

**UFRRJ**

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

**DISSERTAÇÃO**

**Avaliação do Efeito da Superexpressão do Fator de  
Transcrição OsDof25 sobre o Metabolismo e  
desenvolvimento radicular em arroz**

**Renan Pinto Braga**

**2016**



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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DO FATOR DE  
TRANSCRIÇÃO *OSDOF25* SOBRE O METABOLISMO E  
DESENVOLVIMENTO RADICULAR EM ARROZ**

**RENAN PINTO BRAGA**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Manlio Silvestre Fernandes**

*e Co-orientação da Professora*  
**Sonia Regina de Souza**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre**, no Curso de Pós-graduação em Agronomia – Ciência do Solo.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2016

B813a Braga, Renan Pinto, 1988-Avaliação do Efeito da Superexpressão do Fator de Transcrição OsDof25 sobre o Metabolismo e desenvolvimento radicular em arroz / Renan Pinto Braga. - 2016.

50 f.: il.

Orientador: Manlio Silvestre Fernandes.

Coorientadora: Sonia Regina de Souza.

Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-graduação em Agronomia - Ciências do Solo, 2016.

1. Nitrogênio. 2. Fator de Transcrição. 3. Dof. 4. Assimilação. 5. Raiz. I. Fernandes, Manlio Silvestre, 1939-, orient. II. Souza, Sonia Regina de, 1962-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-graduação em Agronomia - Ciências do Solo. IV. Título.

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

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

**RENAN PINTO BRAGA**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/02/2016.

---

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

---

Altamiro Souza de Lima Ferraz Junior. Dr. UEMA

---

Rodrigo Grazinoli Garrido. Dr. UFRJ

*Aos meus pais, Luiz Felipe Guimarães Braga e Paulete Pinto Braga, que sempre fizeram tudo pela minha educação.*

*Ao meu avô Clarindo de Oliveira Braga (in memoriam).*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as graças que a mim foram concedidas.

Aos meus pais, Luiz Felipe Guimarães Braga e Paulete Pinto Braga, por todo esforço que tiveram para que eu pudesse ter uma ótima educação.

À minha irmã, Thais Pinto Braga, pelo apoio, carinho e as boas risadas.

À Shayene Bravo Alves, minha namorada, pela companhia nos momentos bons e ruins. Pelos conselhos, carinho, apoio e compreensão.

Aos parentes e familiares, pelo incentivo e por acreditarem em mim.

Ao Professor Dr. Manlio Silvestre Fernandes, pela orientação nos trabalhos acadêmicos, pelos ensinamentos e pelo rigor e vigor científicos.

À Professora Dra. Sonia Regina de Souza, pela orientação desde minha graduação, pela didática como professora, a qual quero espelhar em minha vida profissional.

A Professor Dr. Leandro Azevedo Santos pela amizade, pelos conselhos, ensinamentos, paciência, compreensão e toda a ajuda que me foi dada.

Ao Dr. Orlando Carlos Huertas Tavares, também pela amizade, pelos conselhos, ensinamentos, paciência, compreensão e toda a ajuda que me foi dada.

Aos integrantes do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, todos, pela amizade, ajuda, conselhos, as gargalhadas que tornaram meus dias melhores.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Curso de Pós Graduação em Agronomia Ciência do Solo, pelo ensino gratuito e de qualidade.

À CAPES, pelo financiamento dos meus estudos.

Ao tio Nilton e tia Salete, que cativaram em mim a curiosidade e a vontade de ser cientista, desde que eu era criança.

Ao meu primo Israel e ao Pedro, pelas vitórias nos Campos da Justiça!

Aos meus amigos, Adriano, Deilton, Felipe, Gabriel e Thadeu. Railane, Natália, Nanny, Milena e todos que estão sempre presentes nos melhores encontros. Que sejam eternos.

A todos que de alguma forma me ajudaram a alcançar mais este objetivo em minha vida. Meu mais sincero agradecimento.

## BIOGRAFIA

Renan Pinto Braga nasceu em 21 de agosto de 1988, na cidade do Rio de Janeiro - RJ, concluiu o ensino fundamental na cidade de nascimento e o ensino médio no Colégio MV1, em Bangu - RJ. Em 2007, ingressou no curso de graduação em Licenciatura em Ciências Agrícolas da UFRRJ. Durante a graduação, foi estagiário e bolsista do Laboratório de Bioquímica de Plantas, sob orientação dos professores Sonia Regina de Souza e Marco André Alves de Souza, participando de estudos e experimentos com *Mentha arvensis*. Em 2011, foi bolsista de iniciação científica do CNPq no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, no Instituto de Agronomia, Departamento de Solos da UFRRJ, sob orientação da professora Sonia Regina de Souza. Obteve o título de Licenciado em Ciências Agrícolas em fevereiro de 2012. Em março de 2014, ingressou no mestrado no Programa de Pós-graduação em Agronomia – Ciência do Solo, na UFRRJ, sob orientação do Dr. Manlio Silvestre Fernandes e co-orientação da Dra. Sonia Regina de Souza.

## RESUMO

BRAGA, Renan Pinto. **Avaliação do efeito da superexpressão do fator de transcrição OsDof25 sobre o metabolismo e desenvolvimento radicular em arroz**. 2016. 34 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Um dos alvos mais visados em plantas de interesse agrícola é a Eficiência de Uso do Nitrogênio (EUN). O estudo de proteínas regulatórias relacionadas a expressão gênica, mais especificamente fatores de transcrição, é uma alternativa viável para o controle de características quantitativas como a EUN. O fator de transcrição OsDof25 é um ortólogo do gene de milho ZmDof1 já identificado controlando o metabolismo de carbono (C). Neste trabalho foi avaliado o metabolismo de N e C em linhagens de arroz superexpressando o fator de transcrição OsDof25 e suas alterações morfofisiológicas, visando identificar características que levem a uma melhor EUN. Houve nas linhagens transformadas maior atividade de enzimas de redução e assimilação de N (Nitrato Redutase, Glutamina Sintetase e Glutamato Sintase) e maior conteúdo de metabólitos primários, que indicam maior eficiência de assimilação desse nutriente. As linhagens L#9.6 e L#10.8 apresentaram maior desenvolvimento das raízes quando comparadas com o tipo selvagem. As linhagens superexpressando o fator de transcrição OsDof25 também apresentaram maior número de raízes muito finas, bem como maior volume, área de superfície e comprimento, características importantes para a aquisição e busca por nutrientes e água.

**Palavras-chave:** Nitrogênio. Glutamina. Raiz.

## ABSTRACT

BRAGA, Renan Pinto. **Effect of overexpression of transcription factor OsDof25 over the metabolism and root development in rice.** 2016. 34 p. Dissertation (Master in Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

One of the main targets in plants of agricultural interest is the Nitrogen Use Efficiency (NUE). The study of regulatory proteins related to gene expression, specifically transcription factors, is a viable alternative for controlling quantitative traits such as NUE. The transcription factor OsDof25 is an ortholog ZmDof1 maize gene identified already controlling the metabolism of carbon (C). This study was conducted to evaluate N metabolism and C in rice lines overexpressing the transcription factor OsDof25 and morphophysiological changes generated by overexpression, aiming characteristics that lead to a better NUE. Lines showed increased activity in of nitrogen metabolism enzymes (Nitrate Reductase, Glutamine synthetase and glutamate synthase) and higher content of primary metabolites, indicating better assimilation efficiency. The lines L#9.6 and L#10.8 showed high development of roots, compared to wild type. The transformed lines also showed greater number of very fine roots, as well as increased volume, surface area and length, important features for the acquisition and search for nutrients and water.

**Keywords:** Nitrogen. Glutamine. Root.

## LISTA DE SÍMBOLOS

Dof	Fator de transcrição com motivo dedo de zinco (DNA one finger)
DAG	Dias Após a Germinação
EUN	Eficiência de Uso do Nitrogênio
MF	Massa Fresca
N-amino livre	aminoácidos livres (não proteicos)
NR	Nitrato Redutase
NRT	Nitrate Transporter
OsDof	<i>Oryza sativa</i> Dof
Zm-Dof	<i>Zea mays</i> Dof (Dof de milho)
GS	Glutamina sintetase
GOGAT	Glutamina oxoglutarato amino transferase
IDH/ICDH	Isocitrato Desidrogenase
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Amônio

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Sequências de aminoácidos do Domínio Dof dos fatores de transcrição do tipo Dof de alga verde, *C. reinhardtii* (CrDof), briófita, *P. patens* (PpDof) e eudicotiledonea, *A. Thaliana* (CDF1, SCAP1, DIG1, OBP1, AtDof4.7 e ITD1). Os resíduos de Cisteína coordenados pelo íon de Zinco estão representados em rosa escuro, os resíduos de aminoácidos aromáticos envolvidos na ligação ao DNA estão marcados com pontos pretos acima de suas siglas representativas. Barras vermelhas indicam Sinal de Localização Nuclear (NLS – Nuclear Localization Signal). Barra azul mostra a região envolvida no tráfego célula-célula, de ITD1 e AtDof4.1. Adaptado de Yanagisawa, S. (2016). ..... 3
- Figura 2.** A) Modelo proposto por Yanagisawa (2004b) da estrutura do fator de transcrição do tipo Zinc Finger DNA-binding with one finger (zf-Dof), seu resíduo altamente conservado de cisteína (em vermelho), aminoácidos altamente conservados em todos os FT Dof conhecidos (em roxo), outros aminoácidos também conservados (em azul) e outros aminoácidos redundantes (em cinza). B) Estrutura do domínio Dof de um Fator de Transcrição do tipo Dof. Representada pela estrutura do Dof1 de milho ZmDof1 como exemplo. Adaptado de Yanagisawa, S. (2016). ..... 5
- Figura 3.** Esquema da transferência de elétrons na enzima Nitrato redutase (SOUZA e FERNANDES, 2006). ..... 5
- Figura 4.** Representação esquemática do ciclo GS-GOGAT mostrando a assimilação do nitrogênio (A) e (B) mostrando a atividade de aminação e desaminação da GDH (HARPER et al., 2010). ..... 6
- Figura 5.** (A) Placa de Petri contendo meio semi-sólido com ágar-ágar a 4% e giberelina 0,1mM pH 7,0. (B) Sistema de obtenção de plântulas em pote contendo água destilada, antes de serem transferidas para os potes definitivos. (C) Potes definitivos com plantas aos 30 DAG. .... 8
- Figura 6.** Croqui do experimento: Análise Fenotípica das Raízes de Arroz Superexpressando o Fator de Transcrição *OsDof25*. ..... 13
- Figura 7.** Análise do Metabolismo Primário em Resposta ao Nitrato e ao Amônio em Baixa e Alta doses. Em cinza claro, tratamentos utilizando  $\text{NO}_3^-$  como fonte de N e em cinza escuro, tratamentos utilizando amônio como fonte de N. .... 14
- Figura 8.** Croqui do experimento de Análise do metabolismo de Nitrogênio e Carbono em resposta à aplicação de Amônio em baixa e alta dose. .... 14
- Figura 9.** Análise de Western-blot em raízes de linhagens de arroz superexpressando o fator de transcrição *OsDof25* (#5.1, #9.6 e #10.8) e o tipo selvagem por meio da detecção do TAG-3xHA fusionado ao gene do Fator de Transcrição *OsDof25*. .... 15
- Figura 10.** Comprimento, área de superfície e volume de raízes de plantas de arroz em diferentes coletas. Gráficos A, B e C são médias gerais das três características avaliadas. Outros gráficos mostram diferentes classes de cada característica. Barras representam erro padrão de três repetições. Asteriscos representam diferença entre as linhagens e o tipo selvagem com teste de Dunnett a 5% de significância. .... 16

- Figura 11.** Atividade da Nitrato Redutase (A, B), Teores de  $\text{N-NO}_3^-$  (C, D),  $\text{N-NH}_4^+$  (E, F), N-amino livre (G, H) e Açúcares Solúveis (I, J) em plantas de arroz cv. Nipponbare: duas linhagens de arroz superexpressando o fator de transcrição OsDof25 (#9.6 e #10.8) e o tipo selvagem (TS) sob tratamento constante em baixa e alta dose de nitrato (0,2 mM e 2,0 mM). Barras representam o erro padrão da média de três repetições. Asteriscos representam diferença entre as linhagens e o tipo selvagem com teste de Dunnett a 5% de significância..... 18
- Figura 12.** Teores de  $\text{NH}_4^+$  (A, B), Teores de N-amino livre (C, D), e Açúcares Solúveis (E, F) em plantas de arroz cv. Nipponbare: duas linhagens de arroz superexpressando o fator de transcrição OsDof25 (#9.6 e #10.8) e o tipo selvagem (TS) sob tratamento constante em baixa e alta dose de nitrato (0,2mM e 2,0mM). Barras representam o erro padrão da média de três repetições. Asteriscos representam diferença entre as linhagens e o tipo selvagem com teste de Dunnett a 5% de significância..... 19
- Figura 13.** Teores de  $\text{N-NH}_4^+$ , N-amino livre e Açúcares solúveis em diferentes partes de linhagens de arroz superexpressando o Fator de Transcrição OsDof25 e o Tipo Selvagem, ressupridas com baixa (0,2mM) ou alta dose (2,0mM) de  $\text{NH}_4^+$ . Barras representam o erro padrão da média de três repetições. Letras representam diferença entre as linhagens e o tipo selvagem com teste de Dunnett a 5% de significância. .... 20
- Figura 14.** Atividade de Glutamina Sintetase em diferentes partes de arroz superexpressando o Fator de Transcrição OsDof25 e o tipo selvagem, ressupridas com baixa dose (0,2mM) ou alta dose (2,0mM) de  $\text{NH}_4^+$ . Barras representam o erro padrão da média de três repetições. Letras representam diferença entre as linhagens e o tipo selvagem com teste de Tukey a 5% de significância. .... 21
- Figura 15.** Atividade de Glutamato Sintase em diferentes partes de arroz superexpressando o Fator de Transcrição OsDof25 e o tipo selvagem, ressupridas com baixa dose (0,2mM) ou alta dose (2,0mM) de  $\text{NH}_4^+$ . Barras representam o erro padrão da média de três repetições. Letras representam diferença entre as linhagens e o tipo selvagem com teste de Tukey a 5% de significância. .... 21
- Figura 16.** Atividades de Glutamato Desidrogenase em diferentes partes de arroz superexpressando o Fator de Transcrição OsDof25 e o tipo selvagem, ressupridas com baixa dose (0,2mM) ou alta dose (2,0mM) de  $\text{NH}_4^+$ . Atividade de Aminoação (A) e Desaminoação (B). Barras representam o erro padrão da média de três repetições. Letras representam diferença entre as linhagens e o tipo selvagem com teste de Tukey a 5% de significância. .... 22
- Figura 17.** Atividade de Isocitrato Desidrogenase  $\text{NADP}^+$  dependente em diferentes partes de arroz superexpressando o Fator de Transcrição OsDof25 e o tipo selvagem, ressupridas com baixa dose (0,2mM) ou alta dose (2,0mM) de  $\text{NH}_4^+$ . Barras representam o erro padrão da média de três repetições. Letras representam diferença entre as linhagens e o tipo selvagem com teste de Tukey a 5% de significância. .... 23
- Figura 18.** Dados de comprimento radicular por classes de raízes em linhagens de arroz superexpressando o fator de transcrição OsDof25 ao longo de quatro coletas, cultivadas em solução nutritiva contendo 1,5mM de N (1,0mM  $\text{NO}_3^-$  e 0,5mM  $\text{NH}_4^+$ ). Valores no

eixo X representam dias após a germinação (DAG). A) Raízes muito finas (0,5 a 1,5mm), B) Raízes finas (1,5 a 3,5mm) e C) Raízes grossas (>3,5mm).....	32
<b>Figura 19.</b> Dados de volume radicular por classes de raízes em linhagens de arroz superexpressando o fator de transcrição OsDof25 ao longo de quatro coletas, cultivadas em solução nutritiva contendo 1,5mM de N (1,0mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e 0,5mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ). Valores no eixo X representam dias após a germinação (DAG). A) Raízes muito finas (0,5 a 1,5mm), B) Raízes finas (1,5 a 3,5mm) e C) Raízes grossas (>3,5mm).....	33
<b>Figura 20.</b> Dados de área de superfície radicular por classes de raízes em linhagens de arroz superexpressando o fator de transcrição OsDof25 ao longo de quatro coletas, cultivadas em solução nutritiva contendo 1,5mM de N (1,0mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e 0,5mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ). Valores no eixo X representam dias após a germinação (DAG). A) Raízes muito finas (0,5 a 1,5mm), B) Raízes finas (1,5 a 3,5mm) e C) Raízes grossas (>3,5mm).....	34

