

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

DISSERTAÇÃO

**A Expressão de Citocininas Oxidases em Raízes de
Arroz Altera a Morfologia Radicular e Aumenta a
Eficiência de Aquisição de Nutrientes**

Flávia Caldeira do Nascimento

2014



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

**A EXPRESSÃO DE CITOCININAS OXIDASES EM RAÍZES DE ARROZ
ALTERA A MORFOLOGIA RADICULAR E AUMENTA A
EFICIÊNCIA DE AQUISIÇÃO DE NUTRIENTES**

FLÁVIA CALDEIRA DO NASCIMENTO

Sob a Orientação do Professor
Leandro Azevedo Santos

e Co-orientação da professora
Sonia Regina de Souza

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2014

633.18

N244e

T

Nascimento, Flávia Caldeira, 1987-

A expressão de citocininas oxidases em raízes de arroz altera a morfologia radicular e aumenta a eficiência de aquisição de nutrientes / Flávia Caldeira do Nascimento. – 2014.

56 f.: il.

Orientador: Leandro Azevedo Santos.

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

Bibliografia: f. 37-42.

1. Arroz - Crescimento – Teses. 2. Arroz - Raízes – Teses. 3. Hormônios vegetais - Teses. 4. Citocininas - Teses. 5. Plantas – Reguladores - Teses. I. Santos, Leandro Azevedo, 1980-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta 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**

FLÁVIA CALDEIRA DO NASCIMENTO

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25/02/2014

Leandro Azevedo Santos. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Márcia Soares Vidal. Dra. UFRJ

Everaldo Zonta. Dr. UFRRJ

DEDICATÓRIA

"Nunca me deixe esquecer que tudo que tenho, tudo que sou, o que vier a ser vem de ti Senhor."

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Marly Pereira Caldeira, por todo carinho, amor, atenção e ensinamentos que me deu durante toda a minha vida e que me fizeram chegar até aqui. A minha querida irmã Elisamara Caldeira do Nascimento, sempre pronta pra me ajudar no que fosse necessário, e todos os demais familiares que torceram muito por mim durante esse período. Ao meu querido Rafael pelo amor, dedicação, amizade e ajuda na condução dos trabalhos. À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo acolhimento, pela lição de vida, pelos momentos bons e ruins.

Ao professor e orientador Leandro Azevedo Santos, ao professor Manlio Silvestre Fernandes e a professora Sônia Regina de Souza pelos exemplos de profissionalismo, amizade e pelos bons momentos de convívio, e aos amigos do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas e do Laboratório de Fertilidade do Solo pela colaboração, amizade e ensinamentos na condução das atividades, sem os quais não seria possível a finalização deste trabalho. Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Agronomia da UFRRJ, pela formação e conhecimentos adquiridos.

Ao CNPq pelo fomento.

BIOGRAFIA

Flávia Caldeira do Nascimento, filha de Durvalino Pereira do Nascimento e Marly Pereira Caldeira do Nascimento natural de Guanhães- MG; pequena cidade do interior de Minas Gerais. Formada em técnico Agrícola com habilitação em Agropecuária, na Escola Agrotécnica Federal de São João Evangelista–MG em 2006. Ingressou no curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em Março de 2007. Em 2010 foi estagiária do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas no Departamento de solos da UFRRJ, foi selecionada como bolsista de iniciação científica do CNPq para execução do projeto intitulado "Efeito da superexpressão do transportador de amônio *OsAMT1.3* em raízes de *Arabidopsis thaliana* sobre a eficiência de absorção de amônio", desenvolvido de setembro de 2010 a agosto de 2011. Em 2012 passou para o curso de mestrado em Agronomia- Ciência do Solo, onde continuou a desenvolver sua pesquisa na área de Nutrição Mineral de Plantas no Departamento de Solos da UFRRJ sob a orientação do professor Leandro Azevedo Santos, sendo bolsista do CNPq.

