas que receberam a construção (Figura 1).

Além das reações de PCR, foi realizado um teste de resistência a higromicina com folhas bandeira das plantas a serem confirmadas como mutantes. Para isso, foi retirado o terço médio de uma folha bandeira para cada planta a ser testada. Três fragmentos de 2cm de comprimento de cada terço médio foram colocados em placas de petri contendo solução contendo 50µgmL⁻¹ de higromicina e 1mgL⁻¹ de 6 benzilaminopurina (BAP). As placas foram colocadas em câmara para germinação (BOD) com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 28°C durante 7 dias. Após o período do teste, as plantas cujos fragmentos de folhas apresentaram necrose foram caracterizadas como suscetíveis à higromicina e, portanto, não transformadas. As plantas que não apresentaram necrose nas folhas foram caracterizadas como resistentes. As plantas tipo selvagem foram utilizadas como controle no teste. Sementes das plantas que apresentaram resultado positivo para a mutação nos dois testes realizados foram cultivadas para a multiplicação e realização de teste de segregação. Foram utilizadas nos experimentos plantas advindas de resultados positivos em teste de segregação, apresentando relação 3:1.

Tabela 3. Identificação das plantas independentes para produção de sementes a partir das linhagens mutantes. Mutantes para os genes *OsAAP1* e *OsAAP18* estão destacados em negrito.

Planta	Gene onde houve a inserção	Numeração das linhagens isoladas
Wild Type (variedade Dong Jin)	-	1 a 10
Wild Type (variedade HY)	-	11 a 20
4A-00262	<i>OsAAP1</i>	21 a 30
1E-00233	<i>OsAAP8</i>	31 a 40
4A-00169	<i>OsAAP3</i>	41 a 48
3A – 05042	<i>OsAAP3</i>	49 a 56
3D-50363	<i>OsAAP1</i>	57 a 60
3A-00581	<i>OsAAP18</i>	61 a 70
3A-60443	<i>OsAAP6</i>	71 a 79
2C-40557	<i>OsAAP18</i>	80 a 87

Apesar da existência de duas linhagens mutantes para cada gene, *OsAAP1* e *OsAAP18*, foram utilizadas somente as plantas das linhagens 4A-00262 para estudos com o gene *OsAAP1* e 3A-00581 para o gene *OsAAP18* uma vez que mesmo após três tentativas de multiplicação de sementes para as linhagens 3D-50363 e 2C-40557 não foi possível obter número de sementes suficiente para utilização em experimentos. Isso pode ter sido resultado da mutação, uma vez que as plantas produziram espiguetas em sua maioria vazias (chochas) durante os plantios realizados no verão. Em cultivos realizados no inverno não foi possível a produção de sementes para nenhuma das linhagens, provavelmente devido a problemas

relacionados ao fotoperíodo, uma vez que essas plantas são adaptadas a cultivos em condições de dias longos.

3.4.3. Caracterização fenotípica e análises metabólicas e de expressão em plantas mutantes *Osaap1* e *Osaap18*

Foi realizado um experimento para caracterização fenotípica das plantas mutantes 3A-00581, mutante por T-DNA para o gene LOC_Os07g04180 (*OsAAP1*), e 4A-00262, mutante para o gene LOC_Os0636210 (*OsAAP18*). Plantas das linhagens 4A-00262, 3A-00581 e tipo selvagem foram germinadas em água em câmara de crescimento. Após germinação as plantas foram transferidas para potes (com capacidade de 700mL) com solução nutritiva de HOAGLAND & ARNON (1950) modificada contendo 2mM de N a ¼ de força iônica (FI). Após três dias as plantas foram transferidas para a solução na mesma concentração a ½ de FI. As plantas permaneceram nos potes por três semanas para a realização do teste de higromicina para confirmar a mutação e separar as plantas a serem utilizadas no experimento.

O teste de resistência à higromicina foi realizado diretamente nas folhas das plantas, para evitar o corte dos tecidos. Para isso, foram aplicados 2µL de uma solução contendo higromicina (100x) com 0,05% de Tween 20 diretamente no limbo da folha mais jovem (primeira folha). Como a higromicina é sensível a luz, o local de aplicação foi coberto com folha de alumínio. Após sete dias foram consideradas sensíveis as plantas que apresentaram necrose no local da aplicação. Após confirmação pelo teste de higromicina foram separadas plantas das linhagens mutantes confirmadas como resistentes e tipo selvagem para implantação do experimento.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 4 (plantas x coletas) com 4 repetições (Figura 2). Foi utilizada terra do horizonte A de um Chernossolo (0-20 cm), previamente peneirada, em malha de 2mm. Foram utilizados vasos plásticos com capacidade de 10 litros que receberam 8 kg de TFSA. A umidade do solo foi mantida entre 80 a 90% da capacidade de campo.

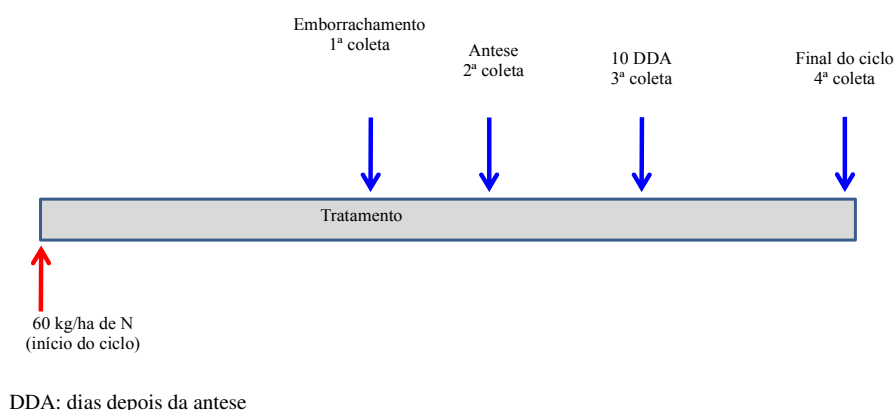


Figura 2. Delineamento experimental utilizado para caracterização fenotípica de plantas mutantes.

Foram cultivadas duas plantas por vaso. As plantas receberam adubação nitrogenada na dose de 60 kg ha⁻¹ de N na forma de (NH₄)₂SO₄. As doses de outros nutrientes necessários ao desenvolvimento das plantas, como P e K, assim como as doses de N necessárias para compor os tratamentos foram determinadas de acordo com análise de solo, seguindo as recomendações para atender as necessidades da cultura.

Foram feitas quatro coletas no ciclo das plantas: no período do "emborrachamento", na antese, aos 10 dias depois da antese (DDA) e a última coleta ao final do ciclo. As plantas foram separadas em folhas, bainha e panículas e foram retiradas amostras para análise de expressão gênica e teores de frações solúveis em todas as coletas, com exceção da última, que foi realizado ao final do ciclo da cultura, devido as plantas encontrarem-se secas nessa época. Na última coleta, foram analisados os teores de N total nas plantas e de proteínas nos grãos. Os parâmetros agrônômicos: altura das plantas, produção de massa, número de perfilhos, número e peso de panículas, número de espiguetas por panícula, número de grãos cheios e chochos, peso total de grãos (g), peso de grãos cheios e peso de 100 grãos (g).

a) Extração de RNA total, síntese de cDNA e análise de expressão gênica

Foi avaliada a expressão dos genes que codificam transportadores de aminoácidos em arroz *OsAAP1* (LOC_Os07g04180), *OsAAP2* (LOC_Os03g25869), *OsAAP3* (LOC_Os03g37984), *OsAAP6* (LOC_Os01g65670) e *OsAAP18* (LOC_Os06g36210) nas folhas bandeira, folhas superiores, colmo, ráquis e grãos das plantas mutantes *Osaap1e* *Osaap18e* da planta tipo selvagem. Foram utilizadas amostras das coletas realizadas antes da antese, na antese e aos 15 DDA. Essa análise foi realizada para confirmar a redução dos níveis de expressão dos genes *OsAAP1* e *OsAAP18* nos seus respectivos mutantes e verificar se haveria aumento de expressão de outros genes que codificam para transportadores de aminoácidos nos mutantes.

A extração de RNA e síntese de cDNA foram realizadas conforme descrito nos subitens d) e e) do item 3.4.1.

Para realizar a RT-PCR semi-quantitativa em tempo real foram usados *primers* para os genes controle do fator de alongamento em arroz (*eEF1- α*) e actina (*ACT11*) desenhados por JAIN et al. (2006) (Tabela 4). Os *primers* para os demais genes foram desenhados com o programa Primer Express 3.0 (Tabela 4). A especificidade de cada *primer* foi analisada por alinhamento das seqüências no banco de dados *Genbank* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e experimentalmente no fim da reação de PCR durante a curva de *melting*. Todos os *primers* se mostraram específicos para os genes analisados.

Tabela 4. Iniciadores (*primers*) *forward* e *reverse* para análises por PCR em tempo real dos genes das isoformas de glutamina sintetase citossólica (*OsGS1.1* e *1.3*) e plastidial (*OSGS2*) de arroz e genes controle da actina 11 (*OsActin11*) e fator de alongamento (*eEF-1 α*).

Gene	Proteína	“Forward primer”	“Reverse primer”
OseEF (JAIN et al., 2006)	Fator de alongamento	5'-TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT-3'	5'-GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA-3'
<i>OsAAP6</i>	AAP6	5'TGCTCATCGAGATCCAGGACA3'	5'CGATCGACACGTAGAAGACGGT3'
<i>OsAAP1</i>	AAP1	5'TTGGTGACATTGCCTTTGCA3'	5'CGCCTTCTTCATCACCTCGTT3'
<i>OsAAP18</i>	AAP18	5'AGACCAGGTCTGATTTCGACCT3'	5'AAGCTGCACCTCAGAGAGTCCA3'
OsActin11 (JAIN et al., 2006)	Actina	5'CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGA3'	5'CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA'
<i>OsAAP2</i>	AAP2	5'CGGAGGCGTGGGAGAAC3'	5'TTGAGATTCTCACAAGCTTCGT3'
<i>OsAAP3</i>	AAP3	5'TGGGCACTATGTTTCTGAGAA3'	5'GGCCCAAGGGCTGAAGAG3'
<i>OsAAP7</i>	AAP7	5'CACGACGCAGCCTGCTT3'	5'TTGATGCCAGCAAATATGATC3'

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, utilizando o kit “SYBR[®] Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. A 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 e finalmente a “curva de dissociação (*melting*) com aumento de temperatura de 0,3°C, de 60°C até 95°C, para verificar a especificidade da reação. Os genes da actina 11 e fator de alongamento foram utilizados como controle endógeno para o cálculo da expressão gênica relativa. Os cálculos de expressão foram feitos de acordo com LIVAK & SCHMITTGEN (2001) adotando as folhas superiores das plantas tipo selvagem como controle.

b) Análise de frações solúveis

As amostras de folhas, bainha e panículas coletadas antes da antese, na antese e após a antese foram acondicionadas a 4°C em frascos contendo 20 mL de etanol 80%. Posteriormente essas amostras foram homogeneizadas e trituradas utilizando um triturador de tecidos, filtradas em quatro camadas de gaze e papel filtro e transferidas para funil de separação, onde foi adicionado volume de clorofórmio igual ao da solução alcoólica para a separação das fases apolar e polar (FERNANDES, 1984). A fase polar (fração solúvel) foi avolumada para 25 mL e utilizada para as análises de N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955), N-NH₄⁺ (FELKER, 1977), N-NO₃⁻ (MIRANDA et al., 2001) e açúcares solúveis (YEMM & WILLIS, 1957).

c) Análise de N e proteína total

O material vegetal coletado foi pesado e seco a 65°C em estufa de ventilação forçada por 72h para obtenção da massa seca das folhas, colmo e panículas. A massa seca total foi obtida a partir da soma das partes. Após secagem o material foi triturado e pesado para avaliação de N-total segundo TEDESCO et al. (1998). O N-total nos grãos foi multiplicado por 5,95 para determinação do teor de proteína (JULIANO, 1985).

Com os resultados de N-total nas diferentes partes da planta calculou-se a remobilização de N para os grãos (N-total da parte aérea na antese – N-total da palha no final do ciclo). Não foi determinado o teor de N-total das raízes devido a dificuldade de limpeza do material para evitar contaminação com solo.

3.4.4. Análises estatísticas

Os resultados das diferentes linhagens independentes foram analisados separadamente e comparados com as plantas controle (tipo selvagem) por análise de variância utilizando o programa SAEG (UFV, 2000). Os efeitos das variáveis foram verificados pelo teste F (5% de probabilidade). Quando houve diferenças significativas reveladas pela ANOVA, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

mutantes de *Arabidopsis AtAAP8* tanto em linhagens insercionais por T-DNA quanto por RNAi. Os autores observaram ainda, que o gene *AtAAP8* (At1g10010) tem papel crucial no transporte de aminoácidos para o endosperma das sementes e para o embrião no início da embriogênese. No entanto, apesar de *AtAAP1* e *AtAAP8* estarem associados à importação de aminoácidos para o endosperma e embrião, esses dois transportadores apresentam função distinta, uma vez que diferem na afinidade por substrato (aminoácidos transportados) e local e época de expressão.

Apesar do genoma de arroz e *Arabidopsis* serem pouco relacionados, a proximidade de *OsAAP1* e *OsAAP18* com os genes envolvidos na remobilização de N para grãos em *Arabidopsis* fornece evidências de provável envolvimento desses genes em processos de remobilização em arroz, podendo apresentar funções semelhantes às dos genes de *Arabidopsis*, constituindo-se assim prováveis ortólogos. A análise filogenética também mostrou uma similaridade entre os genes *AtAAP1*, *AtAAP8* e o gene de arroz Os06g12330 (Figura 3), no entanto, esse gene não foi considerado para análise nesta pesquisa, devido a falta de mutantes.

3.5.2. Prováveis locais e épocas de expressão dos genes *OsAAP1* e *OsAAP18* determinados nas plataformas Genevestigator e RiceXpro

De acordo com as análises realizadas no Genevestigator observou-se que o gene *OsAAP1* tem aumento de expressão na fase reprodutiva das plantas de arroz, em especial após a antese, nas fases de grão leitoso e duro (Figura 4), apresentando uma queda da expressão no estágio de alongamento do colmo. Ainda de acordo com o Genevestigator, esse gene apresenta expressão de média a alta em grande parte dos tecidos de plantas de arroz (Figura 5).

Através de análises no RiceXpro, observa-se que *OsAAP1* é expresso durante a fase inicial de desenvolvimento dos grãos, com maior expressão nos dois primeiros dias após o florescimento, durante a formação do ovário e aos 6,7 e 8 dias após florescimento, durante o período de desenvolvimento do embrião (Figura 6). A expressão de *OsAAP1* é verificada também nos diferentes órgãos reprodutivos: inflorescências, antera, pistilo, pálea e lema (Figura 7). Durante a fase de enchimento de grãos, quando ocorre a formação do endosperma, observou-se maiores valores de expressão no embrião aos 10 dias após florescimento (Figura 8).

Esses resultados estão de acordo com a análise de expressão em tecidos realizadas por LU et al. (2012), que verificaram que o gene *OsAAP1* é altamente expresso em sementes após a germinação e no endosperma de grãos de arroz e que esse gene pode ter importante papel na produção de grãos, produção de biomassa e metabolismo e distribuição de C e N em plantas de arroz, uma vez que mutantes *Osaap1* utilizados no trabalho apresentaram alterações na produção de biomassa e conteúdo de C e N. ZHAO et al. (2012) também detectaram expressão de *OsAAP1* em panículas. O perfil de expressão ao longo do ciclo de desenvolvimento das plantas e os locais indicam provável participação de *OsAAP1* na remobilização de N para os grãos, em especial para a formação de embrião e enchimento dos grãos, funções desenvolvidas pelo gene *AAP1* em *Arabidopsis* (SANDERS et al., 2009).

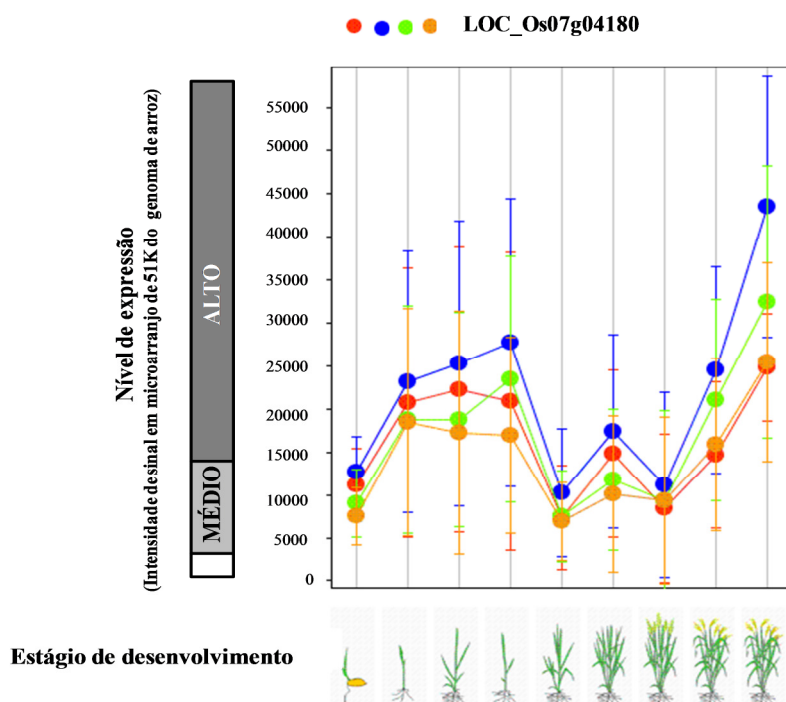


Figura 4. Níveis de expressão do gene *OsAAP1* ao longo do ciclo de desenvolvimento das plantas conforme a plataforma GENEVESTIGATOR. Cículos de diferentes cores indicam dados de expressão para o mesmo gene inseridos na plataforma.

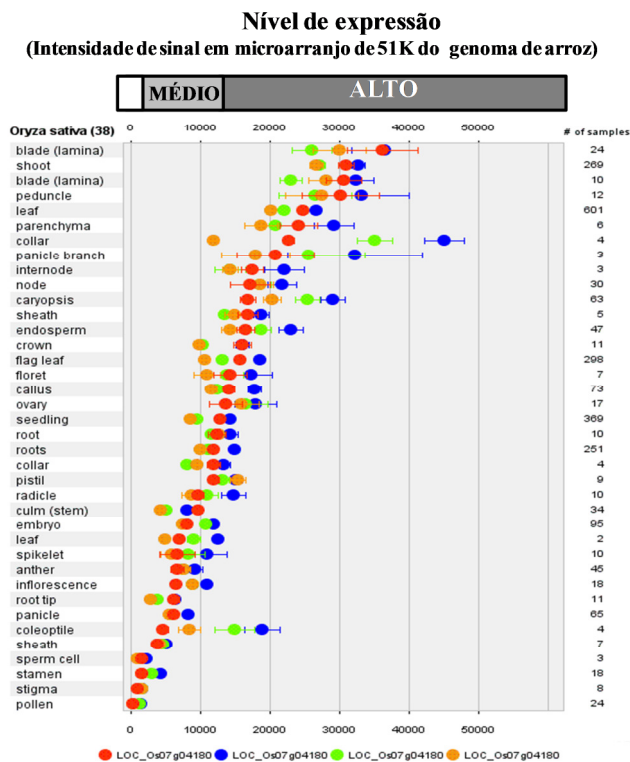


Figura 5. Níveis de expressão do gene *OsAAP1* em diferentes tecidos das plantas conforme a plataforma GENEVESTIGATOR. Cículos de diferentes cores indicam dados de expressão para o mesmo gene inseridos na plataforma.