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequências dos “primers” para os genes do Fator de Transcrição OsDof25, Fator de Alongamento 1- $\alpha$ (eEF1- $\alpha$ ) e Actina1 como gene controle endógeno usados nas reações de PCR em tempo real.....	12
--	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Fatores de Transcrição Dof.....	3
2.2. Enzimas do Metabolismo de Nitrogênio .....	5
2.3. Enzimas do Metabolismo de Carbono .....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1. Obtenção das Sementes Transformadas .....	8
3.2. Preparo das Sementes e Cultivo.....	8
3.3. Análise das Frações Solúveis.....	8
3.4. Extração de Proteína .....	8
3.5. Atividade das Enzimas do Metabolismo de N e C .....	9
3.6. Atividade da Nitrato Redutase (NR).....	9
3.7. Atividade de Glutamina Sintetase (GS).....	9
3.8. Atividade de NADH- Glutamato Sintase (NADH-GOGAT) .....	9
3.9. Atividade de Glutamato Desidrogenase (GDH) Aminoação e Desaminoação .....	9
3.10. Atividade de NAD <sup>+</sup> -Isocitrato Desidrogenase e NADP <sup>+</sup> -Isocitrato Desidrogenase ..	10
3.11. Análise da Imunodeteção da Proteína contra o Tag de HA Fusionado ao Gene <i>OsDof25</i> .....	10
3.11.1. Extração de proteína nuclear .....	10
3.11.2. Preparo da amostra e eletroforese .....	11
3.11.3. Transferência e imunoblotting .....	11
3.12. Extração de RNA Total.....	11
3.12.1. Tratamento com DNase I e síntese do cDNA e PCR em tempo real.....	12
3.12.2. Desenho dos iniciadores (“primers”) para os estudos de expressão gênica.....	12
3.13. Experimento I: Análise Fenotípica das Raízes de Arroz Superexpressando o Fator de Transcrição <i>OsDof25</i> .....	13
3.14. Experimento II: Análise do Metabolismo Primário em Resposta ao Nitrato e ao Amônio em Baixa e Alta doses.....	13
3.15. Experimento III: Análise do metabolismo de Nitrogênio e Carbono em resposta à aplicação de Amônio em baixa e alta dose .....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1. Análise de Imunodeteção da Proteína <i>OsDof25</i> Contra o Tag de Hemaglutinina.....	15
4.2. Experimento I: Análise Fenotípica das Raízes de Arroz Superexpressando o Fator de Transcrição <i>OsDof25</i> .....	15
4.3. Experimento II: Análise do Metabolismo Primário em Resposta ao Nitrato e ao Amônio em Baixa e Alta doses (Figura 11) .....	17
4.3.1. Tratamento com NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	17
4.3.2. Tratamento com NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .....	19
4.4. Experimento III: Análise do metabolismo de nitrogênio e carbono em resposta à aplicação de amônio em baixa e alta dose .....	19

4.4.1. Atividade de Glutamina Sintetase .....	21
4.4.2. Atividade de NADH-glutamato sintase .....	21
4.4.3. Atividade de glutamato desidrogenase (GDH) .....	22
4.4.4. Atividade de isocitrato desidrogenase NADP <sup>+</sup> dependente .....	23
5. CONCLUSÕES .....	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25
7. ANEXOS .....	32

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial e a subsequente demanda por alimentos, tem exigido do setor agrícola uma maior produção. O arroz é um dos cereais com maior importância global, provendo 21% das necessidades calóricas em todo o mundo e até 76% na Ásia oriental (FITZGERALD et al., 2009). Com o intuito de atender a essas necessidades, o uso de fertilizantes tem aumentado, principalmente os nitrogenados, na forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ).

O nitrogênio (N) é um elemento essencial para o desenvolvimento vegetal, compõe cerca de 2 a 5% da matéria seca total da planta (ROBERTSON & VITOUSEK, 2009). O N é componente de proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, coenzimas e vários produtos secundários, além de ser um dos elementos minerais mais abundantes no tecido vegetal.

O uso em larga escala de fertilizantes nitrogenados causa diversos problemas ecológicos (MILLER & CRAMER, 2004; KURAI et al., 2011). As características físicas e químicas dos solos tropicais têm baixa retenção de ânions, fazendo com que a absorção do N pelas plantas seja prejudicada devido à lixiviação na forma nítrica. Pesquisas mostram que 85 a 90 milhões de toneladas de N são aplicadas no solo anualmente (GOOD et al., 2004). Porém cerca de 50 a 70% desse N aplicado é perdido no sistema solo-planta (PEOPLES et al., 1995). Com o intuito de atender a essas demandas e reduzir a quantidade de N aplicado no solo, pesquisas são feitas a fim de desenvolver plantas mais produtivas e com maior Eficiência no Uso do Nitrogênio (EUN). A EUN pode ser dividida em dois processos: a habilidade da planta absorver o N do solo; e a capacidade de transferir o N metabolizado para o grão, principalmente na forma de aminoácidos LEA & AZEVEDO, 2006).

Kant et al. (2011) afirmaram que a EUN pode ser dividida em: (i) eficiência de assimilação, que envolve absorção e assimilação do N; (ii) eficiência de utilização, que envolve a remobilização do N.

O nitrato é absorvido contra um gradiente de potencial eletroquímico, juntamente com dois prótons provenientes da solução do solo ou do bombeamento de prótons do interior da planta para o meio externo por proteínas de membrana chamadas bombas de prótons da plasmalema (PM- $\text{H}^+$ -ATPases) SPERANDIO et al., 2014). Transportadores de  $\text{NO}_3^-$  localizados também na membrana plasmática, reconhecem a molécula e a transportam para o interior da planta. Alguns transportadores também tem a capacidade de sinalização, e são chamados transeptors (HOLSBECKS et al., 2004), pois ao perceberem a presença da molécula, são capazes de enviar sinais para a transcrição e tradução de enzimas que irão efetuar a redução do  $\text{NO}_3^-$  para sua assimilação ou para o armazenamento desta molécula no vacúolo (KROUK et al., 2006).

A absorção do N é realizada por transportadores, que são codificados por famílias multigênicas. No entanto, existem dois sistemas principais: o de alta afinidade (HATS – *High Affinity Transport System*), que absorve o N em concentrações menores que 1mM e o de baixa afinidade (LATS – *Low Affinity Transport System*), que absorve o N em concentrações maiores que 1,0 mM. O sistema HATS pode ser subdividido em transportadores constitutivos (cHATS) que operam em concentrações baixas (em torno de 0,2 mM), e induzidos (iHATS), que operam em concentrações ainda mais baixas (GLASS et al., 2002).

Plantas desenvolvidas em ambientes com baixa disponibilidade de N precisam adaptar-se a essas condições para garantir sua reprodução. Algumas variedades brasileiras, como a Piauí são conhecidas por apresentarem teores altos de proteína no grão, quando comparadas a variedades melhoradas, como a IAC-47 (SOUZA et al., 1998). No entanto

ainda não se sabe qual a adaptação sofrida por essas plantas em ambientes com baixa disponibilidade de N que resultem em maior teor de proteína no grão.

São grandes os esforços da comunidade científica na busca por variedades mais eficientes no uso de nutrientes, tais como: o uso do melhoramento convencional ou assistido por marcadores moleculares e a transformação de plantas com enzimas envolvidas na assimilação de N e/ou C. Entretanto, os avanços são limitados dada a complexidade de tal característica, onde modificações pontuais no metabolismo de N e/ou C não têm sido suficientes para prover as plantas de maior EUN.

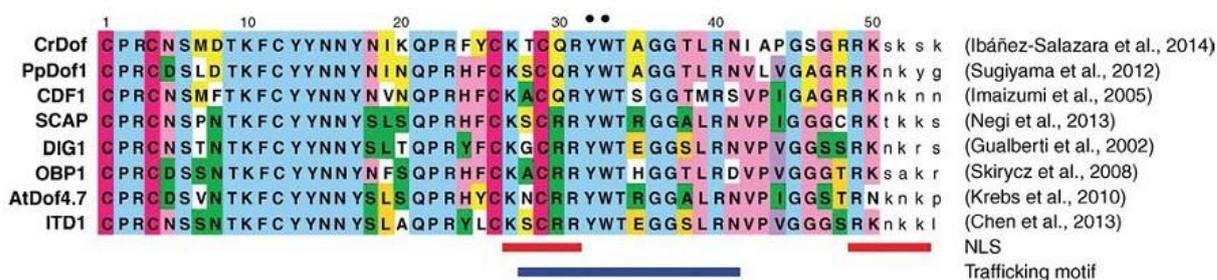
Nos últimos anos, atenção tem sido dada as proteínas regulatórias, especialmente aos fatores de transcrição, na tentativa de modificação de características complexas. Estas proteínas têm geralmente a habilidade de ativar a expressão de genes pertencentes a rotas metabólicas inteiras e ou mesmo de genes pertencentes a rotas metabólicas complementares, sendo, portanto alvo de estudos quando se busca modificações de características complexas. Fortes indícios são relatados para o envolvimento de fatores de transcrição da família Dof no controle do metabolismo de nitrogênio e carbono em plantas.

Este trabalho teve por objetivo, avaliar plantas superexpressando o Fator de Transcrição OsDof25 submetidas a baixa e alta doses de N quanto ao metabolismo de N e C e as características morfológicas, comparando-as com o tipo selvagem.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Fatores de Transcrição Dof

Proteínas Dof pertencem a um grupo de fatores de transcrição (*DNA-binding with one zinc finger*). É uma família com domínio de ligação ao DNA altamente conservado de 50-52 resíduos de aminoácidos, incluindo um dedo de zinco do tipo C<sub>2</sub>-C<sub>2</sub> na região N-terminal (Figura 1), que se liga especificamente a seqüências de DNA do tipo 5'-AAAG-3', ou 5'-TTTC-3', com exceção de um de abóbora (5'-AGTA-3') (SHIMOFURUTANI et al., 1998), e um domínio C-Terminal para regulação transcricional (YANAGISAWA 2002) (Figura 2). Até então nenhum FT do tipo Dof foi relatado em animais, o que os torna exclusivos de plantas. No entanto, nenhum gene Dof foi encontrado na alga vermelha *Cyanidioschyzon merolae* e na diatomácea *Thalassiosira pseudonana* (SHIGYO et al, 2007). Portanto, aparentemente, o gene Dof pertence a algum ancestral de organismos eucarióticos verdes (YANAGISAWA, 2016).



**Figura 1.** Sequências de aminoácidos do Domínio Dof dos fatores de transcrição do tipo Dof de alga verde, *C. reinhardtii* (CrDof), briófitas, *P. patens* (PpDof) e eudicotiledonea, *A. Thaliana* (CDF1, SCAP1, DIG1, OBP1, AtDof4.7 e ITD1). Os resíduos de Cisteína coordenados pelo íon de Zinco estão representados em rosa escuro, os resíduos de aminoácidos aromáticos envolvidos na ligação ao DNA estão marcados com pontos pretos acima de suas siglas representativas. Barras vermelhas indicam Sinal de Localização Nuclear (NLS – Nuclear Localization Signal). Barra azul mostra a região envolvida no tráfego célula-célula, de ITD1 e AtDof4.1. Adaptado de Yanagisawa, S. (2016).

De acordo com o banco de dados de Fatores de Transcrição de plantas, (PÉREZ-RODRIGUEZ et al., 2009), a família C<sub>2</sub>-C<sub>2</sub> Dof está presente em organismos unicelulares, como as algas *Chlamydomonas reinhardtii*, *Ostreococcus lucimarinus* e *Osterococcus tauri*, assim como em pluricelulares, Briófitas, tais como *Physcomitrella patens* e *Selaginella moellendorffii* (MORENO-RISUENO et al., 2007), gimnospermas, como *Pinus pinaster* e *Pinus taeda* (RUEDA-LÓPEZ, M. et al., 2006) e angiospermas, tanto monocotiledôneas como *Oryza sativa* (LIJAVETZKY, D. et al., 2003), *Zea mays* (YANAGISAWA & IZUI, 1993) e eudicotiledôneas, como *Arabidopsis thaliana* (YANAGISAWA, 2004) e *Populus trichocarpa* (YANG et al., 2006). Há 58 Famílias de Fatores de transcrição já relatados em arroz, sendo a Família C<sub>2</sub>-C<sub>2</sub> Dof, com um número de 30 desses fatores.

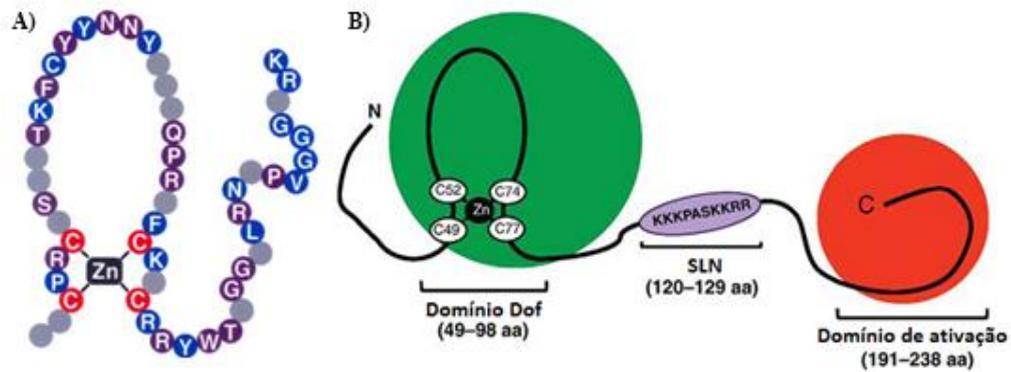
Fatores de Transcrição são elementos chave para estudar a expressão de genes envolvidos em diferentes rotas. Alguns FT Dof tem sido relatados por apresentarem regulação de genes relacionados a: assimilação de carbono (YANAGISAWA & SEEN, 1998; YANAGISAWA, 2000), sinalização de fitocromo (WARD et al., 2005), maturação da semente e germinação (GUALBERTI et al., 2002), resposta à auxina (BAUMANN &

GUALBERTI, 1999), resposta ao ácido salicílico (KANG et al., 2003), funções da célula guarda estomática (PLESCH et al., 2001), florescimento fotoperiódico e biossíntese de glucosinolatos (SKYIRYCZ et al., 2006), abscisão de órgãos florais (WEI et al., 2010), repressor transcricional do crescimento dependente de nutrientes (SUGIYAMA et al., 2012), entre outras funções.

Yanagisawa (2000) verificou que o ZmDof1, um FT de milho, é um ativador da expressão de vários genes associados ao metabolismo de ácidos orgânicos. Em estudos posteriores, verificou que a superexpressão do ZmDof1 aumentou a produção de esqueletos de carbono e a assimilação de N em plantas submetidas a tratamento de baixa disponibilidade desse nutriente (YANAGISAWA, 2004). Santos et al., (2012), estudaram a superexpressão do ortólogo do ZmDof1 em arroz (OsDof25 – LOC\_08g38220) em *Arabidopsis thaliana* sob alta dose de N, e verificaram que houve um aumento na expressão de enzimas do metabolismo de N e C. Yanagisawa et al., (2004b) expressando ZmDof1 em *A. thaliana*, verificaram aumento no conteúdo de Glutamina e Glutamato e uma redução brusca dos conteúdos de Sacarose. A Glutamina Sintetase (GS), é uma das enzimas chave na EUN, é ela a responsável pela assimilação do N inorgânico em esqueletos de carbono (XU et al., 2012). A superexpressão de GS está associada a aumento do crescimento em tabaco (MIGGE et al., 2000).

Wang et al. (2013) superexpressaram Dof1, GS1 e GS2 de *Arabidopsis* em tabaco, obtendo bons resultados na EUN, sob condições de baixo N, além de maior expressão e atividade de GS, PK e PEPC. Kurai et al. (2011) verificaram aumento na atividade de três isoformas de PEPC (OsPpc1, OsPpc2, OsPpc3), Malato desidrogenase dependente de NADP (NADP-MDH) e aumento no conteúdo de 2-oxoglutarato (2-OG) e Isocitrato, ao superexpressar o ZmDof1 em arroz sob o promotor de Ubiquitina de milho (ZmUbi-1). Ao contrário dos resultados obtidos em *Arabidopsis* e arroz (YANAGISAWA 2004; KURAI et al., 2011), LIN et al. (2013) ao superexpressarem o ZmDof1 em Choupo-tremedor (*Populus tremula*) verificaram certa redução na expressão dos genes de Piruvato quinase (PK) e Fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), além de redução no tamanho das plantas modificadas geneticamente, quando comparadas à planta controle não-transgênica, mesmo quando os genes analisados possuíam os motivos de ligação do ZmDof1. Isso mostra que pode haver diferenças metabólicas entre plantas perenes e anuais ou concorrência pelo sítio de ligação.

