

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

TESE

**Efeito da Superexpressão dos Fatores de
Transcrição ZmDof1 e OsDof25 sobre a Eficiência
de Uso de Nitrogênio em *Arabidopsis thaliana* L.**

Leandro Azevedo Santos

2009



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

**EFEITO DA SUPEREXPRESSIONAMENTO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO
ZmDof1 E *OsDof25* SOBRE A EFICIÊNCIA DE USO DE NITROGÊNIO
EM *Arabidopsis thaliana* L.**

LEANDRO AZEVEDO SANTOS

Sob a Orientação do Professor

Manlio Silvestre Fernandes

e Co-orientação da Professora

Sonia Regina de Souza

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

Seropédica, RJ

Junho de 2009

631.84

S237e

T

Santos, Leandro Azevedo, 1981-

Efeito da superexpressão dos fatores de transcrição ZmDof1 e OsDof25 sobre a eficiência de uso de Nitrogênio em *Arabidopsis thaliana* L. / Leandro Azevedo Santos - 2009.

81 f. : il.

Orientador: Manlio Silvestre Fernandes.
Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Bibliografia: f. 69-81.

1. Nitrogênio - Fixação - Teses. 2. Plantas - Efeito do Nitrogênio - Teses. 3. *Arabidopsis thaliana* - Teses. 4. Clonagem molecular - Teses. I. Fernandes, Manlio Silvestre, 1939-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. 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

LEANDRO AZEVEDO SANTOS

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

TESE APROVADA EM 03/06/2009

Manlio Silvestre Fernandes. PhD. UFRRJ
(Orientador)

Everaldo Zonta. Dr. UFRRJ

Leonardo Oliveria Medici. Dr. UFRRJ

Carolina Spiegel. Dra. UFF

Vanildo Silveira. Dr. UENF

A Deus, que sempre esteve presente em todas as decisões que tomei para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Aos meus queridos e amados pais, Sebastião Oliveira Santos e Gerside Abreu Azevedo Santos que sempre me deram forças e torceram por mim.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo amparo que sempre me foi dado em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Sebastião Oliveira Santos e Gerside Abreu Azevedo Santos que com muito amor, carinho, compreensão e apoio incondicional me deram forças no que fosse necessário para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Aos meus irmãos Eileen Azevedo Santos e Huarrisson Azevedo Santos pelo apoio e conselhos valiosos.

A minha companheira Samara Salamene, pelo apoio, carinho e compreensão em todos os momentos que precisei.

Ao Dr. Manlio Silvestre Fernandes pela orientação e ensinamentos sobre pesquisa científica, do qual tenho orgulho de ser orientado.

A Dra. Sonia Regina de Souza pela orientação, ensinamentos, conselhos e carinho na condução dos trabalhos.

A Elvia Mariam Lis Martinez Stark pelo incentivo e valiosos conselhos.

Ao Dr. Eduardo de Matos Nogueira pelo auxílio nas técnicas utilizadas.

A todos os colegas de laboratório pelo apoio na condução dos trabalhos e análises laboratoriais.

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

Ao CNPq e a FAPERJ pelo fomento.

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

BIOGRAFIA

Leandro Azevedo Santos nascido em 24 de outubro de 1981, na cidade de Santana-BA. concluiu o ensino fundamental na cidade de Sítio do Mato-BA e o ensino médio na Escola Agrotécnica Federal de Januária - MG, obtendo o título de Técnico em Agropecuária. Em 1999, ingressou no curso de graduação em Agronomia da UFRRJ. Durante a graduação, foi bolsista por quatro anos do CNPq/PIBIC, onde participou de trabalhos junto à equipe de estudos sobre agroecologia na Embrapa Agrobiologia. Obteve o título de Engenheiro Agrônomo em fevereiro de 2004. Em março de 2004, ingressou no programa de pós-graduação ao nível de mestrado, em Agronomia - Ciência do Solo na UFRRJ. Foi bolsista do CNPq durante o primeiro ano do mestrado e no segundo ano foi bolsista da FAPERJ programa aluno nota 10. Em março de 2006, ingressou no doutorado do mesmo curso de pós-graduação, foi bolsista do CNPq durante os dois primeiros anos e novamente bolsista nota 10 da FAPERJ durante o restante do curso. Foi aprovado em concurso para professor substituto de fisiologia vegetal na UFRRJ em março de 2008.

RESUMO

SANTOS, Leandro Azevedo. **Efeito da superexpressão dos fatores de transcrição *ZmDof1* e *OsDof25* sobre a eficiência de uso de nitrogênio em *Arabidopsis***. 2009. 81f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Com o objetivo de aumentar a eficiência de uso de nitrogênio (EUN) em plantas, foi identificado e clonado o fator de transcrição *OsDof25* de arroz, cujo provável ortólogo é o *ZmDof1* de milho, já identificado e parcialmente caracterizado. Também foi clonado o *ZmDof1* para análises comparativas com o *OsDof25*, a fim de comprovar que este último é realmente ortólogo do *ZmDof1*. As construções para superexpressão destes fatores de transcrição em *Arabidopsis* foram feitas utilizando o sistema “gateway” de clonagem para obtenção dos vetores de expressão 35S*ZmDof1*:HA e 35S:*OsDof25*:HA. Foram obtidas linhagens com diferentes níveis de expressão destes genes, mas com apenas uma inserção. As linhagens transgênicas obtidas quando crescidas em meio MS ½ força iônica (10mM de NH_4^+ e 20mM de NO_3^-) apresentaram fenótipos como clorose e dificuldade de desenvolvimento, ao passo que quando cultivadas em solo mostraram desenvolvimento vegetativo mais intenso e atraso para emissão da inflorescência. Quando analisadas as modificações de expressão gênica causadas pela superexpressão destes fatores de transcrição, observou-se que ambos os fatores de transcrição provocaram aumento de expressão dos transportadores de amônio de alta e baixa afinidades (AMT1.1 e AMT2.1 respectivamente), indicando que o fenótipo observado pode ser devido ao efeito tóxico do excesso de amônio absorvido. Verificou-se também aumento de expressão das enzimas piruvato quinase (PK1 e PK2) e fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC1 e PEPC2). A piruvato quinase converte o fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato, enquanto a fosfoenolpiruvato carboxilase converte o PEP a oxalacetato (OAA) que pode sofrer ação da malato desidrogenase originando o malato. Ambos os metabólitos, piruvato e malato, alimentam o ciclo de Krebs. Houve também aumento de expressão da isocitrato desidrogenase, enzima presente na mitocôndria (ciclo de Krebs) e no citosol que converte isocitrato a 2-oxoglutarato (2-OG). Assim, é provável que o aumento da expressão destas enzimas do metabolismo de carbono foi necessário para aumentar a produção de 2-OG e, por conseguinte, diminuir o efeito tóxico do excesso de amônio absorvido. Além disso, observou-se aumento de expressão e atividade da glutamato desidrogenase (GDH). Essa enzima pode atuar tanto na direção da aminação, quanto na direção da desaminação, em condições de excesso de amônio e/ou sob condições de limitação de carbono nas plantas, respectivamente.

Palavras-chave: Metabolismo de nitrogênio e carbono. Transportador de amônio. Expressão gênica.

ABSTRACT

SANTOS, Leandro Azevedo. **Effects of *ZmDof1* and *OsDof25* transcriptional factors superexpression on nitrogen usage efficiency in *Arabidopsis***. 2009. 81p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

To improve nitrogen usage efficiency in plants the rice transcriptional factor *OsDof25* was identified and cloned, whose probably orthologue is the maize *ZmDof1*, already identified and partially characterized. The *ZmDof1* was also cloned for comparative analysis with *OsDof25*, in order to confirm this last one as *ZmDof1* orthologue in rice. The constructions for *Arabidopsis* superexpression of these transcriptional factors were made using the cloning system of gateway technology (Invitrogen), to obtain the expression vectors 35S*ZmDof1*:HA and 35S:*OsDof25*:HA. Lineages with different expression levels of these genes were obtained, but with only one inserted copy. These transgenic lineages when grown in a half strength of MS medium (10mM of NH_4^+ and 20mM of NO_3^-) showed phenotypes with chloroses and growth difficulty; although when they were cultured in soil they showed great vegetative development and delay in the inflorescence emission. When analyzed the gene expression changes induced by the superexpression of these transcriptional factors, it was observed that both genes produced an increase in the expression levels of high and low affinity ammonium transporters (AMT1.1 and AMT2.1, respectively), indicating that these phenotypes may be due to the toxic effect of an excess of ammonium uptake. We also verified an increase of expression for pyruvate kinase (PK1 and PK2), and phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC1 and PEPC2). Pyruvate kinase converts phosphoenolpyruvate (PEP) to pyruvate, and phosphoenolpyruvate carboxylase converts PEP to oxalacetate, which is substrate for malate dehydrogenase to form malate. Both pyruvate and malate may feed the Krebs cycle. In addition, there was an increase in the expression of isocitrate dehydrogenase, which is present in the cytosol and mitochondria, needed for converting isocitrate to 2-oxoglutarate. Thus, it was hypothesized that the increase of expression levels of these carbon metabolism enzymes was necessary to increase the production of 2-oxoglutarate and, consequently, to reduce the toxic effect of ammonium uptaked. Besides, it was observed an increase of expression levels and activity of glutamate dehydrogenase (GDH). This enzyme may work as much in the direction of glutamate amination as in deamination, when the plants were submitted to ammonium excess or carbon limitation conditions, respectively.

Key words: Carbon and nitrogen metabolism. Ammonium transporter. Gene expression.

LISTA DE SÍMBOLOS

AMT1	Família gênica dos transportadores de NH_4^+ de alta afinidade
AMT2	Família gênica dos transportadores de NH_4^+ de baixa afinidade
AS	Asparagina Sintetase
ATP	Adenosina trifosfato
DAG	Dias Após a Germinação
DOF	(Domínio de ligação ao DNA tipo dedo de zinco – <i>DNA-binding with one finger</i>)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
Fd-GOGAT	Glutamato Sintase dependente de ferredoxina
GDH	Glutamato Desidrogenase
GS1	Glutamina Sintetase citosólica
GS2	Glutamina Sintetase cloroplástica
HATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidade (High Affinity Transport System)
ICDH	Isocitrato Desidrogenase citosólica
IDH	Isocitrato Desidrogenase mitocondrial
LATS	Sistema de Transporte de Baixa Afinidade (Low Affinity Transport System)
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida
NADH-GOGAT	Glutamato Sintase dependente de NADH
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato reduzida
NBT	Azul de Nitro-Tetrazólio (Nitro Blue Tetrazolium)
NiR	Nitrito Redutase
NR	Nitrato Redutase
NRT1	Família gênica dos transportadores de NO_3^- de baixa afinidade
NRT2	Família gênica dos transportadores de NO_3^- de alta afinidade
<i>OsDof25</i>	Fator de transcrição <i>dof25</i> de arroz
pb	Pares de bases
PEPC	Fosfoenolpiruvato Carboxilase
PK	Pituvato Quinase
PMS	Metosulfato de fenazina (phenazine methosulfate)
PVP	Polivinilpirrolidona
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
FT	Fatores de transcrição
TRIS	2-(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol
<i>ZmDof1</i>	Fator de transcrição <i>dof1</i> de milho

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características dos NRT2s e NAR2s em arroz.....	5
Tabela 2. Eficiência no uso de nitrogênio em plantas transgênicas expressando genes envolvidos na absorção e metabolismo de N (Adaptado de GOOD et al., 2004). ...	9
Tabela 3. Glutamina sintetase/Glutamato sintase e genes regulatórios envolvidos na absorção e metabolismo de N (Adapt. GOOD et al., 2004).	11
Tabela 4. Primers utilizados para amplificação dos genes <i>ZmDof1</i> e <i>OsDof25</i>	27
Tabela 5. Primers para amplificação dos genes <i>ZmDof1</i> e <i>OsDof25</i> com os sítios de recombinação attB1 e attB2 em duas reações.....	28
Tabela 6. Reações de recombinação entre os sítios <i>att</i> do fago ? em <i>E. coli</i>	29
Tabela 7. Sítios attB nas tecnologias MultiSite Gateway® e Gateway® padrão	29
Tabela 8. Vetores doadores e suas funções.....	30
Tabela 9. Quantificação dos vetores envolvidos nas reações de LR triplo	33
Tabela 10. Reação de Síntese do cDNA utilizando o kit TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystem).	37
Tabela 11. Sequências dos primers utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real e número de acesso dos genes para busca no site http://www.Arabidopsis.org/	38
Tabela 12. Atividade de Glutamina sintetase (GS) em diferentes linhagens de Arabidopsis superexpressando o gene <i>OsDof25</i>	64

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Árvore de similaridade obtida pelo método de agrupamento UPGMA. Comparação entre as seqüências das proteínas Dof de arroz, ssp. *japonica* e *indica*, e Dof1 e Dof2 de milho. 23
- Figura 2.** Árvore de similaridade obtida pelo método de agrupamento UPGMA. Comparação entre as seqüências codantes (cfs) do mRNA dos Dof de arroz, ssp. *japonica* e *indica*, e Dof1 e Dof2 de milho. 24
- Figura 3.** Alinhamento dos domínios das proteínas Dof do arroz, ssp. *japonica* e *indica* e Dof1 e Dof2 de milho pelo programa ClustalW..... 25
- Figura 4** Esquema ilustrativo da condução do experimento para verificar diferenças nos padrões de expressão do fator de transcrição *OsDof25* em resposta ao ressuprimento e deficiência de N-NO₃⁻ em arroz da variedade Nipponbare. 26
- Figura 5.** Seqüência completa do mRNA do Dof1 de milho. Número de acesso no NCBI, X66076.1. Sublinhado representa a seqüência codante. 27
- Figura 6.** cDNA do *OsDof25*. LOC_Os08g38220.1|11978.m07807. (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/>). Sublinhado representa a seqüência codante. 28
- Figura 7.** Esquema ilustrativo da reação de recombinação BP (Recombinação entre os sítios *attB* dos genes e *attP* do vetor pDONR221 para a obtenção dos vetores de entrada) necessários para a construção do vetor para superexpressão dos genes de interesse em *Arabidopsis*. Ori – origem de replicação; KAN^R- gene de resistência a kanamicina; CM^R – gene de resistência ao clorafenicol; *attB*, *attP*, *attL* e *attR* – sítios de recombinação; *ccdB* – gene que codifica para uma proteína que interfere na atividade da DNA girase de *E. coli*, impedindo o seu crescimento; 35S – Promotor do vírus do mosaico da couviflor CaMV 35S; Tag HA – peptídeo de fusão..... 30
- Figura 8.** Esquema ilustrativo da reação LR triplo para obtenção dos vetores para superexpressão dos genes de interesse. Neste trabalho usamos o promotor 35S e um Tag-3XHA fusionado ao gene. Ori – origem de replicação; KAN^R- gene de resistência a kanamicina; *attB*, *attP*, *attL* e *attR* – sítios de recombinação; LB – borda esquerda; RB – borda direita; 35S – Promotor do vírus do mosaico da couviflor CaMV 35S; Tag HA – peptídeo de fusão. 31
- Figura 9** Vetor pDONR221 usado para clonagem dos genes e formação dos vetores de entrada. Notar a presença dos sítios de recombinação *attP1* e *attP2*, que recombinam com os sítios *attB1* e *attB2* presente nos genes amplificados..... 32
- Figura 10.** Vetor pK7GW43DNew usado na reação de recombinação tripla com os vetores de entrada obtidos nas reações BP. Este vetor leva o gene de resistência a Kanamicina (Kan) para seleção das plantas transformadas. 34
- Figura 11.** Efeito do ressuprimento e da deficiência de N-NO₃⁻ sobre a expressão relativa do fator de transcrição *OsDof25* na parte aérea (A) e nas raízes (B) de plantas de arroz da variedade Nipponbare. Const: teor constante de N (2mM); Ressup: 72h sem N seguido de ressuprimento com 2 mM durante 3 horas, e Defic: 75 horas sem N. O gene da *actina* foi utilizado como padrão interno nas reações de PCR. Barras representam desvio padrão da média. 41

- Figura 12.** Amplificação do gene *OsDof25* do genoma nuclear da variedade de arroz Nipponbare sp. japonica. M - Marcador 100bp DNA Ladder (Invitrogen), 1 - sem Enhacer, 2 - com 0,5X do PCR_x Enhacer, 3 - com 1X do PCR_x Enhacer. 42
- Figura 13.** Amplificação do gene *ZmDof1* do genoma nuclear da linhagem de milho H84. M - Marcador 100bp DNA Ladder (Invitrogen), 1 - com 1X do PCR_x Enhacer. 42
- Figura 14.** Amplificação dos genes *OsDof25* e *ZmDof1* com o sítio de recombinação attB. M – marcador 100bp DNA Ladder; 1 e 2 - primeira e segunda reações, respectivamente, para a construção do sítio de recombinação attB para o gene *OsDof25*; 3 e 4 - primeira e segunda reações, respectivamente, para a construção do sítio de recombinação attB para o gene *ZmDof1*. 43
- Figura 15.** Vetor de entrada, pENTR-*ZmDof1* obtido após reação BP. Vetores construídos com o Software “Vector NTI Advance 10” da Invitrogen. 44
- Figura 16.** Vetor de entrada, pENTR-*OsDof25* obtido após reação BP. Vetores construídos com o Software “Vector NTI Advance 10” da Invitrogen. 44
- Figura 17.** Confirmação por digestão dos vetores pENTR-*ZmDof1* e pENTR-*OsDof25* com as enzimas de restrição PstI e EcoRV, e Sall e EcoRV respectivamente. M – marcador ?PstI; (1 a 10) – clones obtidos com o gene *ZmDof1*; (11 a 20) – clones obtidos com o gene *OsDof25*. 45
- Figura 18.** Vetor para superexpressão do gene *ZmDof1* em Arabidopsis sob o controle do promotor 35S e fusionados a um tag de HA (peptídeo de fusão). Vetor construído com o Software “Vector NTI Advance 10” da Invitrogen. 46
- Figura 19.** Vetor para superexpressão do gene *OsDof25* em Arabidopsis sob o controle do promotor 35S e fusionados a um tag de HA. Vetor construído com o Software “Vector NTI Advance 10” da Invitrogen. 47
- Figura 20.** Confirmação por digestão das construções dos vetores para superexpressão em Arabidopsis pEXP-*ZmDof1*-HA (clones de 1 a 5) e pEXP-*OsDof25*-HA (clones de 6 a 10). M – ?PstI. 48
- Figura 21.** Expressão do gene *ZmDof1* em diferentes linhagens de Arabidopsis transgênicas. * Linhagens escolhidas por apresentar apenas uma inserção do gene e crescimento satisfatório; as linhagens de maior nível de expressão não desenvolveram satisfatoriamente. O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média. 49
- Figura 22.** Fenótipos de algumas linhagens de Arabidopsis transgênicas com diferentes níveis de expressão do gene *ZmDof1*. Aproximadamente 40 sementes por placa. Plântulas com duas semanas após a germinação. 49
- Figura 23.** Expressão do gene *OsDof25* em diferentes linhagens de Arabidopsis transgênicas. * Linhagens escolhidas por apresentar apenas uma inserção do gene; todas as linhagens transformadas com este gene desenvolveram satisfatoriamente, e, portanto escolhemos três com diferentes níveis de expressão do *OsDof25*. O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média. 50
- Figura 24.** Fenótipos de algumas linhagens de Arabidopsis transgênicas com diferentes níveis de expressão do gene *OsDof25*. Aproximadamente 40 sementes por placa. Plântulas com duas semanas após a germinação. 50

- Figura 25.** Expressão gênica de alguns transportadores de amônio em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o *ZmDof1* (A) e o *OsDof25* (B). A expressão gênica foi calculada usando como referência a planta selvagem (WT). O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média. 51
- Figura 26.** Expressão gênica da enzima piruvato quinase (isoformas PK1 e PK2) em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando os genes *ZmDof1* (A) e *OsDof25* (B). A expressão gênica foi calculada usando como referência a planta selvagem (WT). O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média. 52
- Figura 27.** Teores de N-NO_3^- , açúcares solúveis e N-amino livres em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando os genes *ZmDof1* (A) e *OsDof25* (B). Barras representam desvio padrão da média. 53
- Figura 28.** Expressão gênica de transportadores de NO_3^- de baixa (AtNRT1.1) e alta afinidade (AtNRT2.1) em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *OsDof25*. A expressão gênica foi calculada usando como referência a planta selvagem (WT). O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média. 54
- Figura 29.** Expressão gênica da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (isoformas PEPC1 e PEPC2) em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *OsDof25*. A expressão gênica foi calculada usando como referência a planta selvagem (WT). O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média. 55
- Figura 30.** Ilustração da interação entre o metabolismo de C e N. Aqui desconsideramos o processo de fotorrespiração. Modificado de HODGES et al. (2003). RuBP: Ribulose 1,5 bisfosfato; Glu: glutamato; Gln: glutamina; PEP: fosfoenolpiruvato; OAA: oxalacetato; ACoA: acetil coenzima A; cPK: piruvato quinase citosólica; PEPC: fosfoenolpiruvato carboxilase; MDH: malato desidrogenase; PDH: piruvato desidrogenase; IDH: isocitrato desidrogenase NAD^+ -dependente; ICDH: isocitrato desidrogenase NADP^+ -dependente; NR: nitrato redutase; NiR: nitrito redutase; GS: glutamina sintetase; GOGAT: glutamato sintase; DCT: transportador di/tricorboxilato; DiT1: transportador de 2-oxolutarato/malato; DiT2: transportador de glutamato/malato. 56
- Figura 31.** Atividade de malato desidrogenase (MDH) em gel nativo de poliácridamida na parte aérea e raiz de linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *OsDof25*. 57
- Figura 32.** Expressão gênica da enzima isocitrato desidrogenase (isoformas IDH1, IDH2, IDH5 e IDH6) em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *OsDof25*. A expressão gênica foi calculada usando como referência a planta selvagem (WT). O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média. 58
- Figura 33.** Expressão gênica da enzima isocitrato desidrogenase (isoformas ICDH1, ICDH2, e ICDH3) em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *OsDof25*. A expressão gênica foi calculada usando como referência a planta selvagem (WT). O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média. 59

- Figura 34.** Atividade da NADP⁺-dependente isocitrato desidrogenase (ICDH) na parte aérea e raízes de plantas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *OsDof25*. 60
- Figura 35.** Expressão gênica da enzima glutamato desidrogenase (genes *Atgdh-NAD;B1* e *Atgdh-NAD;A1*) em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *OsDof25*. A expressão gênica foi calculada usando como referência a planta selvagem (WT). O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média. 60
- Figura 36.** Atividade de Glutamato Desidrogenase (GDH) em gel nativo de poliacrilamida, mostrando suas sete isoenzimas..... 61
- Figura 37.** Atividade de glutamato desidrogenase (GDH) aminação (A) e desaminação (B) em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o fator de transcrição *OsDof25*..... 62
- Figura 38.** A) Expressão gênica das enzimas glutamina sintetase citosólica (isoformas GS1.1, GS1.2 e GS1.3) e glutamina sintetase cloroplástica (GS2) em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *OsDof25*. A expressão gênica foi calculada usando como referência a planta selvagem (WT). O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média. 63
- Figura 39.** Fenótipo de uma linhagem de *Arabidopsis* superexpressando o *OsDof25* sob controle do promotor 35S. A) Plantas crescidas em meio MS a meia força iônica com 1% de sacarose aos 14 dias após a germinação; WT – tipo selvagem, Os1 – linhagem com nível intermediário de expressão do *OsDof25*; B) Fenótipo de uma linhagem com baixo nível de expressão do *OsDof25*, a Os10, comparada com o tipo selvagem; C) Fenótipo de uma linhagem com nível intermediário de expressão do *OsDof25*, a Os17. (B e C – linhagens crescidas numa mistura de terra:fibra de coco na proporção 2:1 respectivamente). 65
- Figura 40.** Análise da região promotora dos transportadores de amônio *AMT1.1* e *AMT2.1*, mostrando os prováveis sítios de ligação dos fatores de transcrição *Dof*. Em vermelho, a posição +1 significa o sítio de início da transcrição. 66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Eficiência de Aquisição de Nitrogênio	3
2.1.1 P-H ⁺ -ATPases	3
2.1.2 Transportadores de N-NO ₃ ⁻ (NRT).....	4
2.1.3 Transportadores de N-NH ₄ ⁺ (AMT).....	6
2.2. Enzimas de Assimilação de N e Eficiência de Uso de Nitrogênio	7
2.2.1 Nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR).....	7
2.2.2 Glutamina sintetase (GS).....	10
2.2.3 Glutamato sintase (GOGAT).....	12
2.2.4 Glutamato desidrogenase (GDH).....	12
2.2.5 Asparagina sintetase (AS).....	13
2.3. Remobilização do N - Efeitos Sobre a Eficiência no Uso do Nitrogênio	14
2.4. Aplicação de QTL (<i>Quantitative Trait Loci</i> – Loci para Característica Quantitativa) no Estudo de Eficiência de Uso de Nitrogênio	15
2.5. Fatores de Transcrição Envolvidos na Eficiência de Uso de Nitrogênio	16
2.5.1 Fatores de transcrição da família MADS box.....	18
2.5.2 Fatores de transcrição GATA.....	18
2.5.3 Fatores de transcrição Dof.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Identificação do Gene Ortólogo do <i>ZmDof1</i> em Arroz	22
3.2 Resposta do Fator de Transcrição <i>OsDof25</i> ao N-NO₃⁻	26
3.3 Amplificação dos Genes <i>ZmDof1</i> e <i>OsDof25</i> e Montagem dos Sítios de Recombinação para Uso da Tecnologia Gateway	26
3.4 Tecnologia Gateway® e Clonagem dos Genes Amplificados.....	28
3.4.1 Purificação dos genes que apresentam os sítios de recombinação	31
3.4.2 Reação BP – recombinação entre os sítios attB dos genes e attP do vetor pDONR221 para a obtenção dos vetores de entrada	32
3.4.3 Preparo de células competentes para eletroporação (DH5 a).....	33
3.4.4 Reações de LR triplo para obtenção das construções usadas para a transformação de Arabidopsis	33
3.5 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com as Construções de Arabidopsis	34
3.5.1 Preparação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> competentes	35
3.5.2 Meio YEB para cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
3.6 Transformação de Arabidopsis Mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
3.7 Análise do Efeito dos Fatores de Transcrição <i>ZmDof1</i> e <i>OsDof25</i> sobre a Expressão de Genes do Metabolismo de Nitrogênio e Carbono em Arabidopsis.....	36
3.7.1 Extração de RNA total.....	36
3.7.2 Tratamento com DNase I e síntese do cDNA.....	37
3.7.3 Desenho dos iniciadores e expressão gênica por RT-PCR em tempo real.....	37

3.8	Análise de Metabólitos Solúveis	38
3.9	Determinação da Atividade de Glutamato Desidrogenase (GDH) e da Malato Desidrogenase (MDH) em Gel Nativo de Poliacrilamida (Native-PAGE)	38
3.10	Determinação da Atividade de Glutamato Desidrogenase (GDH) Aminoação e Desaminoação	39
3.11	Determinação da Atividade de Glutamina Sintetase (GS).....	39
3.12	Determinação da Atividade da Isocitrato Desidrogenase NADP ⁺ -dependente.....	40
3.13	Análises de Regiões Promotoras de Genes que Sofreram Indução Pelo <i>OsDof25</i>	40
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1	Análise da Resposta do <i>OsDof25</i> ao N-NO ₃ ⁻ em plantas de arroz da variedade Nipponbare.....	41
4.2	Amplificação dos Genes <i>ZmDof1</i> e <i>OsDof25</i> e Construção dos Sítios de Recombinação	42
4.3	Reação BP para Obtenção dos Vetores de Entrada	43
4.4	Reação LR para Obtenção das Construções Usadas na Transformação de <i>Arabidopsis</i>	45
4.5	Análise Funcional dos Fatores de Transcrição <i>ZmDof1</i> e <i>OsDof25</i>	48
4.6	Análise Funcional Detalhada do Fator de Transcrição <i>OsDof25</i>	53
4.7	Análise da Região Promotora dos Transportadores de Amônio (AMT)	65
5.	CONCLUSÕES	67
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 INTRODUÇÃO

Muitos cientistas há tempos vêm reconhecendo a necessidade de desenvolver variedades de plantas que apresentem a capacidade de absorver e utilizar os nutrientes de maneira mais eficiente. Duas estratégias têm sido usadas para aumentar a eficiência de uso de nutrientes em plantas cultivadas (GOOD et al., 2004). A primeira envolve tanto o melhoramento convencional como a seleção assistida por marcadores moleculares, numa tentativa de identificar os genes envolvidos. A segunda usa o desenvolvimento de construções genéticas para transformar as plantas e provê-las de ferramentas específicas de eficiência de uso de nutrientes.

Em solos tropicais, as plantas cultivadas possuem uma forte dependência da fertilização nitrogenada, aplicada principalmente nas formas de NO_3^- e NH_4^+ . Estudos apontam que aproximadamente entre 85 e 90 milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados são adicionados nos solos ao redor do mundo anualmente, e acredita-se que este valor possa chegar a 240 milhões em 2050 (TILMAN, 1999; GOOD et al., 2004). Tem sido estimado que 10^{11} kg de N são aplicados como fertilizantes ao redor do mundo por ano, um valor vinte vezes maior que há 50, com um custo de 50 bilhões de dólares (GLASS et al., 2003). Além disso, dados experimentais apontam que de 50 a 70% do nitrogênio aplicado no solo é perdido do sistema solo-planta (PEOPLES et al., 1995).

Duas importantes razões são geralmente apontadas para justificar a necessidade de promover a eficiência de uso do nitrogênio (EUN) em plantas. Primeiro que os fertilizantes nitrogenados são os que mais contribuem para o aumento dos custos de produção e os que mais limitam os rendimentos das plantas cultivadas. Segundo, que o uso destes fertilizantes está geralmente associado a significativos danos ambientais (GOOD et al., 2004). Segundo LEA e AZEVEDO (2006) a eficiência de uso de nitrogênio pode ser dividida em dois processos: eficiência de absorção, ou seja, habilidade da planta de retirar o N do solo, normalmente presente sob as formas de NO_3^- e NH_4^+ , e eficiência de utilização, que é a habilidade da planta de transferir o N para o grão, predominantemente presente como proteína.

Pelo fato do nitrogênio ser o nutriente exigido em maior quantidade pelas plantas, e também o que mais limita a produtividade das culturas, nas últimas quatro décadas, o aumento em duas vezes na produção de alimentos foi associado a um aumento de 20 vezes no uso de fertilizantes nitrogenados (SHRAWAT e GOOD, 2008). As conseqüências do uso excessivo de fertilizantes nitrogenados já são bem conhecidas por causar de uma série de impactos ambientais, como por exemplo, as contaminações de lençóis freáticos, cursos d'água e lagos com nitrato. Portanto, a necessidade de reduzir a poluição com os fertilizantes nitrogenados e aumentar a produção de alimentos só é possível através do melhoramento de plantas para maior eficiência na absorção e uso do nitrogênio (SHRAWAT e GOOD, 2008).

A eficiência de uso de nitrogênio é crítica para o crescimento das plantas, ganho de biomassa, rendimento dos cultivos, bem como a ótima utilização dos fertilizantes aplicados. Segundo RAGHURAM et al. (2006) esta eficiência requer a expressão coordenada de genes envolvidos na redução do nitrato, bem como uma partição do carbono para síntese de aminoácidos, onde um comportamento coordenado entre o metabolismo de carbono e nitrogênio está sob o controle do nitrato, que atua como um nutriente sinal. Análises de expressão gênica têm demonstrado que centenas de genes são induzidos ou reprimidos pelo nitrato em muitos tecidos das plantas.

O mecanismo preciso da percepção e sinalização proporcionada pelo nitrato ainda não está completamente elucidado, no entanto, têm sido demonstrados que hormônios, cálcio e proteínas quinases estão envolvidas na regulação transcricional de muitos genes responsivos

ao nitrato (RAGHURAM et al., 2006). A regulação pós-transcricional de algumas enzimas responsivas ao nitrato está sob o controle da proteína 14-3-3, embora ela medie principalmente o efeito de luz e outros sinais que não o do nitrato.

O insucesso em promover a eficiência de uso do nitrogênio em plantas transgênicas pela superexpressão de genes relacionados às vias de assimilação do nitrato e amônio tem levado ao entendimento de que o fluxo metabólico através destas rotas pode ser controlado por mecanismos regulatórios fora destas.

Genes que codificam proteínas com função catalítica (enzimas) têm sido freqüentemente utilizados para dotar as plantas de novas características. Quando a nova característica é determinada por uma reação química adicional, a simples transferência de um novo gene para codificação da enzima da requerida reação é suficiente. Da mesma forma, se o objetivo é a ativação de uma rota específica que é regulada por somente uma etapa limitante, a superexpressão da enzima que catalisa esta etapa limitante pode ser a solução. Entretanto, se modificações de múltiplas respostas celulares ou promoção de múltiplas reações enzimáticas são necessárias para uma nova característica, então a expressão de genes que codificam proteínas regulatórias, especificamente fatores de transcrição, podem ser usados com maior probabilidade de sucesso.

Devido a um único fator de transcrição freqüentemente disparar múltiplas respostas celulares a um estímulo específico interno ou externo, resultando na simultânea indução da expressão de muitos genes funcionalmente sem conexão um com outro, a superexpressão de um fator de transcrição pode produzir fortes respostas para um determinado estímulo (YANAGISAWA, 2004). Além disso, um único fator de transcrição freqüentemente regula a expressão coordenada de enzimas envolvidas em rotas metabólicas inteiras.

O controle transcricional em plantas, bem como em outros organismos, é de particular importância na regulação de muitos processos como o crescimento, o desenvolvimento, a diferenciação e o metabolismo. Plantas e animais respondem a uma ampla variedade de estímulos internos e externos através da modulação da transcrição de diversos genes. Para auxiliar no entendimento dos mecanismos regulatórios da expressão de genes e as rotas de sinais de transdução em plantas, numerosos elementos *cis* e fatores *trans* têm sido identificados e caracterizados. Estes estudos revelaram que muitas proteínas de ligação ao DNA em plantas podem ser agrupadas em classes distintas baseadas nos seus domínios conservados de ligação ao DNA (YANAGISAWA & SHEEN, 1998).

Para entender os mecanismos moleculares do controle transcricional em plantas, deve ser levado em conta que inúmeros fatores de transcrição foram identificados nas décadas passadas, com alguns mostrando homologia com as seqüências de fatores de transcrição de animais e outros aparentemente únicos de plantas. Por exemplo, o Dof1 de milho é um dos fatores de transcrição Dof único de plantas (YANAGISAWA, 2002) e um ativador da expressão de muitos genes associados com o metabolismo de ácidos orgânicos (YANAGISAWA, 2000). Esse fator de transcrição aumentou a produção de esqueletos de carbono e a assimilação do N absorvido, melhorando o desempenho das plantas sob condições de baixa disponibilidade deste nutriente (YANAGISAWA, 2004).

No presente estudo, pretende-se verificar o efeito da superexpressão do fator de transcrição *ZmDof1* e seu ortólogo em arroz, o *OsDof25*, sobre a eficiência de absorção e uso de nitrogênio em plantas de *Arabidopsis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção, serão abordados os principais temas referentes à eficiência de aquisição de nitrogênio (N) pelas plantas, bem como a participação das enzimas do metabolismo de N na eficiência de uso deste nutriente. Serão ainda abordadas, as estratégias de estudo para identificar características relacionadas à eficiência de uso de nutrientes por plantas e o que se tem de mais avançado na busca de modificações de características complexas do metabolismo das plantas, que é o uso de proteínas regulatórias, especificamente fatores de transcrição.

2.1 Eficiência de Aquisição de Nitrogênio

2.1.1 P-H⁺-ATPases

A P-H⁺-ATPase, uma glicoproteína de aproximadamente 100 kDa, localizada na membrana plasmática, é uma bomba eletrogênica que hidrolisa ATP para gerar um movimento vetorial de H⁺ em direção ao apoplasto, criando gradientes de pH e potencial elétrico na membrana, o que viabiliza o transporte de íons e moléculas para dentro ou fora da célula via proteínas de transporte.

Células competentes para o transporte de solutos são caracterizadas por apresentarem elevada diferença de potencial entre a face interna e externa da membrana, tipicamente na faixa de -150 mV a -200 mV e um exterior ácido, onde o pH apoplástico está tipicamente entre 4 e 5. Desta forma, é necessária a criação de um gradiente de cargas elétricas e químico (íons ou moléculas) através da membrana que é chamado de gradiente de potencial eletroquímico (SONDERGAARD et al., 2004).

O transporte de NO₃⁻ da rizosfera para o interior celular é termodinamicamente desfavorável em termos de gradiente de potencial elétrico e potencial químico, assim, a absorção de nitrato, que ocorre via simporte com dois prótons (NO₃⁻/2H⁺), requer energia presumidamente como uma força próton-motriz, que é proporcionada por bombas eletrogênicas de prótons (H⁺-ATPases) (SONDERGAARD et al., 2004). SANTI et al. (1995) observaram um aumento na quantidade de H⁺-ATPases e alteração dos seus parâmetros cinéticos em plasmalema de raízes de milho quando expostas ao NO₃⁻.

QUAGGIOTTI et al. (2003) observaram que variedades de milho adaptadas à baixa disponibilidade de nitrogênio, quando sob baixa concentração de NO₃⁻ no meio externo, mantinham um influxo de NO₃⁻ maior que variedades melhoradas e ao mesmo tempo essas variedades adaptadas mantinham um nível constante de mRNA para uma H⁺-ATPase, sugerindo que a expressão dessa enzima possibilitaria uma vantagem na absorção de NO₃⁻ em relação à variedade não adaptada. Em trabalho com milho HIREL et al. (2001) sugerem que o alto teor de nitrato acumulado nas folhas nos estágios iniciais de crescimento das plantas é um bom indicador da sua capacidade para produzir e acumular N nos grãos e supõem que este é um bom parâmetro para a seleção de plantas com alta eficiência no uso de N.

Estudos moleculares têm mostrado que as P-H⁺-ATPases são codificadas por uma família multigênica dividida em duas subfamílias (SANTI et al., 2003). O genoma de plantas dicotiledôneas (*Arabidopsis thaliana*) e monocotiledôneas (*Oryza sativa*) foi seqüenciado, resultando na identificação de, respectivamente, 11 e 10 isoformas das H⁺-ATPases de membrana plasmática (BAXTER et al., 2003). Este elevado número de isoformas em plantas pode indicar que algumas bombas têm função redundante, ou que a diversidade de isoformas também pode estar relacionada com a natureza multicelular das plantas. Algumas isoformas exibem padrão de expressão tecido- e desenvolvimento-específico e apresentam ligeiras diferenças bioquímicas e propriedades regulatórias (PALMGREN, 2001).

Em plantas de trevo, YAN et al. (2002) observaram que quando essas plantas foram cultivadas sob baixas concentrações de fósforo ocorria um intenso desenvolvimento de raízes proteóides que levaram a uma grande acidificação da rizosfera, o que ocasiona um aumento na solubilidade do fósforo tornando possível a sua absorção pela planta. Estes autores mostraram que nessas raízes proteóides havia abundância de P-H⁺-ATPases, indicando também, sua participação na absorção de outros nutrientes.

2.1.2 Transportadores de N-NO₃⁻ (NRT)

Para a maioria das plantas cultivadas, em solos bem aerados, o nitrato é a maior fonte de N. Em arroz inundado a difusão de oxigênio pelas raízes promove o processo de nitrificação em sua rizosfera e por consequência a absorção de N-NO₃⁻ mesmo nestas condições (KIRK e KRONZUCKER, 2005).