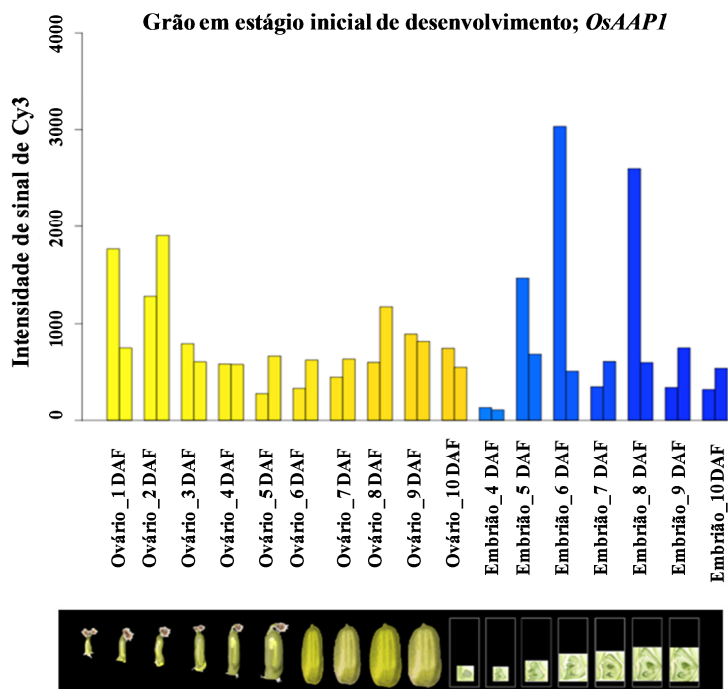


Figura 6. Níveis de expressão do gene *OsAAP1* no ovário e embrião durante o período inicial de desenvolvimento dos grãos, em diferentes dias após florescimento (DAF), conforme plataforma RiceXpro. Agrupamentos de barras de cores repetidas indicam repetições de dados de expressão para o mesmo gene inseridos na plataforma.

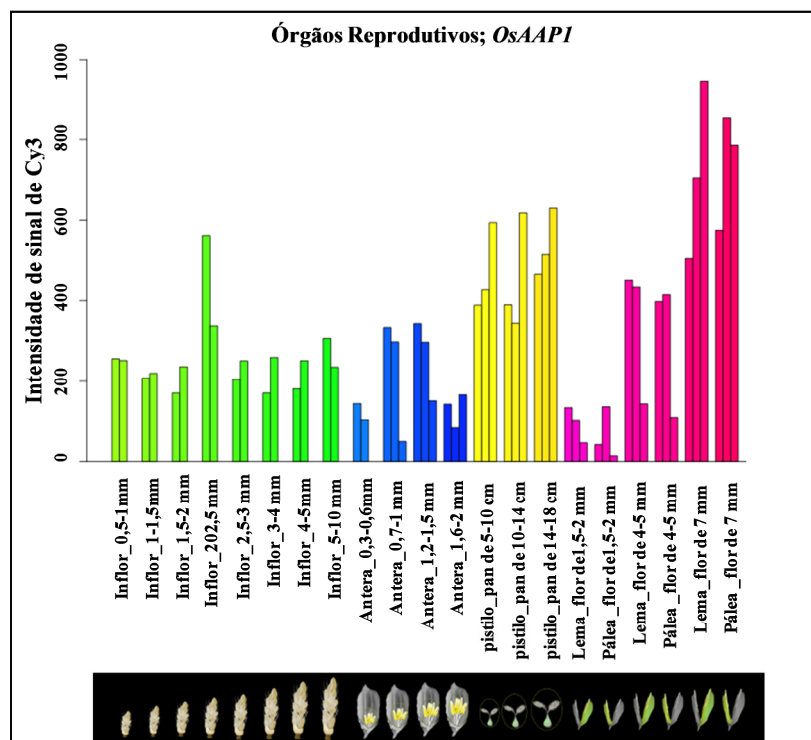


Figura 7. Níveis de expressão do gene *OsAAP1* nas inflorescências (Inflor), anteras, páleas, lemas e pistilos coletados de panículas (pan) de diferentes tamanhos em plantas na

plataforma RiceXpro. Agrupamentos de barras de cores repetidas indicam repetições de dados de expressão para o mesmo gene inseridos na plataforma.

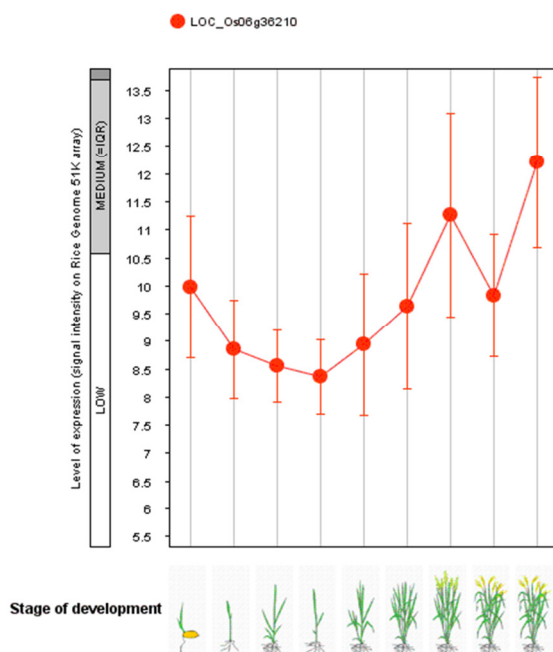


Figura 8. Níveis de expressão do gene *OsAAP1* nos embriões e endospermas durante o período de enchimento dos grãos de arroz, em diferentes dias após florescimento (DAF), na plataforma RiceXpro. Agrupamentos de barras de cores repetidas indicam repetições de dados de expressão para o mesmo gene inseridos na plataforma.

De acordo com análises realizadas no Genevestigator os maiores níveis de expressão do gene *OsAAP18* ao longo do ciclo da planta ocorrem no período reprodutivo, com picos na antese e na fase de grão farináceo (Figura 9). Foram observados também níveis de expressão média a alta nos órgãos reprodutivos das plantas de arroz para o gene *OsAAP18*, com destaque para a antera, pólen, estame, embrião e endosperma (Figura 10).

Em análises no RiceXpro verifica-se alta expressão de *OsAAP18* no embrião no período de 4 a 10 dias após florescimento e durante o período de formação desse órgão (Figura 11). Diferente do observado para *OsAAP1*, o gene *OsAAP18* é pouco expresso no ovário durante o desenvolvimento inicial dos grãos, de 1 a 4 dias após florescimento (Figura 11). Quanto aos órgãos reprodutivos, *OsAAP18* apresenta alta expressão somente nas anteras (Figura 12), diferente de *OsAAP1*, que apresentou expressão em todos os órgãos. *OsAAP18* também apresenta comportamento distinto de *OsAAP1* durante o período de enchimento dos grãos, apresentando baixa expressão no endosperma (Figura 13). LU et al. (2012) verificaram alta expressão de *OsAAP18* em estames durante o florescimento e sementes após germinação. ZHAO et al. (2012) verificaram alta expressão de *OsAAP18* em panículas com 22 a 30 cm de comprimento.

Esses resultados indicam um provável maior envolvimento do *OsAAP18* no transporte de aminoácidos para a formação e manutenção de órgãos reprodutivos, e menor participação na formação do endosperma, diferindo do *OsAAP1*.

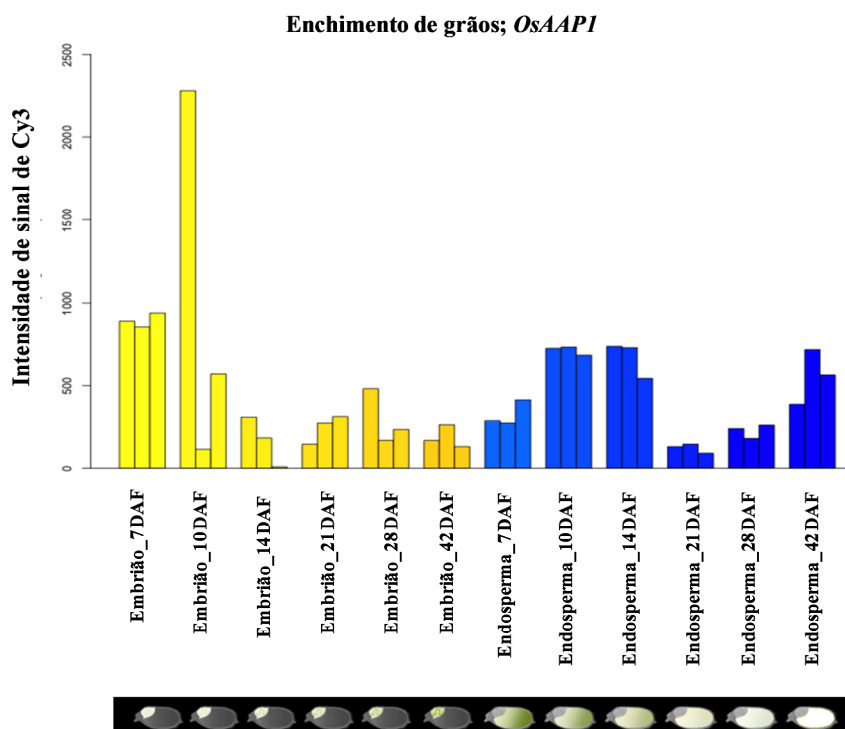


Figura 9. Níveis de expressão do gene *OsAAP18* ao longo do ciclo de desenvolvimento das plantas conforme a plataforma GENEVESTIGATOR.

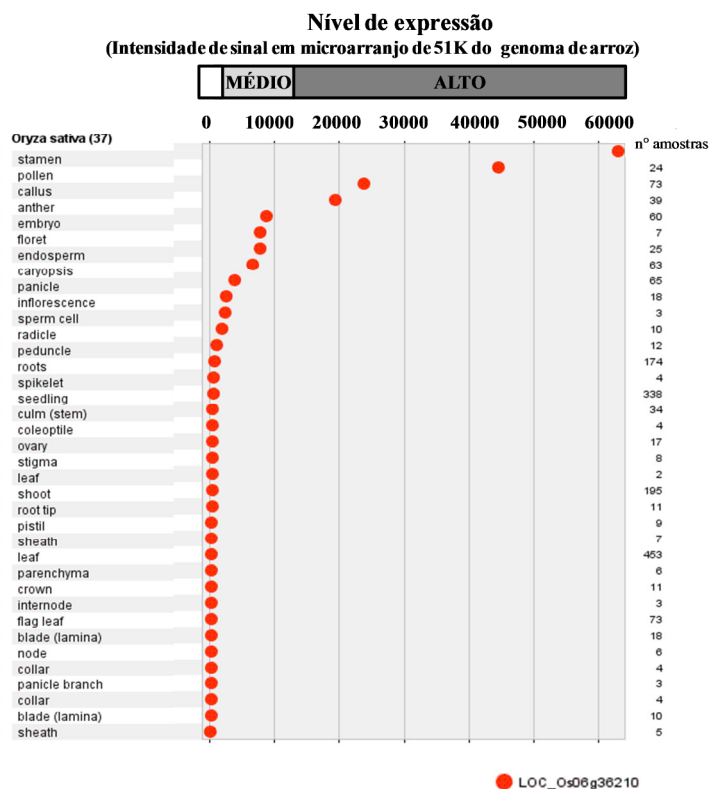


Figura 10. Níveis de expressão do gene *OsAAP18* nos diferentes tecidos das plantas conforme a plataforma GENEVESTIGATOR.

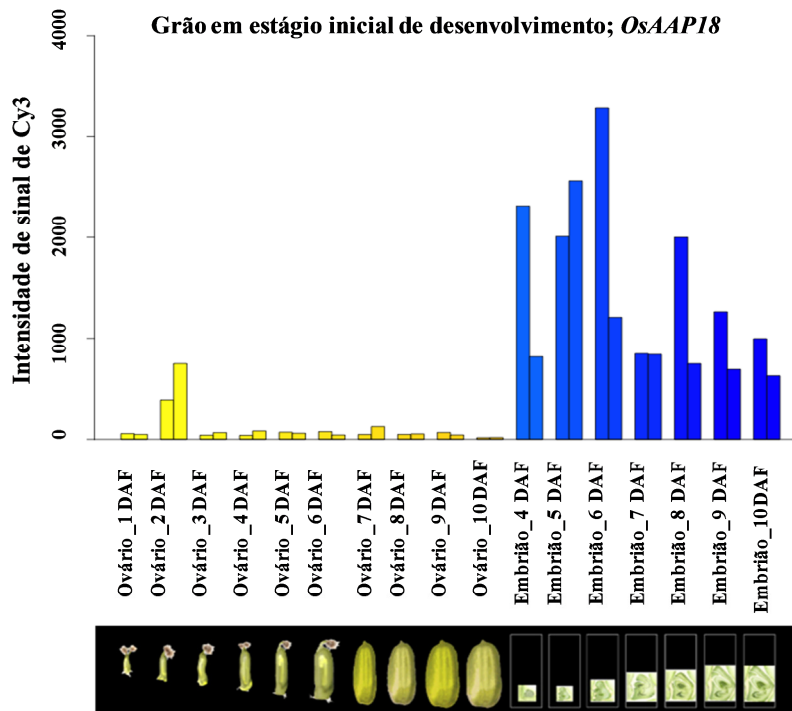


Figura 11. Níveis de expressão do gene *OsAAP18* durante o período inicial de desenvolvimento dos grãos conforme a plataforma RiceXpro. Agrupamentos de barras de cores repetidas indicam repetições de dados de expressão para o mesmo gene inseridos na plataforma.

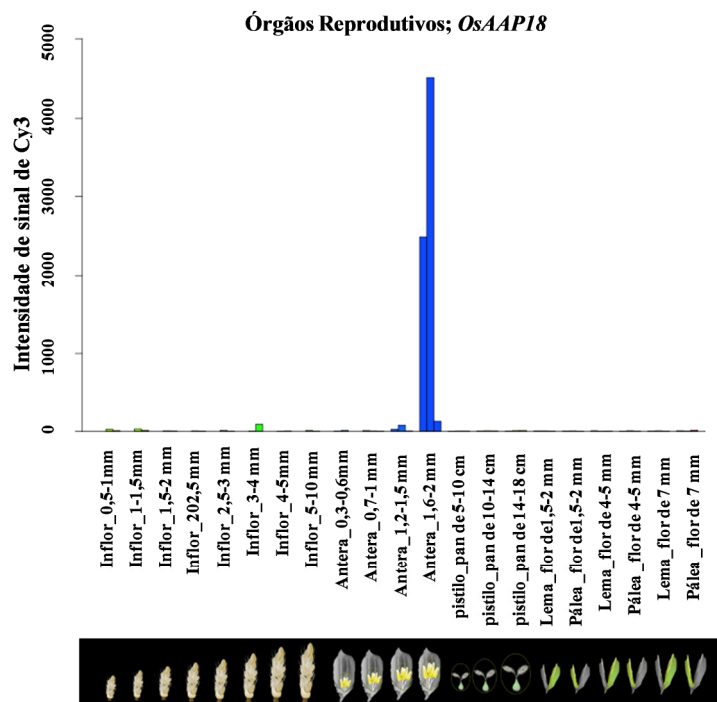


Figura 12. Níveis de expressão do gene em órgãos reprodutivos de plantas de arroz segundo a plataforma RiceXpro. Agrupamentos de barras de cores repetidas indicam repetições de dados de expressão para o mesmo gene inseridos na plataforma.

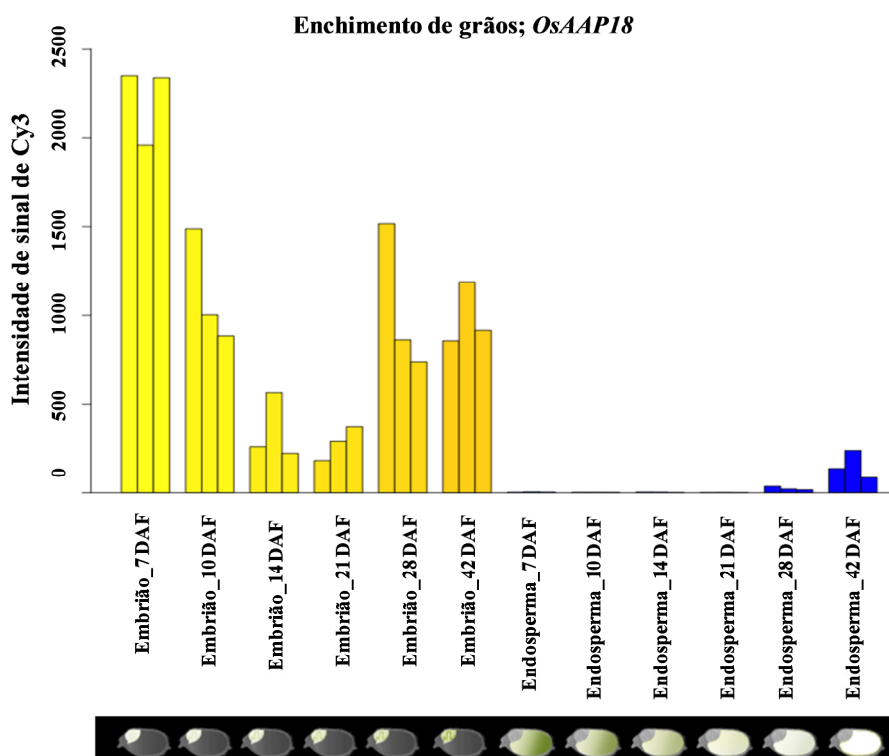


Figura 13. Análises de níveis de expressão do gene durante o período de enchimento dos grãos de plantas de arroz na plataforma RiceXpro. Agrupamentos de barras de cores repetidas indicam repetições de dados de expressão para o mesmo gene inseridos na plataforma.

3.5.3. Análise de caracterização de expressão gênica em plantas da variedade Piauí

Foi realizada análise do perfil de expressão dos genes da família de transportadores de aminoácidos em arroz, para identificar os genes mais expressos nos órgãos considerados fontes e drenos durante a fase reprodutiva, e assim identificar com maior precisão os genes que podem estar relacionados à remobilização de aminoácidos durante o enchimento de grãos. Além disso, a análise da expressão em tecidos foi confrontada com os dados obtidos através do uso do Genevestigator e RiceXpro, e com análises de frações solúveis e atividade da enzima nitrato redutase (ANR) e de proteases, realizadas nas mesmas plantas.

No experimento, os maiores valores de ANR foram observados na coleta realizada no emborrachamento nas folhas superiores (FS) (Figura 14). As folhas, superiores e inferiores, apresentaram maiores valores de ANR que o colmo (C) das plantas da variedade Piauí em todas as coletas (Figura 14). Isso está de acordo com o fato das folhas serem um local de assimilação do nitrato, enquanto as bainhas são conhecidas como órgão de estoque desse N inorgânico, que pode ser acumulado nos vacúolos. SANTOS et al. (2009a e 2009b) demonstraram que plantas de arroz acumulam $N-NO_3^-$ preferencialmente nas bainhas, onde a baixa atividade metabólica favorece o armazenamento do mesmo. O nitrato nos vacúolos não é somente importante para o estoque, mas também para a manutenção de turgor nas células, eo citosol é um ambiente iônico cuidadosamente regulado com homeostase não somente de pH, fosfato e cálcio, mas também de concentração de nitrato (MILLER e SMITH, 2008).

Na antese não houve níveis detectáveis de ANR (Figura 14), o que pode estar associado à ausências de NO_3^- no solo nessa fase do ciclo da planta, uma vez que a adubação nitrogenada foi aplicada somente no início do ciclo de desenvolvimento. O aumento da

atividade após antese, embora menor que no emborrachamento, pode estar associado à assimilação de N-NO_3^- acumulado nas bainhas durante o período vegetativo que é liberado no período reprodutivo. Esses dados estão de acordo com o trabalho de COELHO (2011), que verificou maiores valores de ANR em plantas da variedade Piauí aos 15DDA, adubadas com 60 kg N ha^{-1} no momento do plantio e suplementadas ou não com $40 \text{ kg de N ha}^{-1}$ na antese.