RESUMO

FLÁVIA, Flávia Caldeira do Nascimento. **A expressão de citocininas oxidases em raízes de arroz altera a morfologia radicular e aumenta a eficiência de aquisição de nutrientes.** 2014. 55f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

O hormônio vegetal citocinina é reconhecidamente um importante regulador do sistema radicular das plantas. Pesquisas sugerem que uma redução na quantidade de citocinina na raiz pode provocar um aumento do tamanho do sistema radicular. Diferentes estratégias têm sido empregadas para a redução da quantidade de citocinina em raízes de plantas. Neste trabalho estudou-se o efeito da superexpressão de genes que codificam para citocininas oxidases (*OsCKX*) em raízes de arroz sobre a morfologia e arquitetura radicular, bem como a eficiência de aquisição de nutrientes. Os genes *OsCKX2* e *OsCKX5* foram fusionados ao promotor *Rcc3* que promove uma expressão forte e específica em raízes de arroz. Foram obtidas várias linhagens de plantas de arroz transformadas com as construções gênicas $P_{Rcc3}:OsCKX2:3xHA$ e $P_{Rcc3}:OsCKX5:3xHA$. Ambas as construções promoveram características desejáveis de morfologia do sistema radicular das plantas, como: maior volume, comprimento, área de projeção e número de ápices radiculares. Um experimento em casa-de-vegetação foi conduzido com plantas $P_{Rcc3}:OsCKX5:3xHA$ em solo de baixa fertilidade (Planossolo) para avaliar a eficiência de aquisição de nutrientes e parâmetros morfológicos do sistema radicular. A expressão do gene *OsCKX5* sobre o controle do promotor *Rcc3* provocou um aumento de mais de 150 vezes na expressão deste gene nas raízes das plantas transformadas quando comparadas às plantas não transformadas, sem contudo, afetar os níveis de expressão na parte aérea. A expressão específica na raiz do gene *OsCKX5* resultou em um sistema radicular mais desenvolvido sem comprometer o crescimento da parte aérea. De modo geral, as plantas transformadas (L#48 e L#49) apresentaram maiores valores de massa de raízes, profundidade do sistema radicular e maior relação raiz/parte aérea. Como consequência, demonstraram ser mais eficientes na absorção de macronutrientes (N, P, K, Ca e Mg) e micronutrientes (Fe e Zn) apresentando maiores teores e conteúdos destes nutrientes nas raízes e nas folhas. Os resultados indicam que a expressão específica na raiz do gene *OsCKX5* resulta em maior crescimento do sistema radicular e absorção mais eficiente de nutrientes em solos de baixa fertilidade.

Palavras-chaves: *Oryza sativa*. Sistema radicular. Citocinina. *OsCKX5*

ABSTRACT

FLÁVIA, Flávia Caldeira do Nascimento. **Expression of cytokinins in roots oxidases alters rice root morphology and increases efficiency of nutrient acquisition.** 2014. 55p Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The plant hormone cytokinin is known to be an important regulator of the plant root system. Research suggests that reduction in the amount of cytokinin in the root may lead to an increase in the size of the root system. Different strategies are used to reduce the amount of cytokinin in plant roots. In this work, the effect of over expression of genes encoding cytokinin oxidases (*OsCKX*) in root morphology and architecture of rice plants, as well as the efficiency of nutrient acquisition were studied. The *OsCKX2* and *OsCKX5* genes were fused to the promoter *Rcc3* who runs a strong and specific expression in rice roots. Several strains of rice plants transformed with gene constructs were obtained *PRcc3:OsCKX2:3xHA* and *PRcc3:OsCKX5:3xHA*. Both constructions promoted desirable characteristics of root system morphology of the plants, such as: high volume, length, projection area and number of root tips. A greenhouse experiment was conducted with the plants *PRcc3:OsCKX5:3xHA* in a low fertility soil (Fragiudult) to evaluate the efficiency of nutrient acquisition and the root system morphological parameters. Expression of *OsCKX5* gene under the control of the promoter *Rcc3* resulted in an increase of more than 150 times in the expression of this gene in the roots of transformed plants compared to the untransformed plants; however, without affecting the levels of expression in the shoots. The specific expression in the root of *OsCKX5* gene resulted in highest developed root system without compromising the growth of shoots. In general, the transformed plants (L #48 and L #49) showed biggest root mass, root depth and greater root/ shoot ratio. As a consequence, they showed to be most efficient in the absorption of macronutrients (N, P, K, Ca and Mg) and micronutrients (Fe and Zn), presenting highest levels and contents of these nutrients in the roots and leaves. The results indicate that the root-specific expression of the gene *OsCKX5* results in increased root growth, and more efficient absorption of nutrients in low fertility soils.