Zhang et al., (2015) verificaram que o fator de transcrição, o qual nomearam OsDof25, segundo nomenclatura proposta por Lijavetzky et al., 2003 (gene de referência: LOC\_09g29960), controla a expressão da Piruvato Ortófosfato Diquinase citoplasmática em arroz (CyPPDK). Este fator de transcrição refere-se ao OsDof26, seguindo a nomenclatura dada pelo Banco de dados de fatores de transcrição de plantas (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>), que é a nomenclatura que usamos. A enzima PPDK é uma enzima responsável pelo fornecimento de fosfoenolpiruvato (Piruvato +ATP + Pi → fosfoenolpiruvato (PEP)) ao metabolismo de carbono em plantas C<sub>4</sub>.



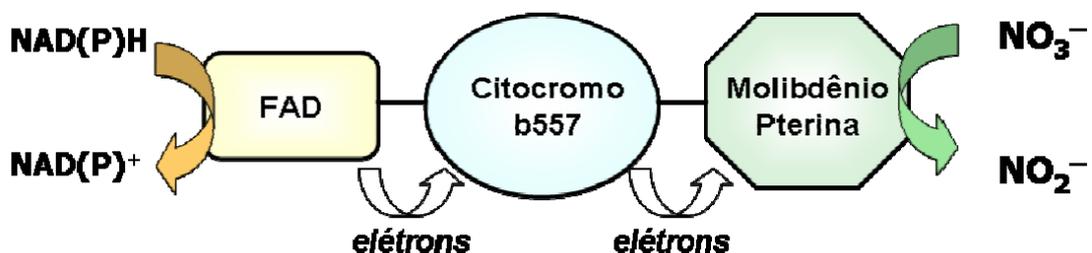
**Figura 2.** A) Modelo proposto por Yanagisawa (2004b) da estrutura do fator de transcrição do tipo Zinc Finger DNA-binding with one finger (zf-Dof), seu resíduo altamente conservado de cisteína (em vermelho), aminoácidos altamente conservados em todos os FT Dof conhecidos (em roxo), outros aminoácidos também conservados (em azul) e outros aminoácidos redundantes (em cinza). B) Estrutura do domínio Dof de um Fator de Transcrição do tipo Dof. Representada pela estrutura do Dof1 de milho ZmDof1 como exemplo. Adaptado de Yanagisawa, S. (2016).

## 2.2. Enzimas do Metabolismo de Nitrogênio

O nitrogênio não é só a substância estrutural mais importante, mas também a mais ativa e o componente principal de todas as enzimas (ZHAO et al., 1998). Entretanto, a forma de suprimento de N disponível no solo, não só afeta a formação de carboidratos, como também afeta a absorção de outros nutrientes. A Nitrato Redutase (NR), enzima chave na redução de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) pelas plantas, inicia o processo de assimilação. A Nitrato Redutase é induzida pela presença de  $\text{NO}_3^-$ , portanto a concentração interna deste nutriente pode ativar ou inibir a Atividade da Nitrato Redutase (ANR).

O  $\text{NO}_3^-$  após ser absorvido é transportado para o interior das células radiculares, e é reduzido a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) pela NR ao custo de dois elétrons transferidos das coenzimas NAD(P)H e um próton ( $\text{H}^+$ ), no citoplasma (

Figura 3).



**Figura 3.** Esquema da transferência de elétrons na enzima Nitrato redutase (SOUZA e FERNANDES, 2006).

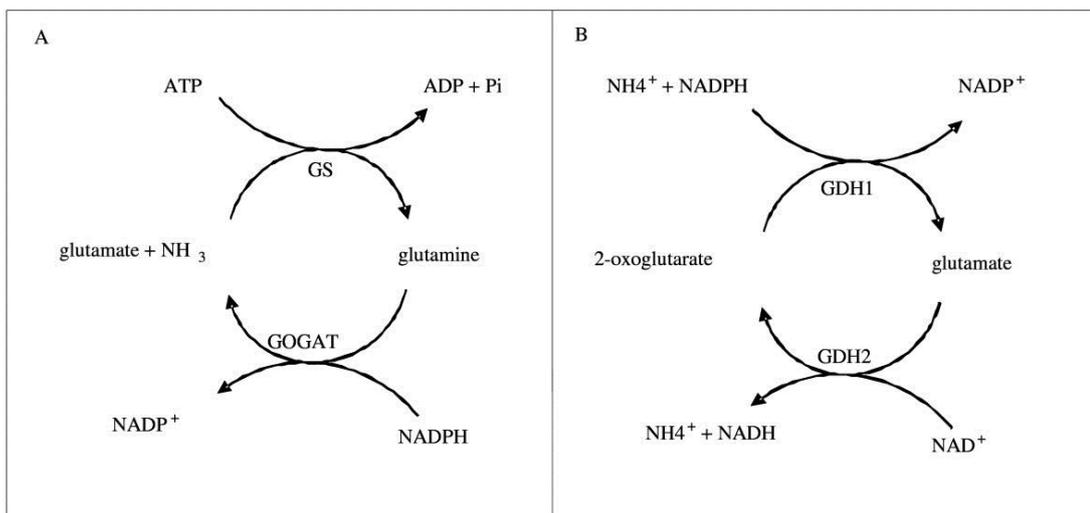
O  $\text{NO}_2^-$  é então enviado para os cloroplastos nas folhas ou plastídios, nas raízes, onde é reduzido a  $\text{NH}_4^+$ , ao custo de seis moléculas de Ferredoxina (Fd), reação esta catalizada pela enzima Nitrito Redutase (NiR).

Diversos fatores bióticos e abióticos que influenciam na atividade da enzima, como fitormônios, resposta a luz, metabólitos, baixa temperatura, seca, entre outros (YANAGISAWA, 2014). Isso significa que o controle pós-transcricional desta enzima é cuidadosamente controlado por proteínas kinases, fosfatases, proteína 14-3-3 e proteases.

Outro principal fator que regula os genes da NR é o  $\text{NO}_3^-$ , que age como molécula sinalizadora, iniciando uma cascata transcricional de genes relacionados à redução do  $\text{NO}_3^-$ , armazenamento ou assimilação (CRAWFORD, 1995). Além disso, outra função tem sido atribuída a esta enzima, que inclui a produção de óxido nítrico (NO), molécula sinalizadora essencial para a regulação da abertura e fechamento de estômatos, pela ação do ácido abscísico (ABA), resistência a patógeno, crescimento e desenvolvimento (GARCYA-MATA & LAMATTINA, 2003, DESIKAN, 2002; YAMASAKI & SAKIHAMA, 2000).

A atividade da enzima NR pode ser encontrada tanto em raízes quanto em folhas, principalmente quando  $\text{NO}_3^-$  é a principal fonte de N disponível. Em plantas  $\text{C}_4$ , a atividade de NR ocorre somente em células especializadas da bainha perivascular.

A via de assimilação do N na planta depende de várias enzimas. Sendo a Glutamina sintetase (GS), a Glutamato sintase (GOGAT) e a Glutamato desidrogenase (GDH), as principais. A Glutamina Sintetase é a principal via de assimilação do  $\text{NH}_4^+$  em plantas (HIREL & GADAL, 1980), formando Glutamina + ADP + Pi a partir de uma molécula de Glutamato + ATP (Figura 4). Há duas isoformas de GS, uma localizada no citossol (GS1) e outra localizada nos plastídeos (GS2). A isoforma GS1 é codificada por uma família multigênica, contendo três a cinco genes, dependendo da espécie (BERNARD et al., 2008), enquanto a isoforma GS2 é codificada por um único gene (LEA & IRELAND, 1999).



**Figura 4.** Representação esquemática do ciclo GS-GOGAT mostrando a assimilação do nitrogênio (A) e (B) mostrando a atividade de aminação e desaminação da GDH (HARPER et al., 2010).

A regulação dos genes da GS depende de diversos fatores, estágio de desenvolvimento, condições ambientais, fatores nutricionais. Em um estudo para verificar a expressão desses diferentes genes de GS, Hirel et al. 1982 verificaram baixa ou nenhuma atividade de GS2 em folhas estioladas. Entretanto, quando os tecidos tornaram-se verdes novamente, verificaram que a atividade da GS2 voltou a ocorrer nos tecidos, enquanto que a atividade da GS1 diminuiu, sugerindo que a isoforma GS2 estaria ligada a tecidos fotossintéticos, enquanto que a GS1 deveria ser expressa de forma generalizada. A isoforma

GS1 é expressa principalmente em tecidos vasculares, assimilando o  $\text{NH}_4^+$  e transportando glutamina para diferentes tecidos através da planta.

Estudos que superexpressaram os genes da GS mostraram valores mais altos de biomassa, aumento do conteúdo de N no grão e assimilação do N. No entanto, outro estudo mostrou que existe uma regulação pós-traducional das isoformas de GS, o que sugere que sua superexpressão não alteraria a EUN (CAI et al., 2009). Wang et al., 2013 superexpressaram as isoformas GS1 e GS2, além de superexpressar o Dof1 de *Arabidopsis thaliana* (AtDof1) em tabaco, e verificaram aumento na altura de plantas, proteína solúvel, maior EUN, maior atividade da NR, Piruvato quinase (PK) e Fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), maior conteúdo de glicose, amido, glutamato e aminoácidos totais, mostrando que a superexpressão destes genes envolvidos diretamente no metabolismo de N e C podem ser o caminho para uma maior EUN.

A Glutamato sintase (GOGAT) trabalha em conjunto com a Glutamina sintetase, convertendo uma Glutamina + 2-OxG em duas moléculas de Glutamato, uma reinicia o ciclo da GS para formar Glutamina e a outra parte para outras vias metabólicas. Existem duas diferentes isoformas de GOGAT. Uma delas utiliza Ferredoxina reduzida (Fd-GOGAT) e a outra NADH (NADH-GOGAT). A isoforma Fd-GOGAT é encontrada principalmente em tecidos fotossintéticos, no estroma dos cloroplastos, enquanto que a NADH-GOGAT é encontrada principalmente em plastídios de tecidos não fotossintetizantes (SUZUKI et al., 1982; CHEN et al., 1990).

Da mesma forma como a falta de N no solo pode causar problemas clássicos como clorose, o excesso de  $\text{N-NH}_4^+$  na planta também pode causar problemas, como clorose. Em casos onde ocorre toxidez por excesso de  $\text{NH}_4^+$ , a atividade da enzima Glutamato desidrogenase (GDH) se eleva, auxiliando na proteção da planta contra toxidez por  $\text{NH}_4^+$ . Níveis elevados de N-amino também estão relacionados a fatores de estresse, como bloqueio de síntese de proteínas e degradação de proteínas, aumento de gasto energético e perda de biomassa (FERNANDES e ROSSIELLO, 1995). A Glutamato desidrogenase faz uma reação reversível de aminação do 2-OG, formando Glutamato, ou desaminação do Glutamato, formando 2-OG. Sabe-se que a atividade da GDH em arroz ocorre preferencialmente no sentido de desaminação, uma vez que seu  $K_m$  para o  $\text{NH}_4^+$  é de 5 a 70 mM e o da GS é de 50  $\mu\text{M}$  (LEA & MIFLIN, 1977).

### 2.3. Enzimas do Metabolismo de Carbono

A isocitrato desidrogenase é conhecida em duas isoformas, uma dependente de  $\text{NAD}^+$  (IDH) e a outra de  $\text{NADP}^+$  (ICDH). Ela é uma das enzimas chave na comunicação do metabolismo de Carbono com o metabolismo de Nitrogênio, pois sua reação fornece o 2-OG necessário para a assimilação do  $\text{NH}_4^+$  no sistema GS-GOGAT (HODGES et al., 2003). Kurai et al. (2011) e Santos et al (2012), ao superexpressarem o fator de transcrição ZmDof1 e OsDof25, respectivamente, em *Arabidopsis thaliana*, verificaram aumento na expressão gênica de isoformas de IDH e ICDH, PK e PEPC.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção das Sementes Transformadas

Das linhagens de arroz (*Oryza sativa* L.) superexpressando o fator de transcrição OsDof25 obtidas por SOUZA, V. M. (2014) foram selecionadas sementes de três (#5.1, L#9.6 e L#10.8), todas na terceira geração, que apresentaram crescimento e massa fresca (MF) equivalentes ao tipo selvagem (TS), segundo o autor.

#### 3.2. Preparo das Sementes e Cultivo

As sementes de arroz foram previamente descascadas e desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2%, mantidas sobre agitação por 10 minutos e álcool 70% por 30 segundos. A seguir foram lavadas várias vezes com água destilada auto-clavada para total retirada do hipoclorito de sódio e álcool 70%. Para igualar a germinação, as sementes foram transferidas para placas de petri contendo agar-agar 4% e solução de giberelina 0,1mM pH 7,0. Ao emitirem o epicótilo e apresentar presença de clorofila, foram lavadas novamente com água destilada para retirada do resíduo do gel contendo giberelina e foram transferidas uma a uma para potes contendo água destilada cobertos com gaze.



**Figura 5.** (A) Placa de Petri contendo meio semi-sólido com ágar-ágar a 4% e giberelina 0,1mM pH 7,0.(B) Sistema de obtenção de plântulas em pote contendo água destilada, antes de serem transferidas para os potes definitivos. (C) Potes definitivos com plantas aos 30 DAG.

O cultivo foi realizado em câmara de crescimento no Depto. de Solos da UFRRJ onde as plantas foram submetidas a fotoperíodo de 14h/10h (luz/escuro) com luminosidade de  $400\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (fluxo de fótons fotossintéticos), umidade relativa do ar de 70% e temperatura  $28^{\circ}\text{C}/24^{\circ}\text{C}$  (diurna/noturna).

#### 3.3. Análise das Frações Solúveis

As amostras coletadas foram armazenadas em etanol 80%, trituradas e homogeneizadas para filtração. O líquido filtrado foi particionado com clorofórmio (FERNANDES, 1984). A fração solúvel obtida será utilizada para análise de  $\text{N-NO}_3^-$  (MIRANDA et al., 2001),  $\text{N-NH}_4^+$  (FELKER et al., 1977), N-Amino livre (YEMM & COCKING, 1955) e Açúcares solúveis (YEMM & WILLIS, 1957).

#### 3.4. Extração de Proteína

As amostras de tecido foram maceradas em  $\text{N}_2$  líquido e homogeneizadas em tampão de extração na proporção 3:1 (tampão:amostra). O tampão é composto por Tris-HCl pH 8,0;

1,0 mM de EDTA, 1,5% de polivinil polipirrolidona (PVPP), 10mM de dithiothreitol (DTT), 30% de glicerol e 1mM de phenilmethyl sulfonil fluoridio (PMSF). O homogenato foi centrifugado a 14.000g por trinta minutos e o sobrenadante será armazenado em freezer -80°C para posterior análise. O conteúdo de proteína foi determinado de acordo com protocolo descrito por BRADFORD (1976), usando albumina de soro bovino como padrão.

### **3.5. Atividade das Enzimas do Metabolismo de N e C**

As amostras coletadas foram armazenadas em nitrogênio líquido para análise da atividade das enzimas do metabolismo de nitrogênio: Nitrato Redutase (JAVROSKY, 1973), Glutamina sintetase (FARNDEN & ROBERTSON, 1980), Glutamato sintase (SCHIAVON et al., 2008) e Glutamato desidrogenase (SCHIAVON et al., 2008). E do metabolismo de Carbono, NAD<sup>+</sup>-Isocitrato desidrogenase e NADP-Isocitrato desidrogenase (TURANO et al., 1996).

### **3.6. Atividade da Nitrato Redutase (NR)**

A atividade foi feita *in vivo*, obtendo-se 0,1g em pequenos cortes de material vegetal, imergindo-os em solução incubadora contendo tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M, NaOH 0,1M, n-propanol 3% (v/v), KNO<sub>3</sub> 0,3 (p/v), pH 7,5. O material vegetal permaneceu imerso nesta solução por uma hora à 30°C. Em seguida, uma alíquota de 0,4mL foi transferida para tubo de ensaio contendo sulfanilamida 1% (p/v) em HCl (3M) para parar a atividade da enzima e após agitação, n-naftil-etileno-diamino 0,02% (p/v) foi adicionada para dar a coloração, antes da leitura, 4mL de água ultrapura foi adicionada, seguida de outra agitação. A leitura da atividade foi feita em espectrofotômetro à 540nm.

### **3.7. Atividade de Glutamina Sintetase (GS)**

A atividade foi feita em 450 µL de uma solução contendo 50 mM de Imidazol-HCl pH 7,5; 5 mM de hidroxilamina neutralizada com Tris; 20 mM de MgCl<sub>2</sub>; 25 mM de L-glutamato; 5 mM de β-mercaptoetanol e 5 mM de Adenosina trifosfato (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 totalizando 500 µL de reação, e conduzida a 30°C por 30 minutos. A reação foi paralisada 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 – FeCl<sub>3</sub> preparada em HCl 0,5 Normal. O γ-glutamilhidroxamato (GHD) foi colorimetricamente determinado em λ=540 nm. A atividade de GS foi determinada pela concentração de GHD por mg de proteína por minuto.