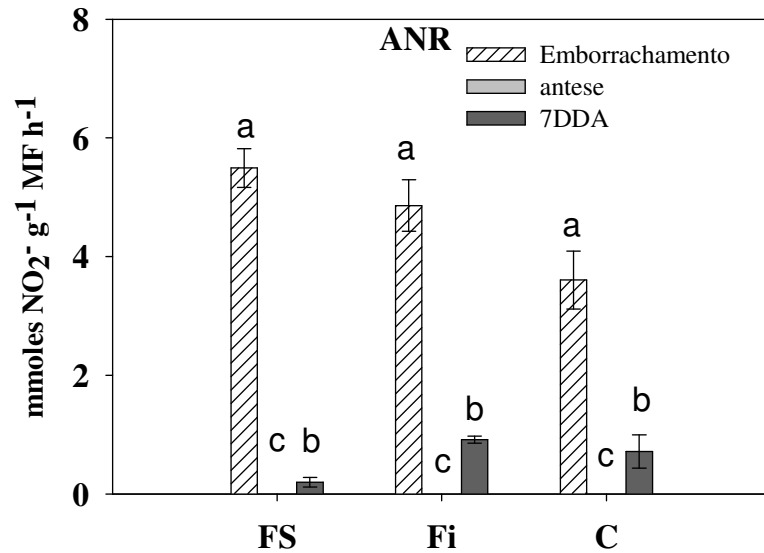


Figura 14. Atividade da Nitrato-reductase (NR) nas folhas superiores (FS), Folhas inferiores (Fi) e colmo (C) das plantas da variedade Piauí nas coletas realizadas emborrachamento, antese e aos 7 dias depois da antese (DDA) no experimento para a análise de expressão dos genes candidatos. Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre linhagens pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na análise de atividade de proteases, aos 7 DDA, foram observados maiores valores para as folhas inferiores, quando comparadas às folhas superiores e colmo (Figura 15). Isto está associado ao fato das folhas inferiores serem as mais velhas, ou seja, em estágio mais avançado de senescência. Diversos processos proteolíticos estão envolvidos na remobilização de N uma vez que a progressiva degradação celular, iniciados nos cloroplastos, para liberação de proteínas de reserva durante a senescência foliar é acompanhada de modificações nas vias de assimilação de C e N e da expressão de proteases (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2008).

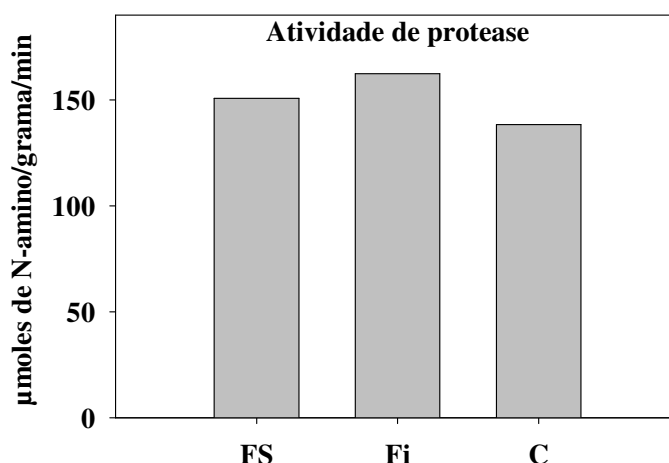


Figura 15.Atividade de protease nas folhas superiores (FS), Folhas inferiores (Fi) e colmo das plantas da variedade Piauí no experimento para a análise de expressão dos genes candidatos.

Não houve grandes diferenças nos valores de NO_3^- entre as coletas nas diferentes partes da planta (Figura 16). Os maiores teores de NO_3^- foram observados nas folhas superiores e inferiores na época do emborrachamento (Figura 16). Não foi realizada análise das panículas no emborrachamento, pois estas ainda não tinham sido emitidas. Os maiores valores de nitrato encontrados nas folhas na época vegetativa, antes da antese, podem estar associados à metabolização do N disponível nessa fase.

Os maiores teores de amônio foram observados aos 7DDA no colmo e panículas (Figura 16). As panículas apresentaram maiores teores de aminoácidos livres nas coletas realizadas na antese e aos 7DDA. No colmo houve diferenças entre os teores de aminoácidos nas três coletas, sendo maior após a antese, o que pode estar associado à remobilização de N na forma de aminoácidos (Figura 16). Não houve diferenças nos teores de aminoácidos entre as três coletas nas folhas.

O fato das panículas apresentarem maiores teores de amônio pode estar ligado à assimilação do N fornecido para as panículas para a formação de proteínas de reserva do grão, assim como os maiores teores de aminoácidos encontrados nas panículas quando comparados as demais partes das plantas nas coletas realizadas na antese e 7DDA.

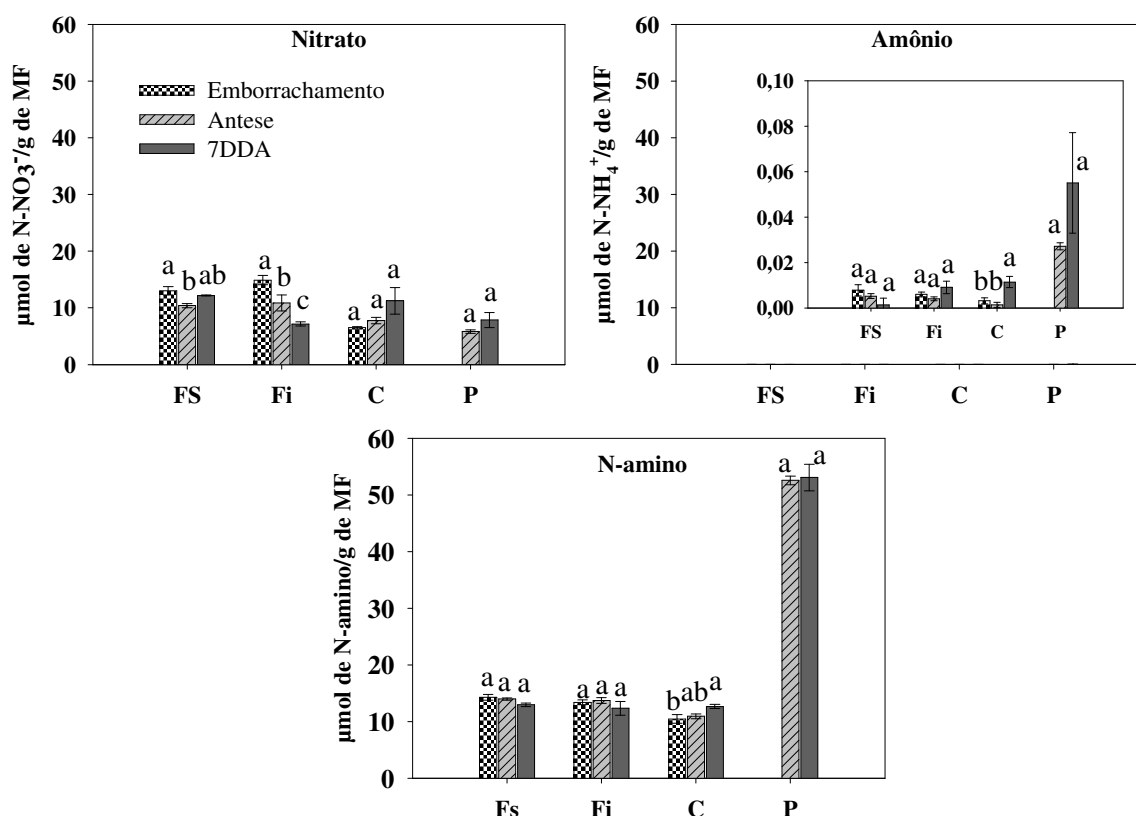


Figura 16. Teores de Nitrato, N-amino e amônio nas folhas superiores (FS), folhas inferiores (Fi), colmo (C) e panículas (P) das plantas da variedade Piauí nas coletas realizadas no emborrachamento, antese e aos 7 dias depois da antese (7DDA) no experimento para análise de expressão dos genes candidatos. Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre coletas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As análises de expressão mostraram um grande aumento de expressão do gene Os06g36210 (*OsAAP18*) nas panículas no período da antese quando, comparado ao emborrachamento, e posterior queda de expressão (Figura 17). Nas análises de filogenia esse gene mostrou similaridade com o *AtAAP1*, *AtAAP6* e *AtAAP8* de *Arabidopsis*. Em seus trabalhos, SANDERS et al. (2009) demonstraram que *AtAAP1* é responsável pela absorção de aminoácidos pelo embrião e apresenta grande importância para a síntese de proteínas de reserva e produção de sementes. O fato da expressão de *OsAAP18* ter alcançado o maior pico no período da antese pode indicar que esse gene está associado a funções de transporte de aminoácidos apenas nos períodos iniciais de formação da semente, corroborando com os dados de expressão vistos no GENEVESTIGATOR e RiceXpro (Figuras 9-13), onde foi verificado que esse gene é mais expresso em órgãos reprodutivos do que no endosperma.

Os genes Os07g04180 (*OsAAP1*) e Os12g42850 (*OsAAP8*) mostraram um aumento de expressão nas panículas nas coletas realizadas após a antese, sendo que os maiores valores foram observados aos 15 DDA (Figura 17), indicando uma indução na fase de enchimento dos grãos. O que corrobora com a maior expressão de *OsAAP1* na fase de enchimento do endosperma, como visto nas análises feitas nas plataformas de dados de microarranjo (Figura 4-8). O gene Os03g37984 (*OsAAP3*) também mostrou aumento de expressão nas panículas após o emborrachamento, com os maiores valores apresentados na antese e aos 15 DDA, quando os grãos já estavam em fase de enchimento (Figura 17). Em análises realizadas na plataforma GENEVESTIGATOR, foi verificado que o local de maior expressão do gene

OsAAP3 em sementes de arroz é o endosperma (dados não mostrados).

O aumento de expressão de *OsAAP1* e *OsAAP18* na fase reprodutiva do arroz em plantas da variedade Piauí está de acordo com os resultados verificados no GENEVESTIGATOR e RiceXpro (Figuras 4-13). Os dados de expressão e de análises de provável local de expressão em plataformas de dados indicam uma possível participação dos genes *OsAAP1* e *OsAAP18* no transporte de aminoácidos para os grãos com a finalidade de formar proteínas de reserva no grão e fornecimento de aminoácidos no início do período de formação do embrião, assim como ocorre com os genes *OsAAP1* e *OsAAP8* em *Arabidopsis* (SCHMIDT et al., 2007).

A maior expressão dos genes associados ao transporte de aminoácido em plantas da variedade Piauí no período reprodutivo é importante devido a essa variedade demonstrar maior eficiência de remobilização de N em condições de baixo fornecimento de adubos nitrogenados. SOUZA et al. (1998) verificaram que a variedade local de arroz Piauí foi mais eficiente na utilização do N acumulado e, portanto menos dependente de suplementação externa desse nutriente no período de enchimento dos grãos do que uma variedade melhorada, IAC-47. COELHO (2011) verificou que a variedade de arroz Piauí possui características adaptativas favoráveis ao cultivo em condições limitantes de N, pois apresenta maior capacidade de acúmulo de nitrogênio nos períodos iniciais do ciclo de desenvolvimento e eficiência de remobilização do N acumulado quando não recebe suplementação nitrogenada.

OsAAP1 parece atuar mais no transporte de aminoácidos para a formação do endosperma enquanto *OsAAP18* parece suprir os órgãos reprodutivos. No entanto, para confirmação disso, são necessários estudos futuros para caracterização funcional desses genes e confirmação de localização em tecidos e subcelular.

As análises de expressão do gene Os03g25869.1 (*OsAAP2*) foram realizadas mas não levaram a resultados satisfatórios devido a problemas com o primer utilizado.

Em análises na plataforma GENEVESTIGATOR, foi verificado que os genes Os12g41890 e Os01g11160, que também codificam para transportadores de aminoácidos, são pouco expressos em plantas de arroz no período vegetativo do seu ciclo de desenvolvimento e por esse motivo não foi realizada a análise de expressão.

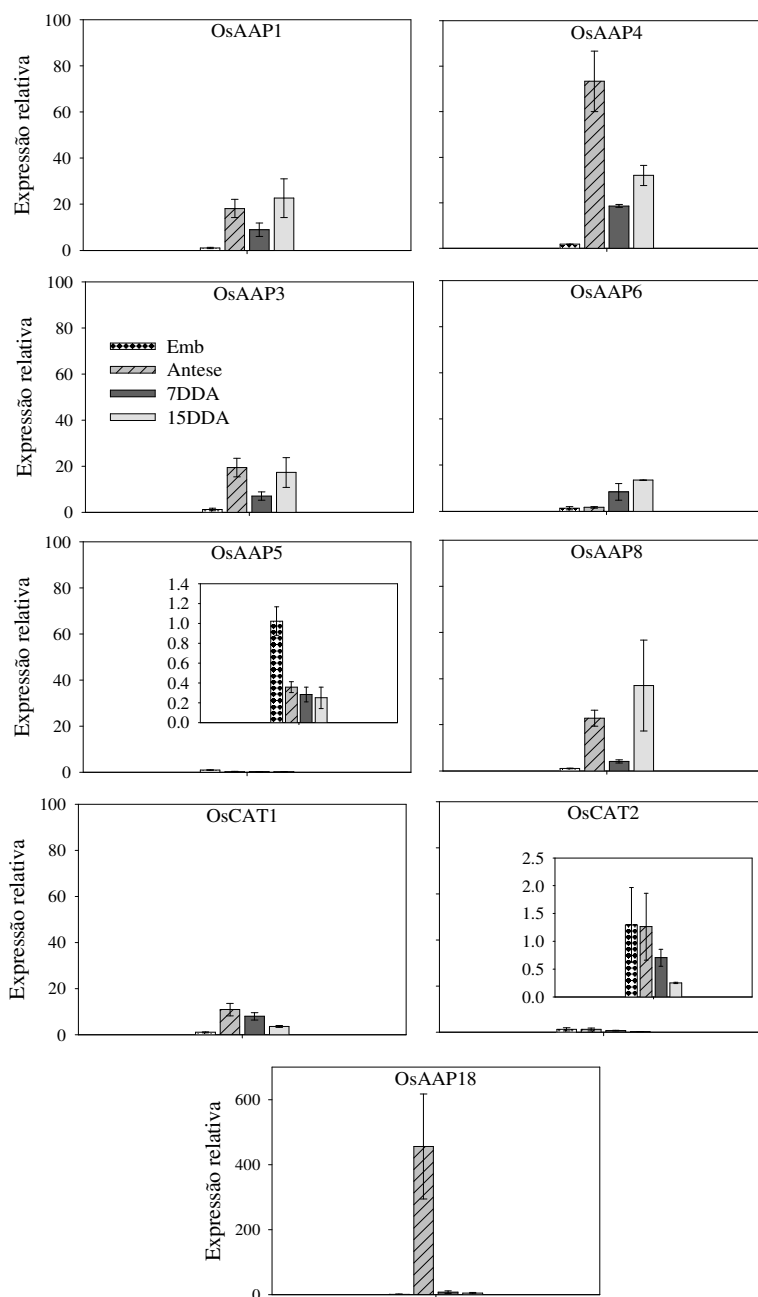


Figura 17. Expressão relativa dos genes Os07g04180.1 (*OsAAP1*), Os06g36210 (*OsAAP18*), Os03g37984.1 (*OsAAP3*), Os06g36180.1 (*OsAAP4*), Os01g66010.1 (*OsAAP5*), Os03g37984.1 (*OsAAP6*), Os12g42850.1 (*OsAAP8*), Os11g05690.1 (*OsCAT1*) e Os12g06060.1 (*OsCAT2*) em panículas das plantas de arroz da variedade Piauí no período do emborrachamento (Emb), na antese, aos 7 dias depois da antese (7DDA) e aos 15 dias depois da antese (15 DDA).

Quanto à expressão em folhas, houve maior expressão do gene *OsAAP1* nas folhas bandeira, que são importantes no processo de remobilização, antes e depois da antese (Figura 18). ZHAO et al. (2012) observaram baixa expressão do gene Os07g04180 (*OsAAP1*) em folhas jovens de plantas de arroz, mas expressão relativamente alta nos demais órgãos, o que está de acordo com os resultados observados, uma vez que as folhas das plantas analisadas não eram mais jovens.

A expressão nas folhas do gene Os01g66010(*OsAAP5*) aumentou após a antese, com o início do processo de remobilização. Os resultados para esse gene estão de acordo com a forte expressão observada por LU et al. (2012) em folhas e bainhas de arroz. Esses autores também observaram baixos níveis de expressão para *OsAAP5* em sementes, raízes, panículas e endosperma. Uma vez que o *OsAAP5* é mais expresso em tecidos dreno após o início do processo de remobilização, esses resultados podem indicar maior participação desse gene no transporte de aminoácidos na parte aérea, para carregamento de vasos condutores. Em *Arabidopsis* foram identificados *AtAAP2*(ZHANG et al., 2010), *AtAAP3* (OKUMOTO et al., 2004) e *AtAAP6*(HUNT et al., 2010) entre os genes envolvidos no transporte de aminoácidos fonte-dreno à longa distância.

Os dados de atividade de protease (Figura 15) em folhas estão de acordo com a análise de expressão dos transportadores de aminoácidos em folhas, uma vez que a expressão de todos os genes estudados apresentou aumento no período de remobilização (Figura 19).

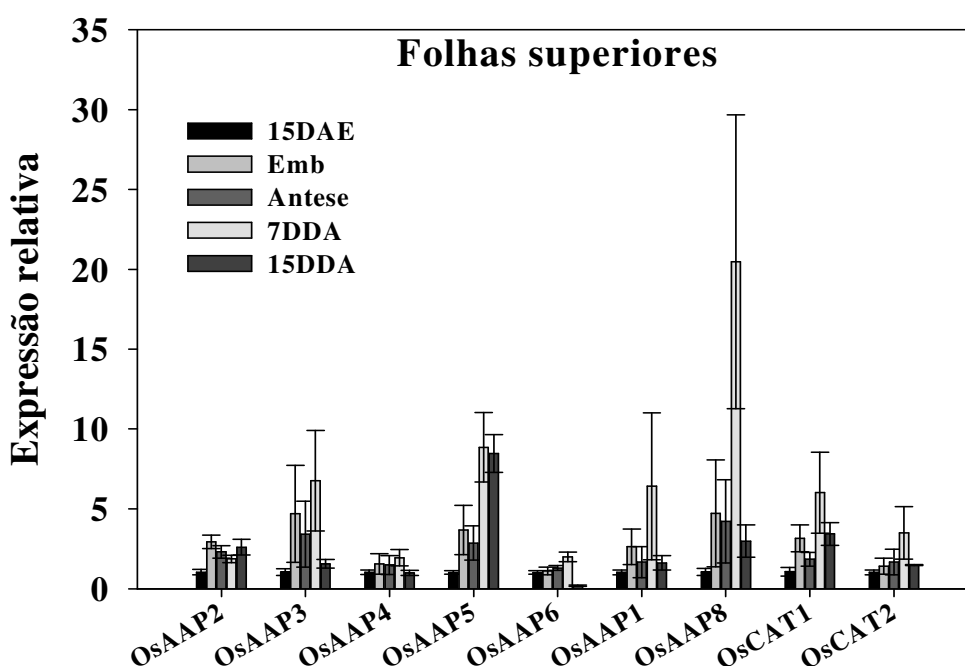


Figura 18. Expressão relativa dos genes Os06g36210 (*OsAAP1*) Os03g37984.1 (*OsAAP3*), Os06g36180.1 (*OsAAP4*), Os01g66010.1 (*OsAAP5*), Os03g37984.1 (*OsAAP6*), Os12g42850.1 (*OsAAP8*), Os11g05690.1 (*OsCAT1*) e Os12g06060.1 (*OsCAT2*) em folhas das plantas de arroz da variedade Piauí no período do emborrachamento, na antese, aos 7 dias depois da antese (7DDA) e aos 15 dias depois da antese (15 DDA). Melhorar diferenciação entre as colunas.