A absorção de nitrato é realizada por transportadores que são codificados por uma família multigênica. Alguns dos transportadores de nitrato são constitutivos, enquanto outros são induzidos pelo NO₃⁻. De acordo com sua afinidade pelo substrato os transportadores de NO₃⁻ são divididos em dois sistemas, denominados: sistema de transporte de baixa afinidade (LATS – “Low Affinity Transport System”) atuando em concentrações externas superiores a 1 mmol L⁻¹ de NO₃⁻ e codificado pelos genes da família NRT1, e sistema de transporte de alta afinidade (HATS – “High Affinity Transport System”), atuando em concentrações externas inferiores a 1 mmol L⁻¹, e que são codificados pelos genes da família NRT2 (VIDMAR et al., 2000; CERESO et al., 2001; FILLEUR et al., 2001). Os HATS são ainda subdivididos em sistemas constitutivos (cHATS), que operam a baixas concentrações de NO₃⁻ (em torno de 0,2 mmoles L⁻¹) e induzidos (iHATS) que são induzidos por concentrações externas de NO₃⁻ muito baixas (CRAWFORD e GLASS 1998; FORDE 2000).

Quando a concentração externa de nitrato alcança valores acima de 1mmol L⁻¹, o sistema de baixa afinidade começa a operar. O sistema de baixa afinidade está envolvido na absorção de NO₃⁻, em concentrações externas elevadas, e a cinética de absorção de NO₃⁻ aparentemente não mostra saturação nessa faixa de concentração, enquanto que os cHATS e iHATS mostram cinética de saturação, mesmo em baixas concentrações externas de NO₃⁻ (VIDMAR et. al., 2000).

Em *Arabidopsis thaliana*, foram isolados sete genes membros da família NRT2 (ORSEL et al., 2002), sugerindo que esta família é composta de vários genes nas plantas superiores. Os mecanismos dos iHATS para absorção de nitrato têm sido revelados por análises funcionais usando mutantes de *A. thaliana*, *atnrt2*, em que não funcionam o *AtNRT2.1* e parte do *AtNRT2.2*, mostrando um decréscimo na habilidade de absorver apenas no iHATS (CERESO et al., 2001; FILLEUR et al., 2001).

Pela quantificação relativa através do método de RT-PCR (Transcrição Reversa acoplada a Reação em Cadeia da Polimerase), a família de genes *AtNRT2* foi agrupada em três categorias, nitrato-induzíveis, nitrato-reprimidos e nitrato-constitutíveis (OKAMOTO et al., 2003). Estes mesmos autores mostram uma clara correlação positiva entre a absorção de nitrato e a quantidade de transcritos de *AtNRT2.1*.

Assim como ocorre regulação na assimilação do NO₃⁻, há também controle na sua absorção. Neste caso, os mecanismos regulatórios atuam principalmente nos transportadores, regulando a entrada do NO₃⁻ na célula por meio do controle no nível de expressão dos seus genes. Membros das famílias NRT1 e NRT2 são induzidos em resposta ao NO₃⁻ no ambiente e regulados por sinais internos, incluindo metabólitos de nitrogênio e demanda da planta por este nutriente (CRAWFORD & GLASS, 1998).

Estudos já mostraram que a quantidade de mRNA dos genes de iHATS aumenta rapidamente após fornecimento de nitrato às plantas previamente privadas deste elemento (ZHUO et al., 1999). É bem conhecido que o sistema de absorção de NO₃⁻ de alta afinidade em plantas superiores é rapidamente induzido pela presença externa de nitrato (CRAWFORD

& GLASS, 1998). Entretanto, esse tipo de indução já foi verificado também para o sistema de baixa afinidade (WANG et al., 2001).

O fato de que os transportadores de NO_3^- de alta afinidade são induzidos pela exposição ao NO_3^- ou NO_2^- nunca foi explicada satisfatoriamente. Nas tentativas de identificar as moléculas responsáveis pela indução e repressão dos transportadores de N, tem havido pouca discordância de que o NO_3^- é o indutor natural dos transportadores de alta afinidade (GLASS, 2003). Por outro lado, estudos na tentativa de identificar metabólicos responsáveis pela repressão destes transportadores têm mostrado que o status de N e o reservatório interno de NO_3^- não são importantes para sua repressão, mas sim os produtos da redução do NO_3^- como NH_4^+ , glutamina e outros aminoácidos (ZHUO et al., 1999; GLASS et al., 2002; ORSEL et al., 2002).

É necessário também considerar os fatores envolvidos na ativação e/ou regulação das funções dos NRT2 (ARAKI e HASEGAWA, 2006). Estudos demonstram que para haver absorção de NO_3^- via NRT2, são necessárias proteínas específicas que se associam a estes transportadores e só assim os tornam funcionais (ZHOU et al., 2000). Estas proteínas receberam a sigla NAR *Nitrate Assimilation Related?* e recentemente foram classificadas numa nova família de transportadores de nitrato, a NRT3.

Em *Chlamydomonas reinhardtii*, a proteína NAR2 possibilita aos NRT2 transportar nitrato (ZHOU et al., 2000). TONG et al. (2005) encontraram genes parecidos ao NAR2 (NAR2-like) de *C. reinhardtii* em cevada e mostraram que um dos seus membros (*HvNAR2.1~2.3*), o *HvNAR2.3*, habilitava o *HvNRT2.1* a transportar nitrato. Estes resultados indicam que as proteínas NAR2 são essenciais para a absorção de nitrato via HATS.

ARAKI e HASEGAWA (2006) estudando os genes envolvidos no transporte de nitrato no sistema de alta afinidade em arroz, encontraram quatro genes da família NRT2 (*OsNRT2.1~2.4*) e dois genes NAR2 (*OsNAR2.1~2.2*) (Tabela 1). Estes autores verificaram que o pré-tratamento com amônio afeta a expressão dos *OsNRT2s* nas raízes. Em plântulas sem o pré-tratamento com amônio, transcritos de *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNRT2.4* foram detectados meia hora após o tratamento com 200 μM de nitrato, enquanto o *OsNRT2.3* já apresentava expressão antes da indução por nitrato. Quando as plântulas foram pré-tratadas com amônio, a indução do *OsNRT2.1* e do *OsNRT2.4* só foram observadas duas horas após a indução com nitrato, enquanto os *OsNRT2.2* e *OsNRT2.3* já apresentavam expressão no início da indução.

Tabela 1. Características dos NRT2s e NAR2s em arroz

Gene	Cromossomo	Fita (+/-)	Nº de acesso	Gene ID
<i>OsNRT2.1</i>	2	+	AB008519	LOC_Os02g02170.1
<i>OsNRT2.2</i>	2	-	AK109733	LOC_Os02g02190.1
<i>OsNRT2.3</i>	1	+	AK109776	LOC_Os01g50820
<i>OsNRT2.4</i>	1	-	-	LOC_Os01g36720
<i>OsNAR2.1</i>	2	-	-	LOC_Os02g38230
<i>OsNAR2.2</i>	4	-	-	LOC_Os04g40410

Fonte: ARAKI e HASEGAWA (2006).

O fato do *OsNRT2.2* não ser expresso em solução sem N e apresentar expressão em solução contendo amônio permitiu levantar a hipótese de que o *OsNRT2.2* possa ser uma isoforma envolvida na absorção do nitrato proveniente da nitrificação na rizosfera do arroz quando este está submetido a nutrição amoniacal (ARAKI e HASEGAWA, 2006).

O nitrato também induz a expressão do *OsNAR2.1* em apenas meia hora após a adição do nitrato acompanhando a expressão do *OsNRT2.1* e *OsNRT2.4*. Por outro lado, o *OsNAR2.2* já apresentava expressão mesmo em solução sem N (ARAKI e HASEGAWA, 2006).

Estes resultados obtidos por ARAKI e HASEGAWA (2006) indicam que o *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* são genes candidatos a programas de melhoramento com o objetivo de aumentar a eficiência de uso de nitrato em arroz.

Mutantes de *Arabidopsis* com bloqueio da expressão dos genes que codificam para o AtNRT2.1 e AtNRT2.2 apresentam o sistema HATS não funcional, ou seja, não absorvem nitrato em baixas concentrações (ORSEL et al., 2006). Estes dois genes estão próximos no genoma de *Arabidopsis* e compartilham 90% de similaridade entre si (ORSEL et al., 2002). É interessante observar que, pares de genes NRT2s também têm localização próxima dentro do genoma de outras espécies, como em *Clamydomonas* (QUESADA et al., 1994) e arroz (ARAKI e HASEGAWA, 2006). No arroz, as duas seqüências são idênticas, mas com as regiões 3' e 5'-UTR diferentes, o que resulta em padrões de expressão diferenciados (ARAKI e HASEGAWA, 2006). Estas informações podem sugerir que genes funcionalmente homólogos codificando a maioria dos componentes HATS devem ter sido originados na evolução das plantas por eventos de duplicação de genes (MILLER et al., 2007). Recentemente, outro mutante de *Arabidopsis* foi descrito, onde unicamente o bloqueio da expressão do AtNRT2.1 foi suficiente para diminuir drasticamente a contribuição dos sistemas iHATS e cHATS, mostrando que o AtNRT2.1 é o maior colaborador para os dois sistemas (LI et al., 2007).

Em oocistos de *Xenopus*, AtNRT2.1 e homólogos de *Clamydomonas* e cevada, todos os genes NRT2 necessitam ser co-expressos com uma proteína NAR2 para serem capazes de transportar NO_3^- (ORSEL et al., 2006). Isto tem sido confirmado em estudos com plantas, usando-se mutantes com a expressão do AtNAR2.1 bloqueada. Um destes mutantes (*atnar2.1-1*) é extremamente deficiente no sistema HATS (ORSEL et al., 2006).

2.1.3 Transportadores de N-NH_4^+ (AMT)

As proteínas transportadoras de NH_4^+ são codificadas por uma família multigênica e apresenta ampla variação de padrões de cinética de absorção, fato que demonstra a plasticidade das plantas para a aquisição de formas reduzidas de N, abundantes durante um grande período na evolução das plantas superiores. Ao contrário do que acontece para o nitrato, as plantas em geral não tendem a acumular altas concentrações do íon amônio (LEA e AZEVEDO, 2006). Da mesma forma que acontece para a absorção de nitrato, a absorção de amônio é feita por um sistema bifásico. Quando os níveis de NH_4^+ no meio externo (solução nutritiva ou solução do solo) estão abaixo de 1 mM, opera um sistema de absorção de alta afinidade (HATS), e acima desta concentração opera o sistema de absorção de baixa afinidade (LATS).

A absorção de amônio é mediada por uma família de transportadores AMT, e a regulação deste transporte pode ocorrer por vários diferentes mecanismos (MILLER et al., 2007). Quando as raízes são nutridas com glutamina (gln) ou se usa inibidores da atividade da glutamina sintetase (GS) é possível observar que a gln na célula altera a transcrição dos genes AMT, enquanto o NH_4^+ citosólico pode regular pós-transcricionalmente os genes AMT (RAWAT et al., 1999). Generalizando, a regulação da absorção de amônio pode ocorrer em nível de mRNA e os transcritos AMT são fortemente dependentes do status de N da planta, mas em *Arabidopsis* o padrão é diferente para os diferentes membros desta família (MILLER et al., 2007). A expressão de alguns genes AMTs aumenta rapidamente logo no início da deficiência de N, enquanto outros podem aumentar só após uma deficiência muito prolongada (LOQUÉ e VON WIRÉN, 2004). Experimentos “split-root” (experimentos com separação espacial das raízes de uma mesma planta em ambientes distintos) sugerem que a disponibilidade local e não o status de N da planta inteira é que regulam a expressão de transportadores de amônio, diferente do observado para os transportadores de NO_3^- onde o status de N da planta inteira é que foi importante para tal regulação (GANSEL et al., 2001).

Plantas de tabaco transformadas com um AMT de *Arabidopsis*, sob o controle do promotor 35S, mostrou aumento de 30% na absorção de NH_4^+ em cultivo hidropônico, quando comparado com o tipo selvagem (YUAN et al., 2007). Por outro lado, em solo suplementado com NH_4^+ como fonte de N, as plantas transformadas não mostraram crescimento ou absorção de NH_4^+ diferentes do tipo selvagem (YUAN et al., 2007).

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

Uma característica chave nos estudos de expressão de genes que codificam para os transportadores de amônio é que eles apresentam consideráveis variações entre espécies. A privação de N e a presença de carboidratos solúveis aumentam a transcrição de genes AMT em *A. thaliana*. Os genes para AMT1;1 e AMT1;3 tiveram seus transcritos aumentados com a remoção da fonte de N, enquanto os transcritos de AMT1;2 e AMT2;1 aumentaram após um longo período de deficiência de N (LOQUÉ e VON WIRÉN, 2004).

A proteína do AMT1;1 localiza-se na membrana plasmática das células do córtex radicular, periciclo, epiderme e pêlos radiculares (MAYER e LUDEWING, 2006). Estudos com a técnica de inserção de TDNA para o AMT1;1 produziram linhagens de *A. thaliana* com apenas 30% de decréscimo na habilidade de absorver amônio através do HATS, indicando a sobreposição de funções das diferentes proteínas AMT (KAISER et al., 2002). Dado o grande número de membros da família AMT em arroz, a regulação gênica é mais complexa. O AMT1;1 mostrou-se constitutivo e induzido por amônio na parte aérea e raiz, enquanto o AMT1;2 foi específico de raiz e a expressão foi induzida por amônio. Já o AMT1;3 foi específico de raiz e sujeito a repressão por nitrogênio (SONODA et al., 2003). Além disso, AMT2;1 mostrou expressão constitutiva nas raízes e na parte aérea, enquanto o AMT3;1 teve apenas fraca expressão nestes mesmos órgãos (SUENAGA et al., 2003). Numa série de experimentos realizados por KUMAR et al. (2003), foram observados aumentos na expressão do AMT1;1 e em menor escala do AMT1;2 e AMT1;3 quando as plantas foram transferidas de uma solução contendo 10 mM de amônio para outra contendo 10 μM .

HOQUE et al. (2006) obtiveram duas linhagens transgênicas de arroz com a superexpressão do cDNA do AMT1;1 sob o controle do promotor da ubiquitina de milho. Estes autores verificaram que as plantas transgênicas exibiram aumento nas taxas de absorção de amônio comparado com as plantas selvagens, e que a biomassa da parte aérea e sistema radicular foram menores durante a germinação e nos estágios iniciais de crescimento das plantas crescidas com alto suprimento de amônio (2 mM).

2.2. Enzimas de Assimilação de N e Eficiência de Uso de Nitrogênio

2.2.1 Nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR)

Duas sucessivas etapas enzimáticas na rota de assimilação de nitrogênio reduzem nitrato a amônio. O nitrato é primeiro convertido a nitrito pela nitrato redutase (NR) e então o nitrito é translocado do citoplasma para os cloroplastos ou plastídios, onde é reduzido a amônio pela nitrito redutase (NiR). Independentemente da quantidade ou forma do fertilizante nitrogenado adicionado, NO_3^- é provavelmente a principal forma de N absorvida pelas plantas, devido ao estímulo do processo de nitrificação nos solos. Nos anos 70, considerava-se que a etapa de redução do NO_3^- a NO_2^- era limitante para assimilação de N nas plantas e a maioria dos programas de melhoramento criados visava seleção de genótipos com alta atividade da NR, e assim altos rendimentos. Para milho, a variabilidade genética na atividade

da nitrato redutase (NRA) existe, sendo a característica herdada e sujeita a manipulação através das técnicas de melhoramento clássico. A seleção para alta atividade da NR estava associada com o decréscimo da concentração de NO_3^- foliar e baixa área foliar específica, mas estes programas não produziram variedades com altos rendimentos (MASCLAUX et al., 2001; HIREL et al., 2001). Realmente em vários casos a NRA e rendimentos estavam negativamente correlacionados. Estes estudos mostraram que os níveis de NR não limitavam a assimilação de NO_3^- e, portanto, o rendimento, em resposta à aplicação adicional de N. As observações de que a superexpressão da NR em folhas de *Nicotiana plumbaginifolia* tem pouco efeito sobre o seu crescimento, suportam esta idéia (KAISER et al., 2002).

Além da NR/NiR, as enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) são requeridas para a assimilação de N, e existe a possibilidade que uma ou que ambas as enzimas limitem a assimilação de NO_3^- e conseqüentemente o crescimento e rendimento. Sob condições de campo, o crescimento (produção de matéria seca) e rendimento aumentaram com a aplicação de N de 50 a 200 kg N ha⁻¹, onde pequenas mudanças ou até mesmo decréscimo pode ocorrer acima desse valor (LAWLOR, 2002). A taxa ótima de aplicação de N em relação à produção de matéria seca e ao rendimento é dependente de uma gama de fatores como: genótipo, condições ambientais e método da aplicação de N.

Usualmente, com elevado suprimento de N, a absorção e assimilação desse nutriente é maior e em alguns casos as plantas podem responder a altas doses de N se a concentração de CO_2 atmosférico for aumentada (ANDREWS et al., 2001). A expressão dos genes da nitrato redutase em plantas é influenciada por vários fatores endógenos e ambientais, e pode ser regulada em nível transcricional, traducional e pós-traducional (MEYER e STITT, 2001). Em geral, mutantes destituídos da atividade de NR ou plantas transgênicas com expressão reduzida do gene da NR tendem a acumular altos níveis de NO_3^- (MEYER e SITT, 2001; HANSCH et al., 2001). Também foi demonstrado que a superexpressão da NR, quando dirigida pelo promotor 35S, reduz o acúmulo de nitrato em folhas de *Nicotina plumbaginifolia* (QUILLERÉ, et al., 1994). A redução nas concentrações de nitrato foi acompanhada por altos níveis foliares de glutamina e malato.

O uso do promotor 35S para dirigir a expressão da NR foi capaz de permitir um aumento na transcrição do gene da NR, mas a proteína NR pode ainda ser controlada pós-traducionalmente através de um mecanismo de fosforilação e posterior ligação à proteína 14-3-3 que inibe a atividade enzimática da NR (PROVAN et al., 2000).

Uma proteína NR na qual estavam faltando os 56 aminoácidos do seu domínio N-terminal foi expressa in *Nicotiana pumbaginifolia* e perdeu a regulação pós-traducional pela luz (LILLO et al., 1997). Neste domínio, a proteína NR é fosforilada e liga-se endogenamente a proteína 14-3-3 e se torna inativa. No entanto, esta modificação da NR não produziu resultados satisfatórios, pois houve acúmulo de NO_2^- tóxico e a planta mostrou-se clorótica.

Embora FERRARIO-MERY et al. (2001) tenham sido capazes de mostrar aumento da atividade da NR em plantas transgênicas, não conseguiram identificar nenhum fenótipo associado com esta característica. DJENNANE et al. (2002), introduziu um gene da NR sobre o controle do promotor 35S em batata. As plantas transgênicas não mostraram nenhum aumento de rendimento ou número de tubérculos.

CRETÉ et al. (1997), ao superexpressar a nitrito redutase (NiR) em *Arabidopsis* e Tabaco, verificaram que as plantas transgênicas não mostraram diferença fenotípica. Embora, o mRNA da NiR tenha sido fortemente expresso nas plantas transgênicas, a atividade da NiR e os níveis de proteína foram significativamente reduzidos nas plantas em meio com amônio, sugerindo que uma regulação pós-transcricional está operando sobre a expressão da NiR.

Recentemente, LEA et al. (2006), relatam que a regulação pós-traducional da NR afeta fortemente os níveis de aminoácidos livre, amônio, e nitrato, enquanto a regulação pós-transcricional tem pouca influência. Alguns exemplos de plantas transformadas com NR e NiR e os principais fenótipos obtidos podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2. Eficiência no uso de nitrogênio em plantas transgênicas expressando genes envolvidos na absorção e metabolismo de N (Adaptado de GOOD et al., 2004).

Gene	Produto gênico (função celular)	Fonte	Promotor	Planta alvo	Fenótipo Observado	Referências
Transportadores de Nitrogênio						
NRT1.1	Transportador de N (alta afinidade)	<i>Arabidopsis</i>	CaMV 35S	<i>Arabidopsis</i>	Absorção de nitrato	LIU et al. (1999)
NRT2.1	Transportador de N (alta afinidade)	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	CaMV 35S; rolD	<i>Nicotiana tabaccum</i>	Conteúdo de nitrato	FRAISIER et al. (2000)
Nitrato Redutase e Nitrito Redutase						
Nia2	Nitrato redutase	<i>Nicotiana tabaccum</i>	CaMV 35S	<i>Solanum tuberosum</i>	Redução do conteúdo de NO ₃ ⁻	DEJANNANE et al. (2002)
Nia	Nitrato redutase	<i>Nicotiana tabaccum</i>	CaMV 35S	<i>Lactus sativa</i>	Conteúdo de NO ₃ ⁻ , sensibilidade ao cloreto, níveis de NO ₃ ⁻	CURTIS et al. (1999)
Nia	Nitrato redutase (mutação Ser521)	<i>Nicotiana tabaccum</i>	CaMV 35S	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	Atividade de NR, acumulação de nitrato	LILLO et al. (2003)
NR	Nitrato redutase	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	CaMV 35S	<i>Nicotiana tabaccum</i>	Atividade de NR, transcritos de NR	VICENTZ et al. (1991)
NR	Nitrato redutase	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	CaMV 35S	<i>Nicotiana tabaccum</i>	Biomassa, atividade de NR, estresse H ₂ O	FERRARIO-MÉRY et al. (1998)
NiR	Nitrito redutase	<i>Spinacia oleracea</i>	CaMV 35S	<i>Arabidopsis</i>	Assimilação de NO ₂	TAKAHASHI et al. (2001)
NiR	Nitrito redutase	<i>Nicotiana tabaccum</i>	CaMV 35S	<i>N. tabaccum, Arabidopsis</i>	Atividade de NiR	CRÉTÉ et al. (1997)
Aminotransferases e Deidrogenases						
AspAT	Aspartato aminotransferase	<i>Panicum miliaceum</i>	CaMV 35S	<i>Nicotiana tabaccum</i>	Atividade enzimática, atividade de PEPC	SENTOKU et al. (2000)
GdhA	Glutamato deidrogenase	<i>E. coli</i>	CaMV 35S	<i>Nicotiana tabaccum</i>	Biomassa, peso seco, rendimento no campo	AMEZIANE et al. (2000)
ASN1	Asparagina sintetase	<i>Arabidopsis</i>	CaMV 35S	<i>Arabidopsis</i>	Sementes com mais N, tolerância a limitação de N	LAM et al. (2003)
ASN1/?glnAS1	Asparagina sintetase, GS mutada	<i>Pisum sativum</i>	CaMV 35S	<i>Nicotiana tabaccum</i>	Taxa de crescimento, análise de aa	BREARS et al. (2003)
AtGluR2	Receptor de glutamato	<i>Arabidopsis</i>	CaMV 35S2	<i>Arabidopsis</i>	Crescimento reduzido, uso do cálcio	KIM et al. (2001)

2.2.2 Glutamina sintetase (GS)

O NH_4^+ absorvido pelas células é assimilado formando aminoácidos primariamente via glutamina sintetase (GS)/Glutamato sintetase (GOGAT), embora rotas alternativas, como, por exemplo, via glutamato desidrogenase (GDH) e asparagina sintetase possam ocorrer, em condições como p. ex. de estresse (HIREL e LEA, 2002; DUBOIS et al., 2003). No caso da GDH, existem fortes evidências que a sua principal função é a desaminação do glutamato, produzindo amônio que pode ser adicionado em aminoácidos de menor relação C:N (MIFLIN e HABASH, 2002).

A glutamina sintetase catalisa a conversão de glutamato e NH_4^+ para glutamina com gasto de ATP. Existem duas isoformas de GS: a GS citosólica (GS_1), ocorrendo no citosol de raízes e células da parte aérea, e a GS plastídica (GS_2), presente nos tecidos fotossintéticos, plastídio de raízes e outros tecidos não fotossintéticos. Embora exista somente um gene que codifica para GS_2 , estudos com diversas espécies mostraram que a GS_1 é codificada por uma família multigênica (variando entre três e seis genes) (HIREL e LEA, 2002). Em milho, foram observados cinco diferentes genes para GS_1 expressos em raízes, e que houve diferenças na expressão dentro dos tecidos. No entanto, o papel preciso de cada uma dessas isoformas de GS_1 ainda não é bem conhecido.

Seguindo a descoberta da importância da glutamina sintetase (GS) e da glutamato sintetase (GOGAT) na assimilação do amônio em plantas superiores, vários laboratórios têm concentrado esforços para entender os mecanismos que controlam esta rota (GOOD et al., 2004). Os mutantes ou plantas transgênicas produzidos com níveis alterados de GS/GOGAT têm sido utilizados para avaliar os efeitos destas enzimas sobre o desenvolvimento das plantas e para estudar a expressão de diferentes membros da família multigênica da GS.

Embora vários estudos tenham demonstrado aumento na atividade de GS em plantas transgênicas, muitas destas plantas tem sido incapazes de mostrar algum fenótipo associado a esta característica. ORTEGA et al. (2001) mostraram que plantas transgênicas de alfafa transformadas com GS sobre o controle do promotor CaMV 35S acumularam transcritos sem um aumento correspondente nos níveis de atividade enzimática. Estes resultados indicam que um controle pós-transcricional pode regular os altos níveis de expressão da GS. Apesar deste exemplo não mostrar resposta ou fenótipo pela superexpressão de GS, outros estudos têm mostrado aumento significativo na biomassa de plantas em outras construções com GS_1 . Por exemplo, OLIVEIRA et al. (2002) superexpressando o gene GS_1 sob o controle do promotor CaMV 35S, demonstrou que as plantas transgênicas aumentaram o peso fresco, peso seco e proteína foliar, correlacionados diretamente com os altos níveis de GS nas folhas. Estes resultados sugerem que a superexpressão da GS não resulta consistentemente em aumento na atividade da GS e que o aumento na atividade da GS não esta sempre relacionado ao conteúdo de N e acumulação de biomassa.

Vários estudos têm reportado o aumento nas taxas de crescimento em plantas transgênicas superexpressando GS_1 , em todos os casos ocorrendo em condições de baixo suprimento de N (OLIVEIRA et al., 2002; FU et al., 2003; HABASH et al., 2001). Quando linhagens transgênicas de trigo superexpressando GS_1 de *Phaseolus vulgaris* sob o controle do promotor da menor subunidade da rubisco (rbcS) foram crescidos em potes até a maturidade e sua produtividade analisada, elas demonstraram um aumento na capacidade de acúmulo de nitrogênio nas plantas. Além disso, uma das linhagens mostrou significativo aumento do sistema radicular e rendimento de grãos com alto conteúdo de nitrogênio (HABASH et al., 2001). Alguns exemplos de plantas transformadas com GS_1 , GS_2 e os principais fenótipos obtidos podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3. Glutamina sintetase/Glutamato sintase e genes regulatórios envolvidos na absorção e metabolismo de N (Adapt. GOOD et al., 2004).

Gene	Produto gênico (função celular)	Fonte	Promotor	Planta alvo	Fenótipo Observado	Referências
Glutamina sintetase/Glutamato sintase (GS/GOGAT)						
GS1	Glutamina sintetase (citossólica)	<i>Pisum sativum</i>	CaMV 35S	<i>Nicotiana tabaccum</i>	Maior crescimento, ptn foliar e níveis de NH ₄ ⁺	OLIVEIRA et al. (2002)
GS1	Glutamina sintetase (citossólica)	<i>Pinus sylvestris</i>	CaMV 35S	Híbrido de álamo (<i>P. tremula</i> X <i>P. alba</i>)	Aumento do crescimento, clorofila e proteína	FU et al. (2003)
GS1	Glutamina sintetase (citossólica)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Subunidade menor da rubisco	<i>Triticum aestivum</i>	Aumento da capacidade de acumular nitrogênio	HABASH et al. (2001)
GS1	Glutamina sintetase (citossólica)	<i>Medicago sativa</i>	CaMV 35S	<i>Nicotiana tabaccum</i>	Aumento do crescimento, peso da raiz e parte aérea	FUENTES et al. (2001)
GS1	Glutamina sintetase (citossólica)	<i>Medicago sativa</i>	Srglb3p	<i>Lotus japonicus</i>	Esterilidade das plantas	SUARES et al. (2003)
GS1	Glutamina sintetase (citossólica)	<i>Glycine Max</i>	RolD	<i>Lotus japonicus</i>	Decréscimo da biomassa	LIMAMI et al. (1999)
GS1	Glutamina sintetase (citossólica)	<i>Glycine Max</i>	CaMV 35S	<i>Lotus corniculatus</i>	Senescencia acelerada	VINCENT et al. (1997).
GS1	Glutamina sintetase (citossólica)	<i>Glycine Max</i>	CaMV 35S	<i>Medicago sativa</i>	Sem aumento da atividade da GS	ORTEGA et al. (2001)
GS2	Glutamina sintetase (plastídica)	<i>Oryza sativa</i>	CaMV 35S	<i>Oryza sativa</i>	Aumento da fotossíntese e tolerância a salinidade	HOSHIDA et al. (2000)
GS2	Glutamina sintetase (plastídica)	<i>Nicotiana tabaccum</i>	Subunidade menor da rubisco	<i>Nicotiana tabaccum</i>	Aumento da taxa de crescimento	MIGGE et al. (2000)
Fd-GOGAT	Glutamato sintase Fdx-dependente	<i>Nicotiana tabaccum</i>	CaMV 35S	<i>Nicotiana tabaccum</i>	Mudança na assimilação diurna de amônio	FERRARIO-MÉRY et al. (2002)
NADH-GOGAT	Glutamato sintase NDAH-dependente	<i>Oryza sativa</i>	<i>O. sativa</i> NADH-GOGAT	<i>Oryza sativa</i>	Aumento do enchimento dos grãos	YAMAYA et al. (2002)
NADH-GOGAT	Glutamato sintase NDAH-dependente	<i>Medicago sativa</i>	CaMV 35S	<i>Nicotiana tabaccum</i>	Maior conteúdo de carbono e N-total na parte aérea e PS seco	CHICHKOVA et al (2001)
Fatores de transcrição						
ANR1	Fator de transcrição MADS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CaMV 35S	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Comprimento radicular	ZHANG e FORDE, (1998)
Dof1	Fator de transcrição DOF, associado ao metabolismo de C.	<i>Zea mays</i>	35SC4PDK	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Crescimento sob condições limitante por N	YANAGISAWA et al. (2004b)
GLB1	Proteína Regulatória PII	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CaMV 35S2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Taxa de crescimento e produção de antocianina	HSIEH et al. (1998)

2.2.3 Glutamato sintase (GOGAT)

A glutamato sintase (GOGAT) catalisa a conversão de glutamina e 2-oxoglutarato (2-OG) formando duas moléculas de glutamato, podendo usar ferredoxina ou NADH como doador de elétrons, passando a ser denominadas, respectivamente, de Fd-GOGAT e NADH-GOGAT. Ambas as isoformas aparentam estar localizadas somente em cloroplastos e plastídios, com uma atividade maior da Fd-GOGAT em tecidos fotossintéticos. Dois distintos genes que são diferencialmente expressos nas raízes e folhas foram encontrados para codificar a Fd-GOGAT, enquanto que para NADH-GOGAT, ainda não está claro se existe um ou dois genes (LEA e MIFLIN, 2003).

Estudos com diferentes espécies afirmam que para concentrações não tóxicas de amônio as raízes são os principais locais de assimilação de NH_4^+ (ANDREWS et al., 2001). Geralmente as raízes aparentam ter altos níveis de GS e NADH-GOGAT e, além disso, ambas as enzimas são induzidas pelo aumento no suprimento de NH_4^+ (HIREL e LEA, 2002; ISHIYAMA et al., 2003).

Nas raízes ou no escuro, o doador de elétrons requerido para redução do NO_3^- e para a glutamato sintase (GOGAT) é gerado através da via oxidativa das pentoses fosfato. Nas folhas, o ATP requerido para a GS₂ e a ferredoxina requerida pela NiR, e Fd-GOGAT são derivados diretamente dos fotossistemas I e II de cloroplastos (sob iluminação).

A raiz é o principal local de assimilação primária de NH_4^+ , enquanto que o NO_3^- pode ser assimilado nas raízes ou parte aérea. Nas raízes, a assimilação primária de NH_4^+ (absorvido diretamente ou através da redução do NO_3^-) acontece via GS₁-GS₂/NADH-GOGAT, enquanto na parte aérea, GS₂/Fd-GOGAT é a principal rota de assimilação do NH_4^+ produzido pela redução do NO_3^- .

Em comparação com a GS, poucos estudos têm sido feitos com a produção de plantas transgênicas superexpressando genes da GOGAT (GOOD et al., 2004). Plantas transgênicas superexpressando uma GOGAT de alfafa, mostraram aumento da produção da proteína GOGAT, mas não houve nenhum fenótipo associado com esta característica (CHICHKOVA et al., 2001). Por outro lado, YAA et al. (2002), superexpressando a NADH-GOGAT em arroz sob o controle do seu próprio promotor, observou que as plantas transgênicas aumentaram (cerca de 80%) o peso dos grãos. Este estudo mostrou que a superexpressão de NADH-GOGAT pode ser usada como uma etapa chave no uso do nitrogênio e enchimento dos grãos em arroz e outros cereais. Alguns exemplos de plantas transformadas com GOGAT e os principais fenótipos obtidos podem ser vistos na Tabela 3.

2.2.4 Glutamato desidrogenase (GDH)

O metabolismo de carbono (C) e nitrogênio (N) é fundamental para o crescimento e desenvolvimento das plantas. A complexa coordenação entre o metabolismo de C e N é conseguida graças a uma percepção celular do balanço C/N e posterior regulação da transcrição de muitos genes envolvidos na fotossíntese, respiração e assimilação de N (CORUZZI e ZHOU, 2001; PALENCHAR et al., 2004; MIYASHITA e GOOD, 2008). Metabolicamente, esta complexa inter-relação entre o metabolismo de C e N envolve inter-conversões entre cetoácidos e aminoácidos (MIYASHITA e GOOD, 2008). A glutamato desidrogenase (GDH) catalisa a aminação redutiva do 2-OG a glutamato, bem como a desaminação oxidativa do glutamato a 2-OG. A conversão destes metabólitos tem sido relatada como a maior conexão do metabolismo de C e N em plantas, onde a GDH aparentemente apresenta um papel central no metabolismo global das plantas (MIYASHITA e GOOD, 2008).

Existem pelo menos dois genes de GDH em todas as espécies de plantas estudadas, cada um codificando para um polipeptídeo distinto, chamados de subunidades α e β da GDH (PURNEL et al., 2005). A montagem randômica das subunidades α e β para formar uma

holoenzima hexamérica possibilita a formação de sete distintas isoenzimas que podem ser visualizadas em gel não desnaturante de poliacrilamida (LOULAKAKIS e ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 1991). Em *Arabidopsis*, dois genes de GDH foram clonados e caracterizados (TURANO et al., 1997).

O verdadeiro papel fisiológico da GDH em plantas foi um assunto controverso durante as décadas passadas. Recentemente, MIYASHITA e GOOD (2008) identificaram e caracterizaram mutantes de *Arabidopsis* defeituosos para os dois genes de GDH. Estes dois mutantes, *gdh1-2* e *gdh2-1* foram cruzados para obtenção de um mutante duplo para estes dois genes, *gdh1-2/gdh2-1* com negligíveis atividades de GDH NAD(H)-dependente. A análise do fenótipo desses mutantes revelou que os mesmos apresentaram aumento de suscetibilidade às condições de deficiência de C, fornecido pela exposição das plantas ao escuro prolongado. Estes autores também verificaram diminuição na taxa de crescimento das plantas mutantes quando o suprimento de N foi fornecido na forma de glutamato, apoiando a função catabólica da GDH para alimentar o ciclo de Krebs durante a condição de depleção de C.

Embora pareça ser claro que a GDH não tem função relevante no processo de assimilação primária de N, sob certas circunstâncias fisiológicas o seu papel na assimilação de NH_4^+ não pode ser descartada (DUBOIS et al., 2003). SKOPELITIS et al. (2006), relatam que a assimilação de amônio pode ser atribuída a GDH sob condições de estresse salino.

Acredita-se que o aumento de expressão da GDH em resposta a elevados níveis de amônio seja em função da importância do seu papel no processo de destoxificação do excesso de amônio absorvido (TERCÉ-LAFORGUE et al., 2004).

MASCLAUX-DAUBRESSE et al. (2008), sugerem que em folhas senescentes, o pool de aminoácidos gerado pela proteólise e uma série de reações de transaminações leva a um aumento no pool de glutamato que serve como substrato imediato para a GDH. Esta enzima por sua vez, catalisaria a desaminação do glutamato para produzir 2-OG e suportando o processo de respiração, e o amônio resultante seria reassimilado pela GS1 para produzir glutamina no citosol para exportação. MASCLAUX-DAUBRESSE et al. (2006), mostraram que a GDH tem função de desaminação do glutamato em folhas fonte.

2.2.5 Asparagina sintetase (AS)

A enzima asparagina sintetase (AS) catalisa a formação de asparagina (Asn) e glutamato através da glutamina (Gln) e aspartato (Asp). Nas plantas superiores, a AS é codificada por uma pequena família de genes (ASN1, ASN2 e ASN3) (LAM et al., 1998). Assim, junto com a GS, acredita-se que a AS tenha papel crucial no metabolismo primário de nitrogênio (CARVALHO et al., 2003). Devido a asparagina ser um aminoácido usado para o transporte de nitrogênio em longas distâncias e possuir uma relação N:C maior que a Gln, a Asn pode ser usada como molécula de transporte e composto de armazenamento de N, tornando-se vital para a assimilação de nitrogênio e outros processos fisiológicos (GOOD et al., 2004). Observações em que os níveis de transcritos e peptídeos de AS em nódulos transgênicos de *Medicago truncatula* aumentaram constantemente, enquanto que os níveis de GS foram reduzidos, sugerem que a AS possa compensar a baixa atividade assimilatória de amônio da GS nesses tecidos (CARVALHO et al., 2003). Por outro lado, estes mesmos autores demonstraram que a atividade de GS é essencial para a manutenção de altos níveis de AS. Assim, a GS é requerida para sintetizar Gln suficiente para suportar a biossíntese de Asp via NADH-GOGAT e aspartato aminotransferase (AspAT).

A redução na atividade da GS em plantas transgênicas de *Lotus japonicus* também foi correlacionado com um aumento no conteúdo de asparagina (HARRISON et al., 2003), apoiando a hipótese de que quando a GS se torna limitante, a AS pode ser importante no controle do fluxo de N reduzido no interior da planta. LAM et al. (2003) superexpressando o gene ASN1 em *Arabidopsis* demonstraram que as plantas transgênicas aumentaram o

conteúdo de proteínas solúveis nas sementes, aumentaram o conteúdo de proteínas totais e apresentaram melhor crescimento em condições de limitação de N. Plantas de *Arabidopsis* superexpressando ASN2 acumularam menos amônio endógeno do que as plantas selvagens quando crescidas em meio contendo 50 mM de amônio (WONG et al., 2004).

Estes estudos demonstram que é possível manipular o metabolismo de nitrogênio e crescer plantas superexpressando AS com características favoráveis na promoção de uma maior eficiência no uso de nitrogênio. Alguns exemplos de plantas transformadas com AS e os principais fenótipos obtidos podem ser vistos na Tabela 2.

2.3. Remobilização do N - Efeitos Sobre a Eficiência no Uso do Nitrogênio

A remobilização de N em plantas é um processo metabólico muito complexo e de grande importância para a produtividade das plantas, porque recicla uma grande quantidade do N armazenado em compostos orgânicos de folhas e de órgãos que podem funcionar como de reserva (MASCLAUX et al., 2001).