Key words: *Oryza sativa*. Root system. Cytokinin. *OsCKX5*

LISTA DE ABREVIATURAS

CKX	Enzima citocinina oxidase/desidrogenase responsável por catalisar a degradação irreversível de citocininas em plantas.
OsCKX	Família gênica de citocininas oxidase/desidrogenase expressas em arroz (<i>Oryza sativa</i>)
DAG	Dias Após a Germinação
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
L# 48 e L#49	Linhagens transformadas superexpressando o gene <i>OsCKX5</i>
L# 30 e L# 38	Linhagens transformadas superexpressando o gene <i>OsCKX2</i>
MS	Massa seca
RNA_m	Ácido Ribonucléico mensageiro (“ <i>Ribonucleic Acid Messenger</i> ”)
TRIS	2-(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol
WT	Tipo selvagem (“ <i>wild type</i> ”) ou planta não transformada

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores (F: forward e R: reverse) utilizados para amplificação do promotor específico de raiz em arroz (<i>Rcc3</i>) e dos genes das citocininas oxidases de arroz <i>OsCKX2</i> e <i>OsCKX5</i> e construção dos sítios de recombinação attB1 e attB2.	10
Tabela 2. Sequências dos <i>iniciadores</i> utilizados para a avaliação da expressão gênica em tempo real das citocininas oxidases <i>OsCKX2</i> e <i>OsCKX5</i> de arroz e genes de referencia: ubiquitina 5 (<i>UBQ5</i>) e fator de alongamento 1- α (<i>eEF1-α</i>)	15
Tabela 3. Atributos químicos do Planossolo Háplico.	16

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do mecanismo de controle endógeno de citocinia por conjugação.6
- Figura 2.** Estrutura molecular do hormônio citocinina e o mecanismo de degradação da enzima citocinina oxidase-desidrogenase (*CKX*) (POPELKOVÁ et al., 2006).7
- Figura 3.** Representação esquemática da reação de recombinação BP (Recombinação entre os sítios *attB* do promotor, gene e *tag* e *attP* dos vetores pDONR-P4-P1R, pDORN-221 e pDONR-P2R-P3 para a obtenção dos vetores de entrada) necessários para a construção do vetor para superexpressão dos genes de interesse em arroz. Ori – origem de replicação; KAN^R- gene de resistência a canamicina; CM^R – gene de resistência ao clorafenicol; *attB*, *attP*, *attL* e *attR* – sítios de recombinação; *ccdB* – gene que codifica para uma proteína que interfere na atividade da DNA girase de *E. coli*, impedindo o seu crescimento; *Rcc3* – Promotor que dirige a expressão em raízes de arroz; 3xHA – peptídeo de fusão11
- Figura 4.** Representação esquemática da reação LR tripla para obtenção do vetor para superexpressão do *OsCKX2* ou *OsCKX5*. Neste trabalho foi empregado o promotor *Rcc3* e um *Tag*-3xHA fusionado ao gene. Ori – origem de replicação; KAN^R- gene de resistência a canamicina; *attB*, *attP*, *attL* e *attR* – sítios de recombinação; LB – borda esquerda; RB – borda direita; *Rcc3* – Promotor que dirige a expressão em raízes de arroz; 3xHA – peptídeo de fusão.12
- Figura 5.** Vista geral e detalhes da montagem do experimento em tubos de PVC de 20 cm de diâmetro e 60 cm de altura para avaliação da absorção de nutrientes nas plantas transformadas para a expressão do gene da citocinina oxidase *OsCKX5* em comparação com plantas não transformadas.16
- Figura 6.** Produtos da amplificação dos genes *OsCKX2* e *OsCKX5* e do promotor *Rcc3* em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. A) Primeira e segunda amplificação dos genes *OsCKX2* (1695pb) e *OsCKX5* (1602pb); b) Primeira e segunda amplificação do promotor *Rcc3* (1731pb). M – marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).18
- Figura 7.** Ilustração dos vetores de entrada para os genes *OsCKX2* e *OsCKX5*. Mapa de restrição dos vetores de entrada pENTR:*OsCKX2* (a) e pENTR:*OsCKX5* (b).19
- Figura 8.** Fragmentos de restrição após digestão do DNA plasmidial dos clones pENTR:*OsCKX2* (A) e pENTR:*OsCKX5* (B) com a enzima *SacI*; Eletroforese em gel de agarose 1,5%.19
- Figura 9.** Esquema ilustrativo do vetor de expressão pH7m34GW com o cassete de expressão; a) P_{Rcc3}:*OsCKX2*:3xHA; e b) P_{Rcc3}:*OsCKX5*:3xHA. LB e RB - bordas direita e esquerda, reconhecidas pela *Agrobacterium* para transferência da construção gênica; Hyg - gene da higromicina fosfotrasferase, que confere resistência a higromicina nas plantas transformadas; P_{Rcc3} - promotor que dirige a expressão em raízes de arroz.20
- Figura 10.** Ilustração das etapas iniciais da transformação genética de arroz. a) desinfestação das sementes; b) sementes dispostas no meio de indução de calos N6D; c) calos produzidos depois de duas semanas no meio de indução de calos; d) *Agrobacterium* crescida por 3 dias em meio AAM; e) Inoculação dos calos com *Agrobacterium* em meio AAM-As; f) calos com excesso de *Agrobacterium* drenado em papel de filtro sendo dispostos no meio de co-cultivo.21
- Figura 11.** Ilustração das etapas finais da transformação genética de arroz. A e B) calos com as construções P_{Rcc3}:*OsCKX2*:3xHA e P_{Rcc3}:*OsCKX5*:3xHA respectivamente em meio de