3.5.4. Análise de plantas mutantes *Osaap1* e *Osaap18*

Foram confirmados menores valores de expressão relativa de *OsAAP1* e *OsAAP18* em plantas mutantes para os respectivos genes quando comparadas a plantas tipo selvagem (Figura 19). Uma maior redução da expressão de *OsAAP18* foi verificada nos grãos das plantas *Osaap18*, local onde esse gene é mais expresso em condições normais. Verificou-se um aumento de expressão dos genes *OsAAP2*, *OsAAP3* e *OsAAP6* em algumas partes das plantas mutantes quando comparadas à tipo selvagem, sendo que o *OsAAP6* foi fortemente induzido. Isso pode estar associado a um provável efeito de compensação da redução da expressão de *OsAAP1* e *OsAAP18* com o aumento de expressão de outros genes, que podem

estar associados ao transporte dos mesmos aminoácidos, mas com características de cinética de transporte diferentes.

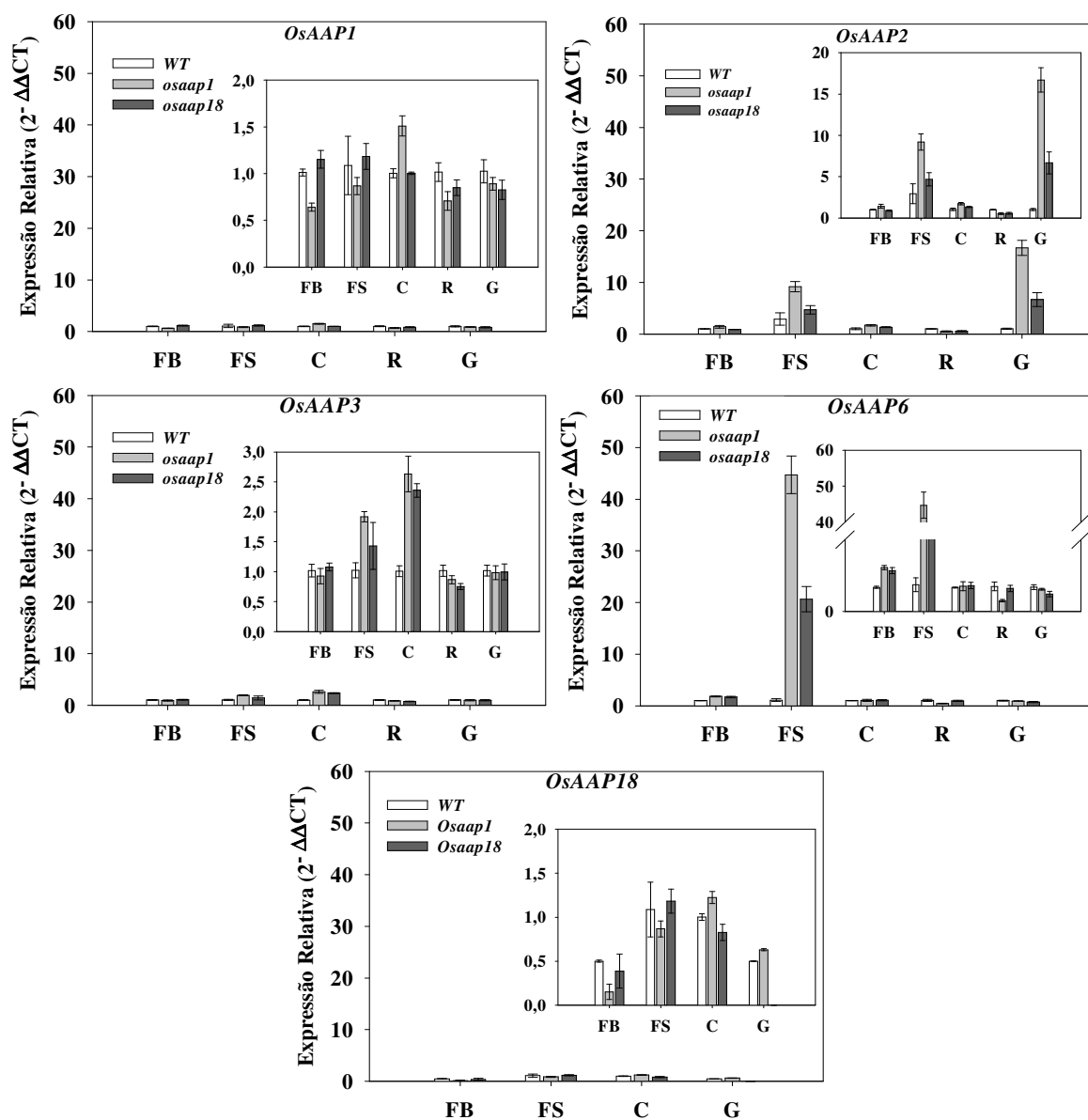


Figura 19. Análise de expressão gênica em plantas *Osaap1* e *Osaap18* nas plantas mutantes *Osaap1* e *Osaap18* e tipo selvagem (WT) nas folhas bandeira (FB), folhas superiores (FS) colmo (C) e grãos (G).

a) Análises de metabólitos solúveis

Foram observados maiores teores de N-amino nas folhas bandeira das plantas *Osaap18* e nos colmos das duas linhagens mutantes quando comparada a tipo selvagem na coleta realizada antes da antese (Figura 20). Corroborando esses resultados, SANDERS et al. (2009) observaram acúmulo de aminoácidos nas rosetas de plantas mutantes de *ArabidopsisAtaap1* e afirmaram que os níveis de aminoácidos nas folhas foram alterados devido a regulação por *feedback* do metabolismo de N nesses órgãos em função das mudanças nos processos de transporte de N para as sementes.

Na antese, as duas linhagens mutantes, *Osaap1* e *Osaap18* apresentaram maiores teores de N-amino nas folhas superiores quando comparadas à tipo selvagem (Figura 20). A linhagem *Osaap18* apresentou maiores teores que a tipo selvagem a *Osaap1* também nas folhas inferiores na antese (Figura 20). Foram observados maiores teores de N-amino nas folhas inferiores e colmo das plantas mutantes *Osaap18* na coleta realizada após a antese. As plantas *Osaap1* e *OsAAP18* apresentaram maiores teores de aminoácidos aos 10DDA no colmo quando comparadas as tipo selvagem. *Osaap1* apresentou os maiores teores de aminoácidos nas folhas bandeira quando comparadas à *Osaap18* e tipo selvagem (Figura 20). A linhagem *Osaap18* apresentou menores teores de N-amino nas folhas superiores após a antese (Figura 20). Não foram observadas diferenças significativas nos teores de aminoácidos nas panículas na antese e após antese (Figura 20).

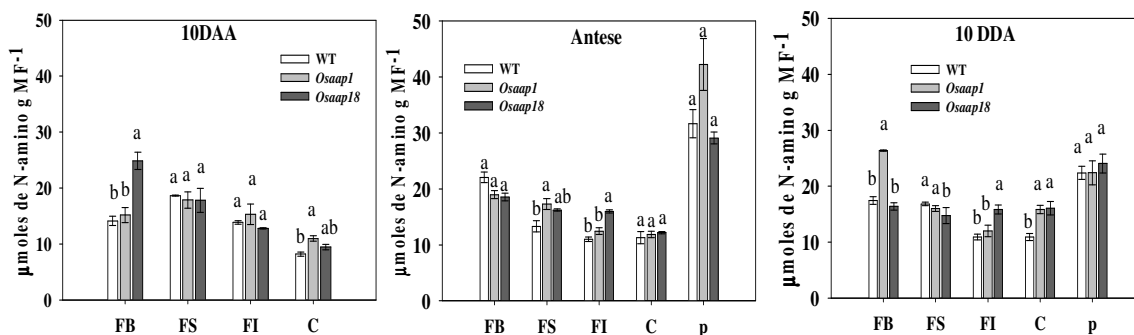


Figura 20. Análise de N-amino nas folhas bandeira (FB), folhas superiores (FS), folhas inferiores (Fi), colmo (C) e panículas (P) das plantas de arroz tipo selvagem e mutantes. Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre linhagens pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os maiores teores de N-amino observados nos tecidos fonte (colmo e folhas) das plantas mutantes, no período reprodutivo, após antese, podem indicar um acúmulo desses aminoácidos nesses órgãos devido a problemas no transporte desses metabólitos para os órgãos dreno (grãos). Já foram verificadas modificações nas concentrações de aminoácidos em órgãos fonte em trabalhos de caracterização de mutantes para transportadores de aminoácidos em outras espécies. ZHANG et al. (2010) verificaram redução nos níveis de aminoácidos em seiva de floema e acúmulo em folhas fonte de plantas mutantes para o gene *AtAAP2*, que é envolvido no carregamento do floema e distribuição de aminoácidos para o embrião.

O fato de não haver diferenças entre as plantas mutantes e tipo selvagem nos teores de aminoácidos nas panículas na antese e após a antese não indica o transporte de aminoácidos de forma adequada para os grãos em plantas mutantes. Uma vez que estes podem ter sido transportados e acumulados em diferentes tecidos e órgãos das sementes. Plantas mutantes de *Arabidopsis AtAAP1* apresentaram decréscimo de absorção de aminoácidos pelo embrião, o que resultou em acúmulo desses compostos nos demais tecidos das sementes, em especial na casca da semente/endosperma, que apresentou um aumento de 2290 e 1222% de glutamina nas diferentes linhagens utilizadas *aap1-1* e *aap1-2* (SANDERS et al., 2009). Esses autores também verificaram acúmulo nos teores de aminoácidos livres totais nas sementes.

O acúmulo de aminoácidos nos órgãos fonte, associado aos dados de expressão e análises no GENEVESTIGATOR e RiceXpro, reforçam o envolvimento dos genes *OsAAP1* e *OsAAP18* na remobilização de N para grãos de arroz.

As plantas mutantes também apresentaram acúmulo de N-amônio quando comparadas às tipo selvagem em todas as coletas realizadas, com exceção das folhas superiores aos 10 DAA, folhas inferiores na antese e colmo 10 DDA (Figura 21). Como o amônio é formado na

proteólise, durante o período de remobilização, esse composto também pode estar sendo acumulado em resposta a problemas de transporte de N na forma de aminoácidos, que são posteriormente formados a partir do amônio liberado. Esses problemas de transporte podem ser resultado da mutação nos genes *OsaAAP1* e *OsaAAP18*.

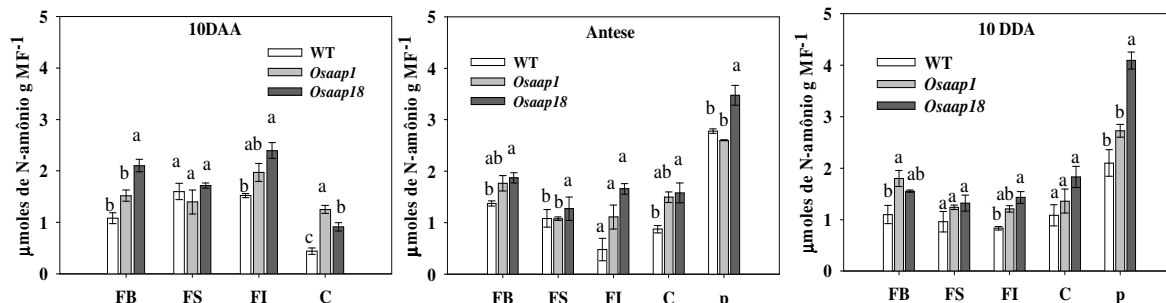


Figura 21. Análise de N-amônio nas folhas bandeira (FB), folhas superiores (FS), folhas inferiores (FI), colmo (C) e panículas (P) das plantas de arroz tipo selvagem e mutantes. Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre linhagens pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foram verificados menores teores de açúcares solúveis nas folhas superiores, colmos e panículas das plantas *Osaap18* no período da antese e nos colmos e panículas aos 10 DDA (Figura 22). Esses resultados, aliados aos maiores teores de amônio nos mesmos órgãos das plantas mutantes podem indicar influência da mutação sobre o transporte de uso de esqueletos de C pelas plantas.

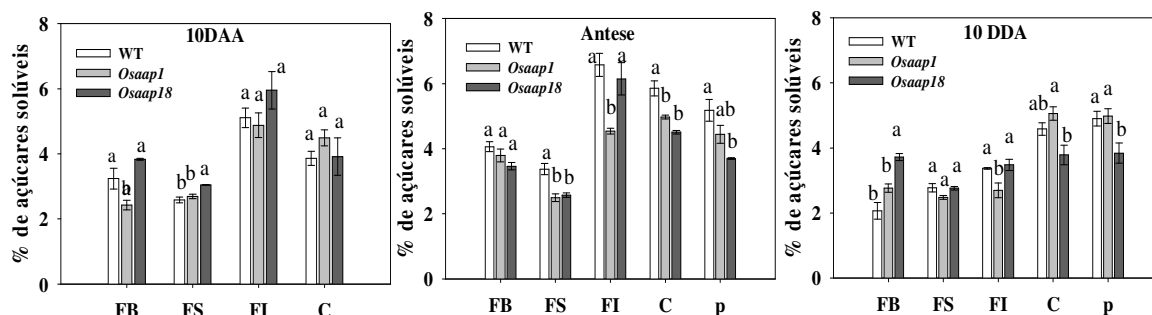


Figura 22. Análise de açúcares solúveis nas folhas bandeira (FB), folhas superiores (FS), folhas inferiores (FI), colmo (C) e panículas (P) das plantas de arroz tipo selvagem e mutantes. Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre linhagens pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

b) Caracterização fenotípica e parâmetros de produção de plantas *Osaap1*, *Osaap18* e tipo selvagem.

As plantas mutantes *osaap18* apresentaram maior número de panículas e perfilhos (Figura 23), no entanto, menor altura média dos perfilhos (Figura 23). Esse maior número de panículas de plantas *Osaap18* refletiu em um maior número total de grãos (Figura 24). No entanto, apesar da grande produção em números totais de grãos das plantas *Osaap18* cerca de 86% deste apresentaram-se chochos (Figura 24) indicando problemas no enchimento dos mesmos, o que pode ser resultado de problemas no transporte de aminoácidos tanto no período de formação do endosperma quanto no período de formação do embrião, o que nesse caso levaria à formação de grãos estéreis. SCHMIDT et al. (2007) verificaram que linhagens *Ataap8* apresentaram um menor tamanho total das silículas do que plantas tipo selvagem e que

o total de possíveis sementes (sementes contáveis + sementes abortadas) foi reduzido em cerca de 50%, sendo esse fenótipo visível nas duas diferentes linhagens mutantes utilizadas no experimento. Esses fenótipos apresentados pelas plantas mutantes para o gene *AtAAP8* foi associado ao fato desse gene ser responsável pela absorção de aminoácidos pelo endosperma e para suprir o embrião no início de seu desenvolvimento. Os resultados de redução de produção de grãos em plantas mutantes sugerem que o gene *OsAAP18* está envolvido no processo de remobilização de N para os grãos em plantas de arroz no período reprodutivo do ciclo da cultura.

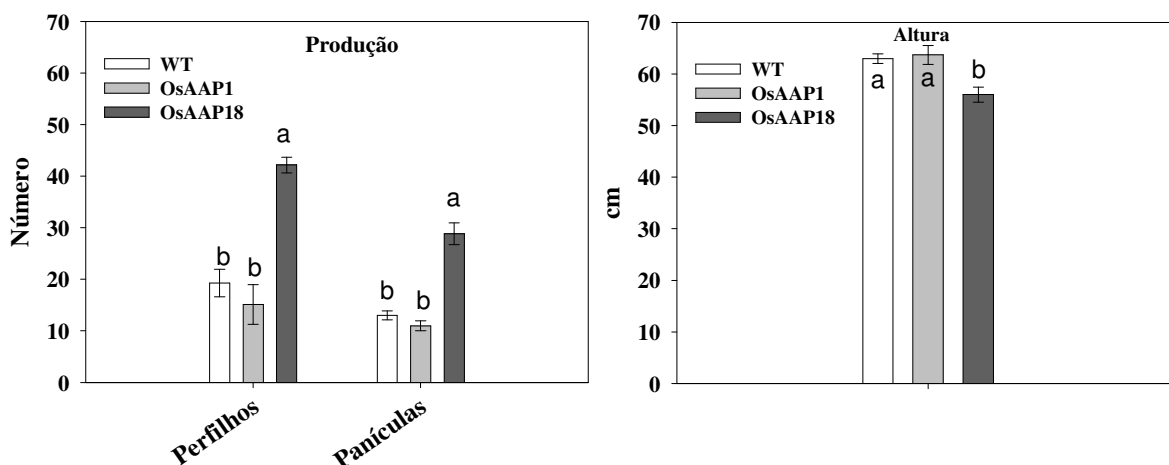


Figura 23. Produção de perfilhos e panículas e altura das plantas. Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre linhagens pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As plantas *Osaap1* não diferiram significativamente dos tipos selvagem em relação ao número de perfilhos, panículas e altura dos perfilhos (Figura 23). Quanto à produção de grãos, as plantas *Osaap1* apresentaram maior número e peso total de grãos que as tiposelvagem, com a maioria dos grãos cheios (Figura 24). O fato das plantas *Osaap1* apresentarem maior produção que as do tipo selvagemmesmo com a mutação pode estar associado ao fato do T-DNA utilizado para a construção das linhagens conter elementos “*enhancer*”, o que pode ter induzido a expressão de outros genes próximos ao seu local de inserção, que podem ser genes associados a essa maior produção de grãos. No entanto, isso só poderia ser confirmado com o sequenciamento das linhagens, o que não foi possível ser realizado neste trabalho. Outra hipótese poderia ser o fato de outros genes, como os que apresentaram maior expressão nas plantas mutantes, *OsAAP2*, *OsAAP3*, *OsAAP6* e *OsAAP8*, codificarem proteínas de transporte com redundância de função de *OsAAP1*, assumindo o papel deste.

Os dados de produção de plantas mutantes *Osaap1* não estão de acordo com os verificados em plantas *Ataap1*, uma vez que esses mutantes de *Arabidopsis* apresentaram redução no número de silículas por plantas, na produção de sementes por planta e no peso de 1000 grãos (SANDERS et al., 2009).