O uso de nitrogênio pelas plantas envolve os mecanismos de absorção, assimilação, translocação e remobilização (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2008). O rendimento de grãos é baseado não somente na absorção de nitrogênio antes do florescimento, mas também durante a remobilização do N na maturação de sementes (KICHEY et al., 2007). Segundo estes autores, a contribuição do N remobilizado das folhas para o N total dos grãos em trigo e milho é cultivar-dependente e pode variar de 50% a 90%. Tem sido proposto que aumentar a eficiência de remobilização do N (ERN) é uma grande vantagem por reutilizar o N das partes vegetativas das plantas para o enchimento dos grãos, além de diminuir os custos com aplicações de altas doses fertilizantes nitrogenados após o florescimento (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2008).

Muitas das pesquisas sobre EUN têm sido focadas na absorção do nitrogênio do solo e seu metabolismo e transporte para as folhas (GOOD et al., 2004). No entanto, em cereais e outras culturas, o rendimento de grãos está baseado não somente no nitrogênio absorvido antes do florescimento, mas também na remobilização do N foliar durante a maturação das sementes (SHRAWAT e GOOD, 2008). Em arroz, aproximadamente 80% do N total nas panículas provém da remobilização através do floema de órgãos senescentes (TABUCHI et al., 2007). Estudos têm sido feitos para identificar genes que codificam para proteínas que são especificamente ativadas durante a remobilização de N, carbono e minerais durante a o período da senescência (GALLAIS e HIREL, 2004).

FELLER et al. (1994), observaram um aumento na atividade da GS e GDH durante a senescência foliar, indicando que estas enzimas podem estar envolvidas de alguma maneira na remobilização do N em plantas.

A GS citosólica (GS1) é somente induzida durante a senescência foliar e, portanto tem sido sugerido que esta enzima reassimilaria o amônio liberado da hidrólise de proteínas (BRUGIERE et al., 2000). Vários estudos utilizando plantas transgênicas de tabaco com GS1 demonstram que a manipulação genética influencia o fenótipo da planta e o metabolismo de N quando sob condições de limitação por N (HIREL e LEMAIRE, 2005). Durante a remobilização de N em cereais, a GS1 promove a síntese de Gln, que é a principal forma de N reduzido encontrada nos vasos do floema, e a NADH-GOGAT1 é importante no desenvolvimento de órgãos dreno para a remobilização de Gln em arroz (ANDREWS et al., 2004). Assim, a síntese de Gln em órgãos senescentes é considerada uma etapa chave na reciclagem do N na planta.

Recentemente, o papel de dois genes que codificam para GS1 citosólica de milho (*gln1-3* e *gln1-4*) foi investigado em detalhes examinando-se o impacto de mutações “knockout” desses genes sobre o rendimento e o efeito da superexpressão do *gln1-3* em milho (MARTIN et al., 2006). Estes autores encontraram um mutante para os dois genes *gln1-3* e

gln1-4 que mostrou reduzido tamanho e número de espigas, sem redução na produção de biomassa na parte aérea na maturidade. Quando o milho foi transformado superexpressando constitutivamente o gene *gln1-3*, houve um aumento significativo no rendimento observado (~30%). Neste mesmo experimento observou-se que não houve diferenças significativas na produção de matéria seca da parte aérea entre as plantas do tipo selvagem e as linhagens transgênicas, sugerindo um impacto específico do *gln1-3* na produção de grãos. As plantas transgênicas de milho superexpressando *gln1-3* produziram maior número de espigas, tanto sob baixo quanto sob alto suprimento de N, quando comparadas com as plantas do tipo selvagem (HIREL et al., 2007). Estes estudos sugerem claramente que a GS1 possui um importante papel no rendimento de grãos sob alta e baixa fertilização com N. Estes autores então sugerem que a reação catalisada pela GS1 pode ser um dos elementos chave no controle dos rendimentos nos cultivos.

Em arroz, mutantes knockout na GS1 feitos através da inserção de um retrotransposon *Tos17* no exon 8 ou 10 do gene *Osgs1;1* exibiu uma severa redução no crescimento e enchimento dos grãos crescendo com uma fertilização nitrogenada convencional. A reintrodução do cDNA do *Osgs1;1* sob o controle do seu próprio promotor nos mutantes restabeleceu o fenótipo com crescimento normal (TABUCHI et al., 2005). Mais tarde, estes mesmos autores mostraram que a GS1;1 é importante para um crescimento e enchimento normal de grãos, e que a GS1;2 e a GS1;3 não são capazes de compensar a função da GS1;1 (TABUCHI et al., 2007).

2.4. Aplicação de QTL (*Quantitative Trait Loci* – Loci para Característica Quantitativa) no Estudo de Eficiência de Uso de Nitrogênio

A eficiência de uso do nitrogênio é um complexo de características quantitativas que dependem de inúmeros fatores externos e internos, além da disponibilidade de nitrogênio, fixação fotossintética de carbono para prover precursores requeridos para biossíntese de aminoácidos e outras moléculas orgânicas, ou respiração para prover energia (RAGHURAM et al., 2006). Embora estas características sejam controladas por um grande número de *loci* atuando individualmente ou em conjunto, dependendo da nutrição, e condições ambientais e de desenvolvimento da planta, é possível encontrar variabilidade fenotípica e genotípica para entender parcialmente as bases genéticas da EUN, e assim, identificar alguns dos componentes chaves de rendimento para o melhoramento assistido por marcadores. Em milho, HIREL et al. (2001) analisaram linhagens recombinantes para características fisiológicas como conteúdo de nitrato, e atividade da NR e da GS. Quando foram comparadas as variações nestas características e componentes de rendimentos foram encontradas correlações positivas entre os conteúdos de nitrato, a atividade de GS e o rendimento. Quando os loci que governam características quantitativas foram determinados no mapa do genoma do milho, as posições de QTLs para os componentes de rendimento e a localização de genes para GS citosólica (GS1) coincidiram. Resultados similares foram obtidos por OBARA et al. (2001), confirmando as indicações prévias de que a atividade de GS1 em folhas é uma das mais importantes etapas no controle da realocação de moléculas das fontes para os órgãos drenos durante a senescência e o enchimento de grãos em cereais.

Nas últimas décadas, a combinação de estudos agrônômicos e fisiológicos com a genética quantitativa tem possibilitado o uso de marcadores moleculares para identificar *loci* regulatórios envolvidos na expressão de uma característica quantitativa (QTL). Alguns trabalhos foram desenvolvidos em busca de QTLs responsáveis pela eficiência de uso de nitrogênio e qualidade de grão (CHO, et al., 2007; ISHIMARU, et al., 2005; LIAN, et al., 2005; HIREL, et al., 2001; HU et al., 2004).

O mapeamento mais refinado, e a clonagem dos maiores loci identificados nestes estudos podem fornecer, em um futuro próximo, uma maior compreensão dos genes

envolvidos nestes processos (KRAPP, et al., 2005). Deste modo, o estudo dos genes presentes nestes QTLs assim como o perfil de expressão de genes em plantas eficientes ou que apresentem maior desempenho em condições de baixa fertilidade, pode fornecer grandes informações sobre os mecanismos envolvidos na maior eficiência de um grupo de plantas.

Em trigo, estudos de QTL sob alta e baixa disponibilidade de N, têm mostrado que independente da disponibilidade de N, a absorção deste nutriente é controlada por vários genes (AN et al., 2006). A tolerância a condições de baixa disponibilidade é uma característica altamente desejável em plantas para um sistema sustentável. Foi observado que a tolerância à baixa disponibilidade de N por plântulas de arroz possui uma complexa base genética e requer extensos estudos para sua completa caracterização (LIAN et al., 2005).

Em trigo, foi identificado um QTL que conferia um maior conteúdo de proteínas nos grãos das plantas que o possuísem em seu genoma (DISTELFELD et al., 2006). Este loci foi encontrado em uma cultivar “antiga”, e comparando esta com cultivares modernas, que apresentam menores teores de proteína, verificou-se que nas variedades modernas ocorreu a substituição de um par de bases, reduzindo a expressão do gene. Além disso, foi verificada uma alta similaridade entre seqüências do DNA deste QTL com seqüências de DNA no cromossomo 2 de arroz, significando que, nesta região do DNA de arroz pode também haver um QTL envolvido com o teor de proteínas nos grãos. Em continuidade ao trabalho de DISTELFELD et al. (2006), a região do QTL para proteína no grão foi seqüenciada e foram identificados três genes. Estes três genes foram classificados como fatores de transcrição, da família NAC (refere-se às iniciais dos três primeiros genes descobertos desta família; NAM de petúnia e ATAF1, ATAF2 e CUC2 de *Arabidopsis*), grupo NAM (No Apical Meristem – um dos genes deste grupo regula a formação do meristema apical), e verificou-se que a deleção de um par de bases em um desses genes resultava em redução dos teores de proteínas e nutrientes nos grãos de trigo (UAUY et al., 2006).

Os genes NAC vêm sendo relacionados à senescência em plantas, assim como os genes da família WRKY (refere-se à sequência de aminoácidos WRKYGQK muito conservada entre as proteínas desta família), e o aumento da expressão dos genes NAC foi observado durante a senescência em folhas de plantas de trigo (GREGERSEN et al., 2007). A maior capacidade de remobilização de N mostra alta correlação com o teor de proteínas nos grãos (REED et al., 1980; SOUZA et al., 2001; DISTELFELD et al., 2006).

2.5. Fatores de Transcrição Envolvidos na Eficiência de Uso de Nitrogênio

Os fatores de transcrição (FT) são proteínas que se ligam ao DNA e/ou que interagem com outros reguladores transcricionais promovendo o remodelamento da cromatina e modificações de proteínas, visando recrutar ou bloquear o acesso da RNA polimerase a determinadas regiões do DNA (UDVARDI et al., 2007). Segundo estes mesmos autores, aproximadamente 7% das seqüências codantes do genoma vegetal é reservada para os fatores de transcrição, o que pode ser considerado um atestado da complexidade da regulação transcricional nestes organismos.

As plantas são organismos sésseis e, portanto estão sujeitas a variações ambientais extremas de luz, temperatura, água, nutrientes, e desafios biológicos de competidores, pestes e patógenos. Dessa forma, o processo evolutivo tem dotado as plantas de um flexível programa de desenvolvimento permitindo-as responder de maneira rápida e precisa às condições abióticas e bióticas prevalentes. O desenvolvimento e a diferenciação em plantas são programados primariamente em nível de transcrição gênica, que são controlados por FT (UDVARDI et al., 2007).

Os fatores de transcrição são frequentemente definidos como proteínas de ligação ao DNA em seqüências-específicas, e são capazes de ativar e/ou reprimir a transcrição de genes. Em *Arabidopsis thaliana* há mais de 1.800 genes que codificam para FTs (GUO et al., 2005;

IIDA et al., 2005). Somente um décimo destes FT já foram caracterizados geneticamente (QU e ZHU, 2006).

Já é bem conhecido o conceito de que em vias de transdução de sinais muitos genes são sujeitos à regulação transcricional por um único sinal comum, geralmente mediado por sequências regulatórias que existem em todos os genes que respondem ao sinal. O controle da transcrição é considerado o passo mais importante da regulação gênica, uma vez que, de todos os passos possíveis para o controle da expressão, apenas o controle da transcrição assegura que nenhum intermediário supérfluo seja sintetizado e, obviamente, porque sem transcrição ou sem síntese de RNA, não haverá síntese protéica. O controle da transcrição ocorre por um mecanismo integrado onde atuam as sequências CIS e os fatores TRANS.

As sequências CIS são sequências preservadas de nucleotídeos (sequências de consenso) que compõem os sítios regulatórios no DNA. Nessas sequências ligam-se fatores de transcrição não específicos (participam da regulação de todos os genes) que formam complexos com a RNA polimerase posicionando essa enzima na região de iniciação da transcrição. Estes sítios geralmente estão situados antes do ponto de início da transcrição no caso da RNA Polimerase II, e são os locais onde o complexo de transcrição é formado. Existem inúmeros sítios regulatórios no DNA, e os mais comuns, ou seja, aqueles presentes na transcrição de quase todos os genes, são o TATA box, o sítio CAT e o sítio GC.

Os fatores TRANS são as proteínas regulatórias, que reconhecem regiões específicas do DNA (que são as sequências CIS). Essas proteínas possuem em geral dois domínios, um para ligação ao DNA e outro para ligação à RNA polimerase ou a outras proteínas. Os domínios de ligação ao DNA dessas proteínas podem apresentar motivos estruturais do tipo dedo de zinco, zíper de leucina ou hélice-volta-hélice, que caracterizam os fatores TRANS.

A superfície de contato entre as proteínas regulatórias e os sítios regulatórios no DNA é altamente específica, e um grande número de contatos entre proteína e DNA assegura uma interação forte.

Depois de mais de uma década desde que os primeiros avanços com a engenharia genética na agricultura surgiram, os primeiros resultados comerciais já começam a serem observados (CASTLE et al., 2006). Estes primeiros produtos foram baseados na sua grande maioria em simples características monogênicas, como tolerância a herbicidas ou resistência a insetos, que não requerem modificações de complexas rotas metabólicas nas plantas transgênicas (CENTURY et al., 2008). Desde então, tem se depositado grande expectativa por parte da indústria da biotecnologia no surgimento de uma segunda geração de produtos transgênicos para características mais complexas relacionadas ao rendimento e à estabilidade de rendimento, que estão geralmente associadas a um complexo controle poligênico (SALMERON e HERRERA-ESTRELLA, 2006).

Avanços nos conhecimentos de genômica de plantas e nos sistemas biológicos, como a disponibilidade das sequências genômicas completas de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) e Arroz (*Oryza sativa*), têm oferecido oportunidades sem precedentes para identificar genes regulatórios e rotas metabólicas que controlam estas importantes características (CENTURY et al., 2008). Segundo estes mesmos autores, devido aos fatores de transcrição atuarem como reguladores chave dos processos celulares, eles se tornam excelentes candidatos para a modificação de complexas características nas plantas cultivadas, e esta tecnologia baseada no uso de FTs se torna agora, parte proeminente de uma próxima geração para obtenção de sucesso na biotecnologia associada a agricultura.

Embora esteja sendo proposto que os fatores de transcrição sejam a onda do futuro da biotecnologia na agricultura, existem fortes evidências de que os FTs já tenham desenvolvido importantes papéis na origem da agricultura através da domesticação de várias espécies de plantas hoje cultivadas. Em arroz, uma característica chave para sua domesticação foi a diminuição da queda dos grãos, permitindo assim uma eficiente colheita. KONISHI et al.

(2006) demonstraram que um gene (*qSH1*) que codifica para um FT estava envolvido com esta característica.

2.5.1 Fatores de transcrição da família MADS box

A arquitetura do sistema radicular tem um papel determinante em como a planta captura água e nutrientes do solo eficientemente. O crescimento ocorre nas pontas das raízes e o processo de exploração do volume de solo depende do comportamento de um grande número de pontas de raízes que podem assumir diferentes ordens de ramificações (FILLEUR et al., 2005). Cada ponta de raiz está equipada com uma bateria de sensores e mecanismos capazes de responder a uma grande variedade de sinais ambientes, tais como: nutrientes, potencial de água, luz, gravidade e ao toque. Quando as plantas estão expostas a flutuações no suprimento de nutrientes, elas respondem com uma extensiva reprogramação do metabolismo, bem como modificações adaptativas nos níveis de crescimento e desenvolvimento (GAN et al., 2005). Profundas mudanças na expressão gênica são conhecidas por preceder ou acompanhar estes ajustamentos metabólicos e morfológicos (WU et al., 2003; WANG et al., 2004), mas as rotas de transdução de sinais e os mecanismos regulatórios que convertem mudanças na disponibilidade de nutrientes em um apropriado conjunto de respostas moleculares e celulares são ainda muito pouco entendidos (GAN et al., 2005).

O ANR1 (gene induzido por NO_3^- em *Arabidopsis* - *NO}_3^-*-inducible *Arabidopsis* gene) de *Arabidopsis* foi identificado como um componente de uma rota de transdução de sinais que regulam o crescimento de raízes laterais em resposta a mudanças no suprimento externo de NO_3^- (ZANG e FORDE, 1998). Estes autores verificaram que linhagens transgênicas de *Arabidopsis thaliana* em que a expressão do ANR1 foi reprimida por antisense ou co-supressão não mostraram crescimento de raízes laterais em resposta ao fornecimento localizado de nitrato. Mais tarde verificou-se que o ANR1 codifica para um membro de uma família de fatores de transcrição conhecida por MADS box (refere-se as iniciais dos primeiros membros identificados; MCM1, AG, DEFA and SRF), com mais de 100 membros em *Arabidopsis thaliana* (PARENICOVA et al., 2003). Tem sido relatado que os genes MADS box apresentam importante papel no controle do desenvolvimento em fungos, metazoa e plantas (MESSENGUY e DUBOIS, 2003).

A expressão do ANR1 em raízes de plantas de *Arabidopsis* crescendo em sistema hidropônico foi especificamente regulada pelas mudanças no suprimento de N, inicialmente induzido pela privação de N na solução e rapidamente reprimido quando do re-suprimento do N (GAN et al., 2005).

2.5.2 Fatores de transcrição GATA

Os fatores GATA são pertencentes a uma classe de reguladores transcricionais presentes em fungos, metazoas e plantas, que normalmente reconhecem a seqüência de consenso WGATAR (onde W = T ou A; R = G ou A) (LOWRY e ATCHLEY, 2000). O domínio de ligação ao DNA dos fatores GATA é constituído por um tipo IV de dedo de zinco na forma $\text{CX}_2\text{CX}_{17-20}\text{CX}_2\text{C}$ seguida por uma região muito básica (REYES, et al., 2004). A letra C representa o aminácido cisteína e a letra X, quaisquer outros aminoácidos. Em animais, onde os fatores GATA desenvolvem funções críticas no desenvolvimento, diferenciação e controle da multiplicação celular, o domínio de ligação ao DNA do GATA adota a forma $\text{CX}_2\text{CX}_{17}\text{CX}_2\text{C}$ (PATIENT e MCGHEE, 2002). Em vertebrados e muitos invertebrados, as proteínas GATA apresentam dois destes dedos de zinco, onde somente o dedo de zinco da região C-terminal está envolvido com a ligação ao DNA. A maioria dos fatores GATA em fungos contém um único domínio: $\text{CX}_2\text{CX}_{17}\text{CX}_2\text{C}$ ou $\text{CX}_2\text{CX}_{18}\text{CX}_2\text{C}$ (TEAKLE e GILMARTIN, 1998). Eles demonstram estarem envolvidos na regulação global do

metabolismo de nitrogênio, fotomorfogênese regulada pela luz e regulação circadiana (SCAZZOCCHIO, 2000).

A maioria dos fatores GATA em plantas contém um único domínio $CX_2CX_{18}CX_2C$, mas fatores GATA com quaisquer motivos dedo de zinco de mais de 18 resíduos ou dois domínios dedo de zinco são também encontrados (REYES et al., 2004). Motivos de ligação ao DNA dos GATA foram implicados na regulação de genes em plantas, dependente de luz (BI et al., 2005). ARGUELLO-ASTORGA e HERRERA-ESTRELLA (1998) os identificaram nas regiões regulatórias de muitos genes responsivos a luz, incluindo genes envolvidos ou relacionados à fotossíntese, como o que codifica a subunidade menor da rubisco e a proteína de ligação à clorofila a/b (KOCH, 1996). Embora alguns fatores GATA tenham sido responsivos a luz *in vitro*, não há ainda dados conclusivos sobre suas funções *in vivo* (JEONG e SHIH, 2003; BI et al., 2005).

Fatores GATA também têm sido relatados na regulação da assimilação de nitrogênio em plantas. Eles foram identificados nas regiões regulatórias de muitos genes envolvidos na assimilação de nitrato, como os genes da nitrato redutase (NIA), da nitrito redutase (NiR) e da glutamina sintetase (GS) (RASTOGI et al., 1997). Nos fungos, *Neurospora crassa* e *Aspergillus nidulans*, respectivamente, as proteínas NIT2 e AREA são fatores de transcrição GATA que regulam globalmente genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio (BI et al., 2005).

Em leveduras, quatro fatores regulatórios globais do metabolismo de N, GLN3, NIL1, NIL2 e DAL80, são fatores GATA com um único dedo de zinco (HOFMAN-BANG, 1999). GLN3 e NIL1 são ativadores transcrpcionais, enquanto NIL2 e DAL80 atuam como reguladores negativos de muitos genes envolvidos no catabolismo de N (HOFMAN-BANG, 1999). O domínio de ligação é altamente conservado dentro dessa família (LOWRY e ATCHLEY, 2000). NIT2 e AREA compartilham funções muito similares, e a homologia entre eles em 50 aminoácidos dentro da região de ligação ao DNA é de quase 100%, enquanto que o total entre eles é de apenas 42%. Os reguladores do metabolismo de N em fungos, NIT2 e AREA, e em leveduras, GLN3, NIL1, NIL2, DAL80, compartilham alta homologia dentro do domínio GATA de ligação ao DNA, mas possuem homologia muito baixa fora deste domínio (BI et al., 2005).

No genoma de *Arabidopsis* existem 30 genes que codificam para fatores de transcrição GATA (BI et al., 2005), e em arroz 28 (REYES et al., 2004). A análise filogenética mostra a existência de quatro diferentes subfamílias de fatores GATA em *Arabidopsis*, todos eles codificando proteínas com um único dedo de zinco. O arroz e a *Arabidopsis* compartilham três subfamílias de fatores GATA que muito provavelmente estão relacionados deste a divergência entre mono e dicotiledôneas, entretanto, vários grupos de fatores GATA são exclusivos de arroz (REYES et al., 2004).

A despeito da identificação destes vários genes que codificam para fatores de transcrição GATA, e os inúmeros estudos que se tem a seu respeito *in vitro*, muito pouco é relatado das suas funções *in vivo* (REYES et al., 2004; BI et al., 2005).

A análise genética de um membro dos fatores de transcrição GATA, *GNC* (induzido por nitrato e envolvido no metabolismo de carbono) mostrou-se importante para a síntese de clorofila e a sensibilidade a glicose (BI et al., 2005). Mutantes de *Arabidopsis* para o gene *gnc*, apresentaram redução nos níveis de clorofila e foram mais sensíveis à glicose exógena. Dois genes para transporte de hexoses com uma possível conexão na sinalização envolvendo glicose foram significativamente reprimidos, enquanto que a superexpressão do GNC em plantas transgênicas induziu a expressão destes transportadores de hexoses e foram menos sensíveis a glicose exógena (BI et al., 2005).

Em trabalho desenvolvido recentemente por GIRIN et al. (2007), foi identificada uma região de 150 pb no promotor de um transportador de nitrato de alta afinidade (AtNRT2.1), envolvido na regulação da expressão gênica dependente da disponibilidade de N e C. Nesta

região de 150 pb foram identificados elementos CIS para ligação de fatores de transcrição GATA e DOF (item 2.5.3), indicando uma possível participação destes na regulação do metabolismo de N e C.

2.5.3 Fatores de transcrição Dof

As proteínas Dof constituem uma família de fatores de transcrição exclusivos de plantas, e que contém uma classe particular de domínio de ligação ao DNA tipo dedo de zinco (Dof, DNA one finger). Membros desta família têm sido encontrados assumindo diversas funções na regulação de genes e processos específicos das plantas. Análises bioquímicas, moleculares e genéticas têm revelado que proteínas de domínio Dof funcionam como um ativador transcricional ou repressor envolvido em diversos processos biológicos em vegetais. Embora muitas funções fisiológicas dos Dof ainda não tenham sido elucidadas, já é evidente que esses fatores desempenham funções críticas na regulação transcricional relacionada ao crescimento e desenvolvimento das plantas (YANAGISAWA, 2004a).

Transgênicos de *Arabidopsis* expressando Dof1 de milho revelaram altos níveis de expressão dos genes que codificam para a fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) e piruvato quinase (PK), cujos promotores continham prováveis locais de ligação para o fator de transcrição Dof1. Além disso, resultados já obtidos através de microarranjos de DNA (microarrays) sugerem que a expressão de outros genes, incluindo citrato cintase (CS) e isocitrato desidrogenase (ICDH), também foi aumentada em plantas transgênicas (YANAGISAWA, 2004b). Assim, a expressão do Dof1 parece estar sincronizada à expressão de muitos genes envolvidos na produção de esqueletos de carbono.

Estudos utilizando cotransfecção mostraram que o Dof1 aumentou a atividade dos promotores dos genes para ortofosfato diquinase citosólica e PEPC, que não estão presentes em animais (YANAGISAWA, 2000). Este mesmo autor observou que outra proteína Dof de milho, a Dof2, inibiu a atividade do promotor da PEPC, mas foi capaz de ativar outros promotores, sugerindo que as proteínas Dof têm função regulatória, na expressão de múltiplos genes associados com rotas específicas de plantas, para o metabolismo de carbono em milho.

A expressão de genes em plantas envolve classes de fatores de transcrição que são especificamente relacionados com a regulação de genes específicos e/ou mediação de uma variedade de sinais específicos. As proteínas Dof têm propriedades similares de ligação ao DNA devido ao seu domínio de ligação ao DNA ser extremamente conservado (YANAGISAWA, 2004a). Muitas proteínas Dof já foram descobertas tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas. Atualmente se conhece apenas uma pequena fração do seu envolvimento no metabolismo das plantas, embora se saiba que estas proteínas exercem função vital na expressão de genes em plantas. No genoma completo de *Arabidopsis*, foram identificadas 37 prováveis seqüências de genes *Dof* relacionados com a formação de sofisticados controles transcricionais em plantas superiores (LIJAVETZKY et al., 2003).

Depois do isolamento do primeiro cDNA para uma proteína de domínio Dof em milho (YANAGISAWA & IZUI, 1993), muitos cDNAs codificando para proteínas Dof tem sido clonados de muitas espécies de plantas.

O genoma das plantas superiores aparentemente codifica um grande número de genes Dof (YANAGISAWA, 2004a), e os processos biológicos envolvendo as proteínas Dof são provavelmente muito divergentes. No genoma de *Arabidopsis*, foram encontrados 37 genes que provavelmente codificam para proteínas Dof (YANAGISAWA, 2002), e aproximadamente 30 genes já foram encontrados no genoma de arroz (LIJAVETZKY et al., 2003). O domínio conservado das proteínas Dof poderia dotar todas estas proteínas com características semelhantes, por outro lado, a diversificada região fora do domínio Dof pode estar ligada a diferentes funções das várias proteínas Dof (YANAGISAWA, 2004a; LIJAVETZKY et al., 2003). Devido ao domínio Dof sozinho ser capaz de conferir

especificidade de ligação ao DNA (KISU et al., 1998), a região fora do domínio Dof não aparenta ter funções de ligação ao DNA.

Todos os domínios Dof apresentam quatro resíduos conservados de cisteína, embora a seqüência de aminoácidos dos domínios Dof e o arranjo dos resíduos de cisteína sejam diferentes de outros motivos dedos de zinco (YANAGISAWA, 2002; YANAGISAWA, 1998). A troca do resíduo conservado de cisteína por um resíduo de alanina ou serina inibiu completamente a ligação do domínio das proteínas Dof ao DNA *in vitro* (YANAGISAWA, 1995; SHIMOFURUTANI et al., 1998) e *in vivo* (MENA et al., 1998).

A seqüência específica de ligação ao DNA das proteínas Dof já foi estabelecida por muitos experimentos *in vivo* e *in vitro*. Todas as proteínas Dof analisadas até o momento, exceto para uma de abóbora, reconhecem a seqüência de nucleotídeos AAAG, essencial em ensaios de ligação ao DNA *in vitro* (YANAGISAWA, 2002). Dessa forma, o domínio conservado das proteínas Dof fundamentalmente aparenta prover todas as proteínas Dof de especificidade similar de ligação ao DNA.

Plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o fator de transcrição *Dof1* de milho, apresentam um desenvolvimento superior ao tipo selvagem quando expostas a um baixo suprimento de nitrogênio (YANAGISAWA, 2004b). As bases genéticas deste comportamento ainda não foram bem definidas e trabalhos são necessários para buscar mais informações a respeito.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo, avaliou-se o efeito da superexpressão dos fatores de transcrição *ZmDof1* e *OsDof25* sobre a eficiência de absorção e uso do nitrogênio (N) em plantas de *Arabidopsis thaliana* L. Inicialmente foi descrito o procedimento utilizado para identificação do ortólogo do *ZmDof1* em arroz. Em seguida, conduzimos um experimento para verificar se há mudanças dos níveis de expressão do *OsDof25* (provável ortólogo do *ZmDof1*) em resposta ao nitrogênio, e assim, certificar que este fator de transcrição está envolvido de alguma forma no controle do metabolismo de N. Estão descritas as metodologias utilizadas para clonagem e superexpressão dos fatores de transcrição *ZmDof1* e *OsDof25*. Uma análise funcional destes genes também foi feita.

3.1 Identificação do Gene Ortólogo do *ZmDof1* em Arroz

Para identificar os prováveis genes ortólogos no arroz para o Dof1 e Dof2 de milho, foi feita uma árvore de similaridade das seqüências dessas proteínas com todas as seqüências de proteínas Dof do arroz (*Oryza sativa*, ssp. *japonica* e *indica*) (Figura 1), bem como entre as seqüências codantes dos mRNA (Figura 2). Um alinhamento dos domínios dessas proteínas também é mostrado na Figura 3. A numeração dos fatores de transcrição do arroz é arbitrária e de acordo com a ordem de localização nos cromossomos. As seqüências polipeptídicas e codantes foram retiradas do site do banco de dados de fatores de transcrição de arroz, o DRTF (Database of Rice Transcription Factors - <http://drtf.cbi.pku.edu.cn/>).

A base de dados dos fatores de transcrição de arroz é uma coleção de fatores de transcrição conhecidos e prováveis de *Oryza sativa* L. ssp. *indica* e ssp. *japonica*. Dentro dessa base de dados já foram identificados 36 genes em 30 loci de fatores de transcrição Dof para arroz ssp. *japonica* e 28 genes em 28 loci para ssp. *indica*.

Como mostrado nas Figura 1 e 2, o *OsDof25* da ssp. *japonica* é similar ao *ZmDof1*, tanto na comparação da seqüência peptídica, como da seqüência dos nucleotídeos do mRNA. Portanto, o *OsDof25* foi identificado como provável ortólogo do *ZmDof1*. Os domínios de ligação desses fatores de transcrição são extremamente conservados, com apenas um aminoácido de diferença entre o *ZmDof1* e o *OsDof25*.

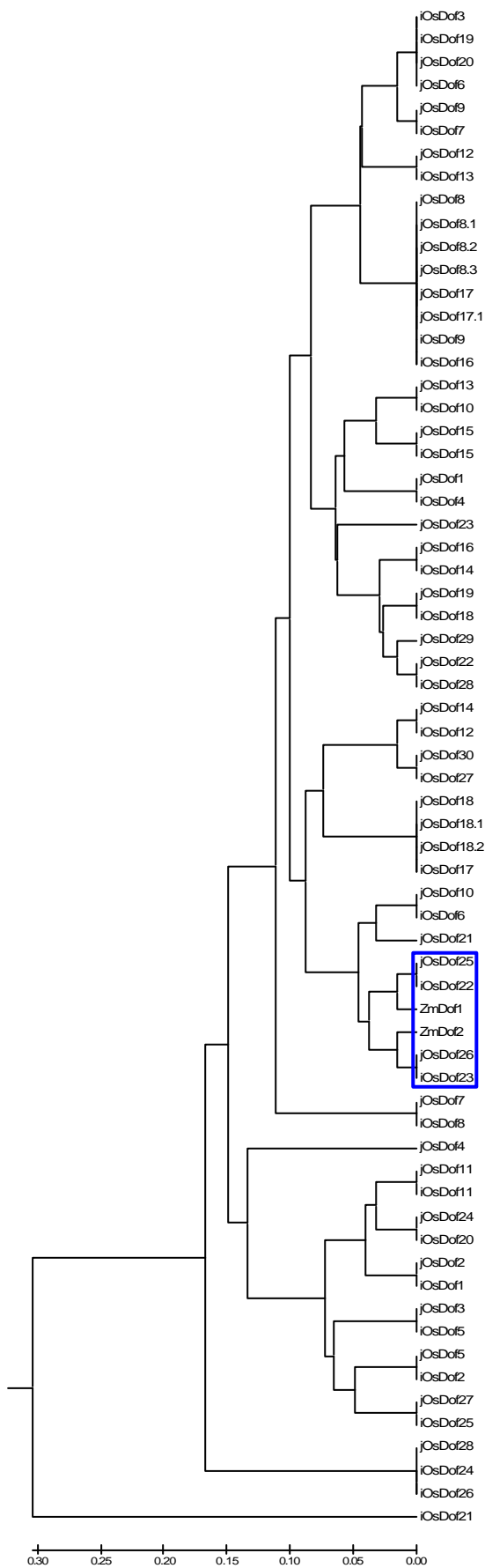


Figura 1. Árvore de similaridade obtida pelo método de agrupamento UPGMA. Comparação entre as seqüências das proteínas Dof de arroz, *spp. japonica* e *indica*, e Dof1 e Dof2 de milho.



Figura 2. Árvore de similaridade obtida pelo método de agrupamento UPGMA. Comparação entre as seqüências codantes (cds) do mRNA dos Dof de arroz, ssp. *japonia* e *indica*, e Dof1 e Dof2 de milho.

#jOsDof8	CPRCNSTNTK	FCYNNYSLQ	QPRYFCKTCR	RYWTEGGSLR	NVPVGGGSRK
#jOsDof17.1	CPRCNSTNTK	FCYNNYSLQ	QPRYFCKTCR	RYWTEGGSLR	NVPVGGGSRK
#jOsDof17	CPRCNSTNTK	FCYNNYSLQ	QPRYFCKTCR	RYWTEGGSLR	NVPVGGGSRK
#iOsDof19	CPRCNSTNTK	FCYNNYSLQ	QPRYFCKTCR	RYWTEGGSLR	NVPVGGGSRK
#jOsDof8.2	CPRCNSTNTK	FCYNNYSLQ	QPRYFCKTCR	RYWTEGGSLR	NVPVGGGSRK
#jOsDof8.3	CPRCNSTNTK	FCYNNYSLQ	QPRYFCKTCR	RYWTEGGSLR	NVPVGGGSRK
#iOsDof22	CPRCNSTNTK	FCYNNYSLQ	QPRYFCKTCR	RYWTEGGSLR	NVPVGGGSRK
#jOsDof8.1	CPRCNSTNTK	FCYNNYSLQ	QPRYFCKTCR	RYWTEGGSLR	NVPVGGGSRK
#jOsDof9	CPRCESTHTK	FCYNNYSLS	QPRYFCKTCR	RYWTKGGSLR	NVPVGGGCRK
#iOsDof20	CPRCESTHTK	FCYNNYSLS	QPRYFCKTCR	RYWTKGGSLR	NVPVGGGCRK
#jOsDof20	CPRCESPNTK	FCYNNYSLS	QPRYFCKGCR	RYWTKGGSLR	NVPVGGGCRK
#iOsDof23	CPRCESPNTK	FCYNNYSLS	QPRYFCKGCR	RYWTKGGSLR	NVPVGGGCRK
#jOsDof6	CPRCDSPNTK	FCYNNYSLS	QPRYFCKGCR	RYWTKGGSLR	NVPVGGGCRK
#iOsDof18	CPRCDSPNTK	FCYNNYSLS	QPRYFCKGCR	RYWTKGGSLR	NVPVGGGCRK
#jOsDof12	CPRCDSTNTK	FCYNNYSLS	QPRHFCKTCR	RYWTRGGSLR	NVPVGGGCRR
#iOsDof6	CPRCDSTNTK	FCYNNYSLS	QPRHFCKTCR	RYWTRGGSLR	NVPVGGGCRR
#jOsDof13	CPRCDSPNTK	FCYNNYSLS	QPRHFCKTCR	RYWTKGGALR	NVPVGGGCRK
#iOsDof7	CPRCDSPNTK	FCYNNYSLS	QPRHFCKTCR	RYWTKGGALR	NVPVGGGCRK
#jOsDof1	CPRCESTNTK	FCYNNYNLA	QPRHFCKACR	RYWTRGGALR	NVPVGGG-TR
#iOsDof16	CPRCESTNTK	FCYNNYNLA	QPRHFCKACR	RYWTRGGALR	NVPVGGG-TR
#jOsDof15	CPRCNSSNTK	FCYNNYNLT	QPRHFCKTCR	RYWTKGGALR	NVPVGGGCRK
#iOsDof21	CPRCNSSNTK	FCYNNYNLT	QPRHFCKTCR	RYWTKGGALR	NVPVGGGCRK
#jOsDof10	CPRCESTNTK	FCYNNYNLS	QPRHFCKSCR	RYWTKGGVLR	NVPVGGGCRK
#iOsDof4	CPRCESTNTK	FCYNNYNLS	QPRHFCKSCR	RYWTKGGVLR	NVPVGGGCRK
#jOsDof21	CPRCDSNTK	FCYNNYNLS	QPRHFCKACR	RYWTKGGLLR	NVPVGGGCRK
#jOsDof25	CPRCESRDTK	FCYNNYNTS	QPRHFCKCCR	RYWTKGGTLR	NVPVGGGTRK
#iOsDof24	CPRCESRDTK	FCYNNYNTS	QPRHFCKCCR	RYWTKGGTLR	NVPVGGGTRK
#ZmDof1	CPRCASRDTK	FCYNNYNTS	QPRHFCKGCR	RYWTKGGTLR	NVPVGGGTRK
#ZmDof2	CPRCGSRDTK	FCYNNYNTS	QPRHLCKSCR	RYWTKGGSLR	NVPVGGGTRK
#jOsDof26	CPRCESRDTK	FCYNNYNTS	QPRHFCKSCR	RYWTKGGSLR	NVPVGGGSRK
#iOsDof25	CPRCESRDTK	FCYNNYNTS	QPRHFCKSCR	RYWTKGGSLR	NVPVGGGSRK
#jOsDof23	CPRCDSANTK	FCYNNYSLS	QPRHFCKACK	RYWTRGGTLR	NVPVGGGCRK
#jOsDof22	CPRCDSTNTK	FCYFNYSLT	QPRHFCKACR	RYWTRGGALR	NVPVGGGFRR
#iOsDof28	CPRCDSTNTK	FCYFNYSLT	QPRHFCKACR	RYWTRGGALR	NVPVGGGFRR
#jOsDof16	CPRCESTNTK	FCYFNYSLS	QPRHFCKTCR	RYWTRGGALR	NVPVGGGCRR
#iOsDof9	CPRCESTNTK	FCYFNYSLS	QPRHFCKTCR	RYWTRGGALR	NVPVGGGCRR
#jOsDof29	CPRCDSTNTK	FCYFNYSLS	QPRHFCKACR	RYWTRGGALR	NVPVGGGCRR
#jOsDof19	CPRCDSTNTK	FCYFNYSLS	QPRHFCRACR	RYWTRGGALR	NVPVGGGYRR
#iOsDof11	CPRCDSTNTK	FCYFNYSLS	QPRHFCRACR	RYWTRGGALR	NVPVGGGYRR
#jOsDof7	CPRCNSIKTK	FCYNNYSMA	QPRYFCRECR	RYWTQGGSLR	NVPVGGGCRK
#iOsDof3	CPRCNSIKTK	FCYNNYSMA	QPRYFCRECR	RYWTQGGSLR	NVPVGGGCRK
#jOsDof14	CPRCASHDTK	FCYNNYNTS	QPRHFCRACR	RYWTLGGSLR	NVPVGGSTRK
#iOsDof8	CPRCASHDTK	FCYNNYNTS	QPRHFCRACR	RYWTLGGSLR	NVPVGGSTRK
#jOsDof30	CPRCASRDTK	FCYNNYNTA	QPRHFCRACR	RYWTLGGSLR	NVPVGGSTRK
#iOsDof15	CPRCASRDTK	FCYNNYNTA	QPRHFCRACR	RYWTLGGSLR	N-----
#jOsDof18.1	CPRCRSTNTK	FCYNNYSTS	QPRHFCRACR	RYWTHGGTLR	DVPVGGASRR
#iOsDof10	CPRCRSTNTK	FCYNNYSTS	QPRHFCRACR	RYWTHGGTLR	DVPVGGASRR
#jOsDof18	CPRCRSTNTK	FCYNNYSTS	QPRHFCRACR	RYWTHGGTLR	DVPVGGASRR
#jOsDof18.2	CPRCRSTNTK	FCYNNYSTS	QPRHFCRACR	RYWTHGGTLR	DVPVGGASRR
#jOsDof4	CPRCGSRETk	FCYFNYNVNR	QPRHLCRSCR	RYWTAGGALR	RVASASPGRR
#jOsDof2	CPRCNSMDTK	FCYNNYNVN	QPRHFCKNCQ	RYWTAGGTMR	NVPVAGRR
#iOsDof1	CPRCNSMDTK	FCYNNYNVN	QPRHFCKNCQ	RYWTAGGTMR	NVPVAGRR
#jOsDof11	CPRCSSMDTK	FCYNNYNIN	QPRHFCKNCQ	RYWTAGGAMR	NVPVAGRR
#iOsDof5	CPRCSSMDTK	FCYNNYNIN	QPRHFCKNCQ	RYWTAGGAMR	NVPVAGRR
#jOsDof24	CPRCNSMDTK	FCYNNYNIN	QPRHFCKSCQ	RYWTAGGSMR	NLPVAGRR
#iOsDof13	CPRCNSMDTK	FCYNNYNIN	QPRHFCKSCQ	RYWTAGGSMR	NLPVAGRR
#jOsDof5	CPRCSRDTK	FCYFNYNVN	QPRHFCKACH	RYWTAGGALR	NVPVAGRR
#iOsDof17	CPRCSRDTK	FCYFNYNVN	QPRHFCKACH	RYWTAGGALR	NVPVAGRR
#jOsDof3	CPRCNSMETK	FCYFNYNVH	QPRHFCKNCQ	RYWTAGGAMR	NVPVAGRR
#iOsDof2	CPRCNSMETK	FCYFNYNVH	QPRHFCKNCQ	RYWTAGGAMR	NVPVAGRR
#jOsDof27	CPRCSSMDTK	FCYFNYNVN	QPRHFCKHCQ	RYWTAGGAMR	NVPVAGRR
#iOsDof14	CPRCSSMDTK	FCYFNYNVN	QPRHFCKHCQ	RYWTAGGAMR	NVPVAGRR
#iOsDof27	CPRCGSANTK	FCYNNYSRT	QPRYLCKACR	RHWTEGGTLR	DVPVGGGRKN
#jOsDof28	CPRCGSANTK	FCYNNYSRT	QPRYLCKACR	RHWTEGGTLR	DVPVGGGRKN
#iOsDof26	CPRCGSANTK	FCYNNYSRT	QPRYLCKACR	RHWTEGGTLR	DVPVGGGRKN
#iOsDof12	-----MA	RCYHDSTTTP	LPRHFCKACK	RYWTRGGTLR	NVPVGGGCRK

Figura 3. Alinhamento dos domínios das proteínas Dof do arroz, *ssp. japonica* e *indica* e Dof1 e Dof2 de milho pelo programa ClustalW.