regeneração de plantas, com detalhe para plântulas recém formadas; C) plântula no meio de indução de raízes; D) plantas transformadas em casa de vegetação.	23
Figura 12. Teste com higromicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 6-BAP (1 mg L^{-1}) para seleção das plantas transformadas ($P_{\text{Rcc3}}:OsCKX2:3xHA$ e $P_{\text{Rcc3}}:OsCKX5:3xHA$).....	24
Figura 13. Parâmetros morfológicos de raízes de plantas não transformadas (WT) e plantas superexpressando os genes <i>OsCKX2</i> (linhagens L#30 e L#38) e <i>OsCKX5</i> (linhagens L#48 e L#49). Diâmetro médio (mm) (A); Comprimento total (cm) (B); Área de projeção (cm^2) (C); Área de superfície (cm^2) (D); Volume total (cm^3) (E) e número de ápices (F).....	25
Figura 14. Morfologia da parte aérea de plantas não transformada (a), plantas superexpressando os genes <i>OsCKX5</i> das linhagens L#48 (b) e L#49 (c).....	26
Figura 15. Parâmetros fenológicos de plantas não transformadas (WT) e plantas $P_{\text{Rcc3}}:OsCKX5:3xHA$, linhagens L#48, L#49.	26
Figura 16. Morfologia do sistema radicular de plantas transgênicas $P_{\text{Rcc3}}:OsCKX5:3xHA$ (L#48 e L#49) e plantas não transformadas (WT). a) vista mostrando o comprimento das raízes principais; b) vista do comprimento das raízes laterais.....	28
Figura 17. Expressão relativa dos genes <i>OsCKX5</i> e <i>OsCKX2</i> em raízes e folhas de plantas transgênicas de arroz $P_{\text{Rcc3}}:OsCKX5:3xHA$ das linhagem L#48 e L#49 e plantas não transformadas (WT).	29
Figura 18. Morfologia do sistema radicular de plantas não transformadas (WT), e plantas $P_{\text{Rcc3}}:OsCKX5:3xHA$ (linhagens L#48 e L# 49) cultivadas em terra de um Planossolo sem adubação. 29	
Figura 19. Massa seca de raiz e parte aérea (A) e razão raiz/parte aérea e profundidade do sistema radicular (B) de plantas não transformadas (WT), e plantas superexpressando <i>OsCKX5</i> (linhagens L#48 e L# 49).....	30
Figura 20. Teores de macronutrientes N, P, K, Ca e Mg expressos em g kg^{-1} MS na parte aérea (A) e raízes (B) de plantas não transformadas (WT) e plantas $P_{\text{Rcc3}}:OsCKX5:3xHA$ (linhagens L#48 e L# 49). *, **: diferença significativa entre as plantas transformadas e WT, pelo teste F com $P < 0,05$ e $< 0,01$, respectivamente.....	31
Figura 21. Conteúdo de macronutrientes N, P, K, Ca e Mg expressos em mg vaso^{-1} na parte aérea (A) e raízes (B) de plantas não transformadas (WT) e plantas superexpressando <i>OsCKX5</i> (L#48 e L#49). *, **: diferença significativa entre as plantas transformadas e WT, pelo teste F com $P < 0,05$ e $< 0,01$, respectivamente.....	33
Figura 22. Teores (A e B) expressos em g kg^{-1} e conteúdos (C e D) expressos em $\mu\text{g vaso}^{-1}$ de Fe e Zn na parte aérea e raízes de plantas não transformadas (WT) e plantas superexpressando <i>OsCKX5</i> (L#48 e L# 49). *, **: diferença significativa entre as plantas transformadas e WT, pelo teste F com $P < 0,05$ e $< 0,01$, respectivamente.	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	Os Diferentes Sistemas de Produção de Arroz	3
2.2	Citocininas	4
2.3	Função da Enzima Citocinina Oxidase/Desidrogenase (CKX) em Plantas	7
2.4	Relação entre os Genes da Citocinina Oxidase (CKXs) e a Absorção de Nutrientes	8
3	MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1	Amplificação dos Genes <i>OsCKX2</i> e <i>OsCKX5</i> para Superexpressão em Raízes de Plantas de Arroz	10
3.2	Clonagem do Promotor <i>Rcc3</i> no Vetor pDONRP4-PIR e dos Genes <i>OsCKX2</i> e <i>OsCKX5</i> no Vetor pDONR221; Reação BP	11
3.3	Construção do Vetor de Expressão pH7m34GW; Reação de Recombinação Múltipla, LR 12	12
3.4	Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (LBA4404) com as Construções Obtidas	13
3.5	Transformação de Plantas via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
3.6	Seleção das Linhagens e Plantas Transformadas.....	13
3.7	Avaliação do Sistema Radicular de Plantas de Arroz Superexpressando os Genes <i>OsCKX2</i> e <i>OsCKX5</i>	13
3.8	Experimento para Avaliação da Expressão Gênica de Plantas de Arroz superexpressando <i>OsCKX5</i>	14
3.8.1	Extração do RNA total	14
3.8.2	Tratamento com DNase I, síntese de cDNA, e PCR em tempo real	15
3.8.3	Desenho dos <i>iniciadores</i> para os estudos de expressão gênica.....	15
3.9	Avaliação da Absorção de Nutrientes nas Plantas Transformadas superexpressando a Citocinina Oxidase <i>OsCKX5</i>	15
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1	Obtenção das Construções Gênicas	18
4.2	Transformação de Plantas de Arroz: Destaque para as Alterações em Relação ao Protocolo Original	20
4.3	Análise do Efeito da Superexpressão do e <i>OsCKX5</i> sobre o Desenvolvimento Radicular das Plantas de Arroz	27
4.4	Análise do Efeito da Superexpressão do <i>OsCKX5</i> em Plantas de Arroz Sobre a Eficiência na Absorção de Nutrientes	28
5	CONCLUSÕES	35
6	PERSPECTIVAS	36
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