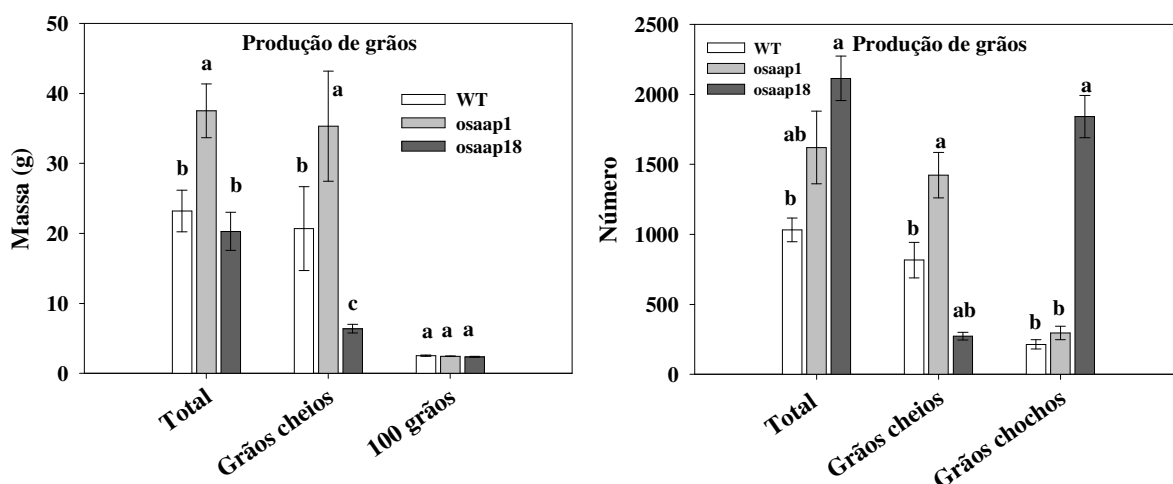


Figura 24. Produção de grãos total, cheios e chochos em plantas *Osaap1* e *Osaap18*. Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre linhagens pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As diferenças no número de altura de perfilhos verificadas entre as plantas não influenciaram a produção de massa seca (Figura 25), uma vez que não foram verificadas diferenças significativas entre as linhagens e plantas tipo selvagem para essa variável.

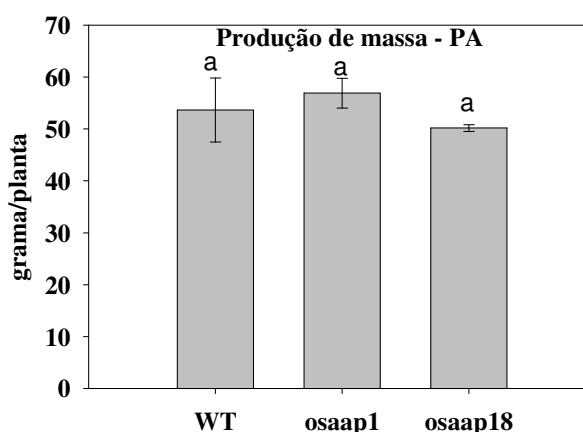


Figura 25. Produção de massa das plantas mutantes e tipo selvagem. Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre linhagens pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

c) N-total e proteínas nos grãos de plantas mutantes e tipo selvagem

Os dados de N-total estão de acordo com o acúmulo de N-amino observados nas plantas mutantes e confirmam um acúmulo do N nos tecidos drenos das plantas, uma vez que foram observados maiores teores de N na parte aérea das plantas mutantes quando comparada com a tipo selvagem (Figura 26). As plantas *osaap18* mostraram maior teor de proteínas nos grãos apesar do acúmulo de N na parte aérea, o que pode ser explicado pela baixa produção de grãos cheios por essas plantas, o que não possibilitou um efeito de diluição do N que foi direcionado às panículas.

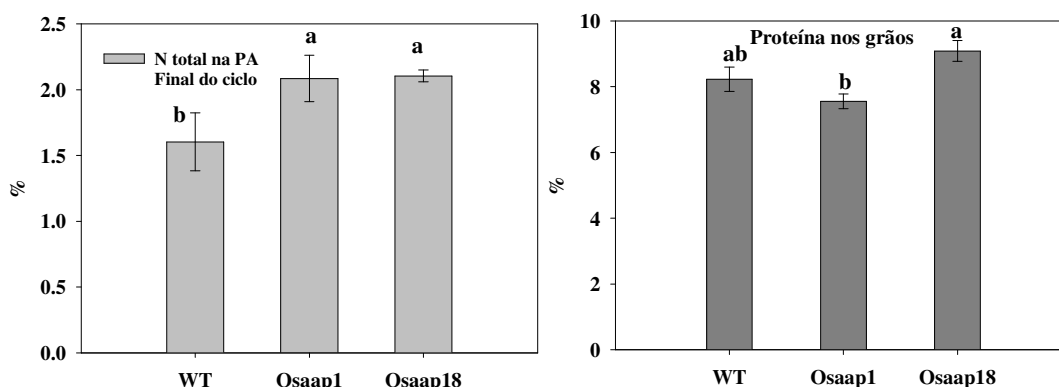


Figura 26. Teores de N-total na parte aérea (PA) e proteínas nos grãos das plantas tipo selvagem e mutantes. Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre linhagens pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Confirma-se o acúmulo de N na parte aérea das plantas mutantes ao se comparar os teores desse nutriente na parte aérea na antese e quanto ficou na palha no final do ciclo (Figura 27). Além disso, ao se comparar os teores de N-total nos grãos no final do ciclo, que foram provenientes da remobilização, verifica-se maiores teores nas plantas tipo selvagem (Figura 27). Esses resultados confirmam a influência da mutação de *OsAAP1* e *OsAAP18* no metabolismo de N e processos de remobilização.

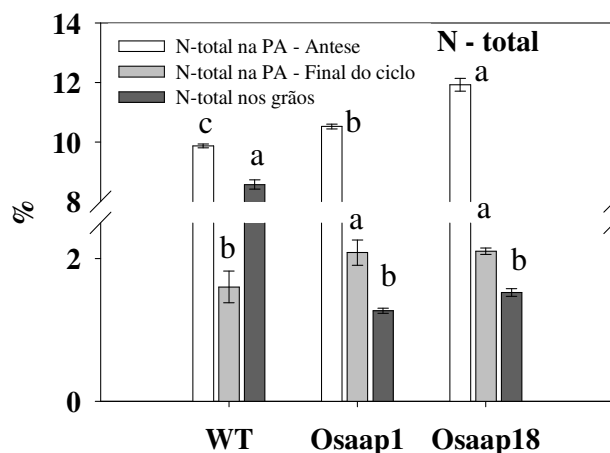


Figura 27. N-total na parte aérea a grãos em plantas de arroz Osaap1, Osaap1 e tipo selvagem. Letras minúsculas nas colunas representam diferença significativa entre linhagens pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Em plantas de *Arabidopsis* já foi comprovado que, apesar de ambos os genes, *AtAAP1* e *AtAAP8*, serem expressos em panícula, o gene *AtAAP1* atua como principal sistema de transporte de aminoácidos para a biossíntese de proteínas de estoque enquanto *AtAAP8* supre o transporte de aminoácidos para desenvolvimento do embrião e a maior expressão de um transportador não pode compensar a ausência do outro (SCHMIDT et al., 2007). Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se afirmar que os genes *OsAAP1* e *OsAAP18* estão envolvidos no processo de remobilização de N para grãos em plantas de arroz, e que a mutação de *OsAAP18* influencia a produção de grãos pelas plantas. No entanto, as funções dos dois genes ainda não podem ser assinaladas devido à ausência de algumas análises, entre elas, a de expressão localizada.

3.6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sugerem a provável participação dos genes OsAAP1 e OsAAP18 no transporte de aminoácidos para os grãos em desenvolvimento, sendo que OsAAP18 afeta a produção de grãos e a remobilização de N para estes.

OsAAP1 parece estar envolvido com a remobilização de aminoácidos para a formação do embrião enquanto OsAAP18 para o fornecimento desses metabólitos para os órgãos reprodutivos.

4. CAPÍTULO II

AFINIDADE DOS TRANSPORTADORES OSAAP1 E OSAAP18 POR DIFERENTES AMINOÁCIDOS EM EXPERIMENTOS DE COMPLEMENTAÇÃO COM LEVEDURAS MUTANTES

4.1. RESUMO

Proteínas de transporte de aminoácidos têm diferentes afinidades por substrato e parâmetros cinéticos de absorção. Este trabalho teve como objetivo verificar a especificidade de OsAAP1 e OsAAP18 por substrato, ou seja, determinar quais aminoácidos essas proteínas são capazes de transportar. Foram realizados experimentos de complementação com as cepas de leveduras mutantes 22Δ8AA, 22Δ6AAL e JA248 carregando a sequência codante dos genes *OsAAP1* e *OsAAP18*. Os testes de complementação com as cepas da levedura 22Δ8AA foram desenvolvidos em meio livre de nitrogênio suplementado com diferentes concentrações de L-prolina, L-citrulina, L-aspartato ou L-glutamato como única fonte de N. Testes de complementação com a cepa JA248 foram desenvolvidos em meio livre de N complementado com diferentes concentrações de L-glutamina como única fonte de N. Testes de complementação com a cepa 22Δ6AAL foram desenvolvidos em meio livre de N complementado com diferentes concentrações de L-lisina como única fonte de N. Não foi possível verificar a afinidade de *OsAAP18* devido a problemas decorrentes do procedimento de clonagem. Os resultados sugerem que *OsAAP1* tem capacidade de transportar amplo espectro de aminoácidos, o que indica um papel importante no processo de transporte de N na forma orgânica em plantas de arroz.

Palavras chave: *Saccharomyces cerevisiae*. Aminoácidos. pDR195, 22Δ8AA, 22Δ6AAL e JA248

4.2. ABSTRACT

Amino acid transport proteins have different affinities for substrates and uptake kinetic parameters. This study aimed to determine the substrate specificity of OsAAP1 and OsAAP18, this means determine which amino acids are those proteins capable of carrying. Complementation experiments were performed with strains of mutants yeast 22Δ8AA, 22Δ6AAL and JA248 harbouring the codantesequence of these genes. Complementation tests with yeast strain 22Δ8AA were performed on nitrogen-free medium supplemented with different concentration of L-proline, L-citrulline, L-aspartate or L-glutamate as the sole source of N. Complementation tests with JA248 yeast strain were developed in N-free medium supplemented with different concentrations of L-glutamine as the only N source. Complementation tests with 22Δ6AAL yeast strains were developed in N-free medium supplemented different concentrations of L-lysine as the sole source of N. We were not able to verify OsAAP18 affinity due problems in the cloning. The results suggest that OsAAP1 is able of carrying wide spectrum of amino acid, indicating a role in the transport of inorganic form of N in rice plants.

Key-words: *Saccharomyces cerevisiae*. Amino acids. pDR195, 22Δ8AA, 22Δ6AAL e JA248

4.3. INTRODUÇÃO

Os aminoácidos são de extrema importância para síntese protéica e metabolismo secundário e seu metabolismo é fortemente relacionado ao metabolismo de carboidratos e amônio. Além disso, esses compostos são utilizados como carregadores de N para vários órgãos, através do xilema e floema, em especial para as sementes, onde são utilizados para a síntese de proteínas de estoque (PRATELLI e PILOT, 2014).

Uma vez que a concentração de aminoácidos tende a ser maior nos órgãos de transporte para o dreno durante o período de remobilização, esse deslocamento ocorre contra um gradiente de concentração, tornando necessária a atuação de proteínas de transporte para esses metabólitos. Essas proteínas de transporte têm diferentes afinidades por substrato e parâmetros cinéticos de absorção.

Leveduras têm um valor inestimável para clonagem e expressão de genes de plantas que codificam transportadores de aminoácidos, podendo ser também um bom modelo para investigar os aspectos da regulação desses genes (FISCHER et al., 1998). Até o momento, foram realizados diversos estudos envolvendo caracterização funcional de genes associados ao transporte de aminoácidos em plantas, com grande impacto nesse campo de pesquisa. Entre eles, pode-se citar a caracterização de transportadores de aminoácido em *Phaseolus vulgaris* (TEGEDER et al., 2000a; TEGEDER e WEBER, 2006; TAN et al., 2008), *Psicumsativum* L. (TEGEDER et al., 2000b; TEGEDER et al., 2007), *Solanum tuberosum* (KOCH et al., 2003), caracterização de transportadores da família aminoácido permease em *Arabidopsis thaliana* (OKUMOTO et al., 2002; OKUMOTO et al., 2004; LEE e TEGEDER, 2004; LEE et al., 2007; SANDERS et al., 2009; ZHANG et al., 2010; PERCHLIK et al., 2014) e estudos de evolução e funcionamento dos transportadores de aminoácidos em plantas (FISCHER et al., 1998; WIPF et al., 2002; LALONDE et al., 2003; TEGEDER e RENTSCH, 2010; TEGEDER, 2012; TEGEDER e WARD, 2012; TEGEDER et al., 2013;), além de outros diversos trabalhos. Em grande parte dos trabalhos foi utilizada a expressão heteróloga em leveduras de transportadores de aminoácidos para auxiliar sua caracterização funcional.

Leveduras mutantes deficientes em sistemas de absorção para certos aminoácidos são utilizadas em sistemas de complementação como alternativa para estudos bioquímicos e para identificar e isolar proteínas de transporte, sendo uma forma de facilitar esses estudos (FISCHER et al., 1998). Através desses estudos de complementação com leveduras já foram determinados os parâmetros de absorção e a afinidade por substrato de diversos transportadores de aminoácidos em plantas.

RENTSCH et al. (2007) resumiram as afinidades de diferentes transportadores de aminoácidos caracterizados em trabalhos com o uso de *S. cerevisiae* e oócitos de *Xenopus* spp, citando que os transportadores de aminoácidos da família aminoácido permease (AAP) em *Arabidopsis* apresentam de moderada (*AtAAP1-5 e 8*) a alta (*AtAAP6*) afinidade com aminoácidos neutros e glutamato, enquanto transportadores *AtLHT1 e AtLHT2* apresentam alta afinidade com aminoácidos ácidos e neutros. Apesar de transportadores de diferentes famílias terem a capacidade de transportar os mesmos grupos de aminoácidos, estes podem não apresentar redundância de funções, uma vez que apresentam diferentes padrões e locais de expressão.

Entre as leveduras utilizadas em estudos de caracterização de genes destaca-se a *Saccharomyces cerevisiae*. Esses organismos são escolhidos por serem saprófitos e apresentarem a capacidade de rápida adaptação a mudanças de fontes de nutrientes sobre diferentes substratos, diferentemente de células vegetais, que não enfrentam mudanças

significativas na composição extracelular de aminoácidos (FISCHER et al., 1998). A confirmação da afinidade por substrato de transportadores de aminoácidos através do uso de sistemas de complementação em leveduras mutantes tem um papel fundamental na elucidação de função de transportadores nas plantas.

Este estudo teve como objetivo verificar a especificidade dos transportadores de aminoácidos de arroz OsAAP1 e OsAAP18 por substrato, ou seja, determinar quais aminoácidos essas proteínas são capazes de transportar, através de estudos de complementação com leveduras mutantes.

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

Os testes de especificidade e afinidade por substrato com as leveduras mutantes foram desenvolvidos na Washington State University (WSU). As cepas de leveduras 22 Δ 6AAL e 22 Δ 8AA utilizadas neste experimento foram obtidas de estoques em glicerol pertencentes ao laboratório da professora Mechthild Tegeder, da Escola de Ciências Biológicas da WSU e a cepa JA248 foi cedida pelo professor Bruno Andre, do Instituto de Biologia e Medicina Molecular da Universidade Livre de Buxelas.

Para isso, a região codante de *OsAAP1* e *OsAAP18* foi clonada no vetor doador Gateway® pDON221 e esse material foi utilizado para inserção do fragmento no vetor pDR195, clonagem da construção nas leveduras mutantes e realização dos testes de absorção de aminoácidos.

4.4.1. Leveduras utilizadas nos experimentos para determinar especificidade do *OsAAP1* e *OsAAP18* por diferentes aminoácidos

Para verificar a especificidade dos transportadores *OsAAP1* e *OsAAP18* por diferentes aminoácidos, foram realizados experimentos de complementação com as cepas de leveduras mutantes 22 Δ 8AA, 22 Δ 6AAL e JA248 carregando a sequência codante desses genes. A cepa de levedura 22 Δ 8AA (MAT α , *ura3-1*, *gap1-1*, *put4-1*, *uga4-1*, *can1::HisG*, *lyp1/alp1::HisG*, *hip1::HisG*, *dip5::HisG*) (FISCHER et al., 2002) é incapaz de utilizar eficientemente como única fonte de N os aminoácidos arginina, aspartato, citrulina, ácido γ -aminobutírico, glutamato e prolina. A cepa JA248 (MAT α *ura3D gap1D gnp1D agp1D*) (VELASCO et al., 2004) é incapaz de utilizar glutamina eficientemente como única fonte de N no meio e a cepa 22 Δ 6AAL (MAT- α , *ura3-1, gap-1*, *put4-1*, *uga1*; *can1::HisG*, *lyp/alp::HisG*, and *lys2::HisG*) (Fischer et al., 2002) é incapaz de utilizar lisina eficientemente como única fonte de N no meio.

Os testes de complementação com as cepas da levedura 22 Δ 8AA foram desenvolvidos em meio livre de nitrogênio (N) suplementado com diferentes concentrações de L-prolina, L-citrulina, L-aspartato ou L-glutamato como única fonte de N. Testes de complementação com a cepa JA248 foram desenvolvidos em meio livre de N e complementado com diferentes concentrações de L-glutamina como única fonte de N. Testes de complementação com a cepa 22 Δ 6AAL foram desenvolvidos em meio livre de N complementado com diferentes concentrações de L-lisina como única fonte de N.

4.4.2. Obtenção das construções plasmidiais para clonagem em leveduras

a) Extração do RNA de plantas de arroz e amplificação da região codante dos genes *OSAAP1* e *OSAAP18*

O RNA total foi extraído a partir de amostras de folhas bandeira e panículas de plantas tipo selvagem da variedade de arroz *Nippombare* no período da antese com a utilização de tampão NTES (0,2 M Tris-Cl pH 8,0; 25 mM EDTA; 0,3 M NaCl; 2% SDS), conforme descrito no item 3.4.1.3.2 do capítulo 1 deste trabalho..

O RNA total foi quantificado em duplicata no *NanoDrop 2000c spectrophotometer* (ThermoScientific). Três microgramas de RNA total foram tratados com DNase (DNase I Amplification Grade – SigmaAldrich™) seguindo as instruções do fabricante. Três microgramas de RNA foram misturados com 3 μ L do tampão de reação da DNase I 10X, 3 μ L da DNase I em um volume total de 30 μ L. A incubação da reação foi conduzida a 25°C por 15 min, seguida da adição de 3 μ L de EDTA 50mM e posterior inativação da DNase I a 65°C por

10 minutos. Após a digestão com DNase I a qualidade do RNA e a presença de DNA nas amostras foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com Gel Red.

A reação de síntese do cDNA foi realizada com o kit “SuperScript™ III Reverse Transcriptase” (Life Technologies) seguindo as instruções do fabricante.

A região codante do gene *OsAAP18* foi amplificada a partir de cDNA sintetizado de RNA extraído de folhas bandeira de plantas tipo selvagem da variedade *Nippombare* no período da antese. Para amplificação da região codante do gene *OsAAP1*, foi utilizado o cDNA sintetizado a partir do RNA extraído de amostras de panículas das mesmas plantas. O período de coleta na fase reprodutiva do ciclo foi importante uma vez que foi verificado aumento de expressão desse gene nessa fase em análises anteriores. Foram desenhados *primers* específicos para a amplificação dos genes (Tabela 5).

Tabela 5. *Primers* utilizados para a amplificação dos genes *OsAAP1* (Os07g04180) e *OsAAP18* (Os06g36210).