3.2 Resposta do Fator de Transcrição *OsDof25* ao N-NO₃⁻

Para verificar se o fator de transcrição *OsDof25* tem sua expressão alterada pelo suprimento ou deficiência de N, foi conduzido um experimento utilizando a variedade de arroz Nipponbare sp japonica. O cultivo foi realizado em câmara de crescimento no Depto. de Solos da UFRRJ onde as plantas foram submetidas a fotoperíodo de 12h/12h (luz/escuro) com luminosidade de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (fluxo de fótons fotossintéticos), umidade relativa do ar de 70% e temperatura 28°C/24°C (diurna/noturna).

As sementes de arroz da variedade Nipponbare foram previamente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2%, por 10 minutos, e depois lavadas várias vezes com água destilada. Em seguida as sementes foram transferidas para potes com gaze contendo somente água destilada. Cinco dias após a germinação, as plântulas receberam solução de Hoagland (HOAGLAND e ARNOM, 1950) modificada com ¼ da força iônica total contendo 2,0 mM de N-NO₃⁻ e pH 5,5. Passados mais cinco dias, as plantas foram transferidas para vasos de 0,7 L (quatro plantas por vaso) com solução de Hoagland modificada a ½ da força iônica total e com 2,0 mM de N-NO₃⁻. A partir de então, esta mesma solução foi reposta a cada três dias. Quinze dias após a germinação, 2/3 dos vasos receberam solução de Hoagland modificada sem nitrogênio, enquanto o restante continuou recebendo a solução de Hoagland com 2,0 mM de N-NO₃⁻. Dezoito dias após a germinação, metade dos vasos com solução sem NO₃⁻ voltaram a receber solução com 2,0 mM de N-NO₃⁻, enquanto a outra metade permaneceu sem N. Assim, totalizam-se três tratamentos: um grupo permaneceu constantemente com N-NO₃⁻ (controle), outro foi submetido a um período de deficiência deste nutriente, e o último foi submetido a um ressuprimento com N-NO₃⁻. Três horas após a aplicação dos tratamentos, as plantas foram coletadas, divididas em parte aérea e raiz e congeladas em nitrogênio para posterior extração de RNA total e análise da expressão gênica.

Uma ilustração da condução do experimento pode ser visualizada na Figura 4.

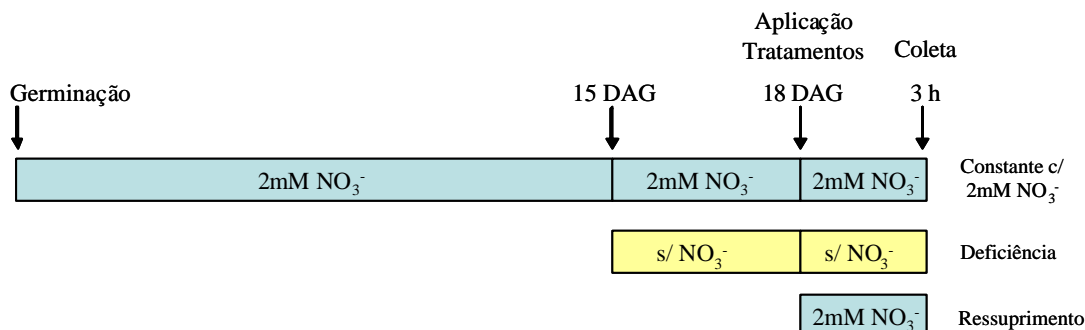


Figura 4. Esquema ilustrativo da condução do experimento para verificar diferenças nos padrões de expressão do fator de transcrição *OsDof25* em resposta ao ressuprimento e deficiência de N-NO₃⁻ em arroz da variedade Nipponbare.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com três repetições. A construção dos gráficos foi realizada utilizando o programa Sigmaplot 10.0.

3.3 Amplificação dos Genes *ZmDof1* e *OsDof25* e Montagem dos Sítios de Recombinação para Uso da Tecnologia Gateway

Observação: Todas as etapas envolvendo o processo de transformação das plantas, bem como a sua manipulação foram realizadas no Instituto de Pesquisa Jardim Botânico - Rio de Janeiro, sob a orientação e supervisão do Dr. Eduardo de Matos Nogueira (UNIRIO e UEZO).

Os genes do *ZmDof1* (Figura 5) e do *OsDof25* (Figura 6) não possuem íntrons e foram amplificados do genoma nuclear. Para o gene *ZmDof1* foi utilizada a linhagem de milho H84, de onde originalmente este gene foi isolado, e para o gene *OsDof25* a variedade Nipponbare

sp. japonica. Foram desenhados primers específicos para amplificação dos genes inteiros (Tabela 4).

Tabela 4. Primers utilizados para amplificação dos genes *ZmDof1* e *OsDof25*

Gene	Primers	Sequência
<i>ZmDof1</i>	<i>ZmDof1F</i>	5'- <u>ATGCAGGAGGCGTCATCGG</u> -3'
	<i>ZmDof1R</i>	5'-CTGTCACGGGAGGTTGAGG-3'
<i>OsDof25</i>	<i>OsDof25F</i>	5'-GACTGCGACCATAAAGAGACT-3'... <u>ATG</u>
	<i>OsDof25R</i>	5'-GTGGGCTCATGGGAGGTTGA-3'

Nota: Sublinhados representam o códon de iniciação (primer Forward) e de terminação (primer Reverse). No *OsDof25F* o códon de iniciação vem à frente do primer.

A reação de PCR foi realizada com uma DNA polimerase de alta fidelidade, a Platinum Pfx, para uma maior fidelidade na amplificação. A reação foi realizada com a seguinte composição: tampão de amplificação Pfx 1X, solução enhancer PCR_x 1X, dNTP 0,3mM cada, MgSO₄ 1mM, primers 0,3μM, Pfx DNA polimerase 1U e amostra de DNA 200ng. Como os genes de interesse possuem uma alta quantidade de CG, antes de iniciar a reação de PCR, o mix de reação sem a Pfx passou por uma etapa de desnaturação a 94°C durante 10 minutos. Logo em seguida foi adicionada a Platinum Pfx e a PCR prosseguiu com a seguinte programação: desnaturação a 94°C por 2min e 45seg e 35 ciclos de 15seg de desnaturação a 94°C, 30 seg de anelamento a 59°C (*ZmDof1*) ou 57°C (*OsDof25*) e 1min de extensão a 68°C para os dois genes.

GCCCCCTCCTTTCAACTCGCTCGCTCGCTCGCCTTCCATCTTTCTCCCTCTGTGCGGCAGTCTGCAGCAGCCCAG
CGCCGTCGCGCATGCAGGAGGCGTCATCGGCGGGCGGGCGGGGGCCGAGCCCGGCCGTCGGGGCGGCGCAGCATC
AGTTCGCCCGGCGTGGACCTCCGGCGGCCAAGGGGTACGCGGCGCCGGCGCCGGCGCCGGCGGTTGGGCGAGGGG
ACCCGTGCCCCGGTGTGCGTTCGCGGACACCAAGTTCTGCTACTACAACAACCTACAACACCTCCAGCCGCGCC
ACTTCTGCAAGGGCTGCCGCGCTACTGGACCAAGGGTGGCACGCTGCGCAACGTCCCCGTCGGCGGCGGCACCC
GCAAGAAGCCCTCCTCCTCCTCCTCGTTCGTCGTCCTACGTGGCCGCGCGGACGCGACAGGCAGCCCAAGAAGA
AGCCCGCCAGCAAGAAGCGCCGCGTTCGTCGGCGCCGGCCCCGGAGCTCGCCACC GCGGCCAGCCAGGCAAGACGG
CGACCACCACACGACGACGAGCGAGATCACCACGGAGACTGGCGCGCTGGAGGACTCCGACTCCCTGGCGCACC
TGCTGCTGCAGCCCCGGGACAGAGGACGCGGAGGCCGTCGCGCTCGGCCCTCGGCCCTCCGACTTCCCCCTCCGCGG
GGAAGGCGGTGCTGGACGACGAGGACTCGTTCGTCGTCGGCCCGCGCTCGTTCGACATGGGCGCGTGTGGGCCG
GCGCAGGGTTCGCCGACCCCGACCCCGCCTGCATCTTCCCTCAACCTCCCGTGACAGCCACACACGGTCCAGGCGC
CGAGGCGTACGTCCTCCTGCTCTGCTCTGCTCTGCGCCTGATGATGAGTGCAAGGAAATGGAGCGCTTTGATTCT
TCAGCTATTTGATGCATCTGCTAATTGATTTGGCAGTGGTGGTAAGGTACACGCACGATGAGCTGACTGCGTGGT
TCTTTGGTTTGGCCCTTAGTATATGATGACGATGACGATGATACTAGTTGTATGTGTGACGTGAGAGACGATCGCG
ACGACGACCTTGAATTTTAGTTTCTGAGATGAAAAAGTCAACTAGTGGCCTCTGTATGACTTTTAGTTTTACTCA
TGAACTCATCAGATGGCTGGCTATGGCTGTGGCTGTGGCTGTGGCTAACTCATCGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 5. Seqüência completa do mRNA do Dof1 de milho. Número de acesso no NCBI, X66076.1. Sublinhado representa a seqüência codante.

CGGACTGCGACCATAAGAGACTCCCGCTTCCGCCAACCGCCACCACCCGTTTCGACCATTTGCTTGCCCCCGCTC
 CTCGGTTTCTCCCGACTCCACCGGCGCGCGCGCGGAGGGACCAGAGCAGCCACGGCGCCGCCGCGCATGCAGG
 AGCAGCAGCCGGAGACCGGCCGCCGGCGCGCAGCAGTTTCGCCACCGTCGACCTGCGCCGTCCCAAGGGCTACG
 CGGCGGCTCCCGCGACGCCACAGCCTGGTTTCGGCTGCGACTGCTGCTGCCGCCGCTGGCCCGGCTGCGACGGCGG
 CAGCGGCGGCGGGGGAGGGTGACCCGTGCCCGCGGTGCGAGTCGCGGGACACCAAATTTCTGCTACTACAACA
 ACTACAACACCTCCCAGCCCCGGCACTTCTGCAAGTGTTCGCCCGGCTACTGGACCAAGGGTGGCAGCGTCCGCA
 ACGTCCCCGTTCGGCGGCGGCACGCGCAAGAAGTCTTCGTCTTCGTGTCGTCGTCGTTCTTCTCGTCATCCGCCGCCG
 CCGCAGCACCCGCCCAAGCGCCAGAAGACGTGCAAGAAGCGCCCGGTCACGACTCCCCGAGCCCCTCGCCGCCA
 CCACCCCGTCTCACCGAAGCCGCCGCTGACTCCGCCGCAAGACGACGACCGAAGCTACGTCGGAGAAGAAGA
 CGACGACTTCCACAACGACGACGACACCGCCGGCGCCTGACACCACGAGCGAGATCACACGGAGCTCGTCGTCC
 CGGCCGTGGAGGAGGACTCGTTCACGGACCTCTGCAGCCGGACTCCGCCCGGCTCACCTTCGGCCTCGACTTCT
 CCGACTACCCGTCACCAAGAGTCTGGCCGACCCGGACCTGCACACTTCGAGTGGCCGCCGCCGGCGTTTCGACA
 TGGCGTCTACTGGCCCGGCCGGGTTTCGCCGACCCGGACCCGACCCGCGGCTGTTTCTCAACCTCCCATGAG
 CCCACTCGCCCGGCGGCGGCGGCGGCTCAGGTGGGTGTGGGGTTTCCAACTACACCCGATGATGATTTTCAT
 CAGTTTCCGATTAATTAAGTAAATTGCGCGTGGGGTATATGGTGAAAATGATGACGTTAATCTTAGCTTTTTGAGA
 TTAGTGGCCGTGTTTTACTCTCGAGAGGGGCTAACTCAACCAAGTTTGGGTTGTTTTTCATGTGTATAACTCCTA
 TCAAGGCTTGGGCTTTTTTTTTTTCATACAATGGTCTGCTATTTTCTACTCCA

Figura 6. cDNA do *OsDof25*. LOC_Os08g38220.1|11978.m07807. (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/>). Sublinhado representa a seqüência codante.

As construções gênicas foram realizadas utilizando a tecnologia “MultiSite Gateway” de clonagem. Depois da amplificação dos genes foram realizadas mais duas reações de PCR com primers híbridos para a construção dos sítios de recombinação *attB1* e *attB2* para cada um dos genes (Tabela 5). Na primeira reação os primers anelaram-se no início e final do gene e levavam metade do sítio de recombinação, e na segunda reação os primers anelaram-se na primeira metade dos sítios *attB* e levavam a outra metade (Tabela 5). A primeira reação foi realizada com uma desnaturação inicial de 2min e 45seg e 25 ciclos de 15seg de desnaturação a 94°C, 30 seg de anelamento a 58°C e 1min de extensão a 68°C para os dois genes. A segunda reação também foi realizada em 25 ciclos com a mesma programação descrita acima, exceto pelos dois primeiros ciclos, que foram a uma temperatura de anelamento de 50°C e os 23 ciclos restantes a 60°C.

Tabela 5. Primers para amplificação dos genes *ZmDof1* e *OsDof25* com os sítios de recombinação *attB1* e *attB2* em duas reações.

Gene	Reação	Primers	Seqüência
<i>ZmDof1</i>	1 ^a	<i>ZmDof1attB1</i>	5'-AAAAAGCAGGCTCCATGCAGGAGGCGTCATC-3'
		<i>ZmDof1attB2</i>	5'-AGAAAGCTGGGTCCGGGAGGTTGAGGAAGATG-3'
<i>OsDof25</i>	1 ^a	<i>OsDof25attB1</i>	5'-AAAAAGCAGGCTACTGCGACCATAAGAGACTC-3'
		<i>OsDof25attB2</i>	5'-AGAAAGCTGGGTATGGGAGGTTGAGGAACAC-3'
Adaptador	2 ^a	Adapt.attB1	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCC-3'
		Adapt.attB2	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTC-3'

3.4 Tecnologia Gateway® e Clonagem dos Genes Amplificados

A tecnologia Gateway desenvolvida pela Invitrogen, é um método de clonagem baseado no sistema sítio-específico de recombinação do bacteriófago lambda, que fornece um rápido e altamente eficiente meio de transferência de seqüências de DNA heterólogo entre múltiplos sistemas de vetores, para análise funcional e expressão de proteínas (HARTLEY et al., 2000). Esta tecnologia é uma poderosa e nova metodologia que facilita sobremaneira estudos de expressão de proteínas, clonagem de produtos de PCR, e análise da função de genes por trocar as endonucleases de restrição e ligases pela recombinação sítio-específica.

As reações de recombinação da tecnologia gateway de clonagem são baseadas nas reações de recombinação sítio-específica do bacteriófago lambda (fago ?) em *E. coli*. O bacteriófago lambda pode crescer como um fago lítico, onde a célula do hospedeiro é lisada

com a liberação da progênie do vírus. Alternativamente, o fago λ pode integrar sítio especificamente dentro do genoma de *E. coli* por um processo chamado lisogenização.

No estado lisogênico o genoma do fago pode ser transmitido para as células filhas em muitas gerações até que surjam condições que viabilizam sua excisão do genoma. Neste momento, o vírus entra na fase lítica do seu ciclo de vida. O controle da passagem entre as rotas líticas e lisogênicas é um dos processos mais bem estudados da biologia molecular.

As reações de recombinação integrativa e excisiva do fago λ são mediadas por proteínas codificadas pelo próprio fago λ e pela *E. coli*. Estas reações de recombinação, feitas *in vitro*, são à base da tecnologia de clonagem gateway (Tabela 6).

Tabela 6. Reações de recombinação entre os sítios *att* do fago λ em *E. coli*.

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

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

Os quatro sítios contêm locais de ligação das proteínas que medeiam à reação. Os sítios *attB*, *attP*, *attL* e *attR* contêm 243, 25, 100, e 168 pares de base respectivamente. A reação *attB* x *attP* (Integração) é mediada pelas proteínas Int (Integrase) e IHF (Fator de Integração do Hospedeiro). A reação *attL* x *attR* (excisão) é mediada pelas proteínas Int, IHF, e Xis (Excisionase). Int e Xis são codificadas pelo genoma do fago λ , enquanto IHF é uma proteína de *E. coli*.

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

No sistema MultiSite Gateway® os sítios *att* do λ foram modificados e otimizados para acomodar clonagens recombinacionais simultânea de múltiplos fragmentos de DNA. As modificações incluem alterações de seqüência e comprimento dos sítios *att* resultando na criação de “novos” sítios *att* que exibem aumento de especificidade e promovem a eficiência requerida para a clonagem de múltiplos produtos de PCR em uma única reação. Na tecnologia MultiSite Gateway® quatro sítios *att* são utilizados, contra apenas dois da tecnologia Gateway® padrão (Tabela 7). Isso permite que mais de um produto de PCR possa ser clonado em apenas uma reação.

Tabela 7. Sítios *attB* nas tecnologias MultiSite Gateway® e Gateway® padrão

MultiSite Gateway®	Gateway®
<i>attB1</i>	<i>attB1</i>
<i>attB2</i>	<i>attB2</i>
<i>attB3</i>	
<i>attB4</i>	

Os vetores doadores da tecnologia MultiSite Gateway® são usados para clonar os produtos de PCR flanqueados pelos sítios *attB* para gerar os clones de entrada. Portanto, devido a estes fragmentos serem flanqueados por diferentes sítios *att*, três diferentes vetores doadores são requeridos para possibilitar a geração de três tipos de clones de entrada requerido para o MultiSite Gateway® (Tabela 8). O exemplo da reação BP é mostrado na Figura 7.

Tabela 8. Vetores doadores e suas funções

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

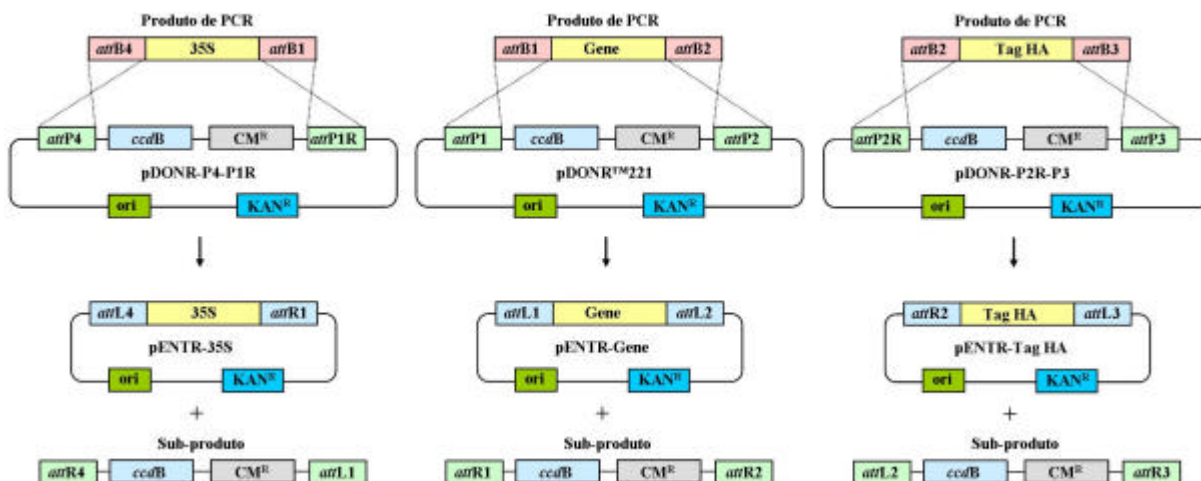


Figura 7. Esquema ilustrativo da reação de recombinação BP (Recombinação entre os sítios *attB* dos genes e *attP* do vetor pDONR221 para a obtenção dos vetores de entrada) necessários para a construção do vetor para superexpressão dos genes de interesse em *Arabidopsis*. Ori – origem de replicação; KAN^R – gene de resistência a kanamicina; CM^R – gene de resistência ao clorafenicol; attB, attP, attL e attR – sítios de recombinação; ccdB – gene que codifica para uma proteína que interfere na atividade da DNA girase de *E. coli*, impedindo o seu crescimento; 35S – Promotor do vírus do mosaico da couviflor CaMV 35S; Tag HA – peptídeo de fusão.

Depois da obtenção de todos os vetores de entrada na reação BP, é necessária a aquisição de um vetor de destino, ou seja, aquele que vai permitir a recombinação coordenada dos três vetores doadores na reação de recombinação múltipla, também chamada de reação LR, pois envolve a recombinação entre sítios de recombinação attL e attR entre os vetores doadores e o vetor de destino (Figura 8).

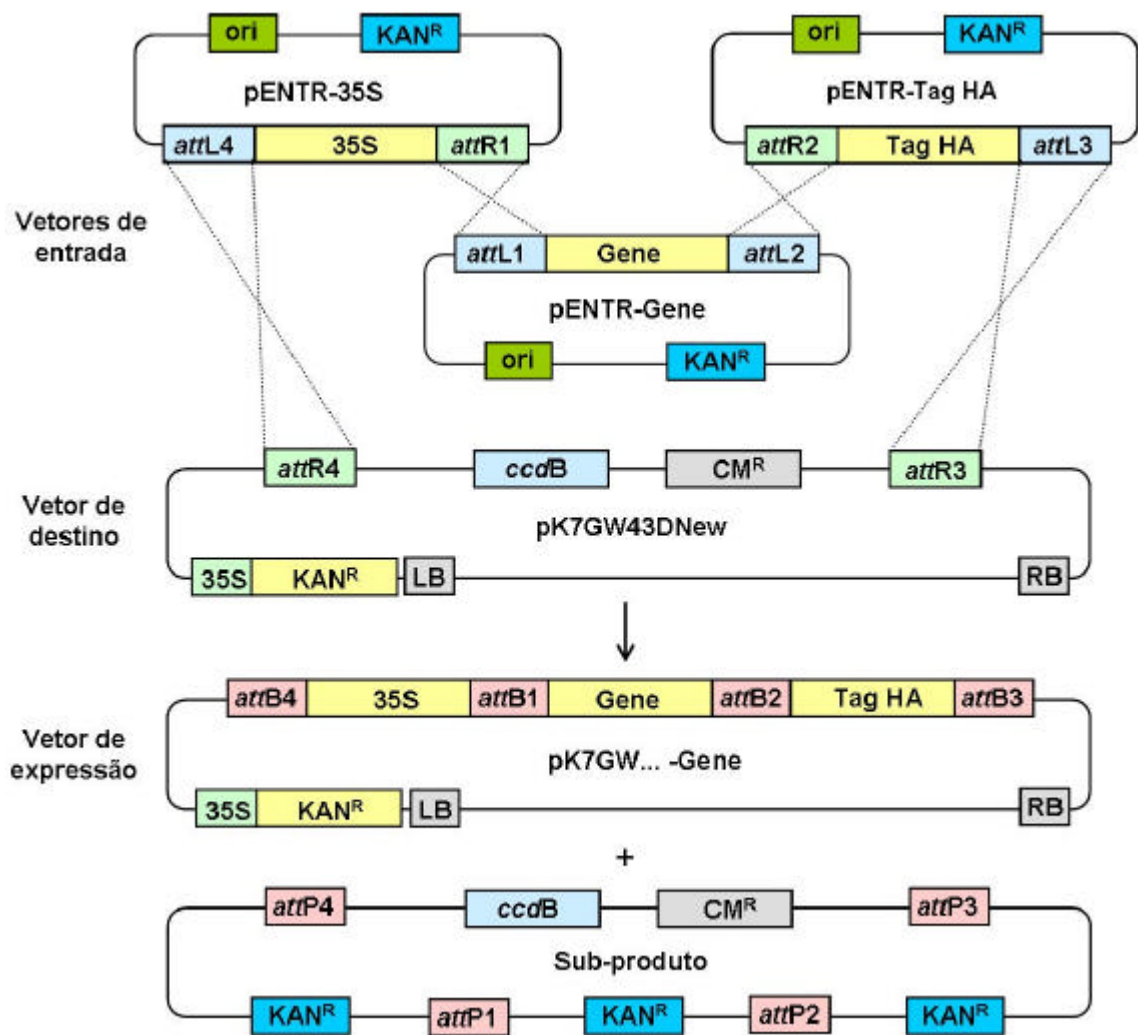


Figura 8. Esquema ilustrativo da reação LR triplo para obtenção dos vetores para superexpressão dos genes de interesse. Neste trabalho usamos o promotor 35S e um Tag-3XHA fusionado ao gene. Ori – origem de replicação; KAN^R- gene de resistência a kanamicina; attB, attP, attL e attR – sítios de recombinação; LB – borda esquerda; RB – borda direita; 35S – Promotor do vírus do mosaico da couviflor CaMV 35S; Tag HA – peptídeo de fusão.

3.4.1 Purificação dos genes que apresentam os sítios de recombinação

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

A purificação foi realizada com aproximadamente 90µL de reação da PCR, para aumentar a quantidade de produto de PCR recuperado. Aos 90µL do produto amplificado contendo os sítios attB foram adicionados 270 µL de TE pH 8,0 e 180 µL de PEG 8000 contendo 30 mM MgCl₂. Esta mistura foi agitada em vórtex e em seguida centrifugada a 10.000g por 15 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta, do lado oposto ao da formação do precipitado. O precipitado foi dissolvido em 16 µL de TE pH 8,0, e a qualidade do produto recuperado foi visualizada em gel de agarose 1%. Após a verificação de que o produto recuperado estava com boa pureza foram realizadas as reações de recombinação BP para criar os vetores de entrada.

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

3.4.2 Reação BP – recombinação entre os sítios attB dos genes e attP do vetor pDONR221 para a obtenção dos vetores de entrada

A reação BP foi realizada com os genes amplificados levando os sítios de recombinação attB1 e attB2 e o vetor doador pDONR221 (Figura 9) para criação dos vetores de entrada pENTR-*OsDof25* e pENTR-*ZmDof1*. Esses vetores participam na reação de LR tripla para formação da construção gênica utilizada na transformação das plantas. Nesta mesma reação de LR tripla estão também os vetores de entrada levando o promotor 35S e o tag de HA (peptídeo de fusão com o gene).

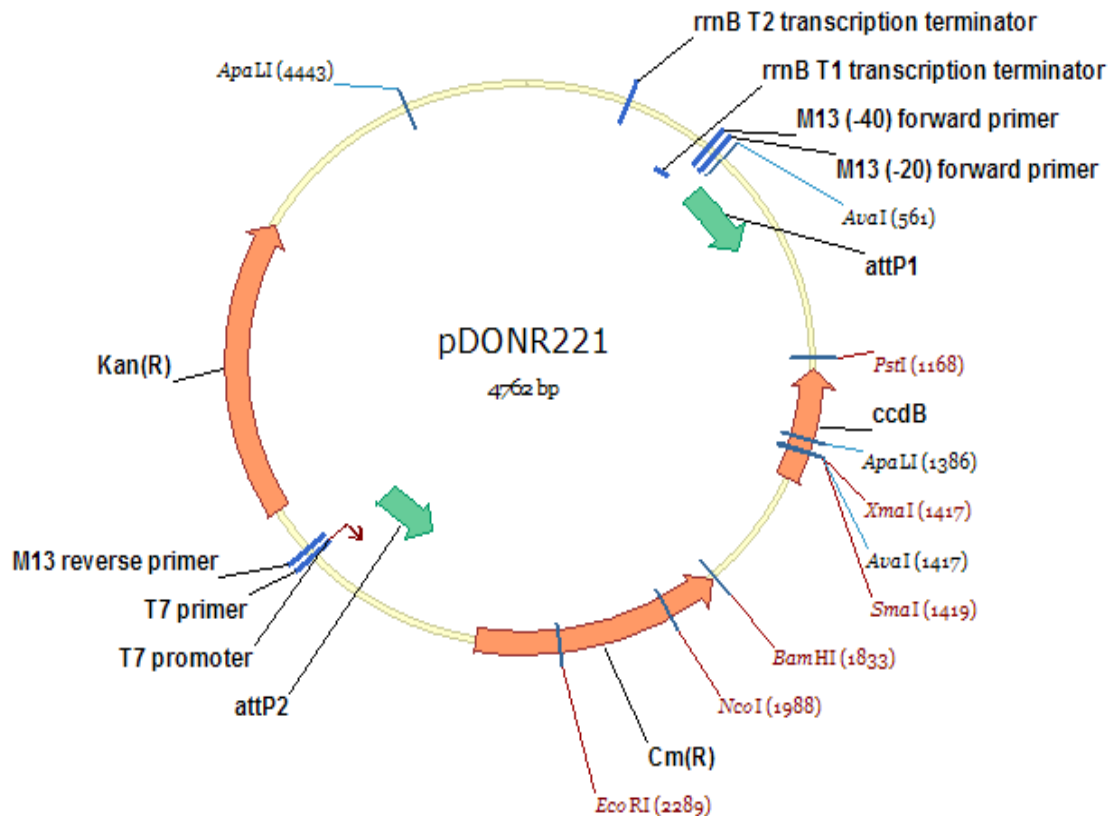


Figura 9. Vetor pDONR221 usado para clonagem dos genes e formação dos vetores de entrada. Notar a presença dos sítios de recombinação attP1 e attP2, que recombina com os sítios attB1 e attB2 presente nos genes amplificados.

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

Antes de proceder à transformação, foi realizada uma diálise por três horas em papel de filtro de 0,025µm colocado sobre água miliQ autoclavada dentro de uma placa de Petri estéril. O volume de reação foi reduzido para 5µL em centrífuga a vácuo. Em seguida, este material da reação BP foi utilizado para transformação de células competentes de *E. coli* (DH5a), a fim de caracterizar os clones de entrada. Misturou-se a reação BP (5µL), com 40µL de células competentes, que foi deixado em descanso no gelo por 5 min. Após este período a mistura foi submetida ao eletroporador a 1.700V e logo em seguida misturada com 400µL de meio SOC. As bactérias, agora transformadas foram cultivadas por 1h a 37°C em agitador orbital a 150 rpm. Para seleção das bactérias transformadas, 100µL foi riscado em meio LB contendo 50µg/mL de kanamicina.

3.4.3 Preparo de células competentes para eletroporação (DH5a)

O estoque de *E. coli* DH5a foi riscado em meio LB sólido e incubado durante a noite a 37°C. Na tarde do dia seguinte, uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB sólido e mantida sob agitação constante a 150 rpm durante a noite. No dia seguinte pela manhã 3mL da cultura fresca foi inoculada em 300 mL de meio LB líquido acondicionado em erlemayer de 2 L, mantido sob agitação constante a 200 rpm e 37°C até a cultura atingir uma DO₆₀₀ entre 0,5 a 0,8. Entre 3 e 4 horas de cultivo foram suficientes para alcançar uma DO₆₀₀ entre esses valores. Depois de atingida a DO, aliquotas de 50 mL da solução de células foram acondicionadas em seis tubos falcon e mantidas em descanso no gelo por 30 min. Em seguida as células foram precipitadas a 4.000 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas, cuidadosamente, em 50 mL água destilada estéril gelada, para retirada do excesso de sais. As células foram novamente precipitadas como descrito acima e ressuspensas em 25 mL de água destilada estéril gelada. As células foram então acondicionadas em três tubos falcon e novamente precipitadas como descrito acima. O precipitado de cada tubo foi cuidadosamente ressuspensado em 2 mL de glicerol 10% gelado e as células transferidas para um único tubo. Finalmente, as células foram precipitadas como descrito acima e o precipitado ressuspensado em 550µL de glicerol 10% gelado. A suspensão de células foi dividida em aliquotas de 50µL, acondicionadas em microtubos de 1,5 mL e mantidas em freezer -80°C por até seis meses.

3.4.4 Reações de LR triplo para obtenção das construções usadas para a transformação de Arabidopsis

Todos os vetores envolvidos nas reações de LR triplo foram preparados utilizando o kit da Qiagen para Midiprep (QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit) seguindo instruções do fabricante. Utilizando-se midiprep foi possível obter plasmídios de alta pureza (Tabela 9), fator indispensável para o sucesso da reação de clonagem múltipla. O Miniprep de lise alcalina não é recomendado para a reação de clonagem múltipla do sistema Gateway.

Tabela 9. Quantificação dos vetores envolvidos nas reações de LR triplo

Vetores	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Razão A ₂₆₀ :A ₂₈₀	Conc. (?g/µL)
pK7GW43DNew	0,041	0,089	2,17	225
pENTR-P.35S	0,035	0,070	2,00	175
pENTR-3XHA	0,026	0,054	2,07	135
pENTR-ZmDof1	0,030	0,080	2,12	220
pENTR-OsDof25	0,055	0,119	2,16	290

Obs.: Todos os vetores foram diluídos para 50ng/uL e usados como solução de trabalho.

As reações de LR foram realizadas utilizando o kit ‘Gateway LR Clonase II Plus Enzyme Mix’ da Invitrogen. Em um microtubo de 1,5 mL foram adicionados: 25fmoles do vetor de destino pK7FGW43DNew (Figura 10), 12,5fmoles do pENTR-P.actina, 12,5fmoles do pENTR-3XHA e 12,5fmoles do pENTR-*ZmDof1* ou pENTR-*OsDof25*. O volume foi elevado para 8 µL com TE 1X pH 8,0 e adicionado 2 µL do mix de enzimas. A mistura da reação foi homogeneizada por pipetagem vagarosamente e a reação ocorreu à temperatura ambiente durante a noite. Depois deste período a reação foi paralisada pelo tratamento com 1µL de Proteinase K a 37°C durante 10 min. Antes de proceder à transformação, foi realizada uma diálise por três horas em papel de filtro de 0,025µm colocado sobre água miliQ autoclavada dentro de uma placa de Petri estéril. O volume de reação foi reduzido para 5µL em centrífuga a vácuo.

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

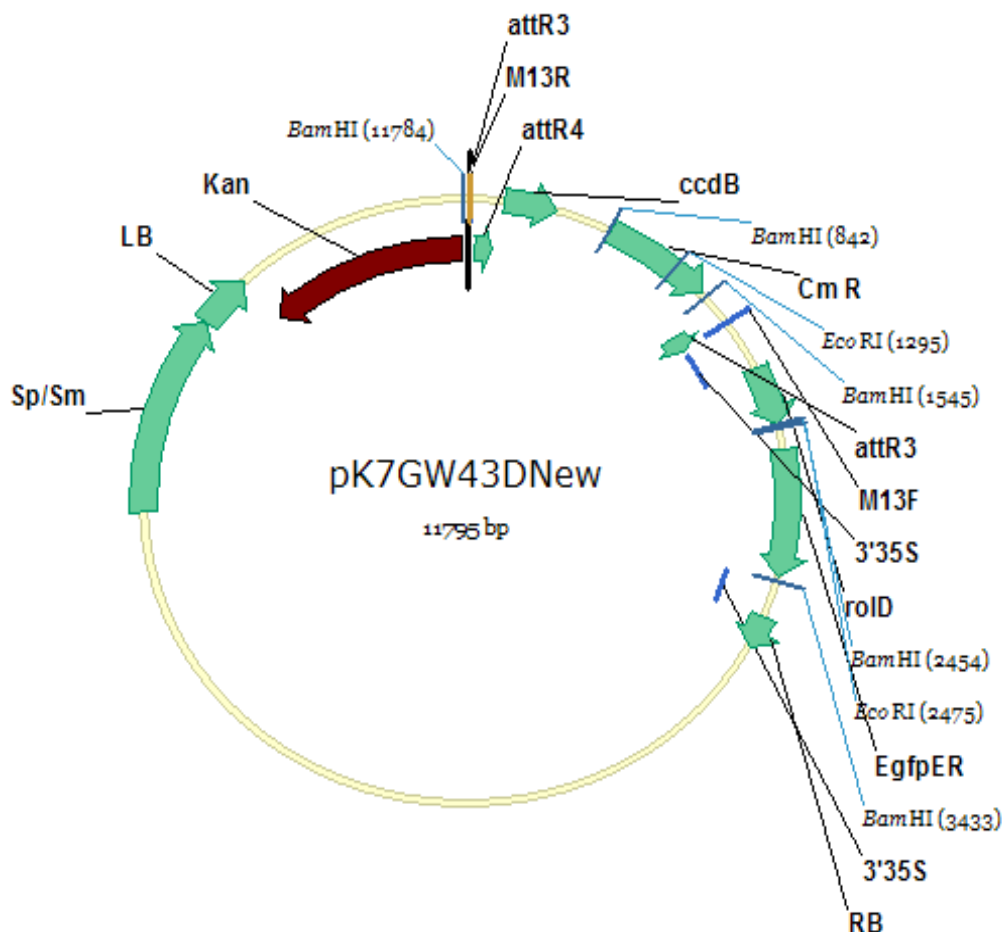


Figura 10. Vetor pK7GW43DNew usado na reação de recombinação tripla com os vetores de entrada obtidos nas reações BP. Este vetor leva o gene de resistência a Kanamicina (Kan) para seleção das plantas transformadas.