### **3.8. Atividade de NADH-Glutamato Sintase (NADH-GOGAT)**

A atividade de Glutamato sintase foi feita como descrito por SCHIAVON et al., (2008). A atividade foi feita em ensaios contendo 25mM de Hepes-NaOH (pH 7,5), 2mM de L-glutamina, 1mM de ácido alfa-cetoglutarico, 0,1mM de NADH, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA e 100uL de extrato de enzima em 1,1mL de volume final. A atividade de GOGAT foi medida espectrofotometricamente pelo monitoramento da oxidação de NADH a 340nm.

### **3.9. Atividade de Glutamato Desidrogenase (GDH) Aminoação e Desaminoação**

A atividade foi feita como descrito por TURANO et al. (1996). Na reação de aminoação, a atividade da GDH foi determinada em 500 µL de solução contendo 100mM de

Tris-HCl pH 8,0; 50 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 13 mM de  $\alpha$ -cetoglutarato; 0,25 mM de NADH; 1mM de  $\text{CaCl}_2$  e 50 $\mu\text{g}$  de proteína. A reação foi iniciada com a adição da proteína e a cinética da atividade foi determinada em dois minutos com registro a cada 5 segundos. A atividade foi expressa pela taxa de decréscimo da densidade óptica com o tempo a 340 nm.

Na reação de desaminação, a atividade da GDH foi determinada em 500  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 100mM de Tris-HCl pH 9,3; 35mM de L-glutamato; 0,25mM de  $\text{NAD}^+$ ; 1mM de  $\text{CaCl}_2$  e 50 $\mu\text{g}$  de proteína. A reação foi iniciada com a adição da proteína e a cinética a semelhante à da reação de aminação. A atividade então é expressa pela taxa de alteração da densidade óptica pelo tempo a 340 nm.

### **3.10. Atividade de $\text{NAD}^+$ -Isocitrato Desidrogenase e $\text{NADP}^+$ -Isocitrato Desidrogenase**

A atividade da Isocitrato Desidrogenase  $\text{NADP}^+$ -dependente foi feita como descrito por SCHIAVON et al. (2008). A atividade foi determinada em 500 $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 88 mM de Imidazol-HCl pH 8,0, 3,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,41 mM de  $\text{NADP}^+$ , 0,55 mM de isocitrato de sódio e 50  $\mu\text{g}$  de proteína. A reação foi disparada com a adição da proteína e uma cinética foi feita a cada 5 segundos durante dois minutos. A atividade da Isocitrato Desidrogenase  $\text{NAD}^+$ -dependente foi determinada em 500 $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 88 mM de Imidazol-HCl pH 8,0, 3,5mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,41 mM de  $\text{NAD}^+$ , 0,55 mM de isocitrato de sódio e 50  $\mu\text{g}$  de proteína. A atividade será expressa pela taxa de acréscimo da densidade óptica a 340 nm pelo tempo.

### **3.11. Análise da Imunodeteção da Proteína contra o Tag de HA Fusionado ao Gene *OsDof25***

Plantas de arroz foram germinadas e cultivadas conforme descrito no item 3.2. Aos 4 DAG foram transferidas para potes de 0,7L contendo solução de Hoagland a  $\frac{1}{4}$  FI modificada contendo 2,0mM de  $\text{NO}_3^-$  e aos 7 DAG, para solução de Hoagland a  $\frac{1}{2}$  FI modificada contendo 2mM de  $\text{NO}_3^-$ . Aos 15 DAG, as plantas foram coletadas e separadas em raízes e folhas. Foram congeladas em  $\text{N}_2$  líquido imediatamente para posterior análise.

#### **3.11.1. Extração de proteína nuclear**

Amostras de raízes de plântulas de arroz com 15 DAG, crescidas em solução de Hoagland modificada para 2,0mM de  $\text{NO}_3^-$  a  $\frac{1}{2}$  força iônica foram coletadas, congeladas em  $\text{N}_2$ -líquido e armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$  até o uso.

Amostras de aproximadamente 1,0g de raízes foram maceradas com almofariz e pistilo em  $\text{N}_2$ -líquido até a formação de um pó fino, em seguida foi adicionado 0,9 mL do tampão de extração composto por: 62,5 mM de Tris-HCl pH 7,4, 2mM de EDTA pH 7,4, 10% (v/v) glicerol, 0,1% SDS, 5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME), 1mM de PMSF e coquetel de inibidores de protease (Sigma P9599) de acordo com a recomendação do fabricante. O  $\beta$ -ME, PMSF e coquetel de inibidores foram adicionados no momento da extração. O homogenato foi novamente macerado, adicionado 18 mg de PVPP (1,5% m/v) e macerado por mais 30 segundos de forma vigorosa. O homogenato foi então transferido para tubos falcon de 50mL contendo uma malha de 100 micras, para retirada da maior parte de compostos sólidos e centrifugado a 14.000.g por 10min para remoção da fase sólida. Essa etapa foi novamente repetida com duas malhas, para uma maior limpeza do extrato. Em seguida foi feita quantificação da proteína pelo método de Bradford (1970) usando albumina de soro bovino como padrão.

### 3.11.2. Preparo da amostra e eletroforese

Amostras de 20 µg de proteína total foram misturadas na proporção 1:1 (v/v) em tampão de amostra 2X composto por: 125mM de Tris-HCl pH 6,8, 20% (v/v) glicerol, 4% SDS, 10% β-mercaptoetanol e 0,01% de azul de bromofenol. A mistura foi imediatamente aquecida a 85°C durante três minutos. Uma breve centrifugação a 17.000xg foi aplicada para precipitação de materiais insolúveis na amostra. As amostras foram aplicadas em mini-gel TGX 10% (BioRad®) no aparato mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad®) a 100V por 90 min. Foi utilizado o marcador *Magic Mark XP Western Protein* (Thermo Fischer®) que pode ser detectado por quimioluminescência.

### 3.11.3. Transferência e imunoblotting

A transferência das proteínas do gel para membrana PVDF foi realizada usando o kit *mini PVDF transfer pack* (BioRad®) no equipamento Trans-Blot Turbo (BioRad®) durante 3 min a 2,5 A constante. Após a transferência, o imunoblotting foi realizado usando o dispositivo *iBind Western System* (Life Technologies®) seguindo as recomendações do fabricante. Foi utilizado o anticorpo primário contra o tag de HA produzido em camundongo na diluição de 1:1.000 (1µg/mL) e o anticorpo secundário contra o IgG de camundongo produzido em cabra conjugado com a peroxidase (HRP) na concentração de 1:10.000 (0,1 µg/mL). A detecção por quimioluminescência foi realizada usando o kit *SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fischer®) seguindo as recomendações do fabricante.

### 3.12. Extração de RNA Total

O RNA total foi extraído utilizando tampão NTES (0,2 M de Tris-Cl pH 8,0; 25 mM de EDTA pH8; 0,3 M de NaCl; 2% de SDS). Amostras de folha e raiz foram maceradas em N<sub>2</sub> e homogeneizadas em uma mistura contendo 600µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e 800µL de tampão NTES por 10 minutos em vortex. Após centrifugação a 18.000g por 20 minutos a 4°C o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e novamente centrifugado por 20 minutos com 500µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Após o procedimento, o RNA total foi precipitado pela adição de 1/10 volume de acetato de sódio 3M pH 4,8 (NaOAc<sub>DEPC</sub>) e 1 volume de isopropanol puro. A seguir a mistura foi mantida a -80 °C por 1 hora seguida de centrifugação a 18.000g por 20 min. Descartado o sobrenadante o precipitado foi lavado em etanol 70% e centrifugado a 18.000g por 10 minutos. O precipitado foi solubilizado em 400µL H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> e novamente precipitado com 400µL de cloreto de lítio 4 M pH 4,8 (LiCl<sub>DEPC</sub>) durante 16 horas a 4°C. Decorrido esse período a solução foi centrifugada a 18.000g por 20 minutos e o precipitado foi novamente solubilizado em 450µL H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>. Após a completa dissolução foi adicionado 50µL acetato de sódio 3M pH 4,8 (NaOAc<sub>DEPC</sub>) e 1000µL etanol absoluto. A mistura foi mantida por 60 minutos a -80 °C e centrifugada a 18.000g por 20 min. O precipitado foi lavado com etanol 70% e após a secagem solubilizado em 30µL de H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> e armazenamento a -80°C.

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

### 3.12.1. Tratamento com DNase I e síntese do cDNA e PCR em tempo real

Meio micrograma de RNA total foram tratados com DNase (“*DNase I Amplification Grade – Invitrogen™*”) seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente foi preparada uma solução estoque de 10µL com concentração de 0,5 µg/ µL, padronização das amostras. Um micro litro de solução representado 0,5µg de RNA foram misturados com 0,5µL do tampão de reação da DNase I 10X, 0,5 µL da DNase I e avolumado para 5µL. A incubação da reação foi conduzida a 25 °C por 15 min, seguida da adição de 0,5 uL de EDTA 25 mM (Solução de parada) e posterior inativação da DNase I a 70 °C por 10 minutos. A reação de síntese do cDNA foi realizada com o kit “*High Capacity RNA to cDNA kit*” (Applied Biosystem®) seguindo as instruções do fabricante.

O gene da Actina (*OsActin 1*) e do fator de alongamento  $\alpha$  (*OseEF-1 $\alpha$* , *Eukaryotic elongation factor1-alpha*) foi utilizado como padrão interno nas reações de PCR devido a sua maior estabilidade em diferentes tecidos (JAIN et al., 2006). As reações foram efetuadas no aparelho “*StepOne Real-Time PCR System*” (“*Applied Biosystems®*”) utilizando o “*kit Power SYBR® Green PCR Master Mix*” (“*Applied Biosystems*”) seguindo as recomendações do fabricante. Todas as reações foram feitas em duplicata.

A reação foi montada em placas de PCR da seguinte maneira: 4µL do tampão “*Power SYBR Green PCR Master Mix*” 2X, 2µL de uma solução de “*primers*” 3,6 µM cada e 2µL do cDNA diluído, com volume final de 8µL. A placa foi selada com filme ótico apropriado, agitada por três minutos em vórtex próprio e centrifugada a 3.000g por 3 min a 25 °C. Cada reação foi realizada da seguinte maneira: dez minutos a 95°C, quarenta ciclos de amplificação com 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto. Uma curva de dissociação (“*melting*”) foi adicionada à programação para identificar possíveis amplificações inespecíficas. A especificidade dos “*primers*” foi analisada por alinhamento das seqüências nos bancos de dados (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e pelo programa OligoAnalyser 1.2 fornecido gratuitamente no site <http://www.genelink.com/tools/gl-downloads.asp>.

### 3.12.2. Desenho dos iniciadores (“primers”) para os estudos de expressão gênica

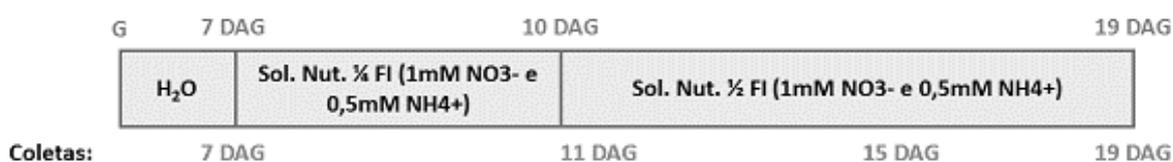
Foram desenhados “*primers*” para o estudo da expressão circadiana do Fator de Transcrição *OsDof25* e os genes de referência Actina1 (*OsActin 1*) e Fator de alongamento (*OseEF1- $\alpha$* ) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Sequências dos “*primers*” para os genes do Fator de Transcrição *OsDof25*, Fator de Alongamento 1- $\alpha$  (*eEF1- $\alpha$* ) e Actina1 como gene controle endógeno usados nas reações de PCR em tempo real.

Gene	Forward Primer
<i>OsDof25</i>	5'-ACTCGTTCACGGACCTCCT-3'
<i>eEF1-<math>\alpha</math></i>	5'-TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT-3'
<i>OsActin 1</i>	5'-CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA-3'
Gene	Reverse Primer
<i>OsDof25</i>	5'-CTTGGTGATGGACGGGTAGT-3'
<i>eEF1-<math>\alpha</math></i>	5'-GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA-3'
<i>OsActin 1</i>	5'-TAGCAGCATGAAGATCAAGGTGGTCG-3'

### 3.13. Experimento I: Análise Fenotípica das Raízes de Arroz Superexpressando o Fator de Transcrição *OsDof25*

Foi conduzido um experimento para avaliar as diferenças fenotípicas entre as raízes das linhagens superexpressando os *OsDof25* e as plantas não transformadas. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento conforme descrito no item 4.2. Aos 4 DAG, recebendo solução nutritiva de Hoagland modificada contendo 1,5mM de N, sendo (1mM de  $\text{NO}_3^-$  e 0,5mM de  $\text{NH}_4^+$ )  $\frac{1}{4}$  de FI e aos 7 DAG foram transferidas para potes contendo 0,6L de solução nutritiva de Hoagland modificada contendo 1,5mM de N, sendo (1mM de  $\text{NO}_3^-$  e 0,5mM de  $\text{NH}_4^+$ )  $\frac{1}{2}$  de FI (Figura 6). Foram feitas coletas a cada 4 dias e as plantas foram armazenadas em tubos falcon contendo 50mL de etanol 50% para posterior análise das raízes por meio de escaneamento pelo software WinRhizo Arabidopsis®, 2012b (Régent Instruments, Quebec, Canadá Inc.).



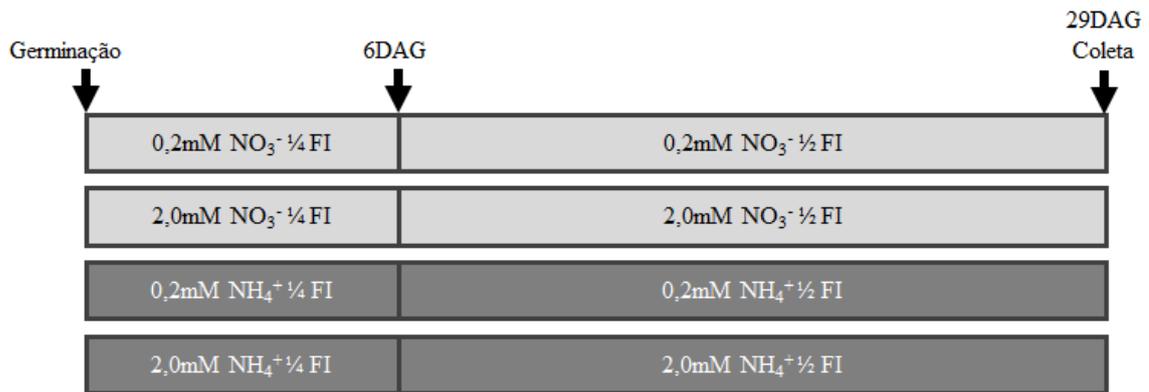
**Figura 6.** Croqui do experimento: Análise Fenotípica das Raízes de Arroz Superexpressando o Fator de Transcrição *OsDof25*.

O sistema radicular de uma plântula de arroz, foi uniformemente distribuído em uma lâmina de água em uma bandeja transparente de acrílico 30 cm (20 cm) e a digitalização da plântula com uma resolução de 600 dpi (pontos por polegada) com um sistema de digitalização Epson Expression 10000XL com uma unidade de luz adicional (TPU) (TAVARES, 2014), foi quantificado um total de 18 diferentes características de raízes: comprimento (mm), área de projeção ( $\text{mm}^2$ ), área de superfície ( $\text{mm}^2$ ), diâmetro médio (mm) e volume ( $\text{mm}^3$ ). Também foram definidos e medidos: Comprimento (mm), área de projeção ( $\text{mm}^2$ ), área de superfície ( $\text{mm}^2$ ), volume ( $\text{mm}^3$ ), dentro das classes de raízes muito finas ( $0,5 < x < 1,5$  milímetros), fino ( $1,5 < x < 3,5$  milímetros) e grossas ( $x > 3,5$  milímetros).

Após a avaliação da morfologia e fenotipagem radicular, as plantas coletadas foram armazenadas em sacos de papel e postas para secar em estufa de circulação forçada a  $40^\circ\text{C}$  para análise da produção de massa seca e relação raiz/parte aérea.