O arroz é um dos cereais mais utilizados na alimentação humana em diversas partes do mundo e também no Brasil, principalmente pela população de baixa renda. O arroz é alimento básico para cerca de 2 bilhões de pessoas, possuindo um excelente balanço nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína *per capita* necessária à dieta humana (IBGE, 2012). A produção brasileira na safra 2010/2011 foi de 12.628,2 mil toneladas em uma área plantada de 2.746,7 mil hectares, ficando entre os dez principais produtores de arroz no mundo, com cerca de 11 milhões toneladas por ano (IBGE, 2012). Entretanto, estimativas indicam que até 2050 será necessário produzir 260 milhões de toneladas a mais de arroz para atender à demanda mundial (CONAB, 2011). Por se adaptar facilmente a diferentes condições de clima e solo, o arroz é considerado como uma espécie que apresenta grande potencial para o combate a fome no mundo.

O arroz é uma planta modelo para estudos entre as monocotiledôneas, por ser um organismo diplóide com 12 cromossomos e genoma de 390 mega pares de bases (Mb), sendo assim, o menor entre os cereais, possuindo aproximadamente 32.000 genes com base no genoma de *Oryza sativa* L. *ssp. Japonica* (THE RICE ANNOTATION PROJECT, 2007).

O genoma do arroz apresenta sintonia com o de outros cereais, como o milho e o trigo, (MOORE et al., 1995). A disponibilidade de fragmentos de sequências expressas (ESTs do inglês, *Expressed Sequence Tags*), e mapas moleculares (INTERNACIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT, 2005; HARUSHIMA et al., 1998), faz do arroz uma planta modelo para estudos fisiológicos e genéticos principalmente entre as monocotiledôneas (GALE & DEVOS, 1998; SHIMAMOTO & KYOZUKA, 2002).

As plantas frequentemente enfrentam condições adversas ou estresses bióticos e abióticos, que as conduzem a uma série de mudanças morfológicas, bioquímicas e moleculares, limitando seu crescimento, reprodução e causando sérios danos a produtividade (MAHAJAN & TUTEJA, 2006).