3.5 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com as Construções de Arabidopsis

Depois de caracterizadas as construções gênicas, estas foram inseridas em *Agrobacterium tumefaciens* estirpe C58C1 com descrito a seguir.

Foi adicionado 1µg de plasmídio a 100µL de *Agrobacterium* competente (obtida conforme descrito no item 3.5.1), a mistura foi homogeneizada suavemente e incubada no gelo por 30 minutos. As células com o plasmídio foram congeladas em nitrogênio líquido por cinco minutos e em seguida incubada a 37°C em banho-Maria por mais cinco minutos. Após este tempo, foi adicionado 1mL de meio YEB, e as células foram mantidas a 28°C, com agitação constante a 150 rpm durante duas horas. A transformação (1mL) foi plaqueada em meio YEB sólido com os antibióticos correspondentes a construção (Sp/Sm) mais Rf-Rifamicina (100µg/mL) e Gm-Gentamicina (40µg/mL). As placas foram incubadas 28°C até o aparecimento de colônias (dois a três dias). A transformação foi confirmada por PCR de colônia.

3.5.1 Preparação de *Agrobacterium tumefaciens* competentes

O estoque de *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1) foi riscado em meio YEB sólido (item 3.5.2) contendo rifamicina (100 µg/mL) e gentamicina (40 µg/mL), e incubado a 28°C por 24 horas. Com uma alça flambada foi transferida uma colônia isolada para um tubo falcon de 50 mL contendo 3 mL de meio YEB (contendo Rf/Gm) que foi incubado a 28°C sob agitação (150 rpm) por 48 horas. Pela manhã, 2 mL da cultura fresca foi inoculada em 50 mL de meio YEB contendo Rf e Gm em erlemayer de 250 mL. A incubação foi realizada a 28°C sob agitação constante (150 rpm) até atingir uma DO₆₀₀ de aproximadamente 0,6. A cultura foi dividida em dois tubos falcon de 50mL e incubada no gelo por 20 min. Em seguida, as células foram precipitadas a 1.000g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet resuspendido em 500µL de uma solução contendo CaCl₂ 20mM e glicerol 10%. As células foram divididas em alíquotas de 100µL acondicionadas em microtubos estéreis de 1,5 mL e mantidas em freezer -80°C por até seis meses.

3.5.2 Meio YEB para cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

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

3.6 Transformação de Arabidopsis Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação de Arabidopsis foi realizada através do método *dip-floral*. *Agrobacterium tumefaciens* da linhagem C58C1 foram transformados com as construções obtidas (35S:*ZmDof1*:HA e 35S:*OsDof25*:HA) como mostrado no item 3.5. Após a transformação e confirmação da mesma por PCR de colônia foi feito, pela manhã, um pré-inóculo em 1mL de meio YEB com os antibióticos (Sm/Sp), e no final da tarde o volume foi elevado para 10mL com meio YEB sem antibiótico. O cultivo ocorreu por toda a noite, e na manhã do dia seguinte foi quantificada a DO que deveria estar por volta de 2. A estes 10mL de cultura foram adicionados 40mL de uma solução contendo sacarose 10% e silwet 0,05%, e usado imediatamente. A inflorescência das plantas de Arabidopsis que deveriam estar com muitos botões florais ainda fechados foi mergulhada nesta solução por 2 a 3 segundos e levemente agitadas. Dez plantas foram utilizadas para cada construção. Um dia antes da transformação as plantas foram irrigadas abundantemente para ficarem com os estômatos bem abertos, e após a transformação as plantas foram mantidas deitadas em bandejas cobertas com filme PVC por 24 horas. Depois da transformação as plantas não foram irrigadas nos dois dias seguintes, a partir de quando a irrigação seguiu normalmente.

As sementes obtidas foram acondicionadas em microtubos, secas em estufa a 30°C por dois dias e depois armazenadas em geladeira a aproximadamente 10°C para uso posterior.

Todas as linhagens transgênicas de *Arabidopsis* obtidas passaram por avaliação visando identificar aquelas com apenas uma cópia do gene, ou seja, as que apresentaram segregação 3:1 na geração T2.

As plantas que sofreram o procedimento de transformação são chamadas de T0, as sementes destas plantas dão origem as diferentes linhagens chamadas de T1, e as sementes das linhagens T1 dão origem à geração T2 onde já é possível observar a segregação. Com o cultivo das sementes das plantas da geração T2 separadamente já é possível identificar quem é heme ou homozigota na geração T3. Para as análises mostradas posteriormente foram escolhidas apenas as linhagens com apenas uma cópia do gene, porém com diferentes níveis de expressão dos genes em estudo.

3.7 Análise do Efeito dos Fatores de Transcrição *ZmDof1* e *OsDof25* sobre a Expressão de Genes do Metabolismo de Nitrogênio e Carbono em *Arabidopsis*

Para o cultivo em placas de Petri as sementes de *Arabidopsis* foram inicialmente lavadas em 1mL de etanol 70% por 30 segundos, seguido de lavagem com hipoclorito de sódio 1% com 0,025% de tween 20 por inversão durante no máximo 5 minutos. O hipoclorito foi rapidamente retirado e as sementes lavadas por mais cinco ou seis vezes com água destilada estéril.

O meio de cultivo das plantas de *Arabidopsis* em placa foi o MS (Murashige & Skoog, 1962) a ½ da força iônica com 1% de sacarose, 0,5g L⁻¹ de MES e solidificado com 0,7% de bacto agar. As sementes já desinfestadas foram colocadas sobre papel de filtro estéril dentro de placas de Petri e transferidas para a superfície do meio de cultivo com palitos de dente estéreis, aproximadamente 40 plantas por placa de 9 mm de diâmetro. As placas foram fechadas e a seguir vedadas com fita microporosa e deixadas invertidas em geladeira a 4°C para homogeneizar a germinação. As placas foram então transferidas para câmara de crescimento a 25°C com aproximadamente 200 μmol de fótons m² s⁻¹ e fotoperíodo de 14 horas.

Duas semanas após a germinação, as plantas inteiras foram coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido para caracterização inicial do efeito dos fatores de transcrição sobre a expressão de enzimas do metabolismo de carbono e nitrogênio. Para análise dos metabólitos solúveis foi coletada apenas a parte aérea das plantas.

3.7.1 Extração de RNA total

Todo o procedimento para extração do RNA total foi realizado sobre gelo e as centrifugações a 4°C. Toda água usada neste procedimento foi tratada com DEPC para eliminação de RNases. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e aproximadamente 100 mg de tecido transferidos para microtubos contendo 500 μL de tampão de extração, composto de 200mM de Tris-HCl pH 7,5, 100mM de LiCl, 5mM de EDTA e 1% de SDS. Depois de misturadas, as amostras e o tampão de extração, foram adicionados 250 μL de fenol e 250 μL de clorofórmio. Esta mistura foi então agitada em vórtex durante um minuto e em seguida centrifugada por 10 min a 20.000xg. A fase aquosa foi transferida para novos tubos já contendo 250 μL de fenol e 250 μL de clorofórmio. Esta mistura foi novamente agitada em vórtex por um minuto, centrifugada por 10 min a 20.000xg e a fase aquosa transferida para um novo tubo. Após este procedimento o RNA foi precipitado com um volume de LiCl 6M durante 16 horas a 4°C. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 min a 20.000xg, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensão com 1mL de LiCl 3M para uma segunda precipitação por 10 min a 20.000xg. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado ressuspensão com 250 μL de H₂O milliQ-DEPC. Após completa dissolução do precipitado foram adicionados 0,1 volume de acetado de sódio 3M (25 μL) e 2 volumes de etanol absoluto (550 μL). Esta mistura foi mantida no freezer -80°C por 2h e

então centrifugada por 15 min a 20.000xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 300 μ L de etanol 70%. Após a secagem do precipitado o RNA foi ressuspensão em 50 μ L de água milliQ-DEPC e armazenado em freezer -80°C.

3.7.2 Tratamento com DNase I e síntese do cDNA

O RNA total foi quantificado em duplicata no espectrofotômetro SmartSpec™ 3000 (BIO-RAD). Três microgramas de RNA total foram tratados com DNase (DNase I Amplification Grade – Invitrogen™) 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 num 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 25mM e posterior inativação da DNase I a 65°C por 10 minutos. A reação de síntese do cDNA foi realizada com o kit “TaqMan® Reverse Transcription Reagents” (Applied Biosystem) seguindo as instruções do fabricante (Tabela 10).

Tabela 10. Reação de Síntese do cDNA utilizando o kit TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystem).

Componentes	Volume (μ L)	Concentração Final
H ₂ O livre de RNase	8,25	---
Tampão TaqMan 10X	5	1X
MgCl ₂ 25Mm	11	5,5mM
Mix dNTPs 2,5mM	10	500 μ M por dNTP
Primer oligo d(T) ₁₆ 50 μ M	2,5	2,5 μ M
Inibidor de RNase (20U/ μ L)	1	0,4U/ μ L
Transcriptase Reversa MultiScribe™ (50U/ μ L)	1,25	1,25U/ μ L
Amostra	11 (1 μ g)	0,02 μ g RNA/ μ L reação
Total	50	---

3.7.3 Desenho dos iniciadores e expressão gênica por RT-PCR em tempo real

Todas as seqüências de mRNA dos genes de Arabidopsis foram obtidas do site <http://www.Arabidopsis.org/>. Os primers foram desenhados o mais próximo possível da região 3'-UTR (região 3' não traduzida) devido a utilização de primers oligo-dT para síntese da 1ª fita do cDNA. Para isso, foi utilizado o software Primer Express 3.0 (Applied Biosystem). As características dos primers foram testadas utilizando o software Oligo Explorer 1.2 fornecido gratuitamente no site <http://www.genelink.com/tools/gl-oe.asp>. A especificidade dos primers foi testada através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, ferramenta de busca e alinhamento básico) (<http://www.Arabidopsis.org/Blast/index.jsp>).

Foram desenhados primers para os seguintes genes: transportadores de amônio de alta e baixa afinidades que mais contribuem para a absorção de N-NH₄⁺ por plantas de Arabidopsis (AMT1.1 e AMT2.1 respectivamente); transportadores de nitrato de alta e baixa afinidades que mais contribuem para a absorção de N-NO₃⁻ em plantas de Arabidopsis (NRT2.1 e NRT1.1 respectivamente); fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC1 e PEPC2); piruvato quinase (PK1 e PK2); isocitrato desidrogenase NAD⁺-dependente mitocondrial mais abundantes em plantas de Arabidopsis (IDH1, IDH2, IDH5 e IDH6); isocitrato desidrogenase NADP⁺-dependente citosólica (ICDH1, ICDH2 e ICDH3); glutamato desidrogenase (GDH1 e GDH2); glutamina sintetase citosólica (GS1.1, GS1.2 e GS1.3); glutamina sintetase cloroplástica (GS2) e ubiquitina 14 (Ubi14). Toda a lista de primers, bem como o número de acesso de cada um dos genes são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11. Sequências dos primers utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real e número de acesso dos genes para busca no site <http://www.Arabidopsis.org/>.

Gene	Primer Forward	Primer Forward	Nº acesso
AMT1.1	5'-CACAAACGTTAGCTGGCTG-3'	5'-CCAATGTCCCGAGAGTAGACG-3'	AT4G13510.1
AMT2.1	5'-TCTGTCATCGGAGCAATTCAAG-3'	5'-AGCTGCCCATGTTTGATCA-3'	AT2G38290.1
NRT1.1	5'-CGTCCACGCTCAATTAACGA-3'	5'-CGATGGAACGGTCCAATGTC-3'	AT1G12110.1
NRT2.1	5'-CTTGCGGAGCCACCTTTG-3'	5'-TTAAACCCGAGATGATGCCTAGA-3'	AT1G08090.1
PK1	5'-CGAGCAACTCCACTTCCAATG-3'	5'-CGCTTTGTTAGCAGTCCGTACA-3'	AT5G08570.1
PK2	5'-ACGAGCAGAAGCCACAGATGT-3'	5'-TTCTCCGCTAAGCATCACACA-3'	AT5G63680.1
PEPC1	5'-TGGACACCACATTTCTAAGGA-3'	5'-GCGTATTGCTAGTCGGGTGA-3'	AT1G53310.1
PEPC2	5'-TGGACGAGGAGGTGGACCTA-3'	5'-GTTACCTCAATTGCCCATGA-3'	AT2G42600.1
IDH1	5'-CGGTCAATGCAAACTAGACTGA-3'	5'-TTTGGCAACAAAATCTGTATCA-3'	AT4G35260.1
IDH2	5'-CCAATTCGCTTGTGTAAAGCA-3'	5'-TCGAAAGAATGTGGAACTAGAAGTA-3'	AT2G17130.1
IDH5	5'-AGAACAATCCACAGTGAATCA-3'	5'-CCGTGGTGGTCAACTACCT-3'	AT5G03290.1
IDH6	5'-GGTTCTCAACTACAACAGATTTAC-3'	5'-GGAAGATCCAATAAGTAAGTAAGGAAAG-3'	AT3G09810.1
ICDH1	5'-GGGCTATTGCATGAATAAAAGGA-3'	5'-GAGAAAGAAGGGCTAAAAAGATTCAA-3'	AT1G54340.1
ICDH2	5'-GCACAAGGATTCGGGTCACT-3'	5'-CGCTTCAGCTCAATCGTCTT-3'	AT1G65930.1
ICDH3	5'-GGACAAGAAACCAGTACTAACAGCATA-3'	5'-CCAGTTTCGCCTGTGTCTA-3'	AT5G14590.1
GDH-NAD;B1	5'-TCCATACTGGTTGAGGATTGTGA-3'	5'-TCATTCGATTCTCCCTGTTG-3'	AT5G18170.1
GDH-NAD;A1	5'-AAGTGGTTGCAGTAAGCGACATT-3'	5'-AGTTGCGCTCTGTGTTTATAGAG-3'	AT5G07440.1
GS1.1	5'-GTCATGTGCGATGCGTACACT-3'	5'-CCGACGCTGCTTTTGTGA-3'	AT5G37600.1
GS1.2	5'-CATCCTTGTATGTGTGATGCTTACA-3'	5'-CGCAGCATGTCGCTTGTAG-3'	AT1G66200.2
GS1.3	5'-CAAGAGGCACAACGCTGCTA-3'	5'-TTCTTGCTCAATCCCATACCAA-3'	AT3G17820.1
GS2	5'-GTGACCTCACTTTGGCAGAGA-3'	5'-TGAGCTGCAAGGGCTTCAG-3'	AT5G35630.1
ZmDof1	5'-ACGAGGACTCGTTCGTGTG-3'	5'-GGGAGGTTGAGGAAGATGC-3'	X66076.1 *
OsDof25	5'-ACTCGTTACGGACCTCCT-3'	5'-CTTGGTATGGACGGGTAGT-3'	LOC_Os08g38220.1 #
Ubi14	5'-TCACTGGAAAGACCATTACTCTTGA-3'	5'-AGCTGTTTTCCAGCGAAGATG-3'	AT4G02890.1

* Número de acesso no NCBI (National Center for Biotechnology Information). # Locus gênico (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/>).

A reação de síntese do cDNA foi diluída 5X para utilização nas reações de RT-PCR em tempo real. O gene da ubiquitina 14 de Arabidopsis foi utilizado como padrão interno nas reações de PCR. As reações de RT-PCR em tempo real foram feitas no aparelho StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando o kit Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) seguindo as recomendações do fabricante. Todas as reações foram feitas em duplicatas e não houve mais de 5% de variação entre tais duplicatas devido à grande sensibilidade desta análise. A reação foi montada em placas de PCR da seguinte maneira: 10µL do tampão Power SYBR Green PCR Master Mix 2X, 5µL de uma solução de primers 3,2µM cada e 5µL do cDNA diluído, com volume final de 20µL. A placa foi selada com filme ótico apropriado, agitada por dois minutos em vórtex próprio e centrifugada a 4.000g por 3 min a 25°C. A reação foi colocada no aparelho com a seguinte programação: 95°C 10 min seguida de 40 ciclos de 95°C 15 seg e 60°C 1min. Uma curva de “melting” foi adicionada ao programa para identificar possíveis amplificações inespecíficas. Nenhum gene estudado mostrou amplificações inespecíficas, validando todas as análises de expressão feitas neste trabalho.

3.8 Análise de Metabólitos Solúveis

Amostras de um grama de material coletado da parte aérea ou raízes 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).

3.9 Determinação da Atividade de Glutamato Desidrogenase (GDH) e da Malato Desidrogenase (MDH) em Gel Nativo de Poliacrilamida (Native-PAGE)

Sementes de Arabidopsis tipo selvagens (WT) e mutantes (superexpressando o fator de transcrição OsDof25), foram cultivadas como descrito no item 3.7.

Duas semanas após a germinação, 0,1 gramas da parte aérea e de raízes das plantas foram coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido para posteriores análises. Cada amostra

vegetal foi homogeneizada em tampão de extração composto por 50mM de Tris-Cl pH=8,0, 1mM de EDTA, 1,5% de polyvinylpolypirrolidone (PVPP), 10mM de dithiothreitol (DTT), 30% de glicerol e 1mM de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas na mesma solução tampão de extração, na proporção 3:1 (tampão : amostra). O homogenato foi centrifugado a 14.000g durante 30 min e o sobrenadante (extrato protéico) armazenado no freezer - 80°C.

O conteúdo de proteína foi determinado como descrito por BRADFORD (1976), usando albumina de soro bovino como padrão. Para determinação da atividade da glutamato desidrogenase (GDH) uma alíquota do extrato protéico contendo 100µg de proteína foi carregada em gel de acrilamida de 2 mm de espessura composto de gel de separação 5% e gel de empilhamento 4%. O pH do gel de separação foi modificado para pH=8,0 e o do gel de empilhamento para pH=7,3, o que permite uma melhor separação das isoenzimas de GDH. O gel correu por 4h em amperagem constante de 20 mA. Para revelação, o gel foi imerso em 50 mL de uma solução contendo 100mM de Tris-Cl pH=9,3, 55mM de L-glutamato, 0,5mM de CaCl₂, 1mM de NAD⁺, 2mg de PMS e 10mg de NBT (Azul de Nitro-Tetrazólio). Após o completo aparecimento das bandas o gel foi armazenado em glicerol 10% e depois escaneado.

Para a enzima malato desidrogenase (MDH), uma alíquota do extrato protéico contendo 100ug de proteína foi carregado em gel de acrilamida composto de gel de separação 8% e gel de empilhamento 5%, segundo LEAMMLI (1970). O gel correu durante uma noite em amperagem constante de 10 mA. O gel foi incubado a 30°C durante 30 min em uma solução contendo 100mM de Tris-Cl pH 7,5, 1,5 mL de DL-malato 1M pH 7,5, 15mg de NAD⁺, 2mg de PMS e 10 mg de NBT. Após o aparecimento das bandas o gel foi armazenado em glicerol 10% e depois escaneado.

3.10 Determinação da Atividade de Glutamato Desidrogenase (GDH) Aminoação e Desaminoação

A atividade foi realizada como descrito por TURANO et al. (1996). O tampão de extração de proteínas foi o mesmo do item 3.9. Na reação de aminoação, a atividade da GDH foi determinada em 500 uL de uma solução contendo 100 mM de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de (NH₄)₂SO₄, 13 mM de 2-OG, 0,25 mM de NADH (adicionado na hora do ensaio), 1 mM de CaCl₂ e 50 µg de proteína. A reação foi iniciada com a adição da proteína e a cinética da atividade foi obtida em dois minutos com registro a cada 10 segundos. A atividade foi expressa pela taxa de decréscimo da densidade ótica com o tempo a 340 nm. Na reação de desaminoação, a atividade da GDH foi determinada em 500uL de uma solução contendo 100 mM de Tris-HCl pH 9,3, 35 mM de L-glutamato, 0,25 mM de NAD⁺ (adicionado na hora do ensaio), 1 mM de CaCl₂ e 50 µg de proteína. A reação foi iniciada com a adição da proteína e a cinética foi a mesma da reação de aminoação. A atividade foi expressa pela taxa de aumento da densidade ótica com o tempo a 340 nm.

3.11 Determinação da Atividade de Glutamina Sintetase (GS)

A atividade foi realizada como descrito por FARDEN e ROBERTSEN (1980). O tampão de extração de proteínas foi o mesmo do item 3.9. A atividade foi realizada em 500 uL de uma solução contendo 50 mM de Imidazol-HCl pH 7,5, 5 mM de hidroxilamina neutralizada com Tris, 20 mM de MgCl₂, 25 mM de L-glutamato, 5 mM de β-mercaptoetanol e 5 mM de ATP. O controle da reação foi realizado sem a adição de ATP no meio de reação. A reação foi iniciada pela adição de 50 µg de proteína já incluídos nos 500 µL da reação e conduzida a 30°C durante 30 min. A reação foi paralizada pela adição de 350µL de uma solução composta por 4% (p/v) de ácido tricloroacético – TCA e 3,2% (p/v) de cloreto férrico anidro – FeCl₃ preparada em HCl 0,5N. O γ-glutamil monohidroxamato (GHD) foi colorimetricamente determinado em λ=540 nm.

3.12 Determinação da Atividade da Isocitrato Desidrogenase NADP⁺-dependente

A atividade da Isocitrato Desidrogenase NADP⁺-dependente foi realizada como descrito por SCHIAVON et al. (2008). O tampão de extração de proteínas foi o mesmo do item 3.9. A atividade foi determinada em 500 μ L de uma solução contendo 88mM de Imidazol-HCl pH 8,0, 3,5mM de MgCl₂, 0,41 mM de NADP⁺ (adicionado na hora do ensaio), 0,55mM de isocitrato de sódio e 50 μ g de proteína. A reação foi disparada com a adição da proteína e uma cinética foi realizada a cada 10 segundos durante dois minutos. A atividade foi expressa pela taxa de acréscimo da densidade ótica a 340nm pelo tempo.

3.13 Análises de Regiões Promotoras de Genes que Sofreram Indução Pelo *OsDof25*

As análises das regiões promotoras foram feitas manualmente contemplando aproximadamente 1000 pb *upstream* (antes do local de início da transcrição dos genes). O motivo de ligação dos genes da família dos fatores de transcrição Dof já está bem caracterizado (YANAGISAWA, 2004). Todas as proteínas Dof exceto uma proteína de abóbora (KISU et al., 1998) reconhecem o motivo AAAG como elemento essencial para ligação do Dof à molécula de DNA *in vitro* (para revisão YANAGISAWA, 2002). YANAGISAWA e SCHMIDT (1999) analisaram sistematicamente quatro proteínas Dof de milho com DNA sintetizado deixando claro o absoluto requerimento de uma sequência AAAG e mostrou que a sequência que flanqueia do motivo AAAG exerce efeito limitado sobre a interação Dof-DNA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da Resposta do *OsDof25* ao N-NO₃⁻ em plantas de arroz da variedade Nipponbare.

Houve aumento significativo nos níveis de expressão do fator de transcrição *OsDof25* após o ressuprimento com N-NO₃⁻ tanto na parte aérea quanto nas raízes da plantas de arroz da variedade Nipponbare (Figura 11). Este tratamento reflete as mudanças nos níveis de expressão gênica do *OsDof25* após transferência das plantas de uma condição de déficit de N (72h sem N) em solução, para três horas de exposição a uma nova solução contendo 2 mM de N-NO₃⁻. Este desenho experimental permite identificar genes que são responsivos tanto ao ressuprimento com N-NO₃⁻ quanto a deficiência, pois compara a expressão em plantas nutridas permanentemente com este nutriente.

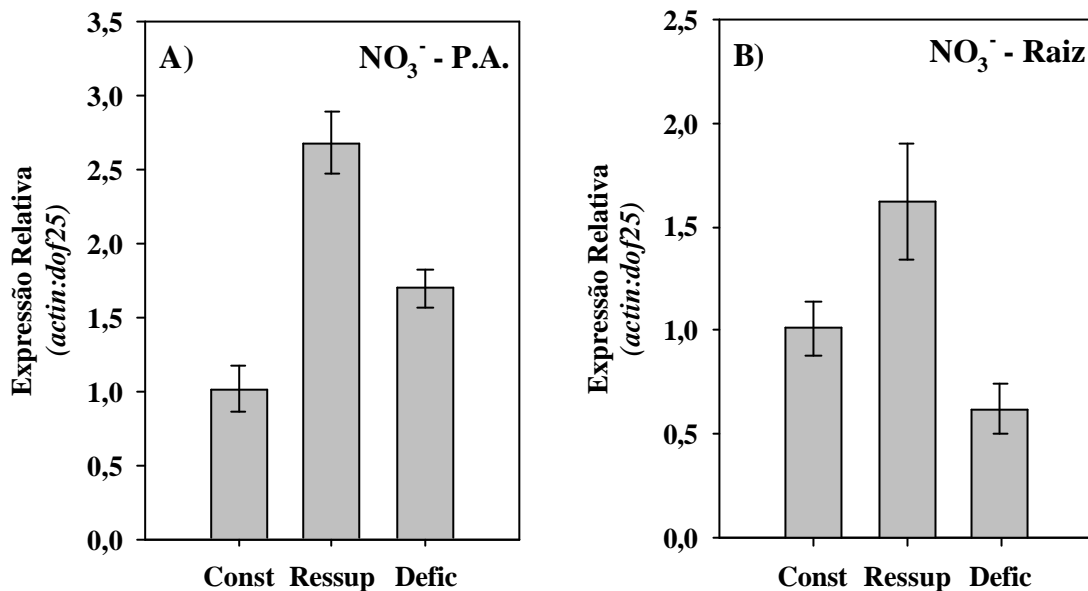


Figura 11. Efeito do ressuprimento e da deficiência de N-NO₃⁻ sobre a expressão relativa do fator de transcrição *OsDof25* na parte aérea (A) e nas raízes (B) de plantas de arroz da variedade Nipponbare. Const: teor constante de N (2mM); Ressup: 72h sem N seguido de ressuprimento com 2 mM durante 3 horas, e Defic: 75 horas sem N. O gene da *actina* foi utilizado como padrão interno nas reações de PCR. Barras representam desvio padrão da média.

Com o ressuprimento de N às plantas que ficaram 72 h sem esse nutriente, houve maior expressão do *OsDof25* na parte aérea em relação às plantas que receberam N constante. O mesmo aconteceu também nas raízes (Figura 11). O aumento de expressão deste fator de transcrição na parte aérea e raízes de plantas submetidas ao ressuprimento de N mostra algum envolvimento deste fator de transcrição no controle da expressão de genes envolvidos em rotas metabólicas envolvendo este nutriente.

Na parte aérea, a deficiência de N também provocou aumento da expressão do *OsDof25* (Figura 11A). Por outro lado, nas raízes a deficiência causou uma redução nos níveis de expressão deste gene (Figura 11B). Este resultado sugere que a participação deste fator de transcrição é diferente entre as partes da planta sob condição de déficit de N.

A constatação de que este fator de transcrição responde à disponibilidade de nitrogênio é um forte indício do seu envolvimento no controle do metabolismo de N e C e foi determinante

para prosseguirmos com a clonagem e expressão deste fator de transcrição em plantas de *Arabidopsis*.

4.2 Amplificação dos Genes *ZmDof1* e *OsDof25* e Construção dos Sítios de Recombinação

A seqüência codante do gene *OsDof25* possui 831pb, no entanto, para que fosse possível a obtenção de um bom par de primers foi necessário amplificar uma região de 978 pb, iniciando antes do códon de iniciação e incluindo no primer reverso o códon de terminação (Figura 12). Os primers utilizados podem ser vistos na (Tabela 4).

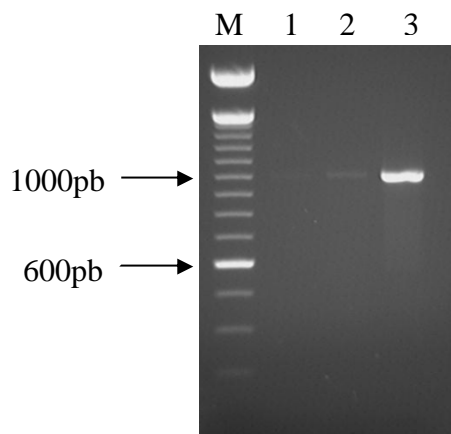


Figura 12. Amplificação do gene *OsDof25* do genoma nuclear da variedade de arroz Nipponbare sp. japonica. M - Marcador 100bp DNA Ladder (Invitrogen), 1 - sem Enhacer, 2 - com 0,5X do PCR_x Enhacer, 3 - com 1X do PCR_x Enhacer.

Quanto ao *ZmDof1*, a região codante possui 717pb. Os primers desenhados para este gene incluem os codons de iniciação e terminação e o tamanho do fragmento amplificado foi de 720 pb (Figura 13). Como pode se observado nesta figura, houve a amplificação de fragmentos inespecíficos e/ou a dimerização de primers, com fragmento majoritário de tamanho esperado. O problema destes fragmentos menores pode ser bastante reduzido no passo de purificação do fragmento de PCR com PEG 8000/30mM MgCl₂.

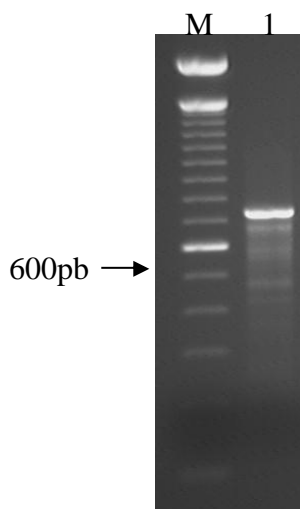


Figura 13. Amplificação do gene *ZmDof1* do genoma nuclear da linhagem de milho H84. M - Marcador 100bp DNA Ladder (Invitrogen), 1 - com 1X do PCR_x Enhacer.

Ambos os genes *OsDof25* e *ZmDof1* possuem alto conteúdo de CG, o que dificultou a reação de PCR e exigiu a utilização de uma DNA polimerase mais robusta, neste caso a

Platinum Pfx (Invitrogen). Também foi indispensável à utilização de 1X do tampão PCRx Enhacer incluso no kit desta enzima.

As reações de PCR para construção dos sítios de recombinação nos genes *OsDof25* e *ZmDof1* podem ser vistas na Figura 14. Para cada gene, foram realizadas duas reações de PCR para construção dos sítios de recombinação. Primers híbridos foram utilizados para este fim. O primeiro par de primers anelou-se no gene e levou metade do sítio de recombinação e o segundo par anelou na primeira metade do sítio de recombinação e levou a outra metade. Assim, após estas duas rodadas de PCR, obtivemos os genes fusionados com os sítios de recombinação attB1 e attB2, necessários para entrada no sistema de clonagem Gateway. Os primers utilizados podem ser vistos na Tabela 5.

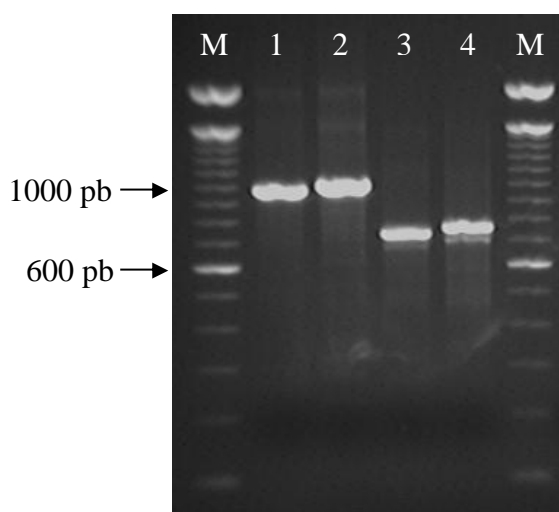


Figura 14. Amplificação dos genes *OsDof25* e *ZmDof1* com o sítio de recombinação attB. M – marcador 100bp DNA Ladder; 1 e 2 - primeira e segunda reações, respectivamente, para a construção do sítio de recombinação attB para o gene *OsDof25*; 3 e 4 - primeira e segunda reações, respectivamente, para a construção do sítio de recombinação attB para o gene *ZmDof1*.

4.3 Reação BP para Obtenção dos Vetores de Entrada

Os vetores de entrada são aqueles utilizados na reação de recombinação múltipla para obtenção do vetor de expressão (vetor utilizado para a transformação das plantas). A reação de recombinação BP está descrita no item 3.4.2.

Após a reação BP, foi necessário verificar se realmente houve a clonagem do gene de interesse, o que foi feito através da digestão dos clones obtidos com as enzimas de restrição PstI e EcoRV para o vetor pENTR-*ZmDof1* (Figura 15) e com EcoRV e Sall para o vetor pENTR-*OsDof25* (Figura 16). Para cada confirmação foram utilizadas duas enzimas de restrição, uma delas cortando no fragmento clonado (gene) e a outra no vetor (Figura 15 e 16).

Uma análise de restrição foi feita com o software “Vector NTI Advance 10” e a confirmação dos tamanhos dos fragmentos obtidos foi feita através da visualização em gel de agarose 1% (Figura 17). Foram obtidos diversos clones para cada um dos genes (Figura 17).

Após a reação de clonagem e confirmação por restrição, foram escolhidos dois clones de cada gene e enviados para seqüenciamento. O resultado mostrou completa similaridade com as seqüências depositadas para os dois genes.

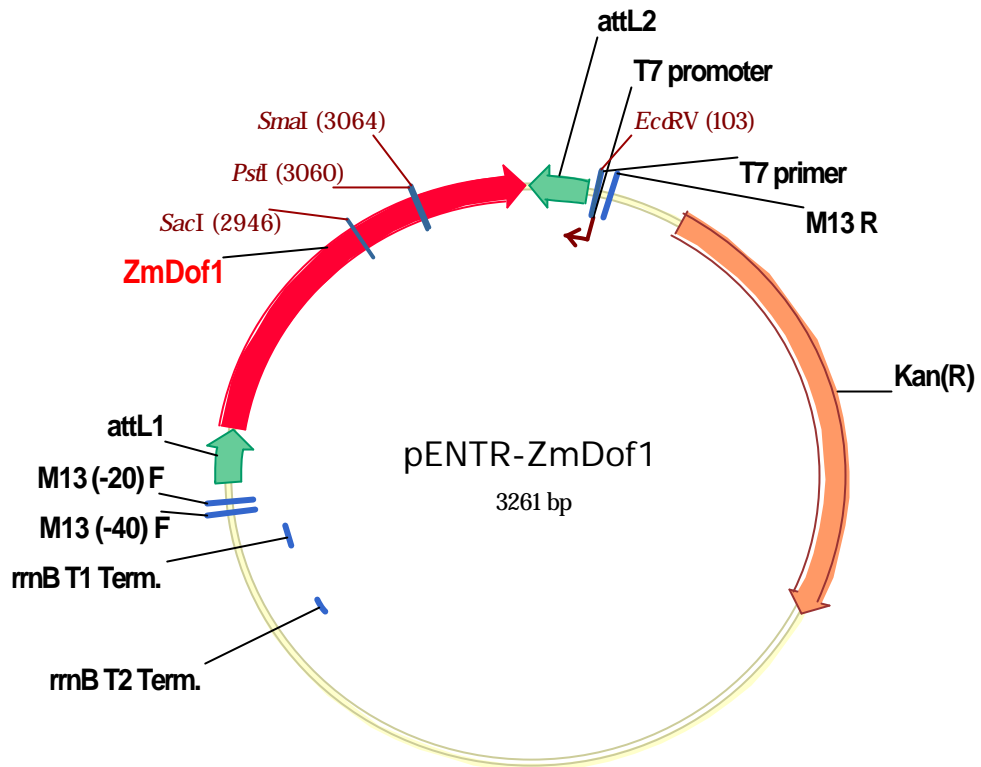


Figura 15. Vetor de entrada, pENTR-*ZmDof1* obtido após reação BP. Vetores construídos com o Software “Vector NTI Advance 10” da Invitrogen.

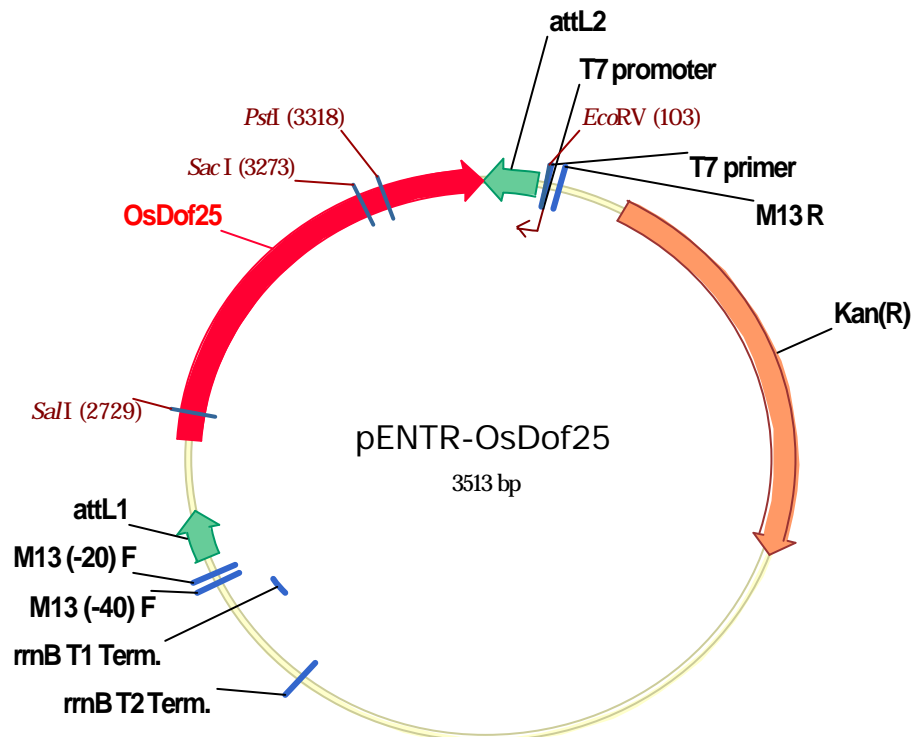


Figura 16. Vetor de entrada, pENTR-*OsDof25* obtido após reação BP. Vetores construídos com o Software “Vector NTI Advance 10” da Invitrogen.

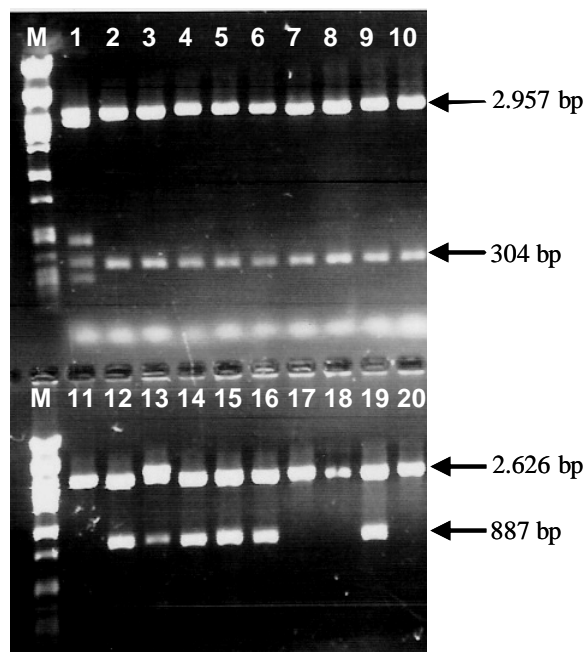


Figura 17. Confirmação por digestão dos vetores pENTR-*ZmDof1* e pENTR-*OsDof25* com as enzimas de restrição PstI e EcoRV, e Sall e EcoRV respectivamente. M – marcador ?PstI; (1 a 10) – clones obtidos com o gene *ZmDof1*; (11 a 20) – clones obtidos com o gene *OsDof25*.