### 3.14. Experimento II: Análise do Metabolismo Primário em Resposta ao Nitrato e ao Amônio em Baixa e Alta doses

Para avaliar o metabolismo primário das plantas transformadas superexpressando o Fator de Transcrição *OsDof25* contra o arroz tipo selvagem, variedade Nipponbare, foi conduzido experimento em câmara de crescimento, sob duas fontes ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ) em baixa e alta dose desses nutrientes (0,2 e 2,0mM) (Figura 7). Sementes de arroz foram postas para germinar segundo o item 3.2 e aos 4 DAG, receberam solução nutritiva de Hoagland a  $\frac{1}{4}$  FI com diferentes fontes ( $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) e doses (0,2 ou 2,0mM). Aos 6 DAG, foram transferidas para potes contendo 0,6L de solução nutritiva de Hoagland a  $\frac{1}{2}$  FI, seguindo o mesmo padrão de tratamentos até a coleta aos 29 DAG. O pH da solução foi corrigido antes da troca para 5,5 no tratamento com  $\text{NO}_3^-$  e 6,0 no tratamento com  $\text{NH}_4^+$ . A solução foi renovada em dias alternados.



**Figura 7.** Análise do Metabolismo Primário em Resposta ao Nitrato e ao Amônio em Baixa e Alta doses. Em cinza claro, tratamentos utilizando  $\text{NO}_3^-$  como fonte de N e em cinza escuro, tratamentos utilizando amônio como fonte de N.

### 3.15. Experimento III: Análise do metabolismo de Nitrogênio e Carbono em resposta à aplicação de Amônio em baixa e alta dose

Para avaliar a resposta metabólica das linhagens superexpressando OsDof25 em relação ao  $\text{NH}_4^+$ , sementes das linhagens #5.1 e #9.6, contrastantes segundo o experimento II (item 4.2), foram postas para germinar segundo o item 3.2 e aos 6 DAG, receberam solução nutritiva de Hoagland modificada para 2,0mM de  $\text{NO}_3^-$  a 1/4 FI. Aos 8 DAG, foram transferidas para potes de 0,7L contendo 0,6L de solução nutritiva de Hoagland modificada para 2,0mM de  $\text{NO}_3^-$  a 1/2 FI, pH 5,8. A solução era renovada a cada três dias.

Aos 26 DAG, as plantas receberam a mesma solução nutritiva, porém sem nenhuma fonte de N, e permaneceram nesta condição por quatro dias. Neste tempo, apenas água destilada era adicionada, para manter o nível de solução. Aos 30 DAG, as plantas foram ressupridas com solução nutritiva, porém modificada para 0,2mM (baixa dose) ou 2,0mM (alta dose) de  $\text{NH}_4^+$ , pH 6,0. A coleta foi feita três horas após ressuprimento com a nova solução nutritiva, a fim de avaliar a resposta do metabolismo de N e C à aplicação de  $\text{NH}_4^+$  (Figura 8).

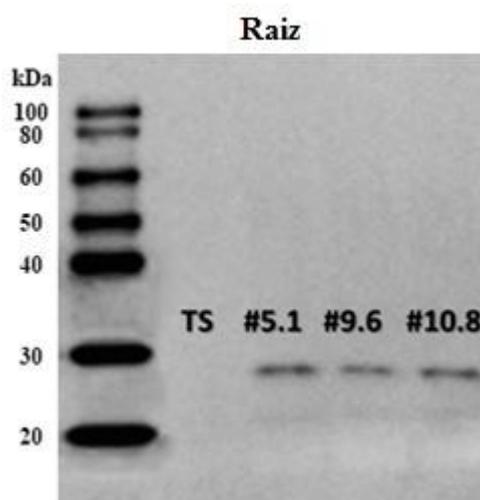
G	5 DAG	8 DAG	26 DAG	30 DAG
$\text{H}_2\text{O}$	2,0mM $\text{NO}_3^-$ 1/4 FI	2,0mM $\text{NO}_3^-$ 1/2 FI	Sem N	0,2mM $\text{NH}_4^+$ 1/2 FI
$\text{H}_2\text{O}$	2,0mM $\text{NO}_3^-$ 1/4 FI	2,0mM $\text{NO}_3^-$ 1/2 FI	Sem N	2,0mM $\text{NH}_4^+$ 1/2 FI

**Figura 8.** Croqui do experimento de Análise do metabolismo de Nitrogênio e Carbono em resposta à aplicação de Amônio em baixa e alta dose.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Análise de Imunodeteção da Proteína *OsDof25* Contra o Tag de Hemaglutinina

A proteína do Fator de Transcrição *OsDof25* é uma proteína de baixo peso molecular, com aproximadamente 28,85kDa. Ao gene foram fusionados três vezes o gene da Hemaglutinina Gripe Humana (Tag de HA). A análise descrita no item 3.11.3, o anticorpo se liga à proteína contendo o Tag de HA, emitindo o sinal detectado pelo equipamento de fotodocumentação. Nesta análise foi detectado o sinal da proteína nas raízes de arroz, confirmando a transformação da planta (Figura 9).



**Figura 9.** Análise de Western-blot em raízes de linhagens de arroz superexpressando o fator de transcrição *OsDof25* (#5.1, #9.6 e #10.8) e o tipo selvagem por meio da detecção do TAG-3xHA fusionado ao gene do Fator de Transcrição *OsDof25*.

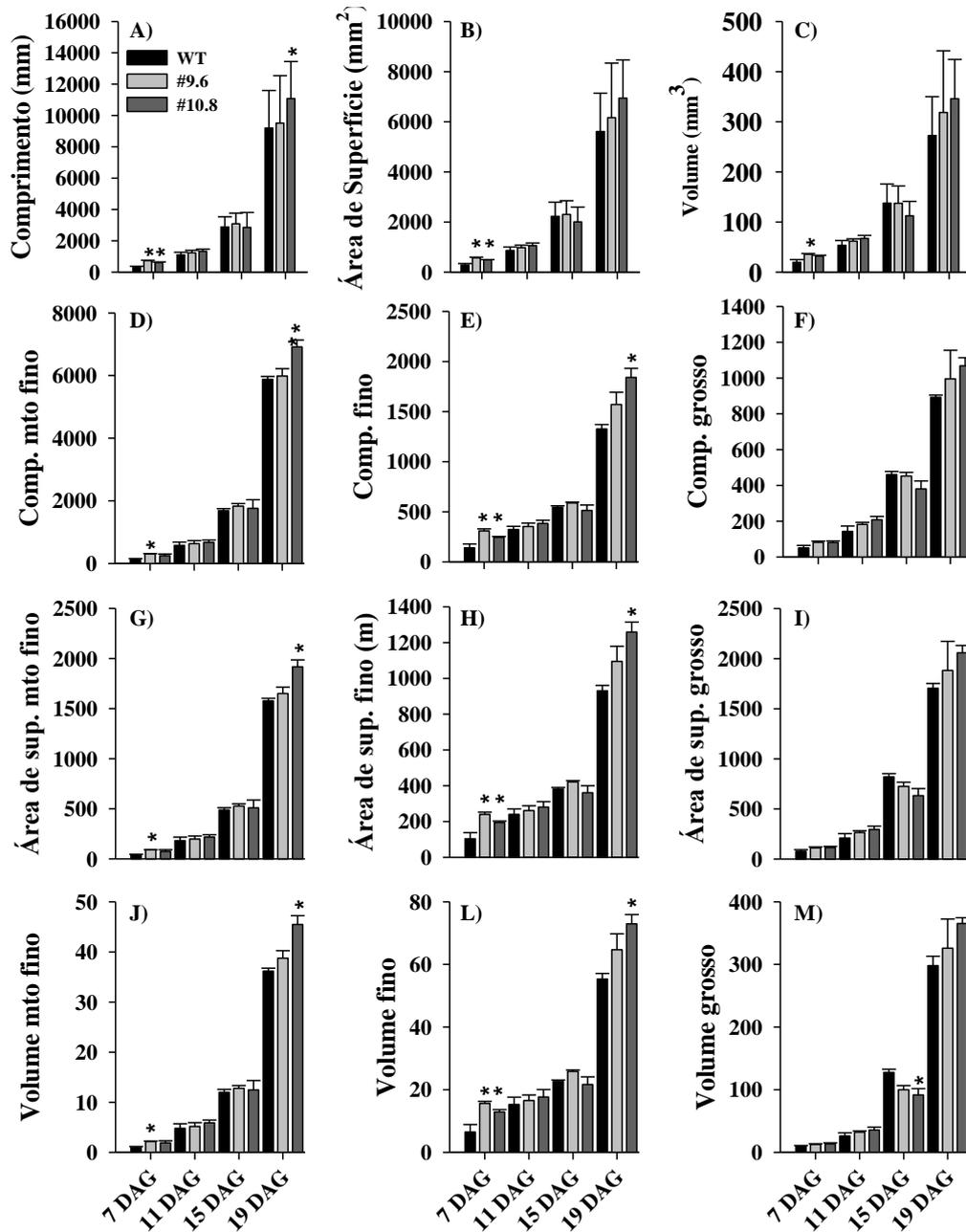
### 4.2. Experimento I: Análise Fenotípica das Raízes de Arroz Superexpressando o Fator de Transcrição *OsDof25*

O sistema radicular é responsável pela exploração do solo e pela aquisição de nutrientes e água. O desenvolvimento desse sistema geralmente é avaliado pelo seu comprimento, área de superfície e volume, características dependentes das condições do solo (Taiz & Zeiger, 2003). Como um sistema, há diferentes tipos de raízes e com diferentes funções (Nielsen et al., 1999). Raízes grossas, tem a principal função de fixação do vegetal no solo, enquanto que raízes finas e muito finas tem função de absorção de água e nutrientes. O desenvolvimento do sistema radicular pode ser afetado quando um determinado nutriente demanda grande quantidade de esqueletos de carbono para assimilação. É o caso do  $\text{NH}_4^+$ , que precisa ser rapidamente assimilado e a maior parte deste, é assimilado ainda na raiz (Ge et al., 2000).

O experimento de análise fenotípica das raízes das plantas transformadas superexpressando o fator de transcrição *OsDof25* (Figura 6) mostrou padrão diferencial principalmente na linhagem #10.8, que apresentou maior comprimento em geral, e também quando separadas em classes, maior desenvolvimento de raízes muito finas e finas (Fig. 10 A, D e E).

Os dados para área de superfície e volume radicular também foi maior na linhagem #10.8 (Fig. 11, G, H, J, L). Um maior desenvolvimento radicular é uma característica

favorável, pois é uma característica que favorece a captação de nutrientes e água no solo (SMITH et al., 2005).



**Figura 10.** Comprimento, área de superfície e volume de raízes de plantas de arroz em diferentes coletas. Gráficos A, B e C são médias gerais das três características avaliadas. Outros gráficos mostram diferentes classes de cada característica. Barras representam erro padrão de três repetições. Asteriscos representam diferença entre as linhagens e o tipo selvagem com teste de Dunnett a 5% de significância.

### 4.3. Experimento II: Análise do Metabolismo Primário em Resposta ao Nitrato e ao Amônio em Baixa e Alta doses (Figura 11)

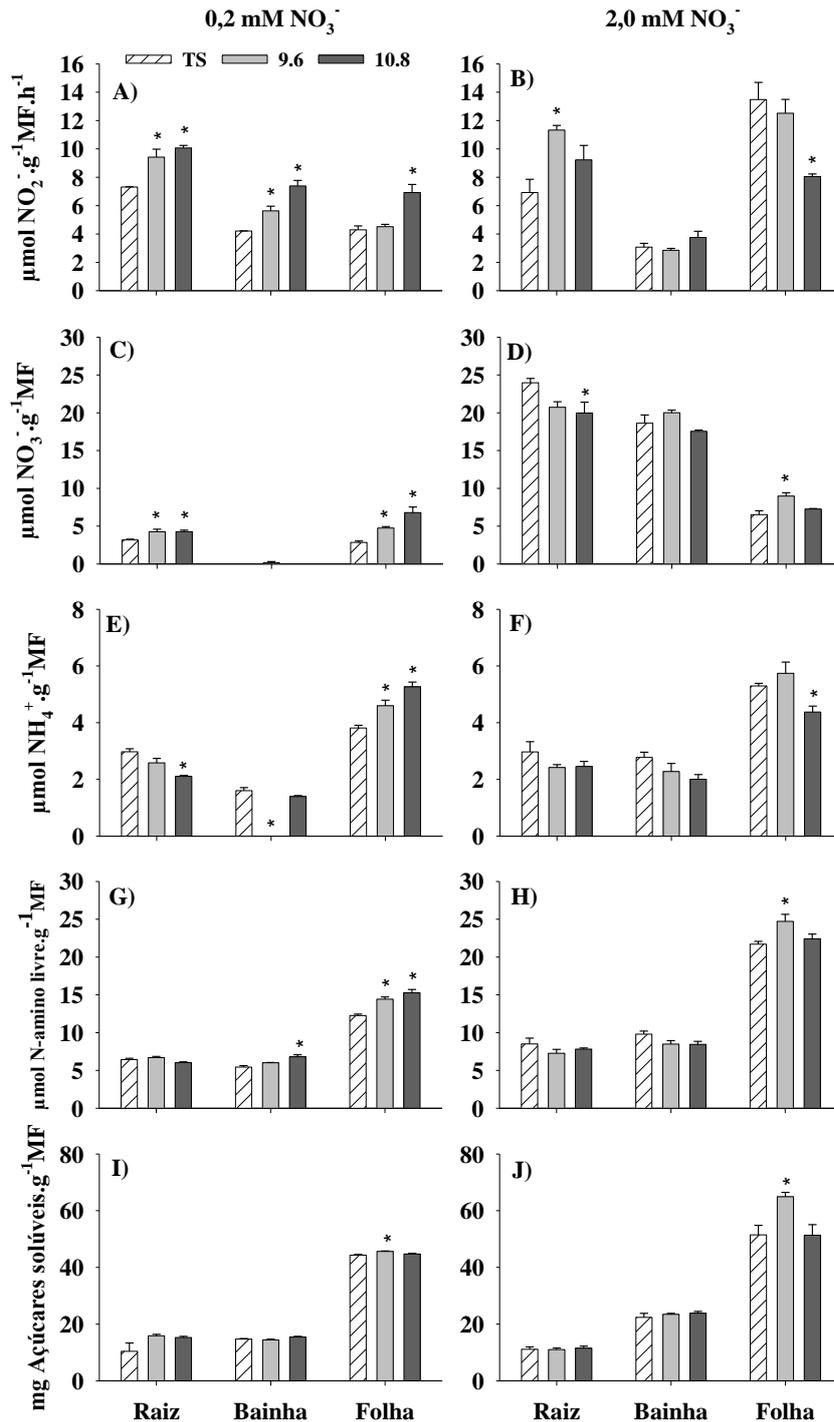
#### 4.3.1. Tratamento com $\text{NO}_3^-$

Os resultados obtidos em baixa dose mostraram que as linhagens superexpressando OsDof25 diferem do tipo selvagem em vários aspectos. A atividade da Nitrato Redutase (NR) nas plantas transformadas foi maior em todos os órgãos avaliados. A NR é a enzima responsável pela primeira etapa de assimilação do N e uma maior atividade desta enzima, indica que as plantas estariam reduzindo uma maior quantidade de  $\text{NO}_3^-$  para sua assimilação, uma vez que o  $\text{NO}_2^-$  e o  $\text{NH}_4^+$  precisam ser rapidamente assimilados (11 A).

Os teores de  $\text{NO}_3^-$  foram maiores também nas plantas transformadas. As bainhas são órgãos de acúmulo deste nutriente e como as plantas foram conduzidas em tratamento com baixa dose, as bainhas não apresentaram  $\text{NO}_3^-$  acumulado, ou seja, todo  $\text{NO}_3^-$  absorvido estava sendo enviado para as folhas, para assimilação (Figura 11 C) Silva, R (2012), trabalhando com plantas de arroz superexpressando o fator de transcrição OsDof25 também encontrou valores mais altos de teores de  $\text{NO}_3^-$ , em tratamento constante com 1,5 mM de  $\text{NO}_3^-$ , assim como também os teores de  $\text{NH}_4^+$ . Os teores de  $\text{NH}_4^+$  foram mais elevados nas folhas, mostrando que grande parte deste nutriente foi translocado para assimilação na parte aérea, para assimilação. Da mesma maneira, os teores mais altos de N-amino livre, foram encontrados nas folhas, órgão responsável pela síntese de carboidratos provenientes da fotossíntese (Figura 11 G) Diferentemente do dados encontrados por Santos, L. (2009), trabalhando com Arabidopsis superexpressando o FT OsDof25, os teores de açúcares solúveis não decresceram quando os teores de N-amino livre aumentaram.