Os estresses abióticos são a causa primária de perda de produção agrícola, reduzindo a produtividade dos cereais em até 50% (BOYER, 1982; BRAY et al., 2000). Segundo MAHAJAN & TUTEJA (2006), estresses abióticos causam a perda de milhões de dólares a cada ano devido à redução da produtividade de grãos, o que ameaça a sustentabilidade da agricultura.

O estresse hídrico e a baixa disponibilidade de nutrientes são os mais importantes fatores que limitam a produção de diversas culturas e tem se tornado problema severo em muitas regiões do mundo (PASSIOURA, 2007). A cultura do arroz é particularmente suscetível ao estresse hídrico, onde se estima que 50% da produção de arroz no mundo está associada à ocorrência ou não de seca (BOUMAN et al., 2005).

O reconhecimento da importância das raízes para a tolerância à seca, a eficiência na absorção de nutrientes e a diversidade na arquitetura radicular do arroz, tem sido base sólida para a pesquisa de tolerância à seca no Instituto Internacional de Pesquisa do Arroz (IRRI) (HENRY, 2013). Nos anos 2000, o IRRI iniciou um programa de melhoramento para a seleção de características radiculares relacionadas a produtividade sob condições de estresse hídrico. Após a identificação de QTLs (Loci para Características Quantitativas) para produtividade sob condições de estresse hídrico, foram identificados genes relacionados a características de morfologia e arquitetura radicular.

O crescimento dos órgãos de uma planta é regulado pelo ambiente (ex.: disponibilidade de nutrientes e luz), bem como, por fatores endógenos, como os hormônios vegetais. Os mecanismos que regulam o tamanho dos órgãos em plantas estão começando a

ser elucidados e somente uma pequena fração dos fatores genéticos já foram identificados (KRIZEK, 2009). Mudanças no crescimento das plantas obtidas por mutações em genes que controlam a homeostase hormonal contribuíram significativamente para aumento dos rendimentos dos cultivos (SALAMINI, 2003).

O tamanho e a arquitetura do sistema radicular determinam a habilidade das plantas para adquirir água e nutrientes, fatores limitantes para o crescimento e rendimento das plantas em muitos ecossistemas agrícolas (PRICE et al., 1997).

O hormônio vegetal citocinina é reconhecidamente um importante regulador do sistema radicular das plantas (WERNER & SHMULLING, 2009). É também sabido que a citocinina inibe o alongamento e a ramificação de raízes (CARY et al., 1995). Por outro lado, uma redução na quantidade de citocinina na raiz pode provocar um aumento do tamanho do sistema radicular (WERNER et al., 2003). Diferentes estratégias são usadas para a redução da quantidade de citocinina, como a expressão constitutiva de genes que codificam para citocinina oxidase/desidrogenase (CKX) (YANG et al., 2003), redução da biossíntese de citocinina (MIYAWAKI et al., 2006), mutação de genes que codificam para receptores (REIFLER et al., 2006), ou supressão da rota de sinalização da citocinina (HEYL et al., 2008). Esses trabalhos demonstraram que a citocinina é um regulador negativo do crescimento das raízes e que sua concentração fisiológica é ótima para o crescimento radicular sob condições normais. Portanto, a manipulação da quantidade de citocinina pode ser uma estratégia viável para obtenção de plantas com sistema radicular mais desenvolvido.

Em função da citocinina também ser importante para o crescimento da parte aérea das plantas, é necessário que a redução da quantidade de citocinina na planta se dê especificamente nas raízes. Recentemente, foi demonstrado que em *Arabidopsis* e tabaco, a expressão da citocinina oxidase com promotores específicos de raízes foi capaz de reduzir os teores de citocinina nas raízes, sem alterar sua concentração na parte aérea das plantas (WERNER et al., 2010). Esses autores verificaram aumento do sistema radicular sem efeitos negativos sobre a parte aérea das plantas. Há, entretanto, dúvidas se essa estratégia pode funcionar para outras culturas e espécies monocotiledôneas.

Esta dissertação teve por objetivo estudar a superexpressão do gene da citocinina oxidase (*OsCKX*) em raízes de arroz e sua relação com o processo de absorção de nutrientes, bem como avaliar a morfologia e arquitetura radicular das plantas transgênicas quando comparadas com plantas não transformadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Os Diferentes Sistemas de Produção de Arroz

A falta de água afeta cada vez mais várias partes do mundo. Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) até 2025, 1,8 mil milhões de pessoas estarão vivendo em países ou regiões com absoluta falta de água e dois terços viverão em zonas com falta de água. O cenário mundial mostra que o