4.4 Reação LR para Obtenção das Construções Usadas na Transformação de Arabidopsis

A reação LR, ou reação de recombinação múltipla está descrita no item 3.4.4 e ilustrada na Figura 8. Esta reação permite a clonagem de três fragmentos de PCR (promotor, gene e terminador) na orientação correta dentro de um vetor que será utilizado para transformação das plantas. A confirmação destas construções foi realizada através da digestão dos clones obtidos com as enzimas de restrição EcoRI e EcoRV para os dois vetores de superexpressão 35S:*ZmDof1*:HA (Figura 18) e 35S:*OsDof25*:HA (Figura 19). Os fragmentos liberados após digestão foram de 1.627 e 1.879 pb para o 35S:*ZmDof1*:HA e 35S:*OsDof25*:HA respectivamente, como pode ser visto no gel da Figura 20.

Estes vetores foram introduzidos na linhagem C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* (item 3.5), utilizada para a transformação das plantas de Arabidopsis (item 3.6).

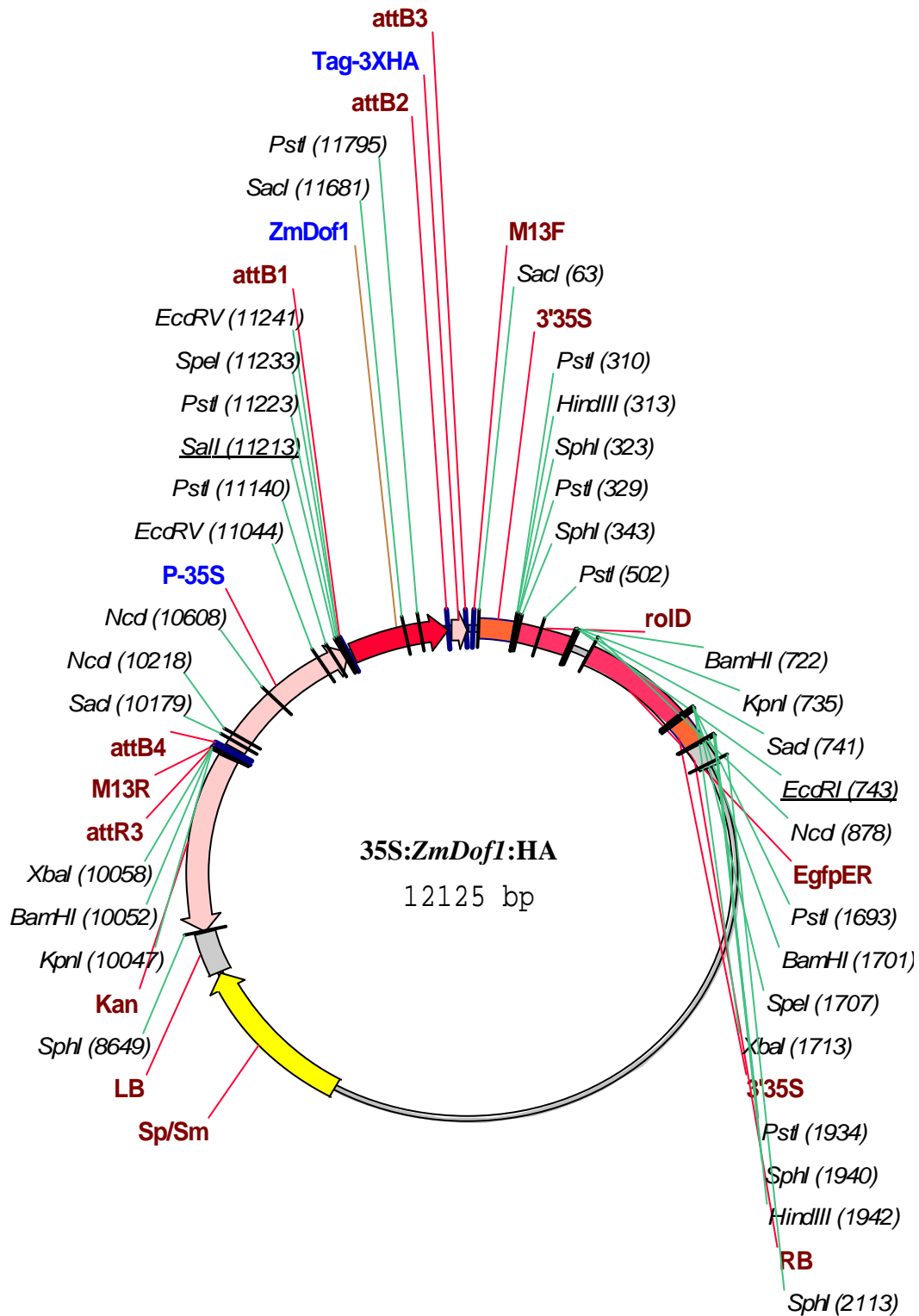


Figura 18. Vetor para superexpressão do gene *ZmDof1* em *Arabidopsis* sob o controle do promotor 35S e fusionados a um tag de HA (peptídeo de fusão). Vetor construído com o Software “Vector NTI Advance 10” da Invitrogen.

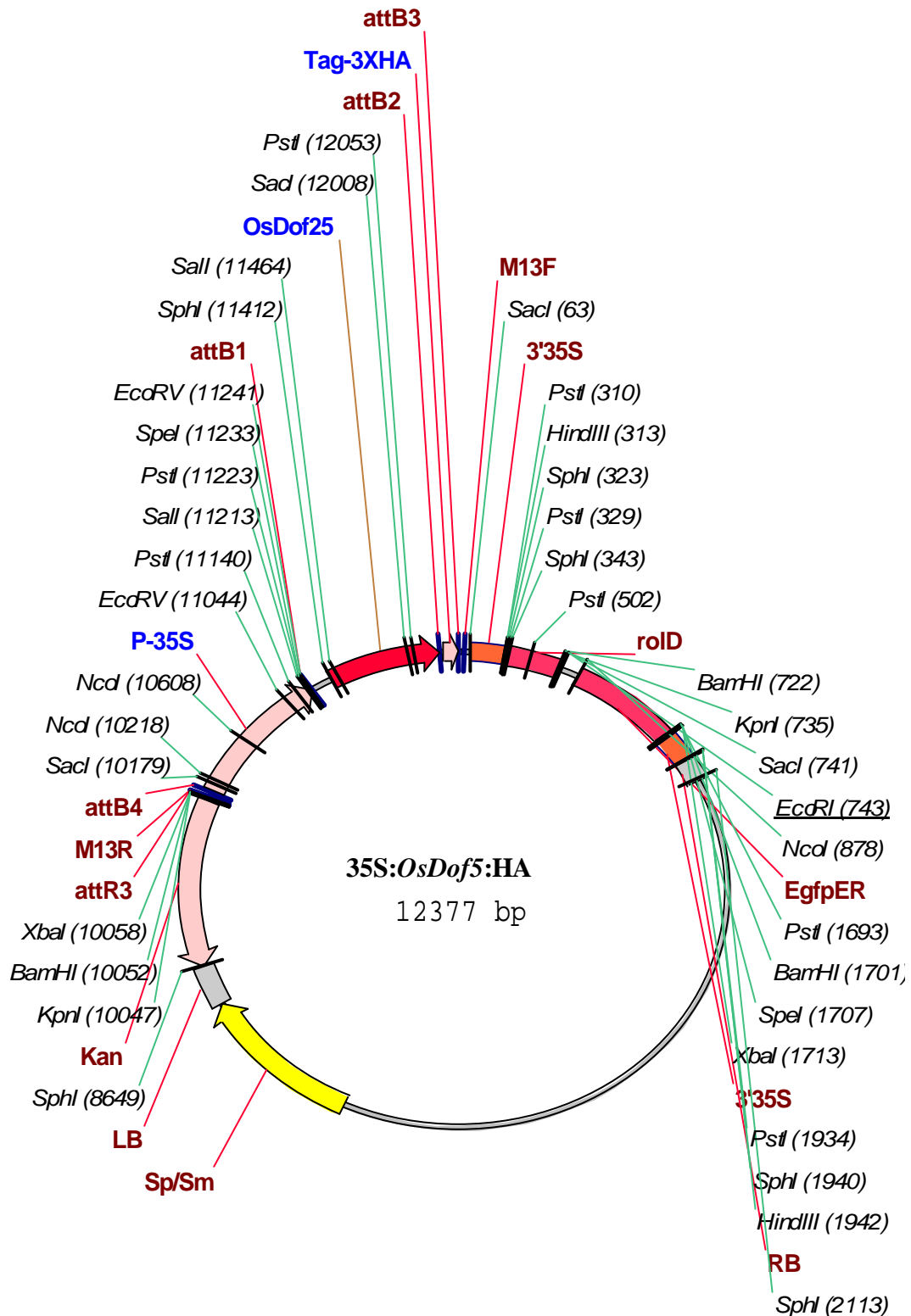


Figura 19. Vetor para superexpressão do gene *OsDof5* em *Arabidopsis* sob o controle do promotor 35S e fusionados a um tag de HA. Vetor construído com o Software “Vector NTI Advance 10” da Invitrogen.

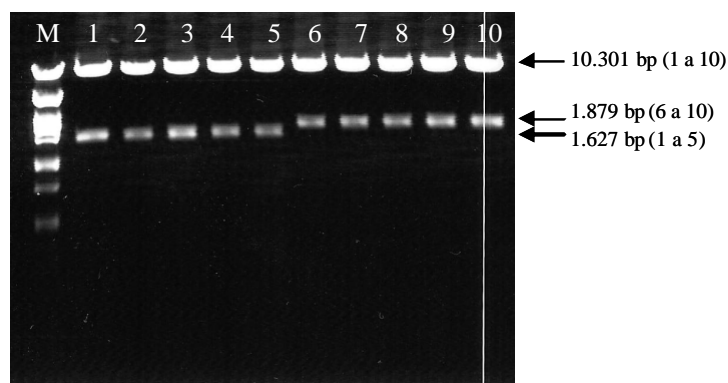


Figura 20. Confirmação por digestão das construções dos vetores para superexpressão em *Arabidopsis* pEXP-*ZmDof1*-HA (clones de 1 a 5) e pEXP-*OsDof25*-HA (clones de 6 a 10). M – ?PstI.

4.5 Análise Funcional dos Fatores de Transcrição *ZmDof1* e *OsDof25*

Para verificar se o *OsDof25* é realmente o ortólogo do *ZmDof*, como determinado pela análise de similaridade das seqüências polipeptídicas das proteínas e das seqüências codantes dos genes (Figura 1 e 2), foi conduzido um estudo comparativo dos efeitos da superexpressão destes fatores de transcrição sobre o fenótipo das plantas transformadas, metabólitos solúveis, além da enzima piruvato quinase, cuja expressão é regulada positivamente pelo *ZmDof1* (YANAGISAWA, 2004).

Obtivemos linhagens de *Arabidopsis* transgênicas com diferentes níveis de expressão dos genes *ZmDof1* (Figura 21) e *OsDof25* (Figura 23). Para *ZmDof1*, foram analisadas apenas as linhagens com os mais baixos níveis de expressão (Zm1, Zm2 e Zm4), pois as linhagens com níveis elevados de expressão deste fator de transcrição não cresceram satisfatoriamente. Já para o *OsDof25*, foi possível avaliar, dentre as linhagens obtidas, aquelas com níveis de expressão intermediários a elevados (Os1, Os3 e Os14).

Foi possível notar que à medida que os níveis de expressão se elevavam, as plantas apresentavam fenótipos com clorose e acúmulo de antocianina, além de dificuldade de crescimento (Figura 22 e 24). Estes dados sugerem modificações drásticas no metabolismo destas plantas, visto que as linhagens com os níveis mais elevados de expressão apresentaram dificuldades marcantes de desenvolvimento (Figura 22 e 24).

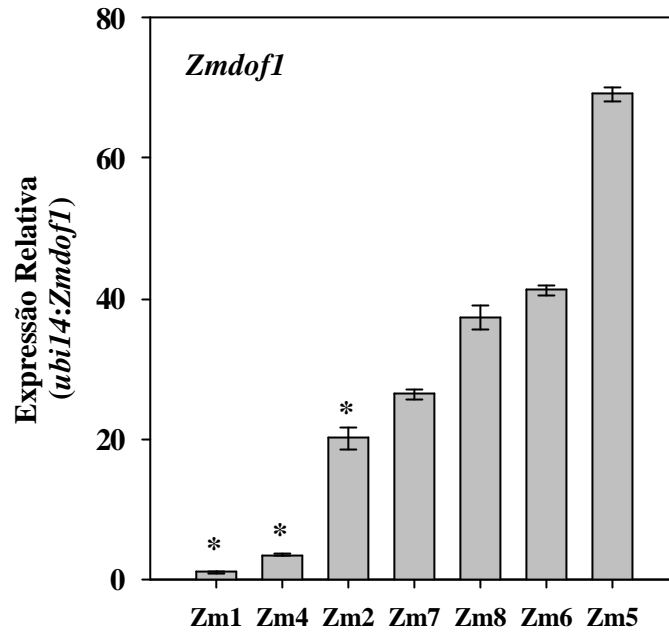


Figura 21. Expressão do gene *ZmDof1* em diferentes linhagens de *Arabidopsis* transgênicas. * Linhagens escolhidas por apresentar apenas uma inserção do gene e crescimento satisfatório; as linhagens de maior nível de expressão não desenvolveram satisfatoriamente. O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média.

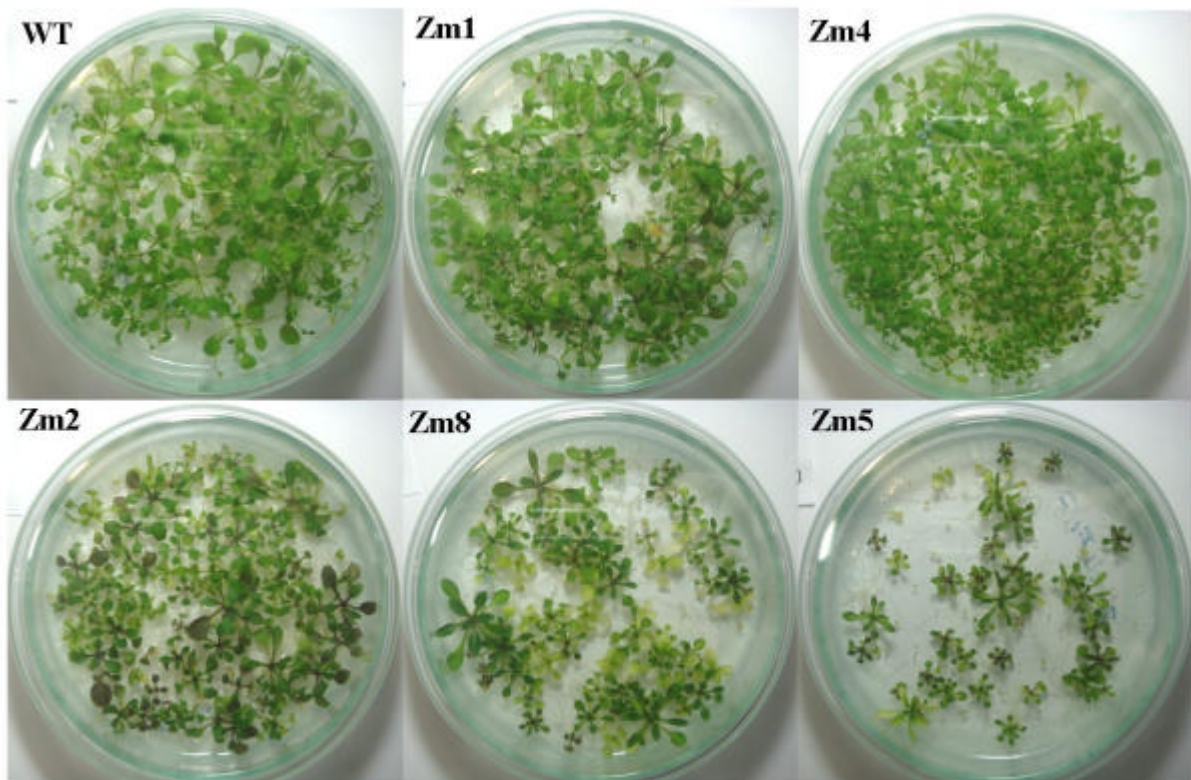


Figura 22. Fenótipos de algumas linhagens de *Arabidopsis* transgênicas com diferentes níveis de expressão do gene *ZmDof1*. Aproximadamente 40 sementes por placa. Plântulas com duas semanas após a germinação.

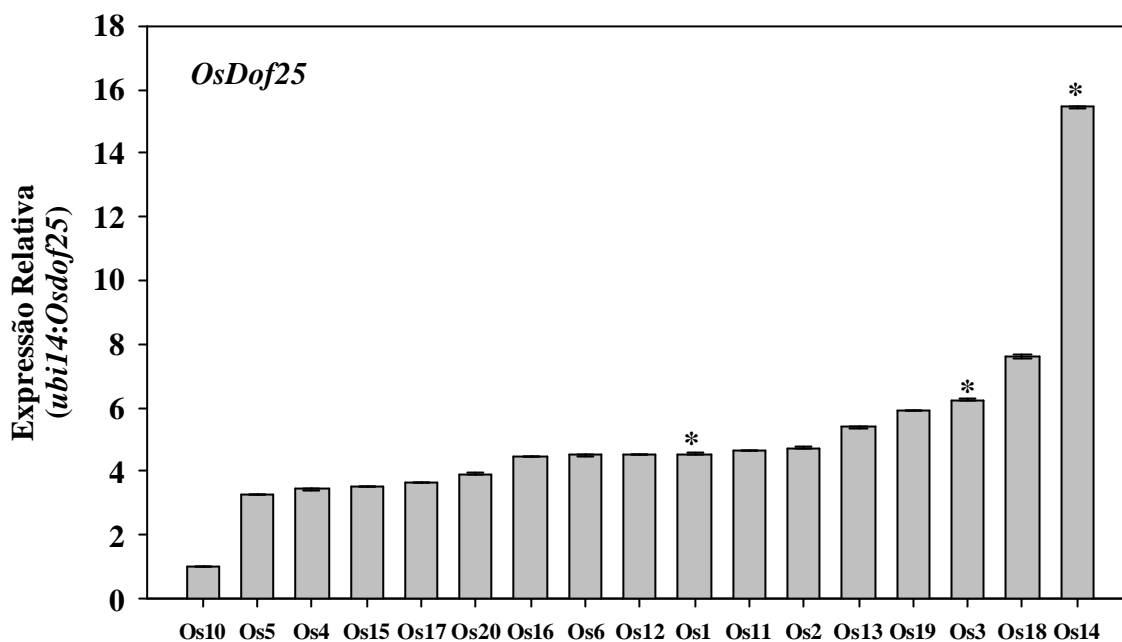


Figura 23. Expressão do gene *OsDof25* em diferentes linhagens de *Arabidopsis* transgênicas. * Linhagens escolhidas por apresentar apenas uma inserção do gene; todas as linhagens transformadas com este gene desenvolveram satisfatoriamente, e, portanto escolhemos três com diferentes níveis de expressão do *OsDof25*. O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média.

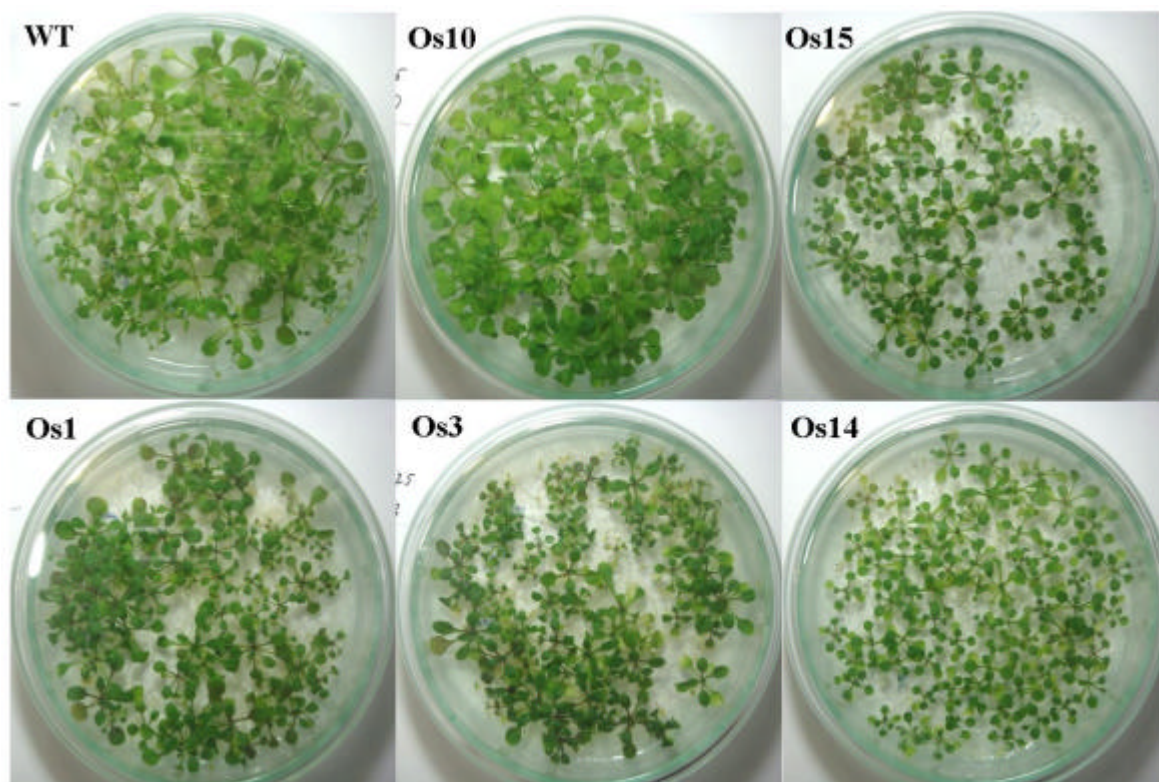


Figura 24. Fenótipos de algumas linhagens de *Arabidopsis* transgênicas com diferentes níveis de expressão do gene *OsDof25*. Aproximadamente 40 sementes por placa. Plântulas com duas semanas após a germinação.

A observação de que as plantas transformadas apresentam dificuldade de desenvolvimento pode estar em parte relacionada com um aumento da capacidade de absorção de N-NH_4^+ por essas plantas. Foram feitas análises de expressão gênica em tempo real de alguns transportadores de amônio e verificou-se que houve aumento significativo na expressão dos principais transportadores de amônio (AMTs) de alta e baixa afinidade em *Arabidopsis* (AMT1.1 e AMT2.1), respectivamente (Figura 25). Os níveis de expressão dos AMTs aumentaram tanto nas linhagens superexpressando o *ZmDof1* (Figura 25A) quanto nas linhagens superexpressando o *OsDof25* (Figura 25B). No entanto, os maiores incrementos nos níveis de expressão foram observados com o gene *OsDof25*.

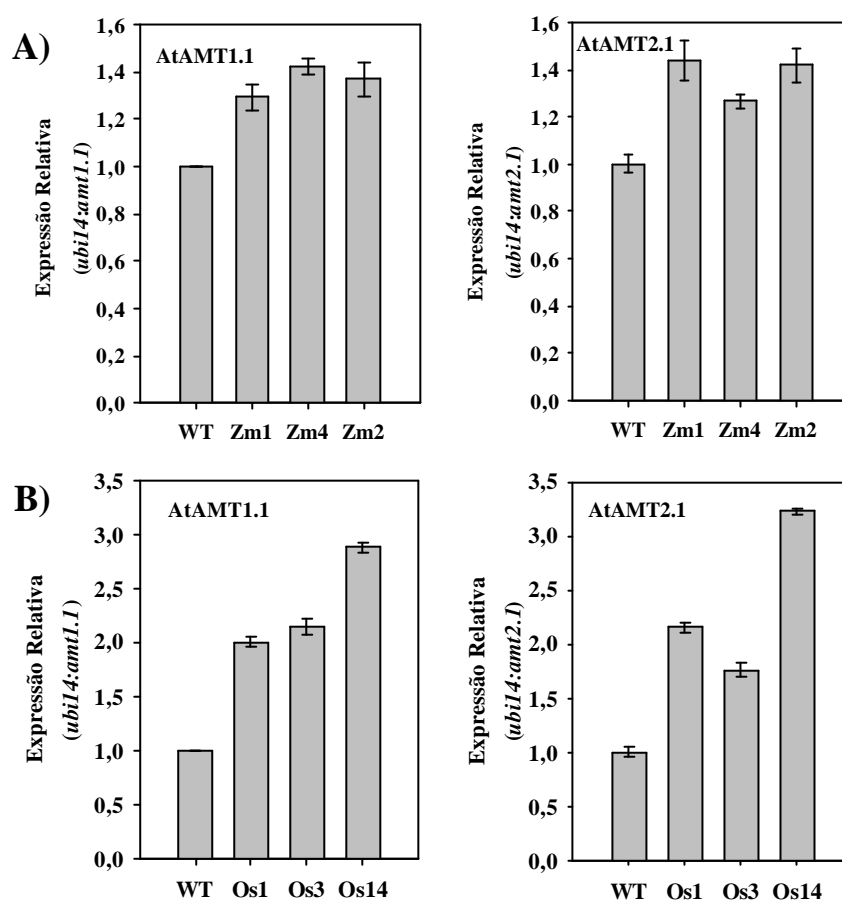


Figura 25. Expressão gênica de alguns transportadores de amônio em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o *ZmDof1* (A) e o *OsDof25* (B). A expressão gênica foi calculada usando como referência a planta selvagem (WT). O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média.

Estas plantas foram cultivadas em 1/2 força iônica do meio MS, que contém 10 mM de amônio e 20 mM de nitrato. Essa concentração de amônio é extremamente elevada, e um possível aumento de absorção promovida pelo aumento de expressão dos AMTs pode de fato causar efeito tóxico. Essa suspeita foi levantada pela observação de que em placas contaminadas por fungos, a área sob influencia deste microorganismo possibilitava um melhor desenvolvimento das plantas, revertendo o fenótipo de clorose.

Ambos os fatores de transcrição, *ZmDof1* e *OsDof25* provocaram aumentos nos níveis de expressão de dois genes da piruvato quinase (PK1 e PK2), onde o *OsDof25* proporcionou

níveis mais elevados de expressão desta enzima que o *ZmDof1* (Figura 26). YANAGISAWA et al. (2004) já relataram que o *ZmDof1* provocava aumento dos níveis de expressão desta enzima. O fato do *OsDof25* produzir a mesma resposta do *ZmDof1* reforça a informação fornecida pelos dendrogramas de similaridade (Figura 1 e 2) de que o *OsDof25* é o ortólogo do *ZmDof1* em arroz.

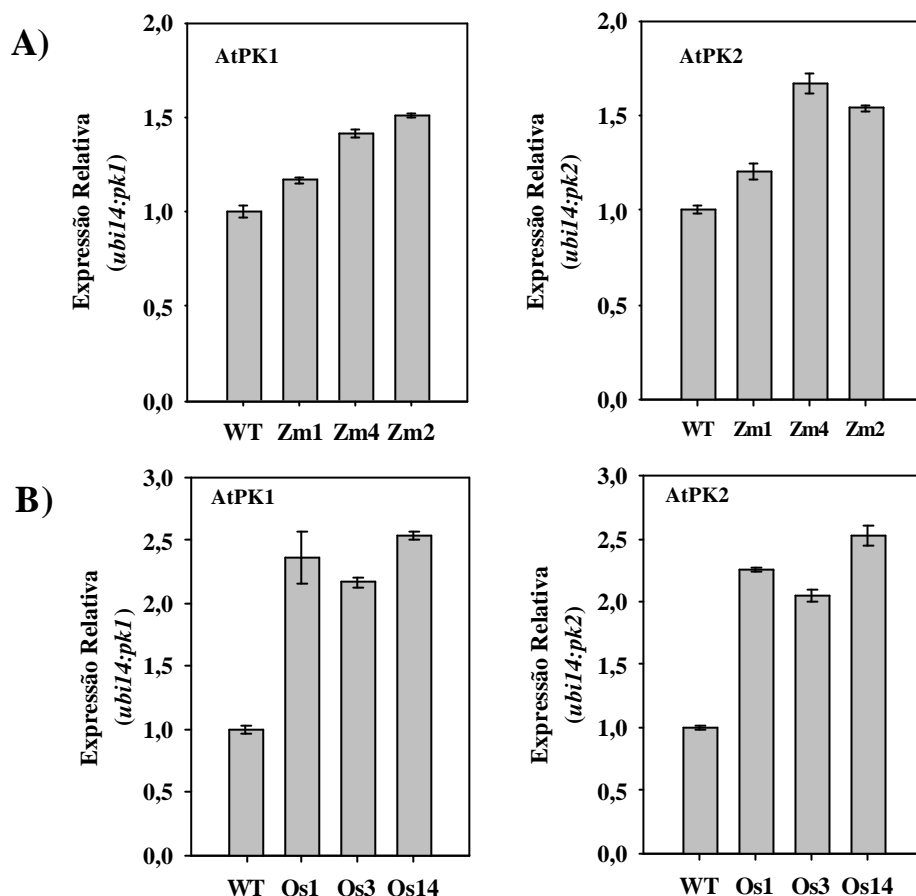


Figura 26. Expressão gênica da enzima piruvato quinase (isoformas PK1 e PK2) em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando os genes *ZmDof1* (A) e *OsDof25* (B). A expressão gênica foi calculada usando como referência a planta selvagem (WT). O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média.

Além de verificar o efeito desses fatores de transcrição sobre a expressão da enzima piruvato quinase, nós também analisamos alguns metabólitos solúveis nestas plantas quando crescidas em meio MS a 1/2 da força iônica. Foi possível observar aumentos significativos nos níveis de N-amino livre nas plantas transformadas com ambos os genes (Figura 27). Apenas a linhagem Zm1 não diferiu das plantas selvagens, mas isso pode ser decorrente do baixíssimo nível de expressão do *ZmDof1* nesta linhagem (Figura 21). As plantas superexpressando o *OsDof25* mostram correlação negativa entre N-amino e açúcares ($R=0,56$).

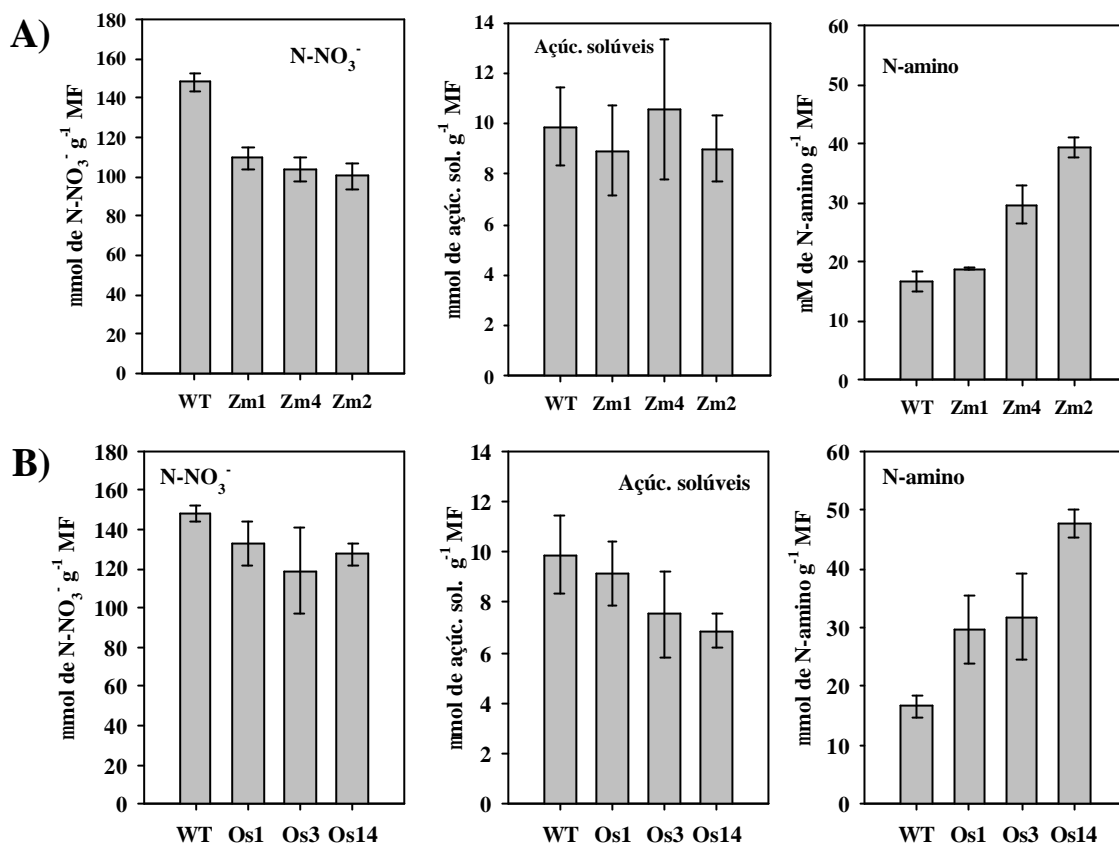


Figura 27. Teores de N-NO₃⁻, açúcares solúveis e N-amino livres em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando os genes *ZmDof1* (A) e *OsDof25* (B). Barras representam desvio padrão da média.

4.6 Análise Funcional Detalhada do Fator de Transcrição *OsDof25*

Depois de verificado que o *OsDof25* é o ortólogo do *ZmDof1* em arroz, nós conduzimos um experimento apenas com as linhagens de *Arabidopsis* superexpressando o *OsDof25*. Neste experimento foram utilizadas apenas três linhagens de *Arabidopsis* transgênicas com diferentes níveis de expressão e que apresentaram segregação 3:1 na geração T2, ou seja, com apenas uma cópia do gene *OsDof25*; Os1, Os3 e Os14 (Figura 23).

As linhagens apresentaram aumento da expressão gênica de transportadores de alta e baixa afinidades para absorção de amônio, AMT1.1 e AMT2.1 respectivamente (Figura 25). LOQUÉ e VON WIRÉN (2004) relataram que a privação de N e a presença de carboidratos solúveis produziam aumentos dos níveis de transcrição de genes AMT em *A. thaliana*, onde AMT1;1 e AMT1;3 teve seus transcritos aumentados com a remoção da fonte de N, enquanto que transcritos de AMT1;2 e AMT2;1 aumentam apenas depois de um longo período de deficiência de N.

Neste trabalho, as plantas foram crescidas em meio MS com metade da força iônica, ou seja, com aproximadamente 20mM de NO₃⁻ e 10mM de NH₄⁺. Dessa forma, as condições para aumento de expressão destes transportadores não foram oferecidas, mas ainda assim, houve aumento significativo da expressão destes transportadores, sobretudo na linhagem com maior nível de expressão do *OsDof25* (Figura 25B). Este resultado sugere que o fator de transcrição *OsDof25* pode estar envolvido no controle da transcrição destes transportadores de amônio.

Não houve aumento de expressão do transportador de nitrato de baixa afinidade (NRT1.1), no entanto houve forte repressão da expressão do transportador de alta afinidade (NRT2.1) (Figura 28).

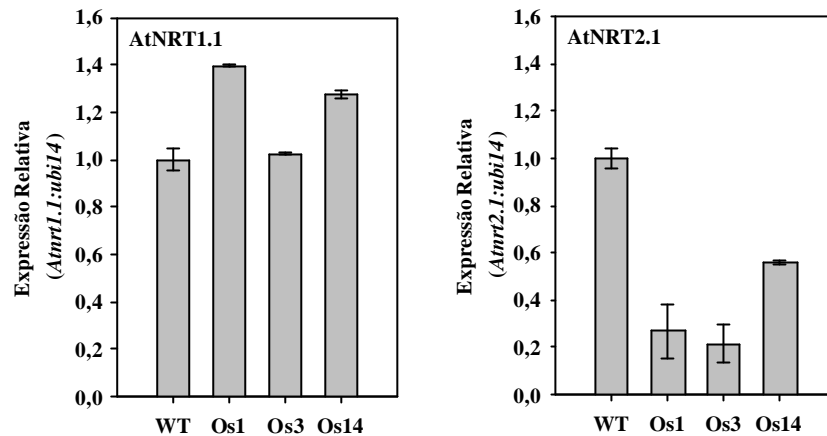


Figura 28. Expressão gênica de transportadores de NO_3^- de baixa (AtNRT1.1) e alta afinidade (AtNRT2.1) em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *OsDof25*. A expressão gênica foi calculada usando como referência a planta selvagem (WT). O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média.

Na tentativa de identificar as moléculas responsáveis pela indução e repressão dos transportadores de NO_3^- , há pouca discordância de que o NO_3^- é o indutor natural dos transportadores de alta afinidade (GLASS, 2003). Por outro lado, estudos para identificar metabólitos responsáveis pela repressão destes, têm mostrado que o status de N e o reservatório interno de NO_3^- não são importantes para sua repressão, mas sim os produtos da redução do NO_3^- como o NH_4^+ , a glutamina e outros aminoácidos (ZHUO et al., 1999; GLASS et al., 2002; ORSEL et al., 2002).

Neste trabalho foi possível observar um aumento significativo nos teores de N-amino nas linhagens transgênicas superexpressando o *OsDof25* (Figura 27). Estes resultados corroboram os obtidos para a expressão dos transportadores de amônio (Figura 25). O amônio absorvido pelas plantas deve ser prontamente assimilado para evitar efeitos tóxicos, o que pode gerar aumento no *pool* de N-amino livre, fato este, observado neste trabalho (Figura 27). Assim, a forte repressão da expressão gênica dos transportadores de alta afinidade para nitrato pode ser devido ao aumento do conteúdo de N-amino observado nas linhagens transgênicas estudadas.

Apesar de ter ocorrido elevado aumento nos teores de N-amino livre, a redução nos teores de açúcares solúveis só pode ser observada com clareza na linhagem que apresentou maior nível de expressão do *OsDof25*, a Os14 (Figura 27). De qualquer forma, houve uma correlação negativa entre N-amino livre e teores de açúcares solúveis ($R=0,56$).

Houve aumento de aproximadamente duas vezes na expressão da enzima piruvato quinase, isoformas 1 e 2 (Figura 26B) em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *OsDof25* e também foi possível observar aumento de expressão da enzima fosfoenolpiruvato carbolixase isoformas 1 e 2 (Figura 29).