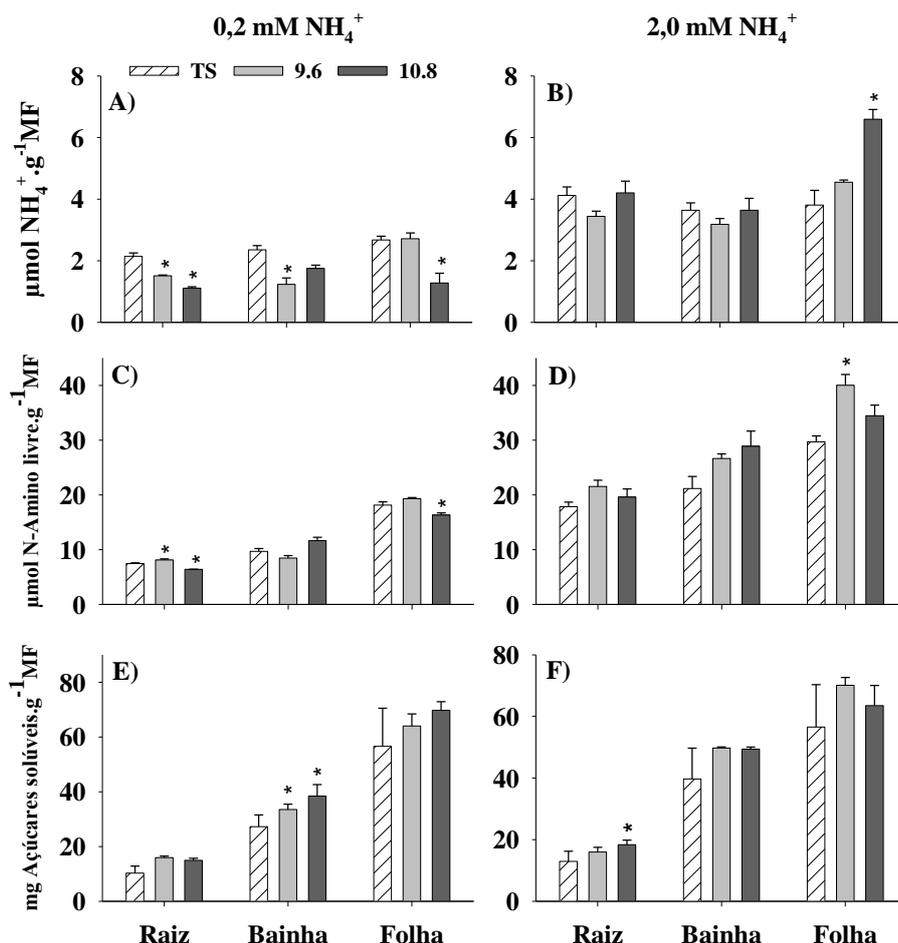
Silva (2012) também não verificou diferença nos teores de açúcares solúveis, quando as linhagens transformadas superexpressando o FT OsDof25 apresentaram teores de N-amino livre o tratamento constante, tais resultados concordam com o encontrado por Fernandes (1990), já que as doses utilizadas para a condução do experimento não foram altas o suficiente para causar qualquer sintoma de estresse por excesso de N. Os teores de açúcares solúveis não apresentaram grande diferença entre linhagens e o tipo selvagem, com exceção da linhagem #9.6 que apresentou pouca diferença estatística, no entanto, tal diferença torna-se insignificante metabolicamente para determinar qualquer vantagem desta linhagem sobre o tipo selvagem (Figura 11 I). O tratamento de alta dose não mostrou grandes diferenças quando comparado ao tipo selvagem.

O tratamento com amônio em baixa dose apresentou teores de  $\text{NH}_4^+$  mais baixo nas plantas transformadas mas ao mesmo tempo, mostrou teores de N-amino livre mais altos, nas raízes, o que mostra uma maior atividade de assimilação deste nutriente neste órgão (Figura 12 A). No tratamento de alta dose, a linhagem #10.8 apresentou teores de N- $\text{NH}_4^+$  muito elevados, quando comparado com o tipo selvagem e a outra linhagem transformada. Apresentando um comportamento inverso com o tratamento de baixa dose, onde apresentou menores teores deste metabólito nas folhas. Porém este nível alto de  $\text{NH}_4^+$  não se refletiu em diferença estatística quando analisados os teores de N-amino livre nem açúcares solúveis (Figura 12 D e F). Por outro lado, o tratamento com  $\text{NO}_3^-$  deveria apresentar níveis de açúcares solúveis mais altos, devido a baixa produção de N-amino, quando comparado com o tratamento de  $\text{NH}_4^+$  (Figuras 12 e 13).



**Figura 11.** Atividade da Nitrato Redutase (A, B), Teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (C, D), N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (E, F), N-amino livre (G, H) e Açúcares Solúveis (I, J) em plantas de arroz cv. Nipponbare: duas linhagens de arroz superexpressando o fator de transcrição OsDof25 (#9.6 e #10.8) e o tipo selvagem (TS) sob tratamento constante em baixa e alta dose de nitrato (0,2 mM e 2,0 mM). Barras representam o erro padrão da média de três repetições. Asteriscos representam diferença entre as linhagens e o tipo selvagem com teste de Dunnett a 5% de significância.

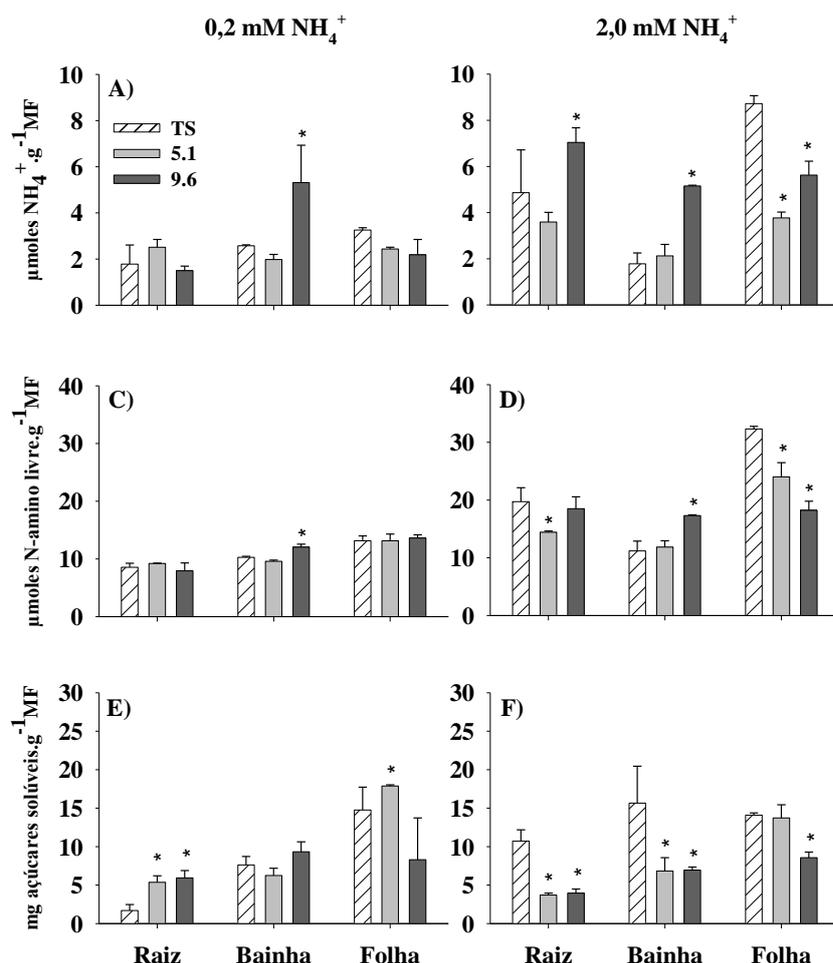
### 4.3.2. Tratamento com $\text{NH}_4^+$



**Figura 12.** Teores de  $\text{NH}_4^+$  (A, B), Teores de N-amino livre (C, D), e Açúcares Solúveis (E, F) em plantas de arroz cv. Nipponbare: duas linhagens de arroz superexpressando o fator de transcrição OsDof25 (#9.6 e #10.8) e o tipo selvagem (TS) sob tratamento constante em baixa e alta dose de nitrato (0,2mM e 2,0mM). Barras representam o erro padrão da média de três repetições. Asteriscos representam diferença entre as linhagens e o tipo selvagem com teste de Dunnett a 5% de significância.

### 4.4. Experimento III: Análise do metabolismo de nitrogênio e carbono em resposta à aplicação de amônio em baixa e alta dose

Os resultados de teor de amônio mostraram que em baixa dose, acúmulo deste nutriente é igual em todas as partes das plantas. Em alta dose, houve diferença na bainha (B), onde a linhagem #9.6 se destaca. No entanto, nas folhas (C), as linhagens transformadas apresentaram teores mais baixos de  $\text{NH}_4^+$ . Estes resultados concordam com os valores obtidos na análise de N-amino livre (Figura 13 C e E). A maior parte do amônio é assimilado nas raízes, os resultados para folhas indicam maior assimilação nas plantas transformadas.



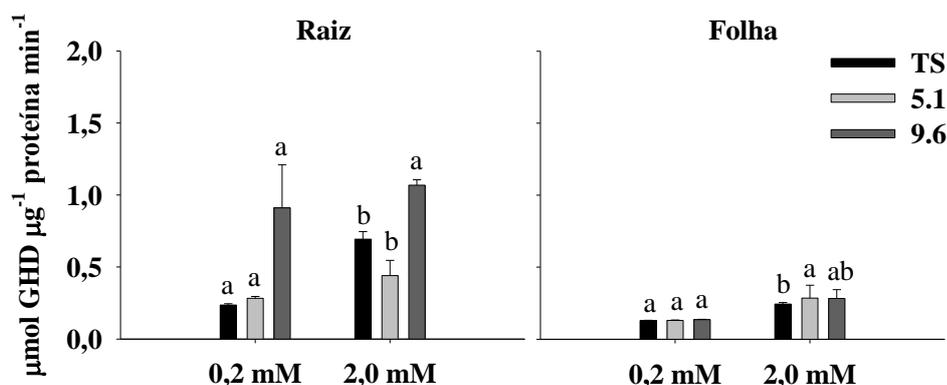
**Figura 13.** Teores de  $\text{N-NH}_4^+$ , N-amino livre e Açúcares solúveis em diferentes partes de linhagens de arroz superexpressando o Fator de Transcrição OsDof25 e o Tipo Selvagem, ressupridas com baixa (0,2mM) ou alta dose (2,0mM) de  $\text{NH}_4^+$ . Barras representam o erro padrão da média de três repetições. Letras representam diferença entre as linhagens e o tipo selvagem com teste de Dunnet a 5% de significância.

Os teores de N-amino livre em baixa dose de N mostraram diferença principalmente na bainha, que é um órgão de acúmulo de nutrientes. A bainha também mostrou teores comparáveis de N-amino livre em ambos os tratamentos. Ambos seguindo o mesmo padrão, onde a linhagem #9.6 mostrou teores mais altos deste metabólito. Nas folhas, o tipo selvagem mostrou teores mais altos de N-amino livre, quando comparados às linhagens transformadas. Os teores de N-amino livre nas folhas (Figura 13 F), mostrou diferenças, onde a linhagem #9.6 mostrou teores superiores deste metabólito, no tratamento de baixa dose.

As raízes também mostraram maior conteúdo de N-amino livre quando comparada aos outros órgãos analisados, uma vez que o  $\text{NH}_4^+$  é assimilado rapidamente nas raízes. Os níveis de N-amino encontrados nas plantas transformadas foi inferior ao encontrado no tipo selvagem. As raízes das plantas transformadas mostraram maiores teores e maior conteúdo de açúcares solúveis em baixa dose, quando comparadas com o tipo selvagem. Em alta dose, ocorre o contrário, onde o tipo selvagem mostrou maiores teores deste metabólito. Nas folhas, houve diferença no tratamento de alta dose, onde o tipo selvagem e a linhagem #5.1 mostraram maiores teores de açúcares solúveis.

#### 4.4.1. Atividade de glutamina sintetase

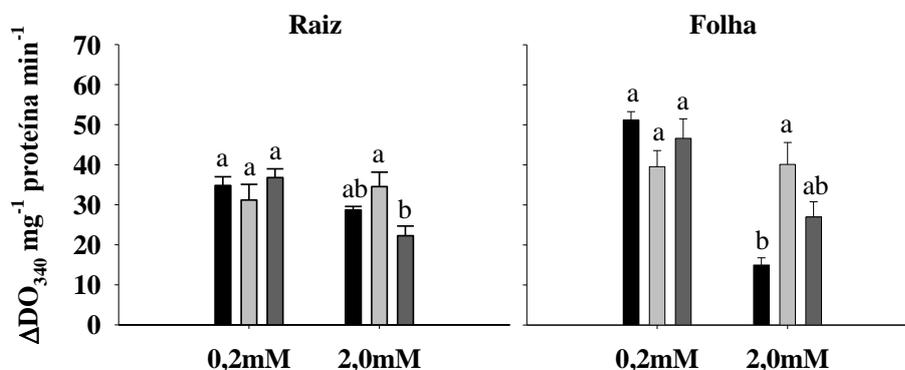
Os resultados de atividade da Glutamina sintetase mostraram diferenças no tratamento de alta dose em ambos órgãos analisados. As linhagens transformadas tiveram maior atividade desta enzima. A atividade da glutamina sintetase mostra a capacidade da planta assimilar o  $\text{NH}_4^+$  absorvido, fixando-o numa molécula de glutamato. SOUZA (2014) também encontrou maior atividade de GS nas plantas transformadas superexpressando o Fator de Transcrição OsDof25, ao submetê-las a tratamento de alta dose constante de  $\text{NH}_4^+$ . Os resultados obtidos para Atividade de GS e NADH-GOGAT concordam com os teores e conteúdo de  $\text{NH}_4^+$  e N-amino livre (Figura 14). As raízes são órgãos principais para assimilação do  $\text{NH}_4^+$  absorvido.



**Figura 14.** Atividade de Glutamina Sintetase em diferentes partes de arroz superexpressando o Fator de Transcrição OsDof25 e o tipo selvagem, ressupridas com baixa dose (0,2mM) ou alta dose (2,0mM) de  $\text{NH}_4^+$ . Barras representam o erro padrão da média de três repetições. Letras representam diferença entre as linhagens e o tipo selvagem com teste de Tukey a 5% de significância.

#### 4.4.2. Atividade de NADH-glutamato sintase

Houve alta atividade de NADH-GOGAT no tratamento de baixa dose, porém sem diferença entre as plantas transformadas e o tipo selvagem (Figura 15). No tratamento de alta dose, houve diferença na raiz, onde a linhagem #5.1 mostrou maior atividade; já nas folhas, ambas plantas transformadas mostraram atividade superior comparadas ao tipo selvagem.

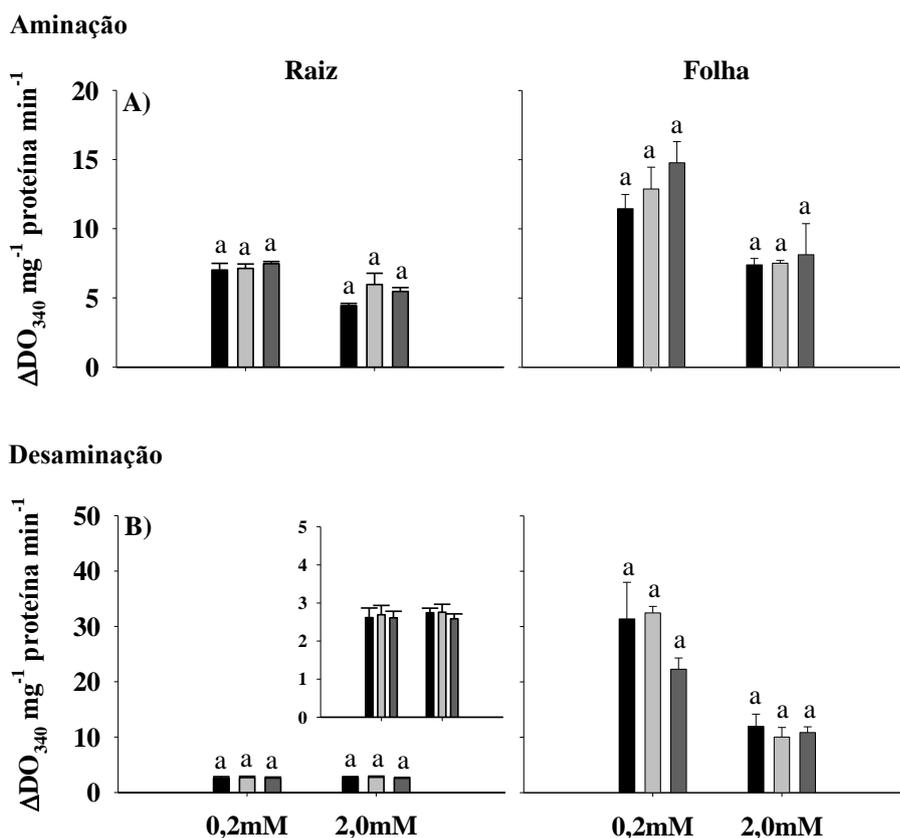


**Figura 15.** Atividade de Glutamato Sintase em diferentes partes de arroz superexpressando o Fator de Transcrição OsDof25 e o tipo selvagem, ressupridas com baixa dose (0,2mM) ou alta dose (2,0mM) de  $\text{NH}_4^+$ . Barras representam o erro padrão da média de três repetições. Letras representam diferença entre as linhagens e o tipo selvagem com teste de Tukey a 5% de significância.