Gene	Sequência
Os07g04180 Foward	AAAAAGCAGGCTAAATGGGGATGGAGAGGCCGCA
Os07g04180 Reverse	AGAAAGCTGGGTACATGAGGAGACGCTGAATG
Os06g36210 Foward	AAAAAGCAGGCTGCATGGGAGGAGGGACCAACGG
Os06g36210 Reverse	AGAAAGCTGGGTACAGGACCTGGTCTTGAAGGGC

A reação de PCR foi realizada com uma DNA polimerase de alta fidelidade, a *PlatinumPfx* (Life Technologies) conforme recomendações do fabricante, com adaptações de acordo com as características dos *primers*. Em uma primeira reação foi adicionado o tampão de amplificação Pfx 1,5x, solução enhancer PCRx 2x, dNTP 0,3mM cada, MgSO₄ 1mM, 1 μM de cada *primer*, Pfx DNA polimerase 1U e amostra 2μl de cDNA. Primeiramente a mistura de reação passou por uma etapa de desnaturação a 94°C por 10 minutos antes da adição da enzima Pfx devido à alta quantidade de CG que os genes de interesse apresentam. Após essa primeira etapa a enzima Pfx foi adicionada e a PCR seguiu com as seguintes etapas: desnaturação a 94° por 3 minutos e 45 segundos e 34 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento a 60°C e 2 minutos de extensão a 68°C.

b) Inserção dos sítios de recombinação através de reações BP

As regiões codantes dos genes *OsAAP1* e *OsAAP18* foram clonadas no vetor de doador pDON221, usando a tecnologia “MultiSite Gateway” (Life Technologies) de clonagem. Para isso, após a amplificação dos genes foram realizadas duas reações de PCR com *primers* híbridos desenhados para a construção do sítio de recombinação *attB1* e *attB2* para cada gene (Tabela 6).

Tabela 6. *Primers* utilizados para amplificação de sítios de recombinação *attB1* e *attB2* nas sequências de *OsAAP1* (Os07g04180) e *OsAAP18* (Os06g36210).

Gene	Sequência doPrimer
Os07g04180 attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAA
Os07g04180 attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA
Os06g36210 attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGC
Os06g36210 attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA

Após a inserção dos sítios de recombinação *attB1* e *attB2* as sequências, foram inseridas no vetor Gateway® pDONR™221. Os vetores doadores, da tecnologia MultiSite® Gateway, são usados para clonar os produtos de PCR flanqueados pelos sítios *attB* para gerar clones de entrada.

As reações BP foram realizadas com o kit “Gateway® BP Clonase II Enzyme Mix” (*Life Technologies*) seguindo as recomendações do fabricante. O material da reação BP foi utilizado para a transformação de células competentes de *E. coli* (DH5α) para caracterizar os clones de entrada. O meio de seleção das bactérias transformadas foi o LB contendo 50 μg mL⁻¹ de canamicina.

c) Preparo de células competentes para eletroporação de *E. coli*(DH5α)

Foram utilizadas células de *E. colicepa* DH5α (Invitrogen) preparadas para eletroporação utilizando o protocolo adaptado de SAMBROOK e RUSSEL (2001), com algumas modificações. Uma alíquota da cultura de *E. coli*DH5α, presente na coleção de cepas do laboratório foi cultivada em uma placa contendo meio de LB ágar. A placa foi incubada a 37°C, por um período de 16 a 24 horas. Do crescimento resultante uma colônia foi isolada e cultivada em 5 mL de meio LB líquido durante a noite a 37°C sob agitação de 225 rpm. Posteriormente, 3 mL do cultivo foram utilizados para inóculo em um frasco com a capacidade de 1000 ml contendo 300 mL de meio LB líquido e cultivado a 37°C, sob agitação de 225 rpm, até a densidade óptica a 600 nm (OD₆₀₀) atingir entre 0,5 e 0,7 (aproximadamente 5 x 10⁷). A seguir, a suspensão bacteriana foi transferida para tubos de centrifuga estéreis com a capacidade de 50 mL e resfriada em banho de gelo por 20 minutos, e posteriormente centrifugada a 4.000xg por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sedimento celular foi ressuspenso em 50 mL de água purificada em sistema milli-Q estéril a 4°C. A amostra foi mais uma vez centrifugada sob as mesmas condições, os sedimentos celulares ressuspendidos em 25 mL de água estéril a 4°C e os volumes de cada 3 tubos foram reunidos em um único tubo de 50 mL. Após mais uma centrifugação sob as mesmas condições foi descartado o sobrenadante, e o sedimento celular foi ressuspenso em 2 mL de glicerol 10% estéril a 4°C para cada 50 mL de meio original. As células eletrocompetentes foram alíquotadas (50 μL) em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL de capacidade e congeladas a - 80°C para transformação.

d) Eletroporação para transformação de bactérias

Para a eletroporação, foi utilizado 1 μL da reação BP e 50 μl de DH5α. O eletroporador (BioRad micropulser) foi ajustado para 1,7 kV, e logo em seguida ao pulso elétrico foi adicionado 700 μL de meio SOC. As bactérias transformadas foram incubadas a 37°C por 1:30 h antes de serem inoculadas em meio LB sólido com o antibiótico de seleção 50 μg mL⁻¹ (canamicina ou ampicilina para pDOR221 e pDR195, respectivamente). A confirmação da clonagem foi feita por análise de digestão dos plasmídeos com enzimas de restrição.

e) Clonagem dos fragmentos no vetor pDR195

Foram reamplificadas as regiões codantes dos genes *OsAAP1* e *OsAAP18* em pDON221 e clonadas no vetor de expressão em leveduras pDR195 (Figuras 28 e 29). O pDR195 é um vetor que usa o sistema corte-ligação e as enzimas utilizadas na inserção da região codante de *OsAAP1* e *OsAAP18* no vetor foram a *NotI* e *BamHI*.

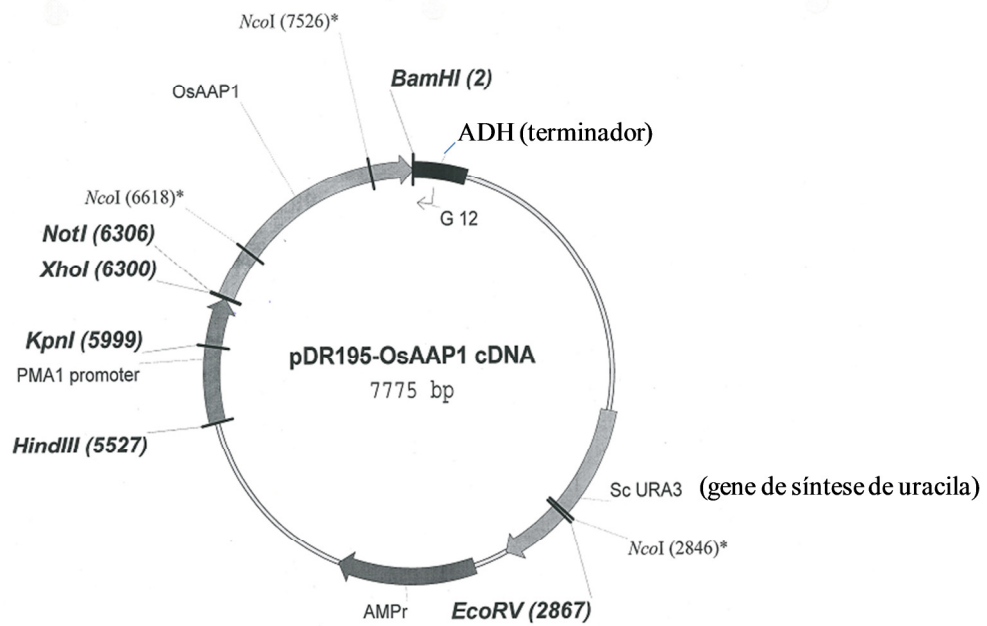


Figura 28. Vetor pDR195 abrigoando sequência codante de *OsAAP1*.

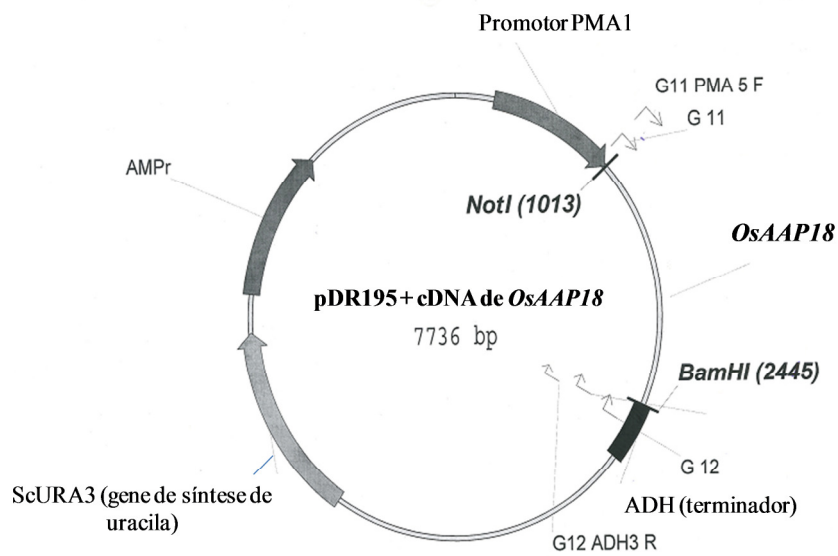


Figura 29. Vetor pDR195 abrigoando a sequência codante de *OsAAP18*

f) PCR e clivagem de *OsAAP1* e *OsAAP18* com enzimas de restrição

Foi realizada a amplificação por PCR da região codante dos genes *OsAAP1* e *OsAAP18* utilizando *primers* com sítios de clivagem das enzimas *NotI* e *BamHI* (Tabela 7). A DNA polimerase utilizada foi a *Phusion High-Fidelity* (ThermoScientific®), seguindo recomendações do fabricante.

Tabela 5. Primers utilizados para amplificação de OsAAP1 e OsAAP18 com sítios de corte das enzimas NotI e BamHI.

Gene	Primerda fita direta com sítio de corte NotI
OsAAP1	AAGGAAAAAAGCGGCCGCATGGGGATGGAGAGGCCGCA
OsAAP18	AAGGAAAAAAGCGGCCGCATGGGAGGAGGGACCAACGG
Gene	Primerda fita inversa complementar com sítio de corte BamHI
OsAAP1	CGCGGATCCTCATGAGGAGACGCTGAATG
OsAAP18	CGCGGATCCTCAGGACCTGGTCTTGAAGGGC

Foram realizadas duas reações de PCR independentes de cada gene para aumentar o volume de reação. Os produtos das reações foram unidos posteriormente e purificados em colunas do Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up kit (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

As reações de PCR para o gene *OsAAP1* foram realizadas com as seguintes etapas: desnaturação a 98°C por 30 segundos e 25 ciclos de 10 segundos de desnaturação a 98°C, 30 segundos de anelamento a 65°C, 45 segundos de extensão a 72°C e 10 minutos de extensão final a 72°C. As reações de PCR para o gene *OsAAP18* foram realizadas com as seguintes etapas: desnaturação a 98°C por 30 segundos e 25 ciclos de 10 seg de desnaturação a 98°C, 30 seg de anelamento a 58°C, 45 segundos de extensão a 72°C e 10 minutos de extensão final a 72°C. As reações foram confirmadas por visualização em gel de agarose e purificadas em colunas com a utilização do kit Wizard® SV Gel and PCR clean up system (Promega) seguindo-se as recomendações do fabricante.

g) Clivagem das sequências dos genes *OsAAP1* e *OsAAP18* com enzimas de restrição

Após a reação de amplificação dos genes foi realizada a reação de digestão com as enzimas de restrição, para a posterior ligação dos genes ao pDR195. Para garantir a clivagem adequada foram realizadas reações independentes com cada enzima de digestão. Foi realizada a reação primeiramente com a *NotI* e após a purificação do produto da reação em coluna do Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up kit (Promega) foi realizada a segunda reação de digestão, com a *BamHI*, seguida de mais uma purificação na coluna. Para a reação de digestão com as enzimas, aproximadamente 1µg de DNA foi tratado com 5 U da enzima, adicionando-se 100 µL de DNA com 15 µL de tampão de reação, 0,5 µL de enzima e 34,5 µL de água. A reação foi incubada a 37°C por 40 minutos. Após a digestão as enzimas foram inativadas por incubação a 75°C por 10 minutos. As reações foram visualizadas em gel de agarose.

h) Preparo do vetor pDR195 para reação de ligação

O vetor pDR195 possui sítios de clivagem das enzimas *NotI* e *BamHI*. Para assegurar o corte pelas duas enzimas e reduzir possível autoligação do vetor, o que levaria a redução de clones falso positivos, os produtos das reações de clivagem foram tratados com fosfatase alcalina. Foram realizadas duas reações de corte independentes com *NotI* e *BamHI*. O volume total de cada reação de clivagem foi 150 µL, sendo 40 µL de pDR195 (extraído por midiprep), 15 µL de tampão de reação da enzima, 4 µL de enzima e 91 µL de água. A reação foi incubada a 37°C e visualizada em gel de agarose. Após confirmação em gel a reação passou por tratamento com fosfatase alcalina.

Para o tratamento com fosfatase alcalina foram adicionados 50µL de DNA (aproximadamente 30µg de pDR195 digerido com *BamHI* ou *NotI*), 10µL de tampão, 5µL de fosfatase alcalina e 35µL de água. A reação foi incubada a 37° por 1 hora e depois interrompida por purificação da amostra em coluna. Após a clivagem com a primeira enzima

e tratamento com fosfatase alcalina as reações passaram pelo mesmo processo com a outra enzima e após a purificação em coluna do Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up kit (Promega) foi realizado um tratamento final com fosfatase alcalina. Então a amostra foi mais uma vez purificada em coluna do Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up kit (Promega) para posterior reação de ligação.

i) Reação de ligação

Para a reação de ligação foi utilizada a enzima T4 DNA ligase (Life Technologies) com a proporção vetor:inserto de 1:4 seguindo-se as recomendações do fabricante.

Os produtos das reações de ligação foram transferidos para células de *E. coli* DH5 α por meio de choque térmico. Células DMSO competentes foram colocadas em gelo por 2 minutos, em seguida adicionados 8 μ L da reação de ligação e os tubos foram deixados no gelo por mais 30 minutos. Posteriormente as células foram colocadas a 42°C por 40 segundos e em seguida no gelo por 2 minutos. As células foram inoculadas em meio LB com 50 μ g mL⁻¹ ampicilina para seleção de transformantes e obtenção da construção. Foi realizada a extração de plasmídeos utilizando o Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), conforme recomendações do fabricante. A obtenção da construção foi confirmada com o uso de enzimas de restrição. Posteriormente as construções foram inseridas nos mutantes de *S. cerevisiae*.

j) Preparo de células DMSO competentes

Células de *E. coli* DH5 α foram cultivadas ao longo da noite a 30°C até uma densidade de 0,6 a 600nm em meio contendo 10g de bactotripton, 2,5g de extrato de leveduras, 1mL de NaCl a 5M, 1,25 mL de KCl a 1M, 5mL de MgCl₂ a 1M e 5 mL de 1M MgSO₄ em 500mL de água. As culturas foram resfriadas em gelo por 10 minutos. Células foram centrifugadas a 2500xg e ressuspensas em 80mL de meio contendo 0,2M de PIPES, 1M de MnCl₂, 1M de CaCl₂ e 1M de KCl. Posteriormente as células foram incubadas no gelo por 10 minutos e centrifugadas novamente a 2500xg. As células então foram ressuspensas em 20mL do mesmo meio. Em seguida, 1,4mL de DMSO foram adicionados gentilmente sob agitação. As células foram incubadas em gelo por 10 minutos, posteriormente aliqüotadas em 200 μ L, congeladas em N líquido e imediatamente armazenadas a -80°C até a etapa de transformação. Todas as etapas de preparo das construções estão resumidas na Figura 30.

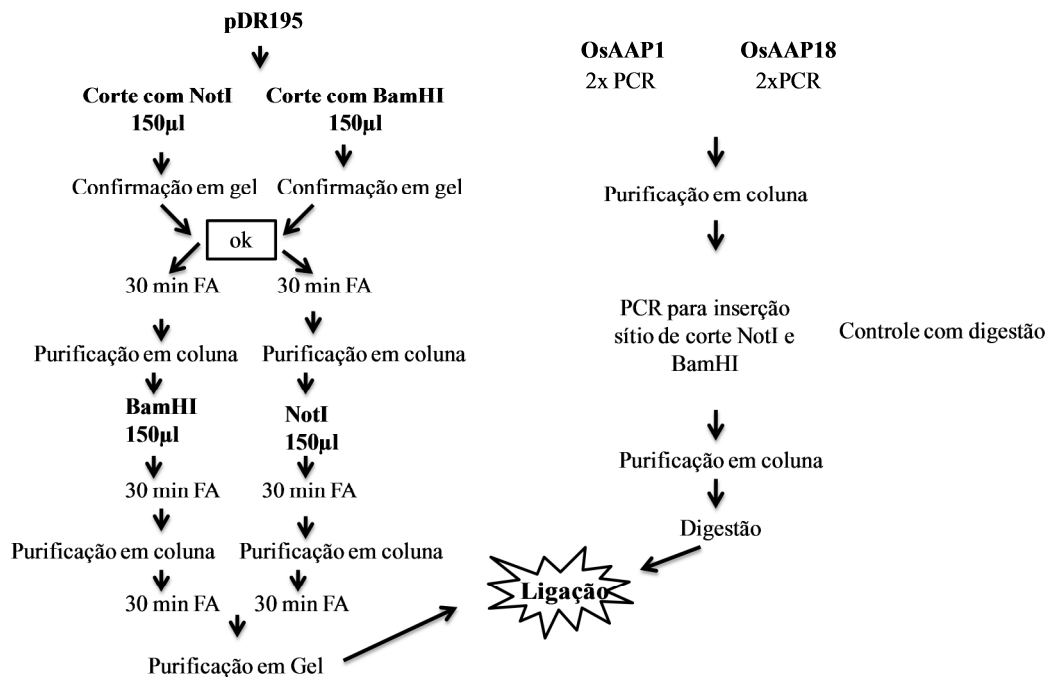


Figura 30. Resumo esquemático das construções do vetor pDR195 abrigando a região codante de *OsAAP1* e *OsAAP18*.

4.4.3. Preparo de células competentes e transformação de leveduras com as construções

Leveduras foram cultivadas durante a noite, sob agitação a 30°C, em 5mL de meio líquido não-seletivo para cada mutante (Tabela 8). Posteriormente 100mL do mesmo meio foram inoculados a 30°C sob agitação com 1 mL da cultura crescida durante a noite e aguardou-se a cultura atingir 0,5 a 0,8 a uma DO de 600nm. As células então foram sedimentadas por centrifugação a 3000rpm por 5 minutos. As células foram lavadas com 20mL de uma solução contendo 10mM de bicina a pH8,35, 1M de sorbitol e 3%(v/v) de etilenoglicol. Repetiu-se a centrifugação e as células foram ressuspensas com 2mL da mesma solução. As células foram aliqüotadas em 200µL e armazenadas a -80°C até a etapa da transformação.

Tabela 8. Meios não seletivos, seletivos para plasmídeo e seletivo para transporte utilizados no experimento.

Levedura/aminoácido testado	Meio não seletivo	Meio seletivo para plasmídeo	Meio seletivo para transporte
22Δ8AA	YPD	BA + (NH ₄) ₂ SO ₄ -ura	BA + aminoácido
L-prolina,	-	-	BA + L-prolina 1, 3 e 6 mM
L-citrulina	-	-	BA + citrulina 1, 3 e 6 mM
L-aspartato	-	-	BA + aspartato 1, 3 e 6 mM
L-glutamato	-	-	BA + glutamato 1, 3 e 6 mM
22Δ6AAL	YPD + 8,2mM de lisina	BA+ uréia+ 500µM lisina-aspartato	SC+50uM de lisina
JA248	YPD	YPD + 10mM de (NH ₄) ₂ SO ₄	BA + 0,01, 0,1, 0,25, 0,5, e 1mM de Glutamina

As cepas de levedura 22Δ8AA, JA248 e 22Δ6AAL foram transformadas com o vetor pDR195 abrindo a sequência de *OsAAP1e OsAAP18e* com o vetor vazio, para serem utilizadas como controle negativo nos testes de transporte dos aminoácidos. As células competentes de cada linhagem mutante de leveduras foram colocadas em gelo e foram adicionados 1 µg de DNA de plasmídeo e 50µg de DNA de esperma de salmão diluídos em 10µl. As células foram incubadas a 37°C por 5 minutos sob agitação e 1µl de uma solução contendo 200mM de bicina (pH8,35) e 40% de PEG1000 foi adicionado. As células foram homogeneizadas gentilmente e colocadas a 60°C por 30 minutos sem agitação. Após a incubação as células foram centrifugadas a 3000rpm, lavadas com 800µl de uma solução contendo 10mM de bicina (pH8,35) e 150mM de NaCl, e posteriormente ressuspensas em 100 µl dessa mesma solução. Após a transformação as células foram inoculadas no meio seletivo para plasmídeo referente a cada linhagem mutante (Tabela 8).