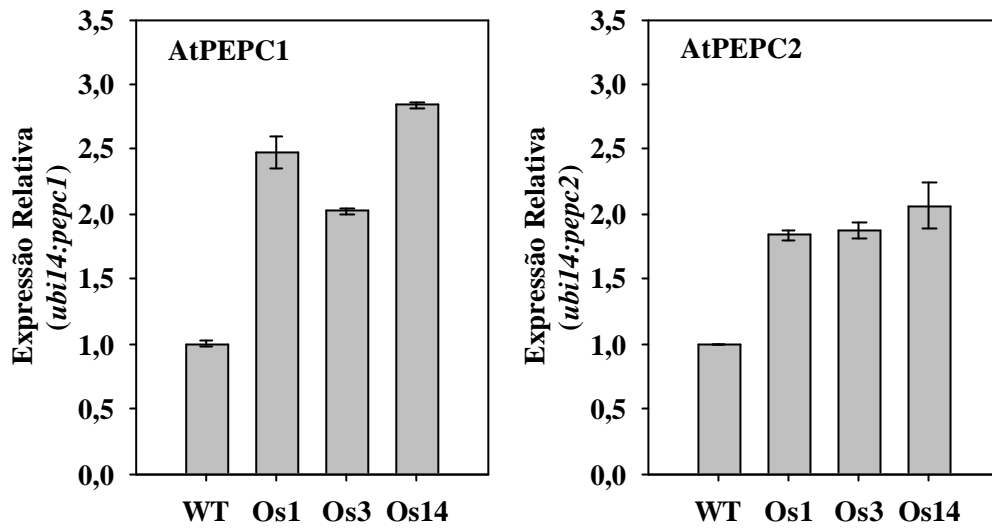


Figura 29. Expressão gênica da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (isoformas PEPC1 e PEPC2) em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *OsDof25*. A expressão gênica foi calculada usando como referência a planta selvagem (WT). O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média.

Na glicólise, a piruvato quinase catalisa a conversão do fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato, que por sua vez pode entrar na mitocôndria e alimentar o ciclo de Krebs (Figura 30). A fosfoenolpiruvato carboxilase catalisa a conversão do PEP a oxalacetato (AOA), este último pode sofrer ação da malato desidrogenase citosólica (MDH) e dar origem ao malato, que por sua vez também pode também entrar no ciclo de Krebs (Figura 30).

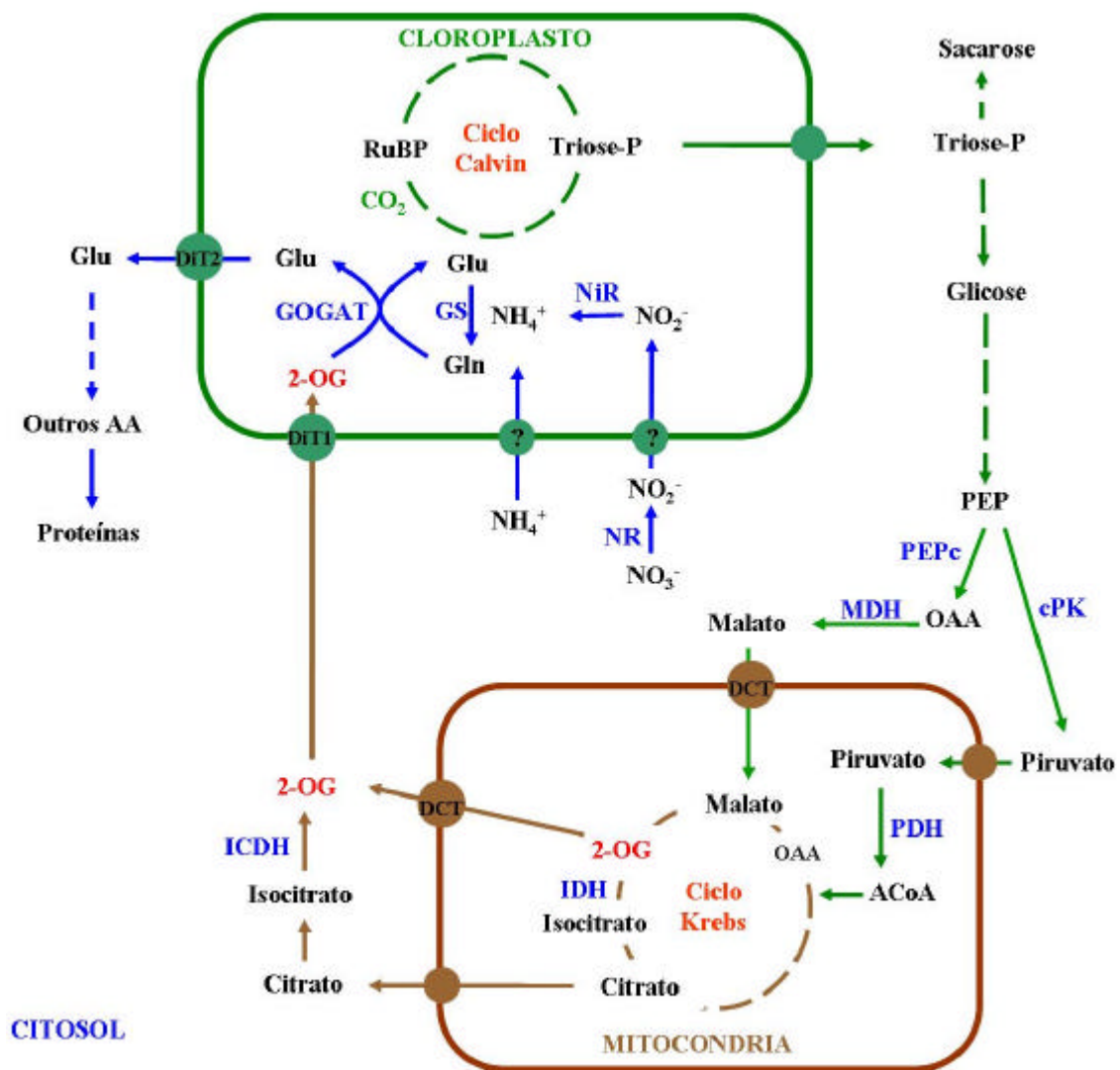


Figura 30. Ilustração da interação entre o metabolismo de C e N. Aqui desconsideramos o processo de fotorrespiração. Modificado de HODGES et al. (2003). RuBP: Ribulose 1,5 bisfosfato; Glu: glutamato; Gln: glutamina; PEP: fosfoenolpiruvato; OAA: oxalacetato; ACoA: acetil coenzima A; cPK: piruvato quinase citosólica; PEPc: fosfoenolpiruvato carboxilase; MDH: malato desidrogenase; PDH: piruvato desidrogenase; IDH: isocitrato desidrogenase NAD⁺-dependente; ICDH: isocitrato desidrogenase NADP⁺-dependente; NR: nitrato redutase; NiR: nitrito redutase; GS: glutamina sintetase; GOGAT: glutamato sintase; DCT: transportador di/tricarboxilato; DiT1: transportador de 2-oxolutarato/malato; DiT2: transportador de glutamato/malato.

YANAGISAWA e SHEEN (1998) já mostraram através de ensaio de mobilidade eletroforética que o Dof1 de milho foi capaz de se ligar ao promotor da fosfoenolpiruvato carboxilase de milho e induzir a sua atividade. Nós sugerimos que o aumento de expressão da fosfoenolpiruvato carboxilase e piruvato quinase pode ser uma estratégia das plantas transformadas para aumentar a produção de esqueletos de carbono, especialmente o 2-OG, buscando a destoxificação do excesso de amônio absorvido. Outra possibilidade é que este fator de transcrição coordene a expressão conjunta dos transportadores de amônio e dessas enzimas do metabolismo de carbono.

Diante do resultado de maior nível de expressão da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), nós procuramos verificar as suas conseqüências para a atividade da malato desidrogenase, enzima que cataliza a conversão entre malato e oxalacetato. No citosol, a

MDH pode converter o oxalacetato a malato e este último pode alimentar o ciclo de Krebs (Figura 30). A análise em gel nativo de poliacrilamida mostrou aumento significativo de atividade da MDH na parte aérea das linhagens transgênicas superexpressando o *OsDof25* (Figura 31). Na raiz, também houve aumento da atividade de uma isoenzima de MDH que aparece abaixo da banda mais forte (Figura 31).

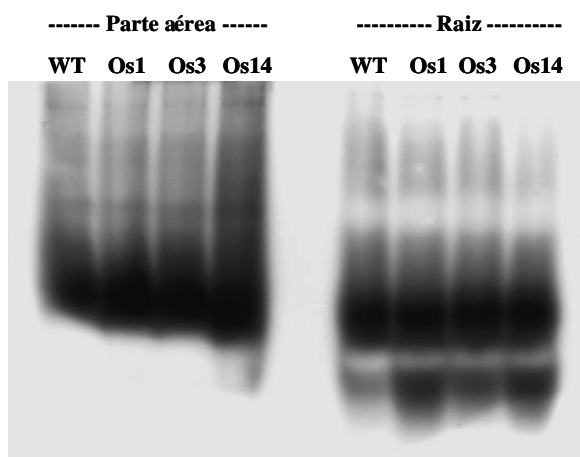


Figura 31. Atividade de malato desidrogenase (MDH) em gel nativo de poliacrilamida na parte aérea e raiz de linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *OsDof25*.

É evidente a íntima relação entre o metabolismo de N e C. Para a assimilação de N são necessários esqueletos de carbono, especialmente o 2-OG que participa na reação catalisada pela glutamato sintase (GOGAT) recebendo um grupo amina proveniente da glutamina para formar o glutamato. Dessa forma, verificamos se havia mudanças de expressão gênica da enzima isocitrato desidrogenase. Esta enzima catalisa a formação do 2-OG a partir do isocitrato. Duas isocitrato desidrogenases, que utilizam NAD^+ ou NADP^+ coexistem na célula, e ambas catalisam a descarboxilação oxidativa do isocitrato para formar o 2-OG. A NAD^+ -dependente (IDH) está presente nas mitocôndrias, enquanto a NADP^+ -dependente (ICDH) é citosólica. Debates a respeito de qual enzima seria a responsável pela formação do 2-OG necessário para a assimilação do amônio tem sido feito e controvérsias são relatadas para o participação de apenas uma delas (HODGES et al., 2003). Recentemente, LEMAITRE et al. (2007) sugerem que a isocitrato desidrogenase NAD^+ -dependente não é limitante para a assimilação do N. Estes autores mostram que mutantes com redução de até 90% na atividade de IDH mitocondrial não apresentaram fenótipo que os distingam do tipo selvagem, quando crescidos no solo, nem mesmo apresentam alterações nos níveis de sacarose, frutose, glicose, citrato, amônio e aminoácidos solúveis totais, sugerindo que a atividade desta enzima pode não ser limitante para a assimilação de amônio.

Nossos resultados apontam para uma pequena variação da expressão da isocitrato desidrogenase mitocondrial, com aumento de 1,5 vezes apenas para o gene IDH5 (Figura 32).

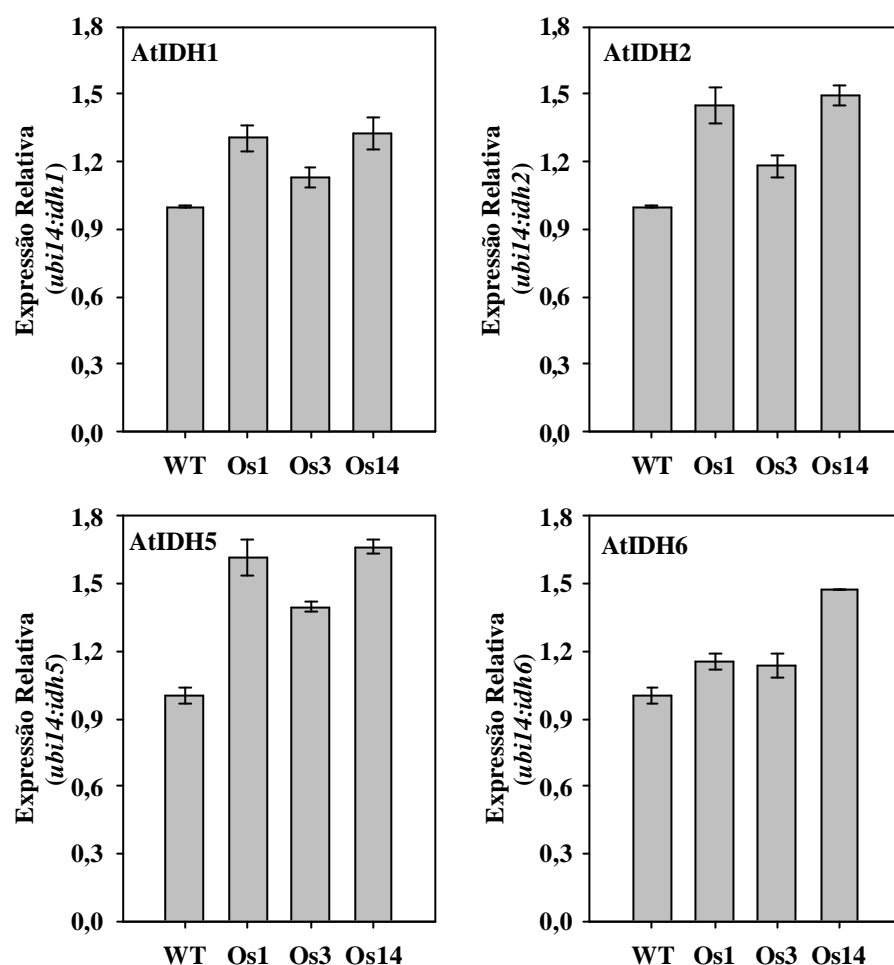


Figura 32. Expressão gênica da enzima isocitrato desidrogenase (isoformas IDH1, IDH2, IDH5 e IDH6) em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *OsDof25*. A expressão gênica foi calculada usando como referência a planta selvagem (WT). O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média.

Quanto à isocitrato desidrogenase citosólica, verificamos que houve aumento expressivo do gene ICDH3 e pouca variação para os genes ICDH1 e ICDH2 (Figura 33). Estes dados estão de acordo com a sugestão de LEMAITRE et al. (2007) de que a isocitrato desidrogenase NAD⁺-dependente tem pouca importância para assimilação de amônio. Por outro lado, o expressivo aumento dos níveis de expressão do gene ICDH3 sugere que a ICDH NADP⁺-dependente é de fato mais importante para o fornecimento de 2-OG para a assimilação do amônio.

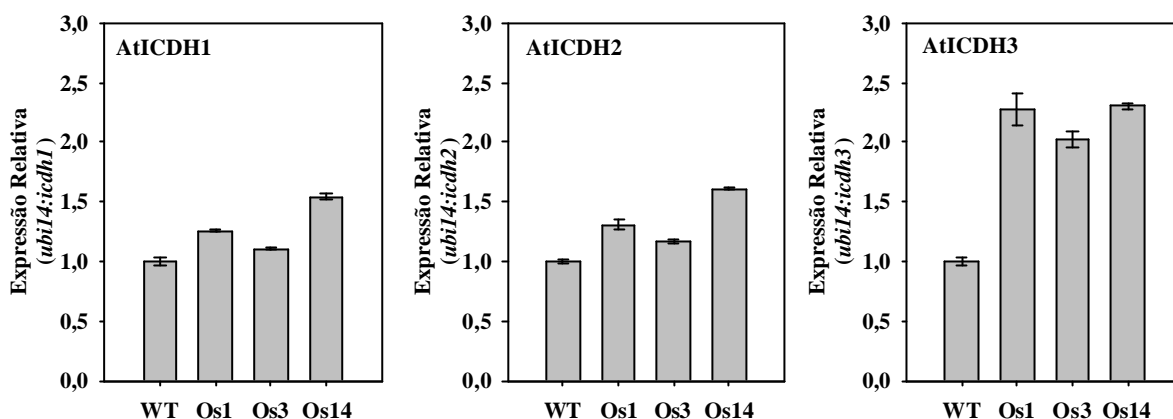


Figura 33. Expressão gênica da enzima isocitrato desidrogenase (isoformas ICDH1, ICDH2, e ICDH3) em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *OsDof25*. A expressão gênica foi calculada usando como referência a planta selvagem (WT). O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média.

CHEN e GADAL (1990) propõem que citrato é exportado da mitocôndria para o citosol e sofre ação de uma aconitase e da ICDH citosólica para formar o 2-OG, indicando que esta enzima pode ser muito importante na formação do 2-OG para a assimilação do amônio. Na linhagem Os14, a que apresenta maior nível de expressão do *OsDof25*, todos os genes da ICDH apresentam aumento nos níveis de expressão (Figura 33).

Relatos de que o *ZmDof1* afeta o metabolismo de ácidos orgânicos já foram feitos (YANAGISAWA et al., 2004). Estes autores mostram também um melhor desenvolvimento das plantas transformadas com o *ZmDof1* sob condição de baixo suprimento de N. Por outro lado, estes autores não apontam para as prováveis causas deste comportamento nem mesmo o relacionam a possíveis alterações de atividade das enzimas de assimilação de N e/ou expressão dos transportadores de N. Nossos resultados sugerem que o melhor desempenho destas plantas sob condições de baixo suprimento de N é decorrente não somente das modificações no metabolismo de ácidos orgânicos, mas também devido ao aumento dos níveis de expressão dos transportadores de NH_4^+ .

Também foi possível observar aumento de atividade da isocitrato desidrogenase NADP^+ -dependente tanto nas raízes quanto na parte aérea (Figura 34), confirmando os valores de aumento de expressão do gene ICDH3. Estes dados mais uma vez sugerem que há um direcionamento de esqueletos de carbono para a assimilação do possível excesso de amônio absorvido.

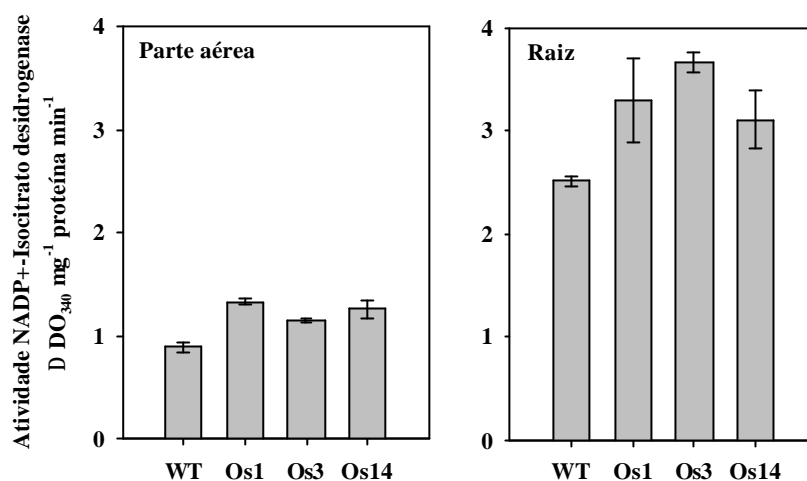


Figura 34. Atividade da NADP⁺-dependente isocitrato desidrogenase (ICDH) na parte aérea e raízes de plantas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *OsDof25*.

As linhagens transgênicas também apresentaram aumentos significativos de expressão e atividade da glutamato desidrogenase (GDH) (Figura 35). Em *Arabidopsis*, a enzima GDH é um hexamero composto da combinação de subunidades oriundas de dois genes que codificam para subunidade α e β (*Atgdh-NAD;A1* e *Atgdh-NAD;B1* ou *Atgdh-NAD;B2*) respectivamente. Assim, existem sete isoenzimas de GDH possíveis, sendo as primeiras com maior número de subunidades β e as últimas com maior número de subunidades α . Tem sido relatado que as últimas isoenzimas, aquelas mais ricas em subunidades α são mais encontradas em plantas submetidas a elevados níveis de NH₄⁺ (LOULAKAKIS e ROUBELAKIS-ANGELAKIS, 1991).

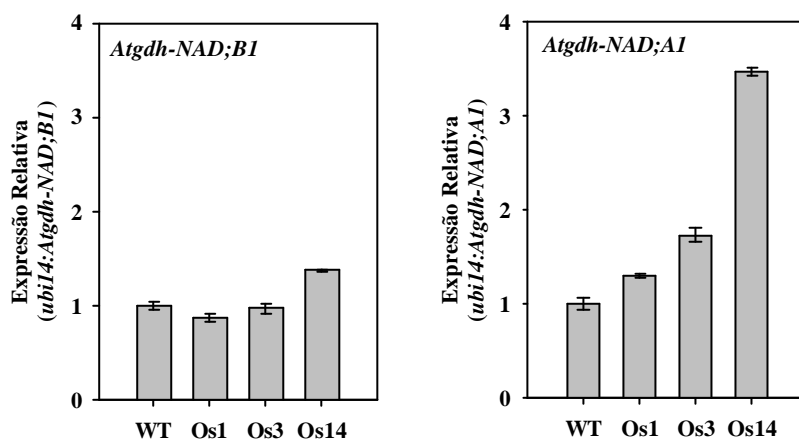


Figura 35. Expressão gênica da enzima glutamato desidrogenase (genes *Atgdh-NAD;B1* e *Atgdh-NAD;A1*) em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *OsDof25*. A expressão gênica foi calculada usando como referência a planta selvagem (WT). O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média.

Houve aumento de expressão considerável do gene *Atgdh-NAD;A1*, principalmente na linhagem com maior expressão do *OsDof25*, a Os14 (Figura 35). Foi possível também detectar maior atividade da GDH em gel nativo de poliacrilamida, sobretudo para as isoenzimas mais ricas em subunidades α , confirmando os dados de expressão (Figura 36).

No gel nativo de poliacrilamida, verificamos que na parte aérea, os padrões das isoenzimas entre o tipo selvagem e as linhagens mutantes não sofrem muitas variações em termos de proporções das isoenzimas que aparecem (Figura 36). É possível notar apenas uma forte diferença de intensidade entre o tipo selvagem e as linhagens mutantes. Por outro lado, na raiz, há um predomínio das últimas duas isoenzimas.

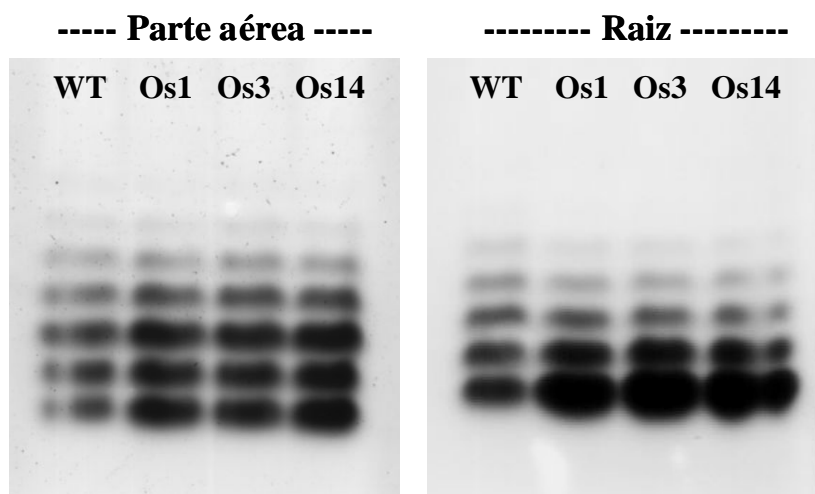


Figura 36. Atividade de Glutamato Desidrogenase (GDH) em gel nativo de poliacrilamida, mostrando suas sete isoenzimas.

O aumento de atividade observado no gel nativo de poliacrilamida das isoenzimas de GDH na parte aérea das linhagens transgênicas reflete numa maior atividade de GDH na direção de aminação, mas não alterou a atividade de GDH para desaminação (Figura 37A e B). Por outro lado, a predominância de atividade das isoenzimas 6 e 7 na raiz observadas no gel nativo de poliacrilamida reflete em aumento tanto na atividade de GDH aminação, quanto na atividade de GDH desaminação (Figura 37A e B).

Nossos resultados indicam que a GDH nestas plantas estão atuando tanto na direção da assimilação do excesso de amônio absorvido quanto para o catabolismo de glutamato. Estes dados reforçam as nossas suspeitas de que a taxa de absorção de N-NH_4^+ nas linhagens transgênicas é aumentada, tornando-se necessário uma maior produção de esqueletos de carbono para a assimilação do amônio absorvido.

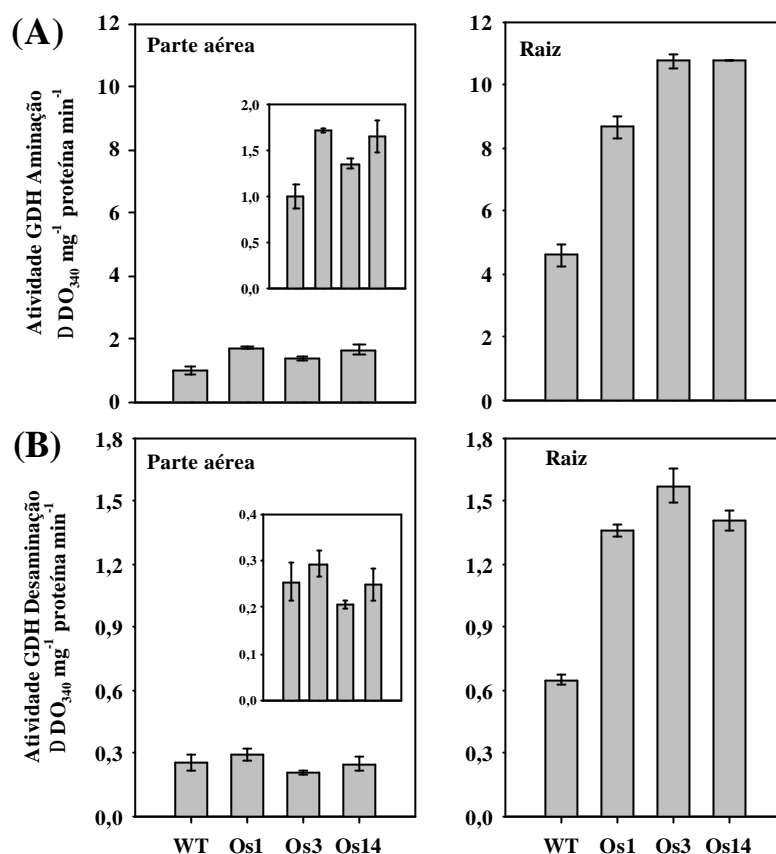


Figura 37. Atividade de glutamato desidrogenase (GDH) aminação (A) e desaminação (B) em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o fator de transcrição *OsDof25*.

Houve aumento considerável de expressão da GS1, isoformas GS1.1 e GS1.3 nas plantas transformadas, sobretudo na linhagem com maior nível de expressão do *OsDof25*, a Os14. Por outro lado, não houve mudança nos níveis de expressão da GS2 (Figura 38A).

Recentemente, foi demonstrado que um dos membros da família de fatores de transcrição Dof em *Pinus pinaster* é um regulador transcricional da glutamina sintetase citosólica (RUEDA-LÓPEZ et al., 2008). Estes autores mostram que a superexpressão do PpDof5 causou aumento de expressão de até duas vezes na GS1b, mas provocou redução de aproximadamente 40% nos níveis de expressão da GS1a. Em estudo de mobilidade eletroforética foi demonstrado que a proteína PpDof5 liga-se a região promotora dos dois genes, GS1a e GS1b, indicando que o PpDof25 pode regular a assimilação de amônio nesta espécie vegetal.

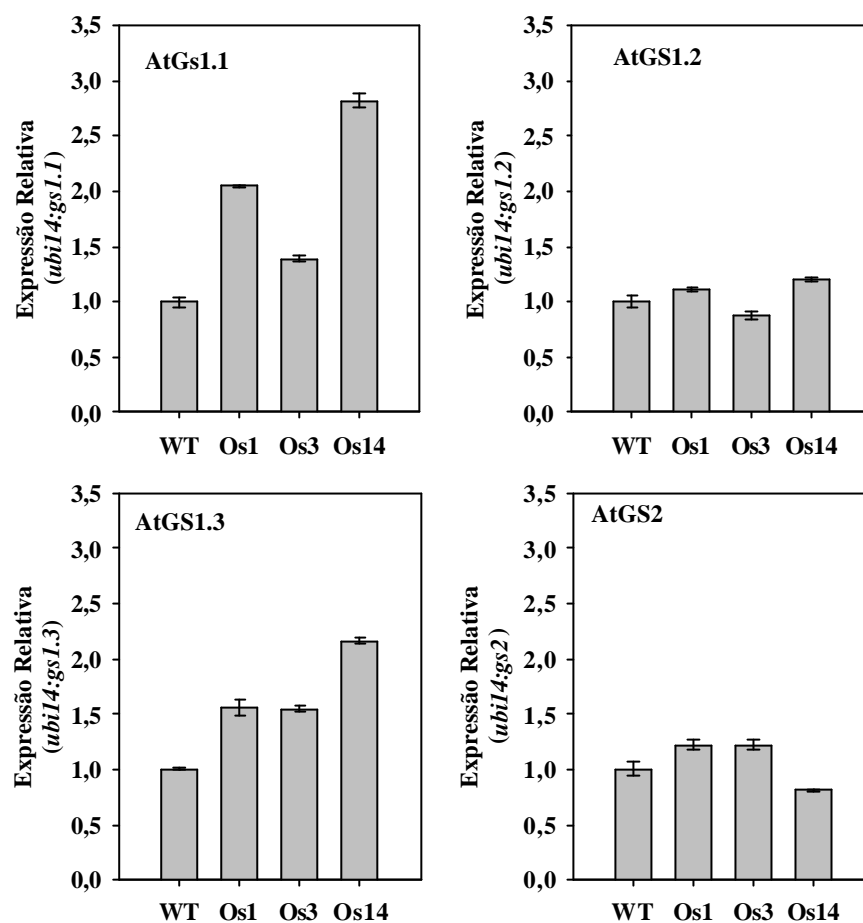


Figura 38. A) Expressão gênica das enzimas glutamina sintetase citosólica (isoformas GS1.1, GS1.2 e GS1.3) e glutamina sintetase cloroplástica (GS2) em linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *OsDof25*. A expressão gênica foi calculada usando como referência a planta selvagem (WT). O gene da *ubiquitina 14* foi utilizado como padrão interno para o cálculo da expressão gênica relativa. Barras representam desvio padrão da média.

Nossos resultados mostram que o aumento da expressão de apenas algumas isoformas de GS1 foi correlacionado com aumento de atividade de GS na parte aérea, mas considerável redução de atividade da GS nas raízes das linhagens transgênicas (Tabela 12). Embora tenha havido diminuição da atividade de GS nas raízes, a atividade de GDH aminação neste órgão é extremamente elevada nas linhagens transgênicas (Figura 36).

Estudos preliminares desenvolvidos pelo grupo de nutrição de plantas da UFRRJ com uma planta mutante de arroz para o *OsDof25*, mostraram que há falhas no processo de enchimento dos grãos (dados não apresentados). Nós suspeitamos que a ausência do *OsDof25* tenha afetado a expressão de isoformas de GS1 e, portanto o processo de remobilização das reservas de N para o enchimento dos grãos. HIREL et al. (2007) já demonstraram que mutantes de milho sem algumas isoformas de GS1 falham no processo de enchimento de grãos.

Tabela 12. Atividade de Glutamina sintetase (GS) em diferentes linhagens de *Arabidopsis* superexpressando o gene *OsDof25*.

Linhagens	Atividade de GS - $\mu\text{mol GHD mg}^{-1} \text{ptn min}^{-1}$	
	Parte aérea	Raiz
WT	51.47 \pm 3.42*	39.59 \pm 0.49
Os1	62.81 \pm 3.60	20.82 \pm 0.38
Os3	65.81 \pm 0.63	20.60 \pm 0.71
Os14	65.02 \pm 1.21	20.05 \pm 1.48

* Desvio padrão da média.

O fenótipo das plantas transformadas quando crescidas em meio MS mostra clorose e dificuldade de desenvolvimento (Figura 39A). O conjunto de dados apresentados neste trabalho nos leva a crer que este fenótipo tenha aparecido devido ao aumento da capacidade de absorção de amônio pelas plantas transformadas. Esta inferência está de acordo com os teores de N-amino que são bem superiores nas plantas transformadas (Figura 27).

Por outro lado, quando linhagens com baixo nível de expressão do *OsDof25* são crescidas em solo, com fornecimento normal de nutrientes, não é mais possível observar o fenótipo de clorose (Figura 39B). Estas plantas exibem maior crescimento vegetativo e atraso variado na emissão da inflorescência que depende do nível de expressão do *OsDof25*, onde, quanto maior a expressão deste fator de transcrição, maior o atraso no ciclo da planta. A Figura 39B mostra uma linhagem com baixo nível de expressão do *OsDof25*, a Os10, crescida em terra com teor de nutrientes mais baixo que a do meio MS, e que apresenta um atraso de aproximadamente uma semana na emissão da inflorescência quando comparada com o tipo selvagem e um desenvolvimento vegetativo um pouco mais pronunciado. A linhagem Os17 apresentou um atraso de duas semanas na emissão da inflorescência e desenvolvimento vegetativo muito exuberante, com folhas bem largas e algumas com aspecto suculento (Figura 39C).

É evidente então, que sob condições de alto suprimento de N-NH_4^+ a superexpressão deste fator de transcrição pode levar a um efeito tóxico, mas por outro lado, em condições de solos com baixa disponibilidade deste nutriente essa característica poderá se transformar numa vantagem adaptativa a solos com baixos níveis de N.

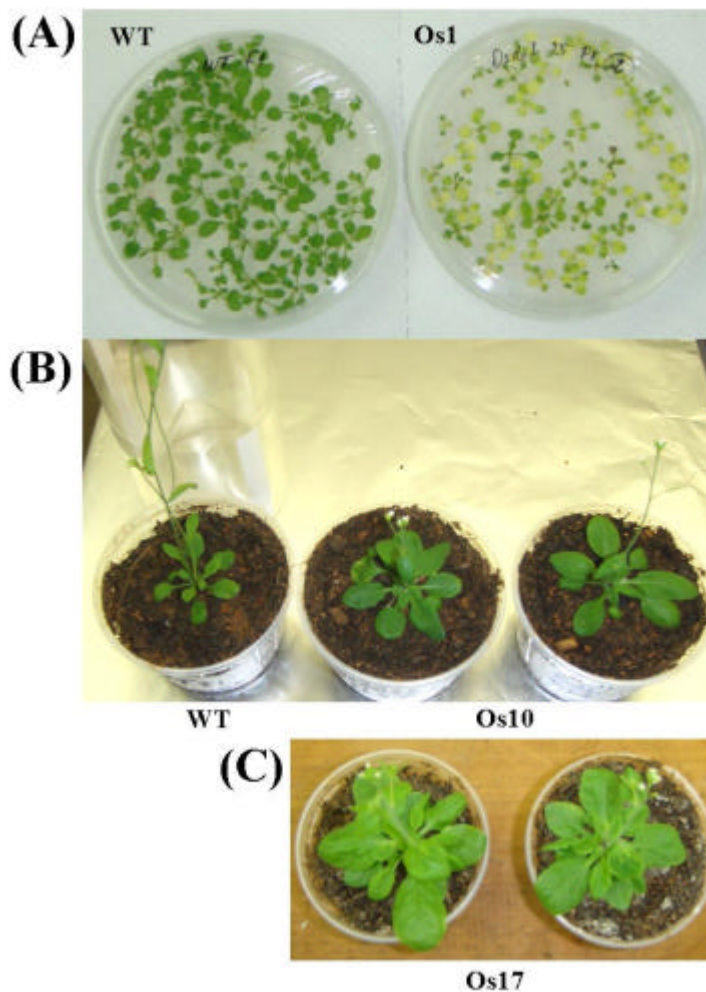


Figura 39. Fenótipo de uma linhagem de *Arabidopsis* superexpressando o *OsDof25* sob controle do promotor 35S. A) Plantas crescidas em meio MS a meia força iônica com 1% de sacarose aos 14 dias após a germinação; WT – tipo selvagem, Os1 – linhagem com nível intermediário de expressão do *OsDof25*; B) Fenótipo de uma linhagem com baixo nível de expressão do *OsDof25*, a Os10, comparada com o tipo selvagem; C) Fenótipo de uma linhagem com nível intermediário de expressão do *OsDof25*, a Os17. (B e C – linhagens crescidas numa mistura de terra:fibra de coco na proporção 2:1 respectivamente).

4.7 Análise da Região Promotora dos Transportadores de Amônio (AMT)

O conjunto de dados que obtivemos nos leva a levantar a hipótese de que o *OsDof25* é um fator de transcrição envolvido no controle da expressão dos transportadores de amônio em plantas de *Arabidopsis*. Identificamos muitos sítios para ligação dos fatores de transcrição Dof na região promotora dos genes dos transportadores de amônio, o que os torna prováveis alvos para sofrerem regulação por fatores de transcrição desta família (Figura 40). Tem sido mostrado que membros desta família de fatores de transcrição podem se ligar ao motivo AAAG ou seu reverso complementar CTTT (YANAGISAWA, 2002). Os nossos dados sugerem que esses genes são realmente fortes candidatos a serem regulados pelo fator de transcrição *OsDof25*, pois foi possível observar aumento significativo de expressão destes genes nas linhagens transgênicas estudadas (Figura 25). Além disso, em apenas 500pb da região promotora upstream, do início da transcrição destes genes, encontramos muitos sítios para ligação de fatores de transcrição Dof (Figura 40).

AMT1.1 -402bp -389bp -378bp -334bp -300bp -232bp -219bp +1
 TCCT**CTTT**GG...AA**CTTT**TT...AT**CTTT**AG...CC**AAAG**AT...TA**AAAG**AT...CA**AAAG**AA...GT**AAAG**CA...TT**AGC**

AMT2.1 +1 -1bp -5bp -83bp -160bp -181bp -375bp -422bp -431bp
 GT**GAAAGCCTTT**AA...GAA**AAAG**TC...T**TCTTT**GT...AG**AAAG**AA...AA**AAAG**AT...TAA**AAAG**TAAAT**AAAG**AG

Figura 40. Análise da região promotora dos transportadores de amônio AMT1.1 e AMT2.1, mostrando os prováveis sítios de ligação dos fatores de transcrição Dof. Em vermelho, a posição +1 significa o sítio de início da transcrição.

5. CONCLUSÕES

Os fatores de transcrição *ZmDof1* e *OsDof25* elevaram os níveis de expressão dos transportadores de amônio de alta e baixa afinidade e isso pode ter causado considerável aumento nos teores de N-amino livre.

A superexpressão do fator de transcrição *OsDof25* causou elevação nos níveis de expressão das enzimas piruvato quinase, fosfoenolpiruvato carboxilase e isocitrato desidrogenase citosólica, além de aumento de expressão e atividade da GDH, sugerindo um direcionamento de esqueletos de carbono para a assimilação do amônio e diminuição do seu efeito tóxico.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento da expressão de transportadores de amônio de alta afinidade proporcionado por níveis elevados de expressão do fator de transcrição OsDof25 pode conferir uma vantagem adaptativa às plantas em ambientes de baixa disponibilidade de N.