A atividade de NADH-GOGAT está diretamente ligada ao metabolismo de carbono, dependendo diretamente do 2-OG para assimilação do  $\text{NH}_4^+$ . De forma interessante, as linhagens transformadas mostraram níveis de atividade desta isoforma de GOGAT, nas folhas, equiparando-se à atividade encontrada nas raízes. A isoforma NADH-GOGAT é encontrada principalmente em tecidos não fotossintéticos, enquanto que a isoforma Fd-GOGAT, que utiliza ferredoxina, é encontrada principalmente em tecidos fotossintéticos.

#### 4.4.3. Atividade de glutamato desidrogenase (GDH)

Os resultados não mostraram diferença entre as linhagens transformadas e o tipo selvagem para a GDH. Entretanto, houve maior atividade de GDH aminação nas folhas, no tratamento de baixa dose, enquanto que a atividade de GS neste órgão foi baixa. O mesmo padrão foi observado na atividade de Desaminação (Figura 16).



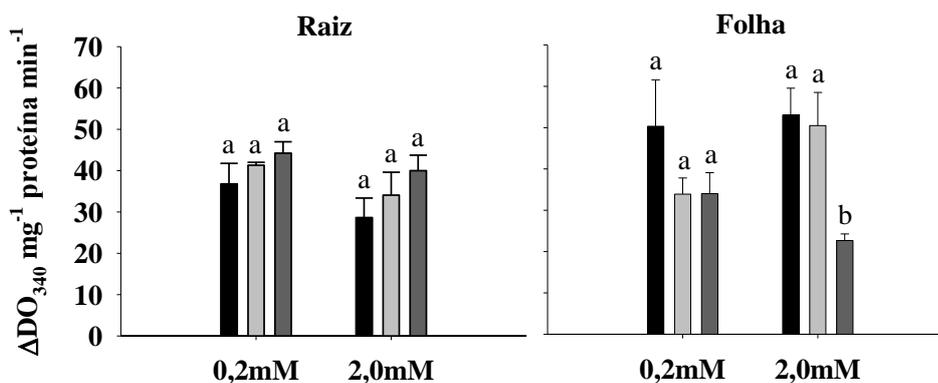
**Figura 16.** Atividades de Glutamato Desidrogenase em diferentes partes de arroz superexpressando o Fator de Transcrição OsDof25 e o tipo selvagem, ressupridas com baixa dose (0,2mM) ou alta dose (2,0mM) de  $\text{NH}_4^+$ . Atividade de Aminoação (A) e Desaminação (B). Barras representam o erro padrão da média de três repetições. Letras representam diferença entre as linhagens e o tipo selvagem com teste de Tukey a 5% de significância.

A atividade de GDH pode estar associada ao estresse nutricional por excesso, onde a planta se encontra com altos níveis de  $\text{NH}_4^+$  livre. Seu  $K_m$  para o  $\text{NH}_4^+$  é de 5 a 70mM e o da GS é de 50 $\mu$ M (LEA & MIFLIN, 1977). No entanto, foi encontrada atividade tanto de aminoação quanto desaminação nas plantas submetidas tanto ao tratamento de baixa dose, como no tratamento de alta dose. A atividade de aminoação está diretamente relacionada à

formação de Glutamato, que vem a suprir o sistema GS-GOGAT ou este pode ser translocado para via de síntese de outros aminoácidos por transaminases. A atividade de desaminação está relacionada à formação de 2-OG e de NA(P)H e o sentido de formação de 2-OG, está associado a estresse nutricional por excesso de  $\text{NH}_4^+$  disponível. No entanto, houve maior atividade de desaminação no tratamento de baixa dose. O que indica que a planta estava demandando 2-OG para outros processos metabólicos.

#### 4.4.4. Atividade de isocitrato desidrogenase $\text{NADP}^+$ dependente

Não houve diferenças na atividade de isocitrato desidrogenase na raiz, mas na folha, a linhagem #9.6 mostrou baixa atividade (Figura 17).



**Figura 17.** Atividade de Isocitrato Desidrogenase  $\text{NADP}^+$  dependente em diferentes partes de arroz superexpressando o Fator de Transcrição OsDof25 e o tipo selvagem, ressupridas com baixa dose (0,2mM) ou alta dose (2,0mM) de  $\text{NH}_4^+$ . Barras representam o erro padrão da média de três repetições. Letras representam diferença entre as linhagens e o tipo selvagem com teste de Tukey a 5% de significância.

Há duas isoformas de isocitrato desidrogenase, sendo uma delas dependente de  $\text{NAD}^+$  (IDH), encontrada exclusivamente nas mitocôndrias e outra isoforma dependente de  $\text{NADP}^+$  (ICDH), encontrada em diversos compartimentos celulares. A atividade da ICDH está relacionada ao suprimento do metabolismo de Nitrogênio com 2-OG e  $\text{NADPH}$ . Foi encontrada atividade da enzima nos dois órgãos analisados, sendo a folha com a atividade ligeiramente mais alta do que a raiz. A linhagem #9.6 teve menos atividade quando comparada às outras linhagens estudadas.

## 5. CONCLUSÕES

A superexpressão do Fator de Transcrição OsDof25 afetou positivamente o desenvolvimento radicular das linhagens #9.6 e #10.8.

As linhagens transformadas também apresentaram maior atividade da Nitrato Redutase, maiores teores de  $\text{NO}_3^-$ , N-amino e Açúcares solúveis no tratamento constante com  $\text{NO}_3^-$ . No tratamento com amônio, as plantas transformadas apresentaram menores teores deste nutriente, o que indica maior taxa de assimilação de N. Apesar do aumento no nível de N-amino, não houve queda nos teores de açúcares solúveis, o que indica maior suprimento de esqueletos de carbono para assimilação do nitrogênio disponível.

A superexpressão do Fator de Transcrição OsDof25 contribuiu para o aumento da atividade de Glutamina Sintetase nas raízes e nas folhas das plantas transformadas, no tratamento com alta dose de  $\text{NH}_4^+$ . As plantas transformadas também apresentaram maior atividade NADH-Glutamato Sintase nas folhas. Tais características podem estar relacionadas a uma maior assimilação de nitrogênio.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUMANN, K., GUALBERTI, G. The DNA-binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the rolB oncogene in plants. *Plant Cell* n.11, p.323-333, 1999.
- BARBER, S. A. Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach. **John Wiley & Sons**, 1995.
- BERNARD, S. M., MØLLER, A.L., DIONISIO, G., KICHEY, T., JAHN, T.P., DUBOIS, F., BAUDO, M., LOPES, M.S., TERCÉ-LAFORGUE, T., FOYER, C.H., PARRY, M.A., FORDE, B.G., ARAUS, J.L., HIREL, B., SCHJOERRING, J.K., HABASH, D.Z. Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Molecular Biology**, v. 67, n. 1-2, p. 89-105, 2008.
- 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.
- CAI, H., ZHOU, Y., XIAO, J., LI, X., ZHANG, Q., LIAN, X., Overexpressed glutamine synthetase gene modifies nitrogen metabolism and abiotic stress responses in rice. **Plant Cell Reports**, v. 28, n. 3, p. 527-537, 2009.
- CHASTAIN, C. J., FAILING, C. J., MANANDHAR, L., ZIMMERMAN, M. A., LAKNER, M. M., NGUYEN, TONY. H. Functional evolution of C4 pyruvate, orthophosphate dikinase. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 9, p. 3083–3091, 2011.
- CHEN, F. L., BENNETT, M. J., CULLIMORE, J. V. Effect of the Nitrogen Supply on the Activities of Isoenzymes of NADH-dependent Glutamate Synthase and Glutamine Synthetase in Root Nodules of *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Experimental Botany**, v. 14, ed. 10, p. 1215-1221, 1990.
- COOKSON, S. J.; WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. Light-dark changes in cytosolic nitrate pools depend on nitrate reductase activity in *Arabidopsis* leaf cells. **Plant Physiology**, v. 138, n. 2, p. 1097-1105, 2005.
- COOPER, G. M. *The Cell: A Molecular Approach* (2<sup>a</sup> ed.). Cap. 10: "The Chloroplast Genome". **ASM Press**. 2000.
- CRAWFORD, N. M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The plant cell**, v. 7, n. 7, p. 859, 1995.
- DELLEDONNE M, ZEIER J, MAROCCO A, LAMB C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, USA 98, 13454–13459, 2001
- DE NISI, P., G. ZOCCHI. "Phosphoenolpyruvate carboxylase in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots under iron deficiency: activity and kinetic characterization." **Journal of Experimental Botany** 51.352 : 1903-1909, 2000.

DESIKAN R, GRIFFITHS R, HANCOCK J, NEILL S. A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 25, p. 16314-16318, 2002.

EDWARDS G.E., FRANCESCHI V.R., VOZNESENSKAYA E.V. "Single-Cell C<sub>4</sub> Photosynthesis Versus The Dual-Cell (Kranz) Paradigm", **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, 173-196, 2004

FARN DEN, 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**, 1980.

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

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.

FERNANDES, M. S., ROSSIELLO, R. O. P. Mineral Nitrogen in Plant Physiology and Plant Nutrition, **Critical Reviews in Plant Sciences**, 14:2, 111-148, 1995.

GARCIA-MATA, C., GAY, R., SOKOLOVSKI, S., HILLS, A., LAMATTINA, L., BLATT, M. R. Nitric oxide regulates K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 19, p. 11116–11121, 2003.

GONZÁLEZ M.C., OSUNA L., ECHEVARRÍA C., VIDAL J., CEJUDO F.J. "Expression and localization of phosphoenolpyruvate carboxylase in developing and germinating wheat grains." **Plant Physiology** 116.4: 1249-1258, 1998.

FITZGERALD, M. A.; MCCOUCH, S. R.; HALL, R. D. Not just a grain of rice: the quest for quality. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 3, p. 133–139, 2009.

GE, Z.; RUBIO, G; LYNCH, J. P. The importance of root gravitropism for inter-root competition and phosphorous acquisition efficiency: Results from a geometric simulation model. **Plant and Soil**, v. 218, p. 159-171, 2000.

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

GUALBERTI G, PAPI M, BELLUCCI L, RICCI I, BOUCHEZ D, CAMILLERI C, COSTANTINO P, VITTORIOSO P. Mutations in the Dof zinc finger genes DAG2 and DAG1 influence with opposite effects the germination of *Arabidopsis* seeds. **Plant Cell**, n. 6, p. 1253-1263, 2002.

GUPTA, S., GUPTA, S. M., GUPTA, A. K., GAUR, V. S., KUMAR, A. Fluctuation of Dof1/Dof2 expression ratio under the influence of varying nitrogen and light conditions:

involvement in differential regulation of nitrogen metabolism in two genotypes of finger millet (*Eleusine coracana* L.). **Gene**, v. 546, n. 2, p. 327–335, 2014.

HARPER, C. J., HAYWARD, D., KIDD, M., WIID, I., HELDEN, P. Glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase are regulated in response to nitrogen availability in *Mycobacterium smegmatis*. **BMC microbiology**, v. 10, p. 138, 2010.

HIREL, B., GADAL, P. Glutamine Synthetase in Rice. **Plant physiology**, v. 66, n. 4, p. 619–623, 1980.

HIREL, B., VIDAL, J., GADAL, P. Evidence for a cytosolic-dependent light induction of chloroplastic glutamine synthetase during greening of etiolated rice leaves. **Planta**, v. 155, tópic 1, p. 17-23 (1982).

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., FLESCHE, V., GÁLVEZ, S., BISMUTH, E. Higher plant NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenases, ammonium assimilation and NADPH production. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 6-7, p. 577–585, 2003.

HOLSBECKS I, LAGATIE O, VAN NULAND A, VAN DE VELDE S, THEVELEIN JM. The eukaryotic plasma membrane as a nutrient-sensing device. **Trends in Biochemistry Science**, v. 29:556–64, 2004.

KANG, H. G., FOLEY, R.C., ONATE-SANCHEZ, L., LIN, C., SINGH, K.B. Target genes for OBP3, a Dof transcription factor, include novel basic helix–loop–helix domain proteins. **Plant Journal**, n. 35 p. 362–372, 2003.

KROUK, G., TILLARD, P., GOJON, A. Regulation of the high-affinity NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake system by NRT1.1-mediated NO<sub>3</sub><sup>-</sup> demand signaling in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 142, n. 3, p. 1075-1086, 2006.

KURAI, T., WAKAYAMA, M., ABIKO, T., YANAGISAWA, S., AOKI, N., OHSUGI, R. Introduction of the ZmDof1 gene into rice enhances carbon and nitrogen assimilation under low-nitrogen conditions. **Plant biotechnology journal**, 9(8), 826-837, 2011.

LEA, P. J., AZEVEDO, R. A. NITROGEN USE EFFICIENCY. 1. Uptake of nitrogen from the soil. **Annals of Applied Biology**, 149(3), 243-247, 2006.

LEA, P. J., IRELAND, R., "Nitrogen metabolism in higher plants." *Plant amino acids: Biochemistry and biotechnology*, 1-47, 1999.

LIJAVETZKY, D.; CARBONERO, P.; VICENTE-CARBAJOSA, J. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and Arabidopsis Dof gene families. **BMC evolutionary biology**, v. 3, n. July 2015, p. 17, 2003.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C., REISDORF-CREN, M., PAGEAU, K., LELANDAIS, M., GRANDJEAN, O., KRONENBERGER, J., VALADIER, M., FERAUD, M., JOUGLET, T.,

SUZUKI, A. Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. **Plant Physiology**, v. 140, n. 2, p. 444-456, 2006.

MIFLIN, B. J., LEA, P.J. Amino acid metabolism. **Ann. Rev. Plant Physiology**, n. 28 p. 299-329, 1977.

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, n. 2, p. 252-260, 2000.

MILLER, A. J., & CRAMER, M. D., Root nitrogen acquisition and assimilation. In *Root Physiology: from Gene to Function*, **Springer Netherlands** p. 1-36, 2005.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric oxide: **biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 5, n. 1, p. 62-71, 2001.

MORENO-RISUENOM. A., MARTÍNEZM., VICENTE-CARBAJOSAJ., CARBONERO P. The family of DOF transcription factors: From green unicellular algae to vascular plants. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 277, n. 4, p. 379-390, 2007.

NIELSEN, K. L.; MILLER, C. R.; BECK, D.; LYNCH, J. P. Fractal geometry of root system: Field observation of contrasting genotype of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under different phosphorous regimes. *Plant and Soil*, v. 206, p.181-190, 1999.

NOGUERO M., ATIF R.M., OCHATT S., THOMPSON R.D. "The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants, **Plant Science**, v.209, 32-45, 2013."

PAPAVASSILIOU A. G., Transcription Factor-Based Drug Design in Anticancer Drug Development. **Molecular Medicine**, v.3, n.12, p.799-810, 1997

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.

PÉREZ-RODRIGUES, P., RIAÑO-PANCHON, D. M., CORRÊA, L. G. G., RENSING, S. A., KERSTEN, B., MUELLER-ROEBER, B. PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acid Research*, n. 10, p. 1-6, 2009.

PLESCH, G., EHRHARDT, T., MUELLER-ROEBER, B. Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. **Plant Jn.** 28, p.455-464, 2001.

ROBERTSON, G. P., VITOUSEK, P. M. Nitrogen in Agriculture: Balancing the Cost of an Essential Resource. *Annual Review of Environmental Resources*. n. 34, p. 97-125, 2009.

RUEDA-LÓPEZ, M., GARCÍA-GUTIÉRREZ, A., CÁNOVAS, F. M., ÁVILA, C. The family of Dof transcription factors in pine. **Trees - Structure and Function**, v. 27, p. 1547–1557, 2013.

SANTOS, L. A.; DE SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. OsDof25 expression alters carbon and nitrogen metabolism in Arabidopsis under high N-supply. **Plant Biotechnology Reports**, v. 6, p. 327–337, 2012.

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** 56.24: 11800-11808, 2008.

SETIÉN, I., VEGA-MAS, I., CELESTINO, N., CALLEJA-CERVANTES, M. E., GONZÁLEZ-MURUA, C., ESTAVILLO, J. M., GONZÁLEZ-MORO, M. B. Root phosphoenolpyruvate carboxylase and NAD-malic enzymes activity increase the ammonium-assimilating capacity in tomato. **Journal of plant physiology**, v. 171, n. 5, p. 49-63, 2014.