4.4.4. Ensaio de transporte e afinidade por aminoácidos

Foram realizados experimentos de complementação com as leveduras mutantes 22Δ8AA, 22Δ6AAL e JA248 carregando as sequências do cDNA dos genes *OsAAP1e OsAAP18* na WSU. O gene *OsAAP6* de arroz (Os01g65670) também foi utilizado neste experimento para comparação com os demais. A construção pDR195 carregando o cDNA de *OsAAP6* foi obtida seguindo o mesmo protocolo utilizado para a clonagem de *OsAAP1e OsAAP18* nas leveduras. Os testes de transporte foram realizados em duplicata com células oriundas de duas colônias independentes para cada linhagem com quatro repetições. Foram utilizadas como controle negativo células de colônias transformadas com o vetor pDR195 vazio, e como controle positivo e negativo células transformadas com os pDR195 carregando as sequências dos transportadores de aminoácidos já caracterizados *AtAAP3*, *AtAAP6* e *AtLHT2*. Foram multiplicadas leveduras transformadas com o vetor pDR195 carregando o cDNA de *AtAAP3* (OKUMOTO et al., 2004), *AtAAP6* e *AtLHT2* (LEE e TEGEDER, 2004) a partir de células estocadas em glicerol a -80°C em coleção existente no laboratório da WSU para realização dos testes.

Para os testes com 22Δ8AA foram utilizados como controle pDR195 carregando as sequências dos genes *AtAAP3* ou *AtAAP6*, para os testes com 22Δ6AAL foi utilizado pDR195 carregando as sequências de *AtAAP3* ou *AtLHT2* e para os teste com JA248 foram utilizados pDR195 carregando as sequências de *AtAAP3*, *AtAAP6* ou *AtLHT2*. Foram utilizados os meios com aminoácidos em concentração seletiva para transporte nas diferentes linhagens mutantes (Tabela 8). Testes de complementação com as cepas da levedura 22Δ8AA foram desenvolvidos sobre meio livre de nitrogênio ao qual foi adicionado 1, 3, ou 6mM de L-prolina, L-citrulina, L-aspartato ou L -glutamato como única fonte de N. Testes de complementação com a cepa JA248 foram desenvolvidos em meio livre de N complementado com 0,5, 1, 2 ou 5mM de L-glutamina como única fonte de N.

Testes de complementação com as cepas da levedura 22Δ8AA foram desenvolvidos sobre meio livre de nitrogênio ao qual foi adicionado 10, 30 ou 50mM de lisina. Foram utilizadas placas com meios que permitem que todas as leveduras, independentemente da construção, cresçam como controle positivo para o meio, chamado meio não seletivo. Para as linhagens 22Δ8AA e JA248, o meio não seletivo foi BA+ 10mM de (NH₄)₂SO₄, enquanto para a linhagem 22Δ6AAL os meios utilizados foram BA + 0,5g/l de Uréia + 500µM de lysaps e BA+0,5g/l de uréia +1mM de lisina (Tabela 8). Colônias isoladas das leveduras foram utilizadas para inocular nos meios adequados e incubadas a 27°C até o aparecimento das colônias (cerca de 3 dias), que foram comparadas às colônias das placas controle para cada linhagem. As construções foram enviadas para sequenciamento no Laboratório de Genômica da WSU antes da realização dos testes de transporte.

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados testes iniciais com a concentração de 1mM para arginina, aspartato, citrulina, GABA, glutamato e prolina com a cepa mutante 22Δ8AA (Figura 31). Os resultados desse teste confirmaram que essa concentração estava adequada para o teste de afinidade por substrato, uma vez que foi possível verificar diferenças entre os controles e os genes testados. Sendo assim, não houve necessidade de realização de testes com as concentrações previamente escolhidas de 3 e 6mM.

A realização de testes iniciais e escolha de uma concentração mínima para determinação da capacidade de transporte das cepas transformadas foi de extrema importância, uma vez que concentrações maiores dos aminoácidos a serem testados podem resultar em meio de cultivo não seletivo para transporte, ou seja, com impossibilidade de distinguir a afinidade dos transportadores pelo substrato. Essa concentração mínima de aminoácidos nos testes é variável entre diferentes transportadores. A concentração de 1mM foi utilizada em trabalhos para testar diferentes transportadores, mostrando-se adequada para seleção de afinidade de transporte para prolina (OKUMOTO et al., 2002; LEE e TEGEDER, 2004), citrulina (OKUMOTO et al., 2002), glutamato (OKUMOTO et al., 2002; LEE e TEGEDER, 2004), aspartato (OKUMOTO et al., 2002; FISCHER et al., 2002) e arginina (OKUMOTO et al., 2002, HIRNER et al., 2006). No entanto, deve-se atentar para possível necessidade de uso de concentrações maiores dos substratos no caso de transportadores de aminoácidos que apresentam baixa afinidade.

A complementação de leveduras com *OsAAP1* inserido no pRD195 restaurou a capacidade de crescimento na cepa mutante 22Δ8AA em meio enriquecido com 1mM de arginina, aspartato, citrulina, glutamato ou prolina como única fonte de N (Figura 31). *OsAAP1* também mostrou a capacidade de sustentar o crescimento da cepa mutante 22Δ6AAL em meio suplementado com lisina como única fonte de N mesmo na concentração mais baixa, de 10μM (Figura 32).

Foi verificado que os meios utilizados para os testes de complementação com a levedura JA248 possibilitaram o crescimento de todas as construções testadas, inclusive as leveduras que receberam o vetor pDR195 vazio, mesmo na menor concentração, de 0,01mM de glutamina (Figura 33). Isso caracteriza um meio não seletivo, ou seja, que possibilita o crescimento de todas as células. Sendo assim, como não houve o estabelecimento de uma dose seletiva de glutamina não foi possível verificar a capacidade de transporte desse aminoácido por *OsAAP1* no experimento. Além disso, existe a possibilidade do teste com a cepa JA248 não mostrar resultados de seleção devido a problemas com a cepa, como por exemplo contaminação com cepas não mutantes.

Os resultados indicam a capacidade de transporte de ampla gama de aminoácidos pelo transportador *OsAAP1*, embora não seja possível indicar os parâmetros cinéticos de transporte desses aminoácidos, uma vez que não foram determinados o K_m e V_{max} . Para determinar esses parâmetros seriam necessários testes de absorção desenvolvidos com aminoácidos marcados (^{14}C), o que não foi possível ser realizado na WSU, apesar da universidade possuir toda a infra-estrutura necessária para realização dos testes, devido ao curto tempo disponível para realização dos experimentos nos Estados Unidos. Esses resultados estão de acordo com os observados para o transportador AAP1 de *Arabidopsis*. LEE et al. (2007) verificaram através de estudos de complementação em leveduras que o transportador AAP1 de *Arabidopsis* apresenta a capacidade de transporte de prolina, e através de estudos com plantas mutantes, observaram que glutamato, histidina e aminoácidos neutros, incluindo fenilalanina, são substrato para AAP1.

O amplo espectro de aminoácidos pelos quais OsAAP1 tem afinidade pode representar um papel desse transportador no transporte de N orgânico em diferentes fases de desenvolvimento da planta, e em diferentes órgãos, apresentando distintos padrões cinéticos de acordo com o substrato. Além disso, o fato de OsAAP1 transportar diferentes aminoácidos pode indicar função de compensação quando algum outro transportador não é expresso, ou redundância de funções. O amplo espectro de aminoácidos transportados por OsAAP1 pode estar ligado ao fato da mutação nesse gene não ter reduzido a produção de plantas mutantes *Osaap1* como descrito no capítulo 1, uma vez que outros transportadores com afinidade para os mesmos aminoácidos podem compensar sua ação.

A complementação de leveduras com *OsAAP18* inserido no pDR195 não restaurou a capacidade de crescimento em nenhum dos meios testados. Resultados de seqüenciamento comprovaram erro na sequência de *OsAAP18* inserida em pDR195, invalidando os resultados verificados para essa construção. Com isso, não pode ser afirmado que *osAAP18* não é capaz de transportar os aminoácidos testados, uma vez que a ausência de crescimento deve ter ocorrido pelo erro na seqüência codante inserida.

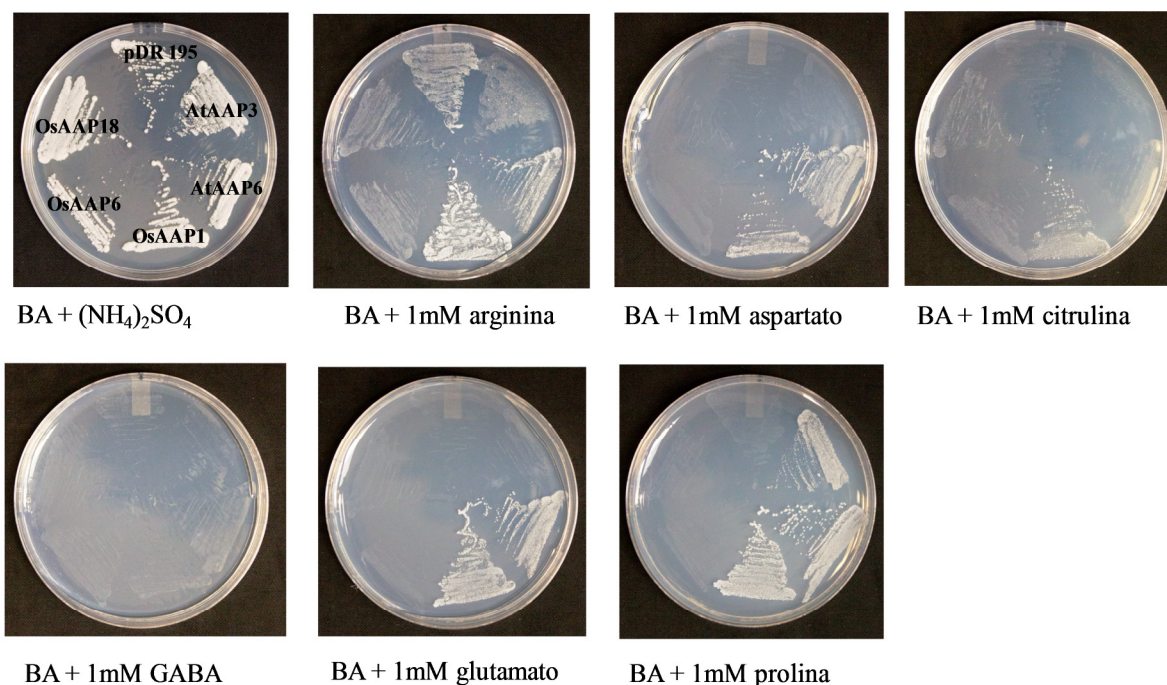


Figura 31. Teste de afinidade dos transportadores OsAAP1, OsAAP6 e OsAAP18 por substrato a 1mM (aminoácidos arginina, aspartato, citrulina, GABA, glutamato e prolina) com colônias das leveduras 22Δ8AA. O meio BA enriquecido com 10mM de (NH₄)₂SO₄ foi utilizado como controle positivo para cultivo. Leveduras da cepa 22Δ8AA carregando vetor vazio (pDR195) foram utilizadas como controle negativo para o teste. Leveduras 22Δ8AA carregando a sequência dos genes *AtAAP3* e *AtAAP6* foram utilizadas como controle positivo.

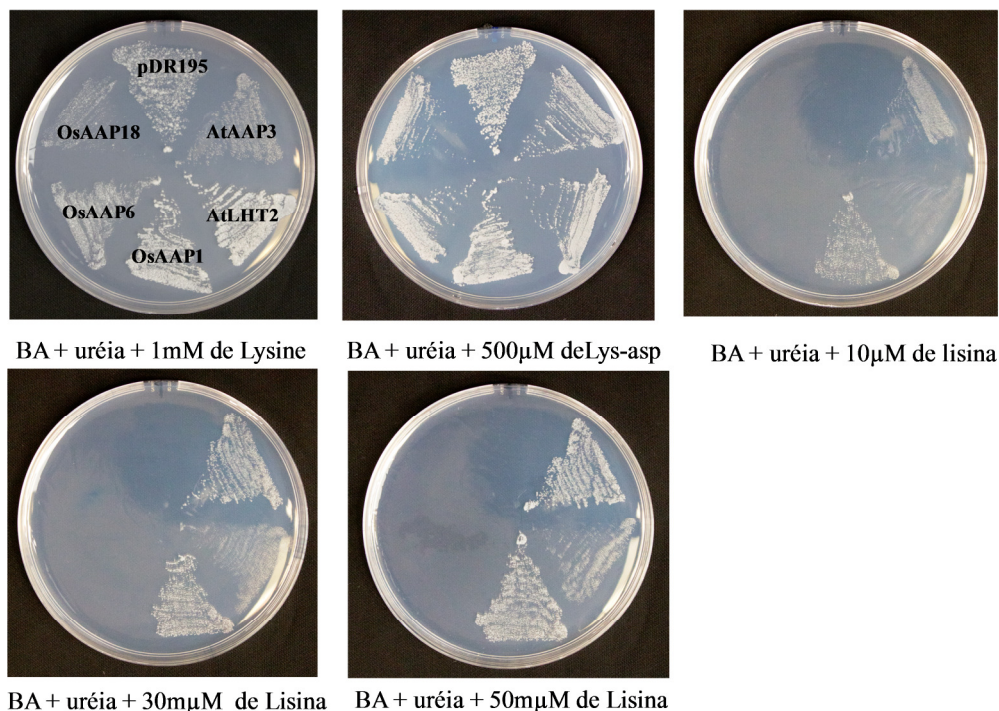


Figura 32. Teste de afinidade de OsAAP1, OsAAP6 e OsAAP18 por substrato (lisina) em meio BA com concentrações de 10, 30 e 50 µM utilizando colônias das leveduras 22Δ6AAL. O meio BA enriquecido com 0,5g/l de uréia + 1mM de lisina foi utilizado como controle positivo. Leveduras da cepa 22Δ6AAL carregando vetor vazio (pDR195) foram utilizadas como controle negativo para o teste. Leveduras 22Δ6AAL carregando a sequência dos genes *AtAAP3* e *AtLHT2* foram utilizadas como controle positivo.

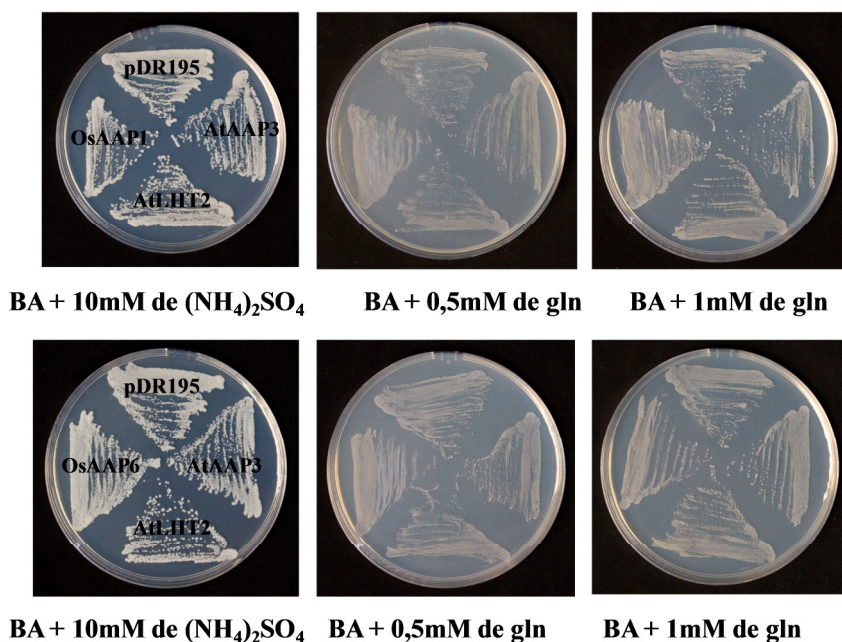


Figura 33. Teste de afinidade de OsAAP1 e OsAAP6 por substrato (glutamina) em meio BA com 0,5 e 1mM de glutamina utilizando cepas das leveduras mutantes JA248. O meio BA enriquecido com 10mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi utilizado como controle positivo para cultivo. Leveduras da cepa JA248 carregando vetor vazio (pDR195) foram utilizadas como controle negativo para o teste. Leveduras JA248 carregando a sequência dos genes *AtAAP3* e *AtLHT2* foram utilizadas como controle positivo.

4.6. CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que OsAAP1 tem capacidade de transportar amplo espectro de aminoácidos, o que indica um papel importante no processo de transporte de N na forma orgânica em plantas de arroz.

5. CONCLUSÕES GERAIS

O gene *OsAAP18* codifica para uma proteína de transporte de aminoácidos envolvida no processo de remobilização de N para os grãos em plantas de arroz e a interrupção de sua expressão afeta significativamente a produção de grãos.

O gene *OsAAP1* codifica para uma proteína de transporte de aminoácidos em arroz que possui afinidade por um amplo espectro de aminoácidos e apresenta maior expressão no período reprodutivo, podendo estar associada à remobilização de diferentes aminoácidos para a formação do endosperma.

OsAAP1 e *OsAAP18* constituem genes de interesse para estudos envolvidos em engenharia genética podendo ser utilizado em estratégias de aumento na EUN em plantas de arroz.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, S.R.M. Transformação de Plantas. Planaltina, DF: Embrapa-CPAC, 2003, 28p.
- BEATTY, P.H.; YADETA ANBESSA, Y.; JUSKIW, P.; CARROLL, R.T.; WANG, J.; GOOD, A. Nitrogen use efficiencies of spring barley grown under varying nitrogen conditions in the field and growth chamber. **Annals of Botany**, 105: 1171–1182, 2010.
- BOTSTEIN, D. and FINK, G.R. Yeast: An Experimental Organism for 21st Century Biology. **Genetics**, 189: 695–704, 2011.
- BRITTO, D.T.; KRONZUCKER, H.J. Bioengineering nitrogen acquisition in rice: can novel initiatives in rice genomics and physiology contribute to global food security? **Bioessays**, 26:683–692, 2004.
- CANHOTO, J.M. Biotecnologia vegetal: da clonagem de plantas à transformação genética. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 407p. 2010.
- CASTRILLO, J.I. and OLIVER, S.G. Yeast Systems Biology: The Challenge of Eukaryotic Complexity. In: Castrillo JI, Oliver SG, editors. Yeast Systems Biology: Methods and Protocols. New York : Humana Press, 2011.
- CATALDO, D.; HARRON, M.; SCHARADER, L. E. & YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, New York, 6: 853-855, 1975.
- CHARDON, F.; BARTHÉLÉMY, J.; D-V, F. AND MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Natural variation of nitrate uptake and nitrogen use efficiency in *Arabidopsis thaliana* cultivated with limiting and ample nitrogen supply. **J. Exp. Bot.** 61(9): 2293–2302, 2010.
- CHARDON, F.; NOËL, V.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Exploring NUE in crops and in *Arabidopsis* ideotypes to improve yield and seed quality. **J. Exp. Bot.** 63 (9): 3401-3412, 2012.
- CHEN, L. & BUSH, D.R. LHT1, a lysine- and histidine-specific amino acid transporter in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, 115: 1127–1134, 1997.
- CHEN, L.; ORTIZ-LOPEZ, A.; JUNG, A. AND BUSH, D.R. *ANT1*, an Aromatic and Neutral Amino Acid Transporter in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 125(4): 1813–1820, 2001.
- COELHO, C.P. **Remobilização de Nitrogênio em Variedades de Arroz com e sem Suplementação Nitrogenada**. 2011. 69f. Dissertação de Mestrado. (Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.
- COUTURIER, J. FAÏ, E.; FITZ, M.; WIPF, D.; BLAUDEZ, D. AND CHALOT, M. PtAAP11, a high affinity amino acid transporter specifically expressed in differentiating xylem cells of poplar. **J. Exp. Bot.** ,61(6): 1671–1682,2010.