O grande número de fatores de transcrição da família Dof e o envolvimento de alguns dos seus membros relacionados ao controle do metabolismo de nitrogênio e carbono abrem uma nova fronteira de estudos na busca de marcadores moleculares, que possam ser utilizados em programas de melhoramento para aumentar a eficiência de uso de nitrogênio por plantas cultivadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMEZIANE, R.; BERNHARD, K.; LIGHTFOOT, D. Expression of the bacterial *gdhA* gene encoding a NADPH glutamate dehydrogenase in tobacco affects plant growth and development. **Plant and Soil**, v. 221, p.47–57, 2000.
- AN, D.; SU, J.; LIU, Q.; ZHU, Y.; TONG, Y.; LI, J.; JING, R.; LI, B.; LI, Z. Mapping QTLs for nitrogen uptake in relation to the early growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant and Soil**, v.284, p.73–84, 2006.
- ANDREWS, M.; LEA, P. J.; RAVEN, J. A.; LINDSEY, K. Can genetic manipulation of plant nitrogen assimilation enzymes result in increased crop yield and greater N-use efficiency? An assessment. **Analytical Applied Biology**, v.154, p.25-40, 2004.
- ANDREWS, M.; RAVEN, J. A.; SPRENT, J. I. Environmental effects of dry matter partitioning between shoot and root of crop plants: relations with growth and shoot protein concentration. **Annals of Applied Biology**, v.138, p.57-68, 2001.
- ARAKI, R.; HASEGAWA H. Expression of Rice (*Oryza sativa* L.) Genes Involved in High-Affinity Nitrate Transport during the Period of Nitrate Induction. **Breeding Science**, v.56, p.295-302, 2006.
- ARGUELLO-ASTORGA, G.; HERRERA-ESTRELLA, L. Evolution of light-regulated plant promoters. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.49, p.525–555, 1998.
- BAXTER, I.; TCHIEU, J.; SUSSMAN, M. R.; BOUTRY, M.; PALMGREN, M. G.; GRIBSKOV, M.; HARPER, J. F.; AXELSEN, K. B. Genomic comparison of P-type ATPase ion pump in *Arabidopsis* and rice. **Plant Physiology**, v.132, p.618-628, 2003.
- BECK, T.; HALL, M. N. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. **Nature**, v.402, p.689–692, 1999.
- BERTRAM, P. G.; CHOI, J. H.; CARVALHO, J.; AI, W.; ZENG, C.; CHAN, T. F.; ZHENG, X. F. Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p, and phosphatases. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p. 35727–35733, 2000.
- BI, Y-M.; ZHANG, Y.; SIGNORELLI, T.; ZHAO, R.; ZHU, T.; ROTHSTEIN, S. Genetic analysis of *Arabidopsis* GATA transcriptional factor gene family reveals a nitrate-inducible member important for chlorophyll synthesis and glucose sensitivity. **The Plant Journal**, v.44, p.680-692, 2005.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BREARS, T.; LIU, C.; KNIGHT, T. J.; CORUZZI, G. M. Ectopic Overexpression of Asparagine Synthetase in Transgenic Tobacco. **Plant Physiology**, v.103, p.1285-1290, 1993.
- CARVALHO, H. G.; LOPES-CARDOSO, I. A.; LIMA, L. M.; MELO, P. M.; CULLIMORE, J. V. Nodule-Specific Modulation of Glutamine Synthetase in Transgenic *Medicago truncatula* Leads to Inverse Alterations in Asparagine Synthetase Expression. **Plant Physiology**, v.133, p.243-252, 2003.
- CASTLE, L. A.; WU, G.; MCELROY, D. Agricultural input traits: past, present and future. **Current Opinion on Biotechnology**, v.17, p.105–112, 2006.

- 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, v.6, p.853-855, 1975.
- CENTURY, K.; REUBER, T. L.; RATCLIFFE, O. J. Regulating the regulators: The future prospects for transcription-factor-based agricultural biotechnology products. **Plant Physiology**, v.147, p.20-29, 2008.
- CEREZO, M.; TILLARD, P.; FILLEUR, S.; MUNOS, S.; DANIEL-VEDELE, F.; GOJON, A. Major alterations of the regulation of root NO₃- uptake are associated with mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.127, p.262-271, 2001.
- CHEN, R. D.; GADAL, P. The mitochondria provide the 2-oxoglutarate needed for glutamate synthesis in higher plant chloroplasts? **Plant Physiology and Biochemistry**, v.28, p.141-145, 1990.
- CHICHKOVA, S.; ARELLANO, J.; VANCE, C. P.; HERNANDEZ, G. Transgenic tobacco plants that overexpress alfalfa NADH-glutamate synthase have higher carbon and nitrogen content. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.2079-2087, 2001.
- CHO, Y.; JIANG, W.; CHIN, J. W.; PIAO, Z.; CHO, G.; MCCOUCH, S. R.; KOH, H. Z. Identification of QTLs Associated with Physiological Nitrogen Use Efficiency in Rice. **Molecules and Cells**, v. 23, n. 1, p. 72-79, 2007.
- CORUZZI, G. M.; ZHOU, L. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effects'. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p.247-253, 2001.
- CRAWFORD, N. M. & GLASS, A. D. M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science**, v.3, n.10, p.389-395, 1998.
- CRÉTÉ, P.; CABOCHE, M.; MEYER, C. Nitrite reductase expression is regulated at the post-transcriptional level by the nitrogen source in *Nicotiana plumbaginifolia* and *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.11, n.4, p.625-634, 1997.
- CURTIS, I. S.; POWER, J. B.; DE LAAT, A. M. M.; CABOCHE, M.; DAVEY, M. R. Expression of a chimeric nitrate reductase gene in transgenic lettuce reduces nitrate in leaves. **Plant Cell Reports**, v.18, p.889-896, 1999.
- DISTELFELD, A.; UAUY, C.; FAHIMA, T. Physical map of the wheat high-grain protein content gene Gpc-B1 and development of a high-throughput molecular marker. **New Phytologist**, v. 169, n.4, p. 753-763, 2006.
- DJENNANE S.; CHAUVIN, J.-E.; QUILLERÉ, I.; MEYER, C.; CHUPEAU, Y. Introduction and expression of a deregulated tobacco nitrate reductase gene in potato lead to highly reduced nitrate levels in transgenic tubers. **Transgenic Research**, v. 11, p.175-184, 2002.
- DUBOIS, F.; TERCÉ-LAFORGUE, T.; GONZALES-MORO, M.B. ESTAVILLO, J.M.; SANGWAN, R.; GALLAIS, A.; HIREL, B. Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new store for an old enzyme? **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.565-576, 2003.
- DUBOIS, F.; TERCÉ-LAFORGUE, T.; GONZALEZ-MORO, M.B.; ESTAVILLO, J.M.; SANGWAN, R.; GALLAIS, A.; HIREL, B. Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? **Plant Physiology and Biochemistry**, p.41, 565-576, 2003.
- ECKARDT, N. A.; COMINELLI, E.; TONELLI, C. The future of science: Food and water for life. **The Plant Cell**, Advanced Online Publication, p.1-5, 2009.

- FARNDEN, K. J. S.; ROBERTSON, J. G. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogen. In: BERGSEN, F. J. ed. **Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation**, Chichester: John Wiley, 1980. p.265-314.
- FELLER, U.; FISCHER, A. Nitrogen metabolism in senescing leaves. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.13, p.241-273, 1994.
- FERNANDES, M. S. N carriers, light and temperature influences on the free amino acid pool composition of rice plants. **Turrialba**, v.33, n.3, p.297-301, 1984.
- FERRARIO-MERY, S.; MASCLAUX, C.; SUZUKI, A.; VALADIER, M.-R.; HIREL, B.; FOYER, C. H. Glutamine and α -ketoglutarate are metabolite signals involved in nitrate reductase transcription in untransformed and transformed tobacco plants deficient in ferredoxin-glutamine- α -ketoglutarate-aminotransferase. **Planta**, v.213, p.265-271, 2001.
- FERRARIO-MÉRY, S.; VALADIER, M.-H.; FOYER, C. H. Overexpression of nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA. **Plant Physiology**, v.117, p.293-302, 1998.
- FERRARIO-MERY, S.; VALADIER, M.-H.; GODEFROY, N.; MIALLIER, D.; HIREL, B.; FOYER C. H.; SUZUKI, A. Diurnal changes in ammonia assimilation in transformed tobacco plants expressing ferredoxin-dependent glutamate synthase mRNA in the antisense orientation. **Plant Science**, v.163, n.1, p.59-67, 2002.
- FILLEUR, S.; DORBE, M.-F.; CERESO, M.; ORSEL, M.; GRANIER, F.; GOJON, A.; DANIEL-VEDELE, F. An Arabidopsis T-DNA mutant affected in Nrt2 genes is impaired in nitrate uptake. **FEBS Letter**, v.489, p.220-224, 2001.
- FILLEUR, S.; WALCH-LIU, P.; GAN, Y.; FORDE, B. G. Nitrate and glutamate sensing by plant roots. **Biochemical Society Transactions**, v.33, p.283-286, 2005.
- FORDE, B. G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1465, p.219-235, 2000.
- FRAISIER, V.; GOJON, A.; TILLARD, P.; DANIEL-VEDELE, F. Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. **The Plant Journal**, v.23, n.4, p.489-496, 2000.
- FU, J.; SAMPALO, R.; GALLARDO, F.; CÁNOVAS, F. M.; KIRBY, E. G. Assembly of a cytosolic pine glutamine synthetase holoenzyme in leaves of transgenic poplar leads to enhanced vegetative growth in young plants. **Plant Cell and Environment**, v.26, n.3, p.411-418, 2003.
- FUENTES, S. I.; ALLEN, D. J.; ORTIZ-LOPEZ, A.; HERNÁNDEZ, G. Over-expression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.358, p.1071-1081, 2001.
- GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.396, p.295-306, 2004.
- GAN, Y.; FILLEUR, S.; RAHMAN, A.; GOTENSPARRE, S.; FORDE, B. G. Nutritional regulation of ANR1 and other root-expressed MADS-box genes in Arabidopsis thaliana. **Planta**, v.222, p.730-742, 2005.
- GANSEL, X.; MUNOS, S.; TILLARD, P.; GOJON, A. Differential regulation of the NO_3^- and NH_4^+ transporter genes AtNrt2.1 and AtAmt1.1 in Arabidopsis: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. **The Plant Journal**, v.26, p.143-155, 2001.

- GIRIN, T.; LEJAY, L.; WIRTH, J.; WIDIEZ, T.; PALENCHAR, P. M.; NAZOA, P.; TOURAINÉ, B.; GOJON, A.; LEPETIT, M. Identification of a 150 bp cis-acting element of the AtNRT2.1 promoter involved in the regulation of gene expression by N and C status of the plant. **Plant Cell Environment**, v.30, p.1366-1380, 2007.
- GLASS A. D. M. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, p.453-470, 2003.
- GLASS A. D. M.; BRITTO, D. T.; KAISER, B. N.; KINGHORN, J. R.; KRONZUCKER, H. J.; KUMAR, A.; OKAMOTO, M.; RAWAT, S.; SIDDIQI, M. Y.; UNKLES, S. E.; VIDMAR, J. J. The regulation of nitrate and ammonium transport system in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.855-864, 2002.
- GOOD, A. G.; SHRAWAT, A. K.; MUENCH, D. G. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? **TRENDS in Plant Science**, v.9, n.12, p.597-605, 2004.
- GREGERSEN, P. L.; HOLM, P. B. Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Biotechnology Journal**, v.5, n.1, p. 192-206, 2007.
- GUO, A.; HE, K.; LIU D.; BAI, S.; GU, X.; WEI, L.; LUO, J. DATF: a database of Arabidopsis transcription factors. **Bioinformatics**, v.21, p.2568-2569, 2005.
- HABASH, D. Z.; MASSIAH, A. J.; RONG, H. L.; WALLSGROVE, R. M.; LEIGH, R. A. The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. **Annals of Applied Biology**, v.138, n.1, p.83-89, 2001.
- HANSCH, R.; FESSEL, D. G.; WITT, C.; HESBERG, C.; HOFFMANN, G.; WALCH-LIU, P.; ENGELS, C.; KRUSE, J.; RENNENBERG, H.; KAISER, W. M.; MENDEL, R.-R. Tobacco plants that lack expression of functional nitrate reductase in roots show changes in growth rate and metabolite accumulation. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.359, p.1251-1258, 2001.
- HARRISON, J.; CRESCENZO, M.-A. P. DE; SENÉ, O.; HIREL, B. Does Lowering Glutamine Synthetase Activity in Nodules Modify Nitrogen Metabolism and Growth of *Lotus japonicus*? **Plant Physiology**, v.133, p.253-262, 2003.
- HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERÉ, I.; BOURDONCLE, W.; et al. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. **Plant Physiology**, v.125, p.1258-1270, 2001.
- HIREL, B.; GOUIS, J. L.; NEY, B.; GALLAIS, A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.2339-2358, 2007.
- HIREL, B.; LEA, P. J. The biochemistry, molecular biology and genetic manipulation of primary ammonia assimilation. In: FOYER, C. H.; NOCTOR, G. eds. **Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon and Respiratory Metabolism**. Netherlands, Kluwer Academic, p.71-92, 2002.
- HIREL, B.; LEMAIRE, G. From agronomy and ecophysiology to molecular genetics for improving nitrogen use efficiency in crops. In: BASRA, A.; GOYAL, S. eds. **Efficient Nitrogen Use in Crop Production**. Binghamton, NY, USA: Haworth's Food Product Press. (In press), p.213-257, 2006.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural of Experimental Station Bull**, v.347, p.1-32, 1950.

- HODGES, M.; FLESCH, V.; GÁLVEZ, S.; BISMUTH, E. Higher plant NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenases, ammonium assimilation and NADPH production. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.577-585, 2003.
- HOFMAN-BANG, J. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biotechnology**, v.12, p.35–73, 1999.
- HOQUE, M. S.; MASLE, J.; UDVARDI, M. K.; RYAN, P. R.; UPADHYAYA, N. M. Over-expression of the rice OsAMT1-1 gene increases ammonium uptake and content, but impairs growth and development of plants under high ammonium nutrition. **Functional Plant Biology**, v.33, p.153–163, 2006.
- HOSHIDA, H.; TANAKA, Y.; HIBINO, T.; HAYASHI, Y.; TANAKA, A.; TAKABE, T.; TAKABE, T. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. **Plant Molecular Biology**, v.43, p.103–111, 2000.
- HSIEH, M.-H.; LAM, H.-M.; VAN DE LOO, F. J.; CORUZZI, G. A PII-like protein in *Arabidopsis*: Putative role in nitrogen sensing. **Proceedings of National Academic Science**, v.95, p.13965–13970, 1998.
- HU, Z. H.; LI, P.; ZHOU, M.Q.; ZHANG, Z.; WANG, L.; ZHU L.; ZHU, Y. Mapping of quantitative trait loci (QTLs) for rice protein and fat content using doubled haploid lines. **Euphytica**. v. 135, p. 47–54, 2004.
- IIDA, K.; SEKI, M.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; AKIYAMA, K.; TOYODA, T.; KONAGAYA, A.; SHINOZAKI, K. RARTF: database and tools for complete sets of *Arabidopsis* transcription factors. **DNA Research**, v.12, p.247–256, 2005.
- ISHIMARU, K.; KASHIWAGI, T.; HIROTSU, N.; MADOKA, Y. Identification and physiological analyses of a locus for rice yield potential across the genetic background. **Journal of Experimental Botany**. v.56, n.420, p 2745-2753, 2005.
- ISHIYAMA, K.; KOJIMA, S.; TAKAHASHI, H.; HAYAKAWA, T. YAMAYA, T. Cell type distinct accumulation of mRNA and protein for NADH-dependent glutamate synthase in rice roots in response to the supply of NH₄⁺. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.643-647, 2003.
- JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.43, n.6, p.1274-1279, 1971.
- JEONG, M. J.; SHIH, M. C. Interaction of a GATA factor with cis-acting elements involved in light regulation of nuclear genes encoding chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.300, p.555–562, 2003.
- KAISER, B. N.; RAWAT, S. R.; SIDDIQI, M. Y.; MASLE, J.; GLASS, A. D. M. Functional analysis of an *Arabidopsis* T-DNA ‘Knockout’ of the high-affinity NH₄⁺ transporter AtAMT1;1. **Plant Physiology**, v.130, p.1263–1275, 2002.
- KARIMI, M., De MEYER, B. and HILSON, P. Modular cloning and expression of tagged fluorescent protein in plant cells. **Trends in Plant Science**, v.10, n.3, p.103-105, 2005.
- KICHEY, T.; HIREL, B.; HEUMEZ, E.; DUBOIS, F.; LE GOUIS, J. In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. **Field Crop Research**, v.102, p.22–32, 2007.
- KIM, S. A.; KWAK, J. M.; JAE, S.-K.; WANG, M.-H.; NAM, H. G. Overexpression of the *AtGluR2* Gene Encoding an *Arabidopsis* Homolog of Mammalian Glutamate Receptors

- Impairs Calcium Utilization and Sensitivity to Ionic Stress in Transgenic Plants. **Plant Cell Physiology**, v.42, n.1, p.74–84, 2001.
- KIRK, G. J. D.; KRONZUCKER, H. J. The potential for nitrification and nitrate uptake in the rhizosphere of wetland plants: Modeling study. **Annals of Botany**, v.96, p.639-646, 2005.
- KISU, Y.; ONO, T.; SHIMOFURUTANI, N.; SUZUKI, M.; ESAKA, M. Characterization and expression of a new class of zinc finger protein that binds to silencer region of ascorbate oxidase gene. **Plant Cell Physiology**, v.39, p.1054-1064, 1998.
- KOCH, K. E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p.509–540, 1996.
- KONISHI, S.; IZAWA, T.; LIN, S. Y.; EBANA, K.; FUKUTA, Y.; SASAKI, T.; YANO, M. An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. **Science**, v.312, p.1392–1396, 2006.
- KRAPP, A.; SALIBA-COLOMBANI, V.; DANIEL-VEDELE, F. Analysis of C and N metabolisms and of C/N interactions using quantitative genetics. **Photosynthesis Research**, v.83, p. 251–263, 2005.
- KUMAR, A.; SILIM, S. N.; OKAMOTO, M.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. Differential expression of three members of the AMT1 gene family encoding putative high-affinity NH₄⁺ transporters in roots of *Oryza sativa* subspecies indica. **Plant Cell and Environment**, v.26, p.907–914, 2003.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LAM, H.-M.; HSIEH, M.-H.; CORUZZI, G. Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.16, n.3, p.345-353, 1998.
- LAM, H.-M.; WONG, P.; CHAN, H.-K.; YAM, K.-M.; CHEN, L.; CHOW, C.-M.; CORUZZI, G. M. Overexpression of the ASN1 Gene Enhances Nitrogen Status in Seeds of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 132, p.926-935, 2003.
- LAWLOR, D. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production system. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.773-787, 2002.
- LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Nitrogen use efficiency. Uptake of nitrogen from the soil. **Annals of Applied Biology**, v.149, n.3, p.243-247, 2006.
- LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.555-564, 2003.
- LEA, U. S.; LEYDECKER, M.-T.; QUILLERE, I.; MEYER, C.; LILLO, C. Posttranslational regulation of nitrate reductase strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence. **Plant Physiology**, v.140, p.1085–1094, 2006.
- LEMAITRE, T.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; FLESCH, V.; BISMUTH, E.; FERNIE, A. R.; HODGES, M. NAD-dependent isocitrate dehydrogenase mutants of *Arabidopsis* suggest the enzyme is not limiting for nitrogen assimilation. **Plant Physiology**, v.144, p. 1546–1558, 2007.

- LI, W.; WANG, Y.; OKAMOTO, M.; CRAWFORD, N. M.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 inducible high affinity nitrate transporter gene cluster. **Plant Physiology**, v.143, p.425–433, 2007.
- LIAN, X.; XING, Y.; XU, H.Y.C.; LI, X.; ZHANG, Q. QTLs for low nitrogen tolerance at seedling stage identified using a recombinant inbred line population derived from an elite rice hybrid. **Theoretical and Applied Genetics**. v.112, p.85–96, 2005.
- LIJAVETZKY, D.; CARBONERO, P.; VICENTE-CARBAJOSA, J. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and Arabidopsis Dof gene families. **BMC Evolutionary Biology**, v.23, p.3-17, 2003.
- LILLO, C.; KAZAZAIC, S.; RUOFF, P.; MEYER, C. Characterization of nitrate reductase from light- and dark-exposed leaves (comparison of different species and effects of 14-3-3 inhibitor proteins). **Plant Physiology**, v.114, n.4, p.1377-1383, 1997.
- LILLO, C.; LEA, U. S.; LEYDECKER, M.-T.; MEYER, C. Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in constitutive activation of the enzyme in vivo and nitrite accumulation. **Plant Journal**, v.35, n.5, p.566-573, 2003.
- LIMAMI, A.; PHILLIPSON, B.; AMEZIANE, R.; PERNOLLET, N.; JIANG, Q.; ROY, R.; DELEENS, E.; CHAUMONT-BONNET, M.; GRESSHO, P. M.; HIRE, B. Does root glutamine synthetase control plant biomass production in *Lotus japonicus* L.? **Planta**, v.209, p.495-502, 1999.
- LIU, K.-H.; HUANG, C.-Y.; TSAY, Y.-F. CHL1 Is a dual-affinity nitrate transporter of arabidopsis involved in multiple phases of nitrate uptake. **The Plant Cell**, v.11, p.865–874, 1999.
- LOQUÉ, D.; VON WIRÉN, N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.1293–1305, 2004.
- LOULAKAKIS, K. A.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A. Plant NAD(H)-glutamate dehydrogenase consists of two subunit polypeptides and their participation in the seven isoenzymes occurs in an ordered ratio. **Plant Physiology**, V.97, p.104–111, 1991.
- LOWRY, J.; ATCHLEY, W. Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA binding domain. **Journal of Molecular Evolution**, v.50, p.103–115, 2000.
- MARTIN, A.; LEE, J.; KICHEY, T.; GERENTES, D.; ZIVY, M.; TATOUT, C.; DUBOIS, F.; BALLIAU, T.; VALOT, B.; DAVANTURE, M.; TERCÉ-LAFORGUE, T.; QUILLERÉ, I.; COQUE, M.; GALLAIS, A.; GONZALEZ-MORO, M.-B.; BETHENCOURT, L.; HABASH, D. Z.; LEA, P. J.; CHARCOSSET, A.; PEREZ, P.; MURIGNEUX, A.; SAKAKIBARA, H.; EDWARDS, K. J.; HIREL, B. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. **The Plant Cell**, v.18, p.3252–3274, 2006.
- MASCLAUX, C.; QUILLERÉ, I.; GALLAIS, A.; HIREL, B. The challenge of remobilisation in plant nitrogen economy. A survey of physio-agronomic and molecular approaches. **Annals of Applied Biology**, v.138, n.1, p.69–81, 2001.
- MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; REISDORF-CREN, M.; ORSEL, M. Leaf nitrogen remobilization for plant development and grain filling. **Plant Biology**, v.10, p.23-36, 2008.
- MAYER, M.; LUDEWIG, U. Role of AMT1;1 in NH₄⁺ acquisition in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biology**, v.8, p.522–528, 2006.

- MENA, M.; VICENTE-CARBAJOSA, J.; SCHMIDT, R.J.; CARBONERO, P. An endosperm-specific DOF protein from barley, highly conserved in wheat, binds to and activates transcription from the prolamin-box of a native B-hordein promoter in barley endosperm. **Plant Journal**, v.16, p.53-62, 1998.
- MESSENGUY, F.; DUBOIS, E. Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. **Gene**, v.316, p.1-21, 2003.
- MEYER, C.; STITT, M. Nitrate reduction and signaling. In: MOROT-GAUDRY, J. F.; LEA, P. J. eds **Plant Nitrogen**. INRA (France): Springer-Verlag; 2001, pp.37-59.
- MIFLIN, B. J.; HABASH, D. Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.979, 987, 2002.
- MIGGE, A.; CARRAYOL, E.; HIREL, B.; BECKER, T. W. Leaf-specific overexpression of plastidic glutamine synthetase stimulates the growth of transgenic tobacco seedlings. **Planta**, v.210, p.252-260, 2000.
- MILLER, A. J.; FAN, X.; ORSEL, M.; SMITH, S. J.; WELLS, D. M. Nitrate transport and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p.2297-2306, 2007.
- MILLER, A. J.; FAN, X.; SHEN, Q.; SMITH, S. J. Amino acids and nitrate signals for the regulation of nitrogen acquisition. **Journal of Experimental Botany**, v.59, n.1, p.111-119, 2007.
- MIYASHITA, Y.; GOOD, A. G. NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation. **Journal of Experimental Botany**, v21, p.1-14, 2008.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- OBARA, M.; KAJIURA, M.; FUKUTA, Y.; YANO, M.; HAYASHI, M.; YAMAYA, T.; SATO, T. Mapping of QTLs associated with cytosolic glutamine synthetase and NADH-glutamate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.1209-1217, 2001.
- OKAMOTO, M.; VIDMAR, J. J.; GLASS, A. D. Regulation of NRT1 and NRT2 gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. **Plant Cell Physiology**, v.44, p.304-317, 2003.
- OLIVEIRA, I. C.; BREARS, T.; KNIGHT, T. J.; CLARK, A.; CORUZZI, G. M. Overexpression of cytosolic glutamine synthetase: Relation to nitrogen, light, and photorespiration. **Plant Physiology**, v.129, p.1-11, 2002.
- ORSEL, M.; CHOPIN, F.; LELEU, O.; SMITH, S. J.; KRAPP, A.; DANIEL-VEDELE, F.; MILLER, A. J. Characterization of a two component high affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*; physiology and protein-protein interaction. **Plant Physiology**, v.142, p.1304-1317, 2006.
- ORSEL, M.; KRAPP, A.; DANIEL-VEDELE, F. Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*: structure and gene expression. **Plant Physiology**, v.129, p.886-896, 2002.
- ORTEGA, J. L.; TEMPLE, S. J.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Constitutive overexpression of cytosolic glutamine synthetase (GS_1) gene in transgenic alfalfa demonstrates that gs_1 may be regulated at the level of RNA stability and protein turnover. **Plant Physiology**, v.126, n.1, p.109-121, 2001.

- PALENCHAR, P. M.; KOURANOV, A.; LEJAY, L. V.; CORUZZI, G. M. Genome-wide patterns of carbon and nitrogen regulation of gene expression validate the combined carbon and nitrogen (CN)- signaling hypothesis in plants. **Genome Biology**, v.5, R91, 2004.
- PALMGREN, M. G. Plant plasma membrane H⁺-ATPase: powerhouses for nutrient uptake. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p.817-845, 2001.
- PARENICOVA, L.; DE FOLTER, S.; KIEFFER, M.; HORNER, D. S.; FAVALLI, C.; BUSSCHER, J.; COOK, H. E.; INGRAM, R. M.; KATER, M. M.; DAVIES, B.; ANGENENT, G. C.; COLOMBO, L. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: New openings to the MADS world. **Plant Cell**, v.15, p.1538–1551, 2003.
- PATIENT, R. K.; MCGHEE, J. D. The GATA family (vertebrates and invertebrates). **Curr Opin Genet Dev.**, v.12, p. 416–422, 2002.
- PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F.; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? **Plant Soil**, v.174, p.3–28, 1995.
- PROVAN, F.; AKSLAND, L.-M.; MEYER, C.; LILLO, C. Deletion of the nitrate reductase n-terminal domain still allows binding of 14-3-3 proteins but affects their inhibitory properties. **Plant Physiology**, v.123, p.757–764, 2000.
- PÜRNEL, M. P.; SKOPELETIS, D. S.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A.; BOTELLA, J. R. Modulation of higher-plant NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase activity in transgenic tobacco via alteration of beta subunit levels. **Planta**, v.222, p.167–180, 2005.
- QU, L.-J.; ZHU, Y.-X. Transcription factor families in Arabidopsis: major progress and outstanding issues for future research. **Current Opinion on Plant Biology**, v.9, p.544–549, 2006.
- QUAGGIOTTI, S.; RUPERTI, B.; BORSA, P.; DESTRO, T. & MALAGOLI, M. Expression of a putative high-affinity NO₃⁻ transporter and of an H⁺-ATPase in relation to whole plant nitrate transport physiology in two maize genotypes differently responsive to low nitrogen availability. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.384, p.1023-1031, 2003.
- QUESADA, A.; GALVAN, A.; FERNANDEZ, E. Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. **The Plant Journal**, v.5, p.407–419, 1994.
- QUILLERÉ, I.; DUFOSSÉ, C.; ROUX, Y.; FOYER, C. H.; CABOCHE, M.; MOROT-GAUDRY, J.-F. The effects of deregulation of NR gene expression on growth and nitrogen metabolism of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. **Journal of Experimental Botany**, v.45, n.9, p.1205-1211, 1994.
- RAGHURAM, N.; PATHAK, R. R.; SHARMA, P. Signalling and the molecular aspects of N-use-efficiency in higher plants. In: SING, R. P.; JAIWAL, P. K. eds. **Biotechnological Approaches to Improve Nitrogen Use Efficiency in Plants**. Houston, Texas, USA, p.19-40, 2006.
- RASTOGI, R.; BATE, N.; SIVASANKAR, S.; ROTHSTEIN, S. J. Foot printing of the spinach nitrite reductase gene promoter reveals the preservation of nitrate regulatory elements between fungi and higher plants. **Plant Mol. Biol.**, v.34, p.465–476, 1997.
- RAWAT, S. R.; SILIM, S. N.; KRONZUCKER, H. J.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. AtAMT1 gene expression and NH₄⁺ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. **The Plant Journal**, v.19, p.143–152, 1999.

- REED, A. J.; BELOW, F. E.; HAGEMAN, R. H. Grain protein accumulation and the relationship between leaf nitrate reductase and the protease activities during grain development in maize: variation between genotypes. **Plant Physiology**, v. 64, p. 164-170, 1980.
- REYES, J.C.; MURO-PASTOR, M.I.; FLORENCIO, F. J. The GATA family of transcription factors in Arabidopsis and rice. **Plant Physiol.**, v.134, p.1718–1732, 2004.
- RUEDA-LÓPEZ, M.; CRESPILO, R.; CÁNOVAS, F. M.; ÁVILA, C. Differential regulation of two glutamine synthetase genes by a single Dof transcription factor. **The Plant Journal**, v.56, p.73-85, 2008.
- SALMERON, J.; HERRERA-ESTRELLA, L. R. Fast-forward genomics for improved crop production. **Current Opinion on Plant Biology**, v.9, p.177–179, 2006.
- SANTI, S.; LOCCI, G.; MONTE, R.; PINTON, R.; AND VARANINI, Z. Induction of nitrate uptake in maize roots: expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H⁺-ATPase isoforms. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 389, p. 1851-1864, 2003.
- SANTI, S.; LOCCI, G.; PINTON, R.; CESCO, S.; VARANINI, Z. Plasma membrane H⁺-ATPase in maize roots induced for NO₃⁻ Uptake. **Plant Physiology**, v.109, p.1277-1283, 1995.
- SCAZZOCCHIO, C. The fungal GATA factors. **Current Opinion in Microbiology**, v.3, p.126–131, 2000.
- SCHERENS, B.; FELLER, A.; VIERENDEELS, F.; MESSENGUY, F.; DUBOIS, E. Identification of direct and indirect targets of the Gln3 and Gat1 activators by transcriptional profiling in response to nitrogen availability in the short and long term. **FEMS Yeast Research**, v.6, p.777–791, 2006.
- SCHIAVON, M.; ERTANI, A.; NARDI, S. Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in *Zea mays* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.24, p.11800-11808, 2008.
- SENTOKU, N.; TANIGUCHI, M.; SUGIYAMA, T.; ISHIMARU, K.; OHSUGI, R.; TAKAIWA, F.; TOKI, S. Analysis of the transgenic tobacco plants expressing *Panicum miliaceum* aspartate aminotransferase genes. **Plant Cell Reports**, v.19, p.598–603, 2000.
- SHIMOFURUTANI, N.; KISU, Y.; SUZUKI, M.; ESAKA, M. Functional analyses of the Dof domain, a zinc finger DNA-binding domain, in a pumpkin DNA-binding protein AOBP. **FEBS Letter**, v.430, p.251-256, 1998.
- SHRAWAT, A. K.; GOOD, A. G. Genetic engineering approaches to improving nitrogen use efficiency. **ISB News Report**, p.1-5, may, 2008. (electronic magazine).
- SKOPELITIS, D. S.; PARANYCHIANAKIS, N. V.; PASCHALIDIS, K. A.; PLIAKONIS, E. D.; DELIS, I. D.; YAKOUMAKIS, D. I.; KOUVARAKIS, A.; PAPADAKIS, A. K.; STEPHANOU, E.G.; ROUBELAKIS-ANFELAKIS, K. A. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. **The Plant Cell**, v.18, p.2767–2781, 2006.
- SONDERGAARD, T. E.; SCHULZ, A.; PALMGREN, M. G. Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H⁺-ATPase. **Plant Physiology**, v.136, p.2475-2482, 2004.

- SONODA, Y.; IKEDA, A.; SAIKI, S.; VON WIRÉN, N.; YAMAYA, T.; YAMAGUCHI, J. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (OsAMT1;1–1;3) in rice. **Plant Cell Physiology**, v.44, p.726–734, 2003.
- STANBROUGH, M.; ROWEN, D. W.; MAGASANIK, B. Role of the GATA factors Gln3p and Nil1p of *Saccharomyces cerevisiae* in the expression of nitrogen-regulated genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.92, p.9450–9454, 1995.
- STITT, M. Nitrate regulation of metabolism and growth. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.178–186, 1999.
- SUÁREZ, R.; MÁRQUEZ, J.; SHISHKOVA, S.; HERNÁNDEZ, G. Overexpression of alfalfa cytosolic glutamine synthetase in nodules and flowers of transgenic *Lotus japonicus* plants. **Physiologia Plantarum**, v.117, p.326–336, 2003.
- SUENAGA, A.; MORIYA, K.; SONODA, Y.; IKEDA, A.; VON WIRÉN, N.; HAYAKAWA, T.; YAMAGUCHI, J.; YAMAYA, T. Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter OsAMT2 in rice plants. **Plant and Cell Physiology**, v.44, p.206–211, 2003.
- TABUCHI, M.; ABIKO, T.; YAMAYA, T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.9, p.2319–2327, 2007.
- TABUCHI, M.; SUGIYAMA, K.; ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; SATO, T.; TAKAHASHI, H.; YAMAYA, T. Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking OsGS1;1, a cytosolic glutamine synthetase1;1. **The Plant Journal**, v.42, p.641–651, 2005.
- TAKAHASHI, M.; SASAKI, Y.; IDA, S.; MORIKAWA, H. Nitrite reductase gene enrichment improves assimilation of NO₂ in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.126, p.731–741, 2001.
- TEAKLE, G.R.; GILMARTIN, P. M. Two forms of type IV zinc-finger motif and their kingdom-specific distribution between the flora, fauna and fungi. **Trends in Biochemical Sciences**, v.23, p.100–102, 1998.
- TERCÉ-LAFORGUE, T.; DUBOIS, F.; FERRARIO-MÉRY, S.; POU DE CRECENZO, M-A.; SANGWAN, R.; HIREL, B. Glutamate dehydrogenase of tobacco is mainly induced in the cytosol of phloem companion cells when ammonia is provided either externally or released during photorespiration. **Plant Physiology**, v.136, p.4308–4317, 2004.
- TILMAN, D. Global environmental impacts of agriculture expansion; the need for sustainable and efficient practices. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, p.5995–6000, 1999.
- TONG, Y.; ZHOU, J.-J.; MILLER, A. J. A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. **Plant Journal**, v.41, p.442–450, 2005.
- TURANO, F. J.; DASHNER, R.; UPADHYAYA, A.; CALDWELL, C. R. Purification of mitochondrial glutamate dehydrogenase from dark-grown soybean seedlings. **Plant Physiology**, v.112, p.1357–1364, 1996.
- UAUY, C.; BREVIS, J.C.; DUBCOVSKY, J. The high grain protein content gene Gpc-B1 accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 11, p. 2785–2794, 2006.
- UDVARDI, M. K.; KAKAR, K.; WANDREY, M.; MONTANARI, O.; MURRAY, J.; ANDRIANKAJA, A.; ZHANG, J.-Y.; BENEDITO, V.; HOFER, J. M. I.; CHUENG, F.;

- TOWN, C. D. Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. **Plant Physiology**, v.144, p.538-549, 2007.
- VIDMAR, J. J.; ZHUO, D.; SIDDIQI, M. Y.; SCHJOERRING, J. K.; TOURAINÉ, B. & GLASS, A. D. M. Isolation and characterization of *HvNRT2.3* and *HvNRT2.4*, cDNAs encoding high-affinity nitrate transporters from roots of *Hordeum vulgare*. **Plant Physiology**, v.122, p.783-792, 2000.
- VINCENT, R.; FRAISIER, V.; CHAILLOU, S.; LIMAMI, M. A.; DELEENS, E.; PHILLIPSON, B.; DOUAT, C.; BOUTIN, J.-P.; HIREL, B. Overexpression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in shoots of transgenic *Lotus corniculatus* L. plants triggers changes in ammonium assimilation and plant development. **Planta**, v.201, p.424-433, 1997.
- VINCENTZ, M.; CABOCHE, M. Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. **The EMBO Journal**, v.10, n.5, p.1027-1035, 1991.
- WANG, H.; GARVIN, D. F. & KOCHIAN, L. V. Nitrate-induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. **Plant Physiology**, v.127, p.345-359, 2001.
- WANG, R. C.; TISCHNER, R.; GUTIERREZ, R. A.; HOFFMAN, M.; XING, X. J.; CHEN, M. S.; CORUZZI, G.; CRAWFORD, N. M. Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.136, p.2512-2522, 2004.
- WONG, H. K.; CHAN, H. K.; CORUZZI, G.M.; LAM, H.M. Correlation of ASN2 gene expression with ammonium metabolism in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.134, p.332-338, 2004.
- WU, P.; MA, L. G.; HOU, X. L.; WANG, M. Y.; WU, Y. R.; LIU, F. Y.; DENG, X. W. Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in Arabidopsis roots and leaves. **Plant Physiology**, v.132, p.1260-1271, 2003.
- YAMAYA, T.; OBARA, M.; NAKAJIMA, H.; SASAKI, S.; HAYAKAWA, T.; SATO, T. Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.370, p.917-925, 2002.
- YAMAYA, T.; OBARA, M.; NAKAJIMA, H.; SASAKI, S.; HAYAKAWA, T.; SATO, T. Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.370, p.917-925, 2002.
- YAN, F.; ZHU, Y.; MULLER, C.; ZORB, C.; SCHUBERT, S. Adaptation of H⁺-pumping and plasma membrane H⁺ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. **Plant Physiology**, v.129, p.50-63, 2002.
- YANAGISAWA, S. Dof Domain Proteins: Plant-Specific Transcription Factors Associated with Diverse Phenomena Unique to Plants. **Plant Cell Physiology**, vol.45, n.4, p.386-391, 2004.
- YANAGISAWA, S. Dof1 and Dof2 transcriptional factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. **The Plant Journal**, v.21, n.3, p.281-288, 2000.
- YANAGISAWA, S. Improved nitrogen assimilation using transcription factors. **ISB News Report**, Plant Research, p.1-4, September, 2004. (electronic magazine)
- YANAGISAWA, S. The Dof family of plant transcription factors. **TRENDS in Plant Science**, v.7, n.12, p.555-560, 2002.

- YANAGISAWA, S.; AKIYAMA, A.; KISAKA, H.; UCHIMIYA, H.; MIWA, T. Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, n.20, p.7833-7838, 2004.
- YANAGISAWA, S.; IZUI, K. Molecular cloning two DNA-binding proteins of maize that are structurally different but interact with the same sequence motif. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268, n.21, p.16028-16036, 1993.
- YANAGISAWA, S.; SHEEN, J. Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. **The Plant Cell**, v.10, p.75-89, 1998.
- YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino-acid with ninhydrin. **Analytical Biochemistry**, v.80, p.209-213, 1955.
- YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plants extracts by anthrone. **Biochemistry**, v.57, p.508-514, 1954.
- YUAN, L.; LOQUÉ, D.; YE, F.; FROMMER, W. B.; VON WIRÉN, N. Nitrogen-dependent post-transcriptional regulation of the ammonium transporter AtAMT1;1. **Nature**, v.143, p.732-744, 2007.
- ZHANG, H. M.; FORDE, B. G. An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. **Science**, v.279, p.407-409, 1998.
- ZHUO, D.; OKAMOTO, M.; VIDMAR, J. J. & GLASS, A. D. M. Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (*Nrt2;1At*) in roots of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.17, n.5, p.563-568, 1999.
- ZHUO, J.-J.; FERNÁNDEZ, E.; GALVÁN, A.; MILLER, A. J. A high affinity nitrate transport system from *Chlamydomonas* requires two gene products. **FEBS Letter**, v.446, p.225-227, 2000.