SILVA, R.A.C. Efeito da superexpressão do Fator de Transcrição OsDof25 sobre a Eficiência de Absorção de Nitrogênio em Oryza sativa L. 2012. 68f. (Dissertação de Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo) Seropédica- RJ; UFRRJ.

SHIGYO, M., Tabei, N., YONEYAMA, T., YANAGISAWA S., Evolutionary processes during the formation of the plant-specific Dof transcription factor family. *Plant Cell Physiology*, n. 48, p. 179-185, 2007.

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 Letters**, v. 430, n 3, p. 251-256, 1998.

SKIRYCH, A., REICHEL, M., BUROW, M., BIRKEMEYER, C., ROLCIK, J.; DOF transcription factor AtDOF1.1 (OBP2) is part of a regulatory network controlling glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis. **Plant Journal**; n. 47, p. 10–24, 2006.

SOUZA, S. R., STARK, E. M. L. M., FERNANDES, M. S., MAGALHÃES, J. R., Effect of supplemental nitrogen on nitrogen-assimilation enzymes, free amino nitrogen, soluble sugars, and crude protein of rice. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 30:5-6, 711-724, 1999.

SOUZA, S. R., FERNANDES, M. S., Nutrição Mineral de Plantas, Ed. UFV, capítulo 9, p. 216-251, 2006.

SOUZA, V.M. Caracterização Funcional do OsDof25 e Seus Efeitos Sobre o Metabolismo de Nitrogênio e Carbono em Arroz. 2014. 135f. (Tese de doutorado em Fitotecnia) Seropédica- RJ; UFRRJ.

SPERANDIO, M. V. L., SANTOS, L. A., ARAÚJO, O. J. L., BRAGA, R. P., COELHO, P. C., NOGUEIRA, E. M., FERNANDES, M. S., SOUZA, S. R., Response of nitrate transporters and PM H<sup>+</sup>-ATPase expression to nitrogen flush on two upland rice varieties

contrasting in nitrate uptake kinetics. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 4, p. 568-576, 2014.

SUGIYAMA, T., ISHIDA, T., TABEL, N., SHIGYO, M., KONISHI, M., YONEYAMA, T., YANAGISAWA, S.. Involvement of PpDof1 transcriptional repressor in the nutrient condition-dependent growth control of protonemal filaments in *Physcomitrella patens*. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 8, p. 3185–3197, 2012.

SUZUKI, A., VIDAL, J., GADAL, P., Glutamate synthase isoforms in rice. Immunological studies on enzymes in green leaf, etiolated leaf and root tissues. **Plant Physiology**, n. 70, p. 827-832, 1982.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant physiology*, Sunderland: Sinauer Associates, 2003. 690p.

TAVARES, O. C. H. Efeito dos Ácidos Húmicos Sobre as H<sup>+</sup>-ATPase, Transportadores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e N- NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, e Sobre o Crescimento em Arroz. 2014.100f. **Tese** (Doutorado em ciências). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

TURANO F.J., DASHNER R., UPADHYAYA A., CALDWELL C.R. "Purification of mitochondrial glutamate dehydrogenase from dark-grown soybean seedlings." **Plant Physiology** 112.3 (1996): 1357-1364.

WANG, Y., FU, B., PAN, L., CHEN, L., FU, X., LI, K. Overexpression of Arabidopsis Dof1, GS1 and GS2 enhanced nitrogen assimilation in transgenic tobacco grown under low-nitrogen conditions. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 31, n. 4, p. 886-900, 2013.

WARD, J. M., CUFR, C. A., DENZEL, M. A., NEFF, M. M. The Dof transcription factor OBP3 modulates phytochrome and cryptochrome signaling in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 17, n. 2, p. 475–485, 2005.

WEI, P.C., TAN, F., GAO, X.Q., ZHANG, X.Q., WANG, G.Q., XU, H., LI, L.J., CHEN, J., WANG, X.C.; Overexpression of AtDOF4.7, an Arabidopsis DOF family transcription factor, induces floral organ abscission deficiency in Arabidopsis. **Plant Physiol** n. 153, p. 1031–1045, 2010.

XU, G.; FAN, X.; MILLER, A. J. Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, n. December, p. 153–182, 2012.

YAMASAKI, H., SAKIHAMA, Y.. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. **FEBS Letters**, n. 468, p.89-92, 2000.

YANAGISAWA, S.; SHEEN, J. Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. **The Plant cell**, v. 10, n. 1, p. 75–89, 1998.

YANAGISAWA, S. Dof1 and DOF2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. **The Plant Journal**, 21(3), 281-288, 2000.

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, 2004a.

YANAGISAWA, S. DOF Domain Proteins: Plant-Specific Transcription Factors Associated with Diverse Phenomena Unique to Plants. **Plant Cell Physiol.**, v.45, n.4, p.386-391, 2004b.

YANAGISAWA, S. Plant Science Transcription factors involved in controlling the expression of nitrate reductase genes in higher plants. **Plant Science**, v. 229, p. 167–171, 2014.

YANAGISAWA, S., Structure, Function, and Evolution of the Dof Transcription Factor Family. *Plant Transcription Factors – Evolutionary, Structural and Function Aspects. Academic Press*, p.183-197.

YANG, X., TUSKAN, G. A., CHENG, Z. -M. Divergence of the Dof gene families in poplar, Arabidopsis, and Rice suggests multiple modes of gene evolution after duplication. **Plant Physiology**, n. 142, p. 820-830, 2006.

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

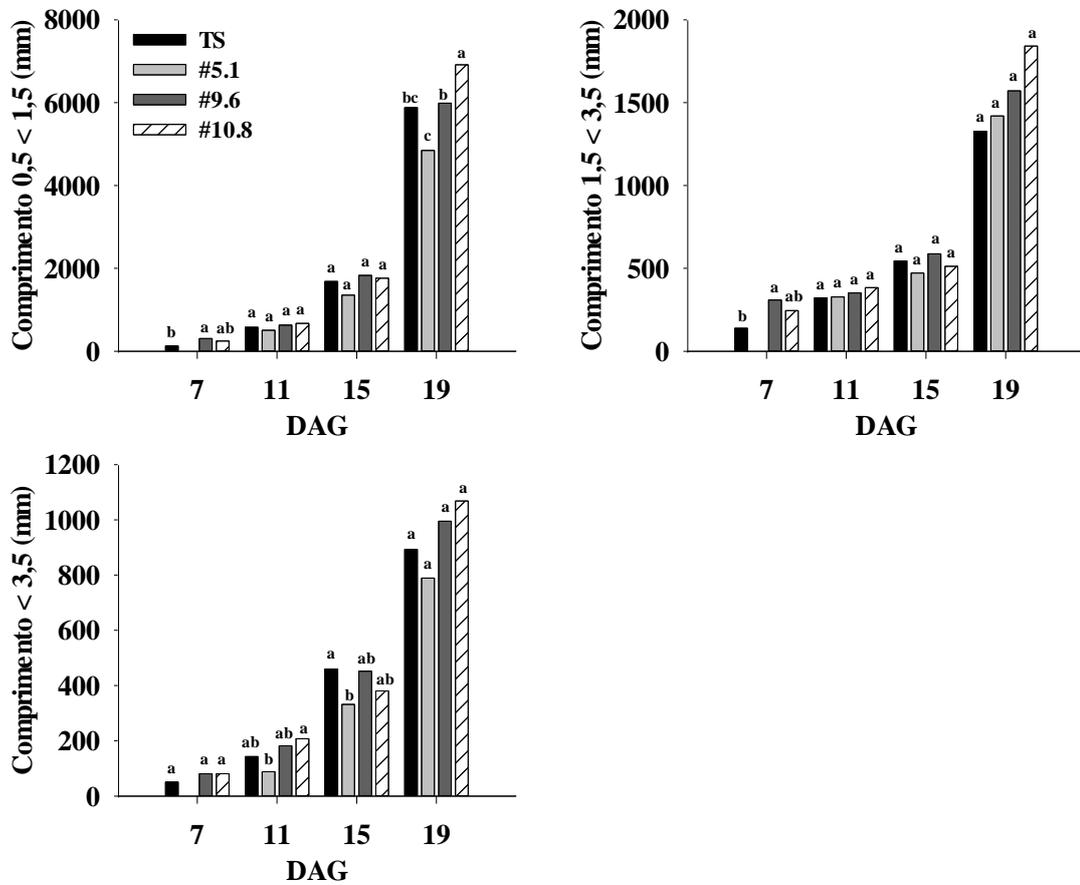
YEMM, E.W. & WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plants extracts by anthrone. **Biochemistry**, v.57, p.508-514, 1954.

ZHANG, Y., VERHOEFF, N., CHEN, Z., CHEN, S., WANG, M., ZHU, Z., OUWEKERK, P. B. Functions of OsDof25 in regulation of OsC<sub>4</sub>PPDK. **Plant Molecular Biology**, 2015.

ZHAO, P., SUN, G.C., PENG, S.L., Ecophysiological research on nitrogen nutrition of plants. **Ecol. Sci.** 17, 36–42, 1998.

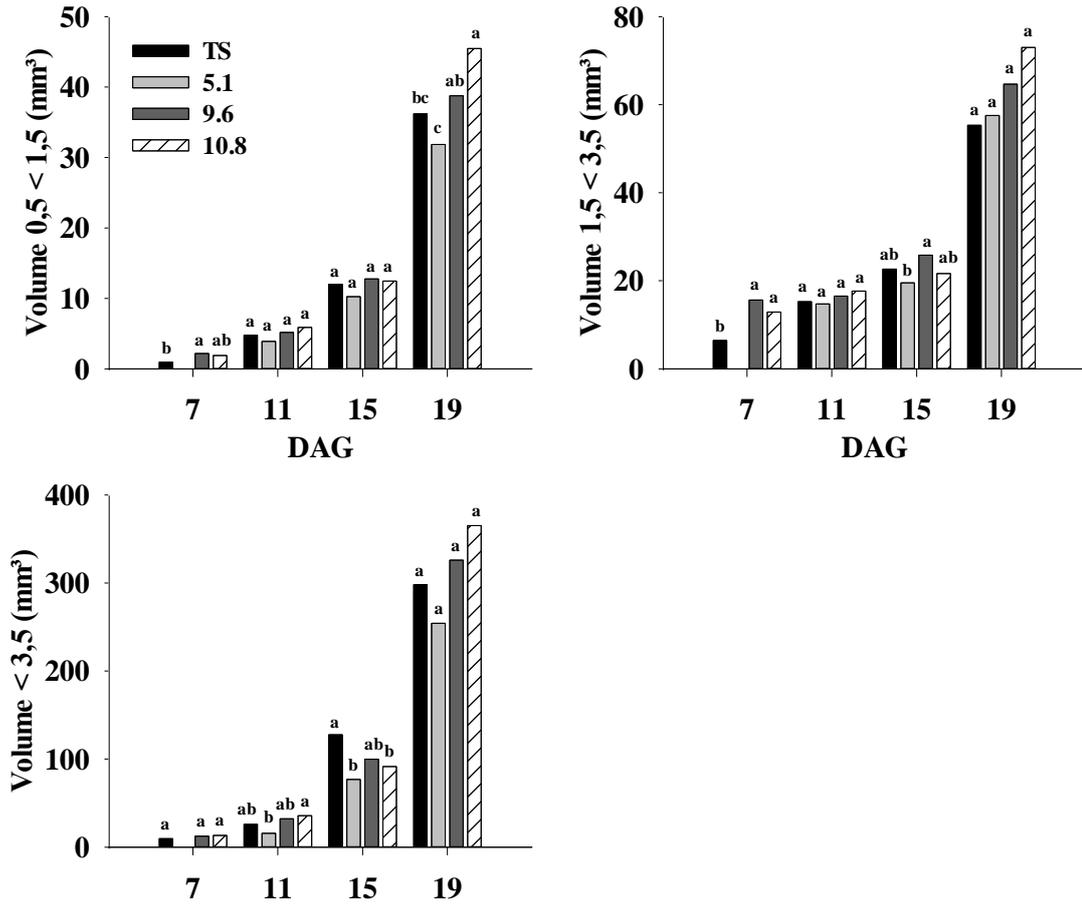
## 7. ANEXOS

### 7.1. Comprimento Radicular



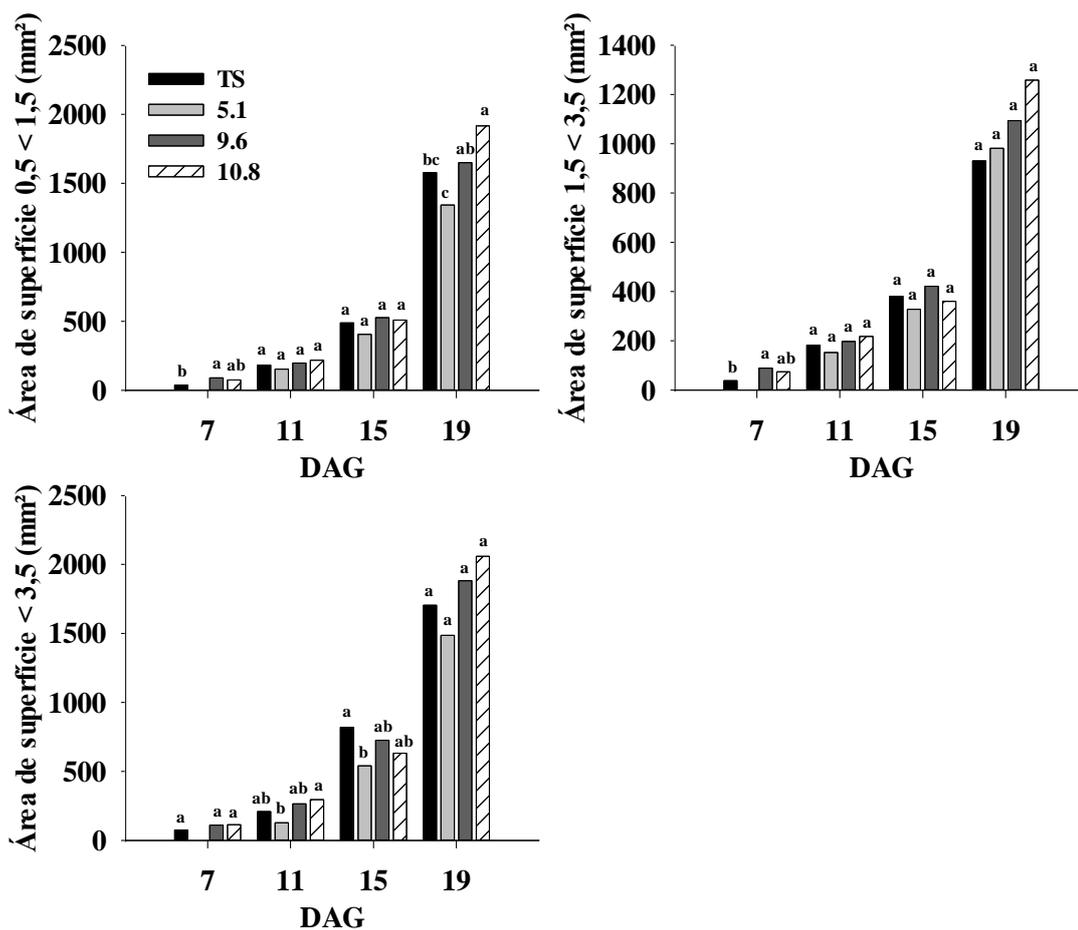
**Figura 18.** Dados de comprimento radicular por classes de raízes em linhagens de arroz superexpressando o fator de transcrição OsDof25 ao longo de quatro coletas, cultivadas em solução nutritiva contendo 1,5mM de N (1,0mM  $\text{NO}_3^-$  e 0,5mM  $\text{NH}_4^+$ ). Valores no eixo X representam dias após a germinação (DAG). A) Raízes muito finas (0,5 a 1,5mm), B) Raízes finas (1,5 a 3,5mm) e C) Raízes grossas (>3,5mm).

## 7.2. Volume Radicular



**Figura 19.** Dados de volume radicular por classes de raízes em linhagens de arroz superexpressando o fator de transcrição OsDof25 ao longo de quatro coletas, cultivadas em solução nutritiva contendo 1,5mM de N (1,0mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e 0,5mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Valores no eixo X representam dias após a germinação (DAG). A) Raízes muito finas (0,5 a 1,5mm), B) Raízes finas (1,5 a 3,5mm) e C) Raízes grossas (>3,5mm).

### 7.3. Área de Superfície



**Figura 20.** Dados de área de superfície radicular por classes de raízes em linhagens de arroz superexpressando o fator de transcrição OsDof25 ao longo de quatro coletas, cultivadas em solução nutritiva contendo 1,5mM de N (1,0mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e 0,5mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Valores no eixo X representam dias após a germinação (DAG). A) Raízes muito finas (0,5 a 1,5mm), B) Raízes finas (1,5 a 3,5mm) e C) Raízes grossas (>3,5mm).