DÜNDAR, E. and BUSH, D.R. BAT1, a bidirectional amino acid transporter in *Arabidopsis*. **Biotechnology Advances**, 28: 427–435, 2010.

DURAND, A.N.; MOSES, T.; DE CLERCQ, R.; GOOSSENS, A.; AND PAUWELS, L. A MultiSiteGatewayTM vector set for the functional analysis of genes in the model *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Molecular Biology**. 13:30, 2012.

FELKER, P. Micro determination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, 49:1980, 1977.

FERNANDES M.S. N-carriers, light and temperature influences on uptake and assimilation of nitrogen by rice. **Turrialba** 34(1):9-18, 1984.

FISCHER, W-N.; ANDRE, B.; RENTSCH, D.; KROLKIEWICZ, S.; TEGEDER, M.; BREITKREUZ, K.; FROMMER, W.B. Amino acid transport in plants. **Trends Plant Sci.** 3:188–195, 1998.

FISCHER, W.N.; LOO, D.D.; KOCH, W.; LUDEWIG, U.; BOORER, K.J.; TEGEDER, M.; RENTSCH, D.; WRIGHT, E.M. and FROMMER, W.B. Low and high affinity amino acid H⁺-cotransporters for cellular import of neutral and charged amino acids. **Plant J.** 29: 717–731, 2002.

FISCHER, W.N.; KWART, M.; HUMMEL, S.; FROMMER W.B. Substrate specificity and expression profile of amino acid transporters (AAPs) in *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**, 270: 16315–16320, 1995.

FISHER, D.B. Protein staining of ribbonedepon sections for light microscopy. **Histochem. Cell Biol.** 16, 92–96, 1968.

FROMMER, W.B.; HUMMEL, S.; RIESMEIER, J.W. Expression cloning in yeast of a cDNA encoding a broad specificity amino acid permease from *Arabidopsis thaliana*. **Proc Natl. Acad. Sci. USA.** 90:5944-5948, 1993.

FROMMER, W.B.; HUMMEL, S.; RENTSCH, D. Cloning of an *Arabidopsis* histidine transporting protein related to nitrate and peptide transporters. **FEBS Letters.** 347: 185-189, 1994.

FROMMER, W.B.; HUMMEL, S.; UNSELD, M. AND NINNEMANN, O. Seed and vascular expression of a high-affinity transporter for cationic amino acids in *Arabidopsis*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 19;92 (26):12036-40, 1995.

GELVIN, S.B. Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. **Microbiology and Molecularbiology Reviews.** 67(1):16–37, 2003.

GOOD, A.G.; SHRAWAT, A.K.; and MUENCH, D.G. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? **Trends Plant Sci.** 9(12): 597–605, 2004.

GRECO, R.; OUWERKERK, P.B.F.; KAM, R.J.; SALLAUDE, C.; FAVALLI, C.; COLOMBO, L.; GUIDERDONE, E.; MEIJER, A.H.; HOGE†, J.H.C.; PEREIRA, A. Transpositionalbehaviour of an Ac/Ds system for reverse genetics in Rice. **TheorAppl Genet.** 108: 10–24, 2003.

HIRNER, A.; LADWIG, F.; STRANSKY, H.; OKUMOTO, S.; KEINATH, M.; HARMS, A.; FROMMER, W. B.; KOCH, W. Arabidopsis LHT1 is a high-affinity transporter for cellular amino acid uptake in both root epidermis and leaf mesophyll. **Plant Cell**, **18**:1931–1946, 2006.

HIRNER, B.; FISCHER, W.N; RENTSCH, D.; KWART, M.; FROMMER, W.B. Developmental control of H⁺/amino acid permease gene expression during seed development of Arabidopsis. **Plant Journal**, **14**:535–544, 1998.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p., 1950.

HSU, L-C.; CHIOU, T-J.; CHEN, L. and BUSH, D.R. Cloning a plant amino acid transporter by functional complementation of a yeast amino acid transport mutant. **Proc Natl Acad Sci U S A**. **90**(16):7441-5, 1993.

HUNT, E.; GATTOLIN, S.; NEWBURY, H.J.; BALE, J.S.; TSENG, H-M, BARRETT, D.M and PRITCHARD, J. A mutation in amino acid permease AAP6 reduces the amino acid content of the Arabidopsis sieve elements but leaves aphid herbivores unaffected. **J. Exp. Bot.** **61**(1): 55–64, 2010.

INVITROGEN. Current Choices in protein expression, functional analysis, and gene Discovery: Navigating via Gateway. Disponível em <<http://tools.lifetechnologies.com/Content/Online%20Seminars/gateway/2.htm>>. Acesso em 16/09/2013b.

INVITROGEN. Gateway[®] Technology: A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems. Disponível em <<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/gatewayman.pdf>>. Acesso em 16/09/2013a.

JAIN, M.; TYAGI, A.K.; KHURANA, J. P. Molecular characterization and differential expression of cytokinin-responsive type-A response regulators in rice (*Oryza sativa*). **BMC Plant Bio**, **16**:1, 2006.

JAWORSKI, E.G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical Biophysical Research Communications**, **43**(6):1274-1279, 1971.

JEON, J.S., LEE, S., JUNG, K.H., JUN, S.H., JEONG, D.H., LEE, J., KIM, C., JANG, S., YANG, K., NAM, J., AN, K., HAN, M.J., SUNG, R.J., CHOI, H.S., YU, J.H., CHOI, J.H., CHO, S.Y., CHA, S.S., KIM, S.I. AND AN, G. T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. **Plant J.** **22**:561-570, 2000.

JEONG, D.H.; AN, S.; KANG, H.G.; MOON, S.; HAN, J.J.; PARK, S.; LEE, H.S.; AN, K. and AN, G. T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. **Plant Physiol.** **130**:1636–1644, 2002.

JIANG, S-Y and RAMACHANDRAN, S. Natural and artificial mutants as valuable resources for functional ge-nomics and molecular breeding. **Int. J. Biol. Sci.** **6**(3):228-251, 2010.

- JULIANO, B. O. Polysaccharides, proteins and lipids of rice. In: JULIANO, B. O., ed. Rice: Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, 1985. p. 59-174.
- KANT, S.; BI, Y-M AND ROTHSTEIN, S.J. Understanding plant response to nitrogen limitation for the Improvement of crop nitrogen use efficiency. . **J. Exp. Bot.** 62(4):1499–1509, 2011.
- KICHEY, T.; HIREL, B.; HEUMEZ, E.; DUBOIS, F.; LE GOUIS, J. In winter wheat (*Triticumaestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilization to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. **Field Crops Research.** 102: 22–32, 2007.
- KOCH, W.; KWART, M.; LAUBNER, M.; HEINEKE, D.; STRANSKY, H.; FROMMER, W.B.; TEGEDER, M. Reduced amino acid content in transgenic potato tubers due to antisense inhibition of the leaf H⁺/amino acid symporter StAAP1. **Plant J.** 33(2):211-20, 2003.
- KWART, M.; HIRNER, B.; HUMMEL, S.; FROMMER, W.B. Differential expression of two related amino acid transporters with differing substrate specificity in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** 4:993-1002, 1993.
- LADWIG, F.; STAHL, M.; LUDEWIG, U.; HIRNER, A.A.; HAMMES, U.Z.; STADLER, R.; HARTEK, K. AND KOCH, W. *Siliques Are Red1* from *Arabidopsis* Acts as a Bidirectional Amino Acid Transporter That Is Crucial for the Amino Acid Homeostasis of *Siliques*. **Plant Physiology.** 158(4): 1643-1655, 2012.
- LALONDE, S.; TEGEDER, M.; THORNE-HOLST, M.; FROMMER, W.B. and PATRICK J.W. Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. **Plant Cell Environ.** 26: 37-56, 2003.
- LEE, Y.-H. and TEGEDER, M. Selective expression of a novel high affinity transport system for acidic and neutral amino acids in the tapetum cells of *Arabidopsis* flowers. **Plant J.** 40:60-74, 2004.
- LEE, Y.H.; FOSTER, J.; CHEN, J.; VOLL, L.M.; WEBER, A.P.M. and TEGEDER, M. AAP1 transports uncharged amino acids into roots of *Arabidopsis*. **The Plant Journal.** 50: 305-319, 2007.
- LIU, X. AND BUSH, D.R. Expression and transcriptional regulation of amino acid transporters in plants. **Amino Acids.**, 30:113–120, 2006.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. : Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. **Methods.** 25: 402–408, 2001.
- LU, Y.; SONG, Z.; LÜ, K.; LIAN, X.; CAI, H. Molecular characterization, expression and functional analysis of the amino acid transporter gene family (OsAATs) in rice. **Acta Physiologiae Plantarum.** 34(5): 1943-1962, 2012.

- LUBKOWITZ, M. The OPT family functions in long-distance peptide and metal transport in plants. **Genet. Eng.** 27: 35-55, 2006.
- MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; REISDORF-CREN, M. & ORSEL, M. Leaf Nitrogen Remobilization for plant development and grain filling. **Plant Biology**, 10:23-36, 2008.
- MELL, J.C. AND BURGESS, S.M. Yeast as a Model Genetic Organism. In: Nature Encyclopedia of Life Sciences , London: Nature Publishing Group. 26 March, 2003.
- MILLER, A.J.; SMITH, S.J. Cytosolic nitrate ion homeostasis, could it have a role in sensing nitrogen status? **Annals of Botany**.101:485-489, 2008.
- MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**. 5: 62-71, 2001.
- OKUMOTO, S.; KOCH, W.; TEGEDER, M.; FISCHER, W.N.; BIEHL, A.; LEISTER, D.; STIERHOF, W.D. AND FROMMER, W.B. Root phloem-specific expression of the plasma membrane amino acid proton co-transporter AAP3. **J. Exp. Bot.** 55(406): 2155–2168, 2004.
- OKUMOTO, S.; SCHMIDT, R.; TEGEDER, M.; FISCHER, W. N.; RENTSCH, D.; FROMMER, W. B. and KOCH, W. High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and developing seeds of *Arabidopsis*. **J. Biol. Chem.** 277: 45338–45346, 2002.
- PERCHLIK, M.; FOSTER, J. and TEGEDER, M. Different and overlapping functions of *Arabidopsis* LHT6 and AAP1 transporters in root amino acid uptake. **J. Exp. Bot.** 65 (18): 5193-5204, 2014.
- PITZSCHKE, A. and HIRT, H. New insights into an old story: Agrobacterium-induced tumour formation in plants by plant transformation. **EMBO J.** 29(6): 1021-32, 2010.
- PRATELLI, R. AND PILOT, G. Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. **J. Exp. Bot.** 65(19): 5535–5556, 2014.
- RENTSCH, D.; SCHMIDT, S. AND TEGEDER, M. Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. **FEBS Lett.** 581:2281–2289, 2007.
- ROLLETSCHEK, H.; HOSEIN, F.; MIRANDA, M.; HEIM, U.; GÖTZ, K-P, SCHLERETH, A.; BORISJUK, L.; SAALBACH, I.; WOBUS, U. AND WEBER, H. Ectopic Expression of an Amino Acid Transporter (VfAAP1) in Seeds of *Vicia narbonensis* and Pea Increases Storage Proteins. **Plant Physiology**, 137:1236–1249, 2005.
- RYU, C.-H.; YOU, J.-H.; KANG, H.-G.; HUR, J.; KIM, Y.-H.; HAN, M.-J.; AN, K.; CHUNG, B.-C.; LEE, C.-H. and AN, G. Generation of T-DNA tagging lines with a bidirectional gene trap vector and the establishment of an insertion-site database. **Plant Mol. Biol.** 54: 489–502, 2004.
- SAMBROOK, J. AND RUSSELL, D.W. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York., 2001.

SANDERS, A.; COLLIER, R.; TRETHERY, A.; GOULD, G.; SIEKER, R. & TEGEDER, M. AAP1 regulates import of amino acids into developing *Arabidopsis* embryos. **Plant J.** 59: 540–552, 2009.

SANTOS, L. A.; BUCHER, C. A.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Effects of nitrogen stress on proton-pumping and nitrogen metabolism in rice. **Journal of Plant Nutrition**, 32: 549 – 564, 2009a.

SANTOS. Efeito da disponibilidade de nitrato em solução nutritiva sobre a absorção de nitrogênio e atividade enzimática de duas cultivares de arroz. *Bragantia*, Campinas, v.68, n.1, p.53-61, 2009b.

SATO, Y.; ANTONIO, B. A.; NAMIKI, N.; TAKEHISA, H.; MINAMI, H.; KAMATSUKI, K.; SUGIMOTO, K.; SHIMIZU, Y.; HIROCHIKA, H.; NAGAMURA, Y. RiceXPro: a platform for monitoring gene expression in *japonica* rice grown under natural field conditions. **Nucleic Acids Research**. 39: 1–8, 2010.

SCHMIDT, R.; STRANSKY, H. and KOCH, W. The amino acid permease AAP8 is important for early seed development in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**. 226:805-813, 2007.

SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L. M. & FERNANDES, M. S. Nitrogen remobilization during the reproductive period in two Brazilian rice varieties. **Journal of Plant Nutrition**, New York, 21(10): 2049-2063, 1998.

STEWART JR, C.N. PLANT BIOTECHNOLOGY AND GENETICS: Principles, Techniques and Applications. Wiley and Sons, New York, 400 p. June 2008.

SWARBRECK, S.M.; DEFOIN-PLATEL, M.; HINDLE, .; SAQI, M.; HABASH, D.Z. New perspectives on glutamine synthetase in grasses. **J. Exp Bot.** 62(4): 1511–1522, 2011.

TABUCHI, M.; ABIKO, T.; YAMAYA, T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in Rice (*Oryza sativa* L.). **J. Exp Bot.** 58: 2319–2327, 2007.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. and KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. 24: 1596-1599, 2007.

TAN, Q.M.; GRENNAN, A.K.; PELISSIER, H.C.; RENTSCH, D.; TEGEDER, M. Characterization and expression of French bean amino acid transporter *PvAAP1*. **PlantSci.** 174:348-356, 2008.

TEDESCO, J. M.; GIANELLO, C.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. Análise de solos, plantas e outros materiais. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 174p.

TEGEDER M. Transporters for amino acids in plant cells: some functions and many unknowns. **Current Opinion in Plant Biology**, 15:315–321, 2012.

TEGEDER M. Long distance transport of amino acids and ureides: Opportunities for crop improvement; **J. Exp. Bot.** (in press), 2013.

TEGEDER M. AND RENTSCH D. (2010) Uptake and Partitioning of Amino Acids and Peptides. **Molecular Plant** 3, 997-1011.

TEGEDER M. AND WARD J.M. Molecular evolution of plant AAP and LHT amino acid transporters, **Frontiers in Plant Physiology**. 3: 1-11, 2012.

TEGEDER M., OFFLER C.E., FROMMER W.B. AND PATRICK J.W. Amino acid transporters are localized to transfer cells of developing pea seeds. **Plant Physiol.** 122: 319-326, 2006b.

TEGEDER M., RUAN Y.-L. AND PATRICK J.W. Roles of membrane transporters in phloem functions; in Thompson G. and van Bel A., eds, *Biochemistry of Phloem*, Wiley-Blackwell, Oxford, pp 63-101, 2013.

TEGEDER M., TAN Q., GRENNAN A. AND PATRICK J.W. Amino acid transporter expression and localisation studies in pea (*Pisum sativum* L.). **Functional Plant Biology**, 34, 1019-1028, 2007.

TEGEDER M., THOMAS M., HETHERINGTON L., WANG X.-D., OFFLER C.E. AND PATRICK J.W. Genotypic differences in seed growth rates of *Phaseolus vulgaris* L. Factors contributing to cotyledon sink activity and sink size. **Aust J Plant Physiol.** 27: 119-29, 2000a.

TEGEDER, M. & WEBER, A.P.M. Metabolite transporters in the control of plant primary metabolism. In: PLAXTON, W. & MCMANUS, M., (Eds.). *Annual Plant Reviews: Control of primary metabolism in plants*, 22: 85–120, Blackwell Publishing, Oxford, 2006.

TZFIRA, T.; LI, J.; LACROIX, B. and CITOVSKEY, V. Agrobacterium T-DNA integration: molecules and models. **TRENDS in Genetics**. 20(8): 375-383, 2004.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. 2000. Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG. Versão 8.0. Viçosa, MG.

VELASCO, I.; TENREIRO, S.; CALDERON, I.L., ANDRÉ, B. Saccharomyces cerevisiae Aqr1 is an internal-membrane transporter involved in excretion of amino acids. **Eukaryotic Cell**, 3: 1492–1503, 2004.

WANG, N.; LONG, T.; YAO, W.; XIONG, L.; ZHANG, Q. AND WU, C. Mutant Resources for the Functional Analysis of the Rice Genome. **Mol. Plant** .6 (3): 596-604, 2013.

WATERWORTH, W.M. AND BRAY, C.M. Enigma variations for peptides and their transporters in higher plants. **Ann. Bot.** 98: 1-8, 2006.

WIPF, D.; LUDEWIG, U.; TEGEDER, M.; RENTSCH, D.; KOCH, W. and FROMMER W.B. Amino acid/neurotransmitter transporters are highly conserved between fungi, plants, and animals. **Trends Biochem Sci.** 27: 139-47, 2002.

XU, G.; FAN, X.; MILLER, A.J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. **Annu. Rev. Plant Biol.** 63:5.1–5.30, 2012.

YEMM, E. W. & COCKING, E. C. The determination of amino-acid with ninhydrin. **Analytical Biochemistry.**, 80:209-213, 1955.

YEMM, E. W. & WILLIS, A. I. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochem. J.**, 57:508-514, 1957.

YESILIRMAK, F. AND SAYERS, Z. Heterologous Expression of Plant Genes. **International Journal of Plant Genomics.** 02/2009: 296482, 2009.

ZHANG, L.; TAN, Q.; LEE, R.; TRETHERY, A.; LEE, Y-H.; TEGEDER, M. Altered Xylem-Phloem Transfer of Amino Acids Affects Metabolism and Leads to Increased Seed Yield and Oil Content in *Arabidopsis*. **The Plant Cell.** 22(11): 3603-3620, 2010.

ZHANG, Q.; LI, J.; XUE, Y.; HAN, B.; DENG, X. W. Rice 2020: A Call For An International Coordinated Effort In Rice Functional Genomics. **Molecular Plant.** 1(5): 715–719, 2008.

ZHAO, H.; MA, H.; YU, L.; WANG, X.; ZHAO, J. Genome-Wide Survey and Expression Analysis of Amino Acid transporter gene family in Rice (*Oryza sativa*). **PlosOne**, 7(11): e49210, 2012.

ZIMMERMANN, P.; LAULE, O.; SCHMITZ, J.; HRUZ, T.; BLEULER, S.; AND GRUISSEM, W. Genevestigator Transcriptome Meta-Analysis and Biomarker Search Using Rice and Barley Gene Expression Databases. **Molecular Plant.** 1 (5), 851-857, 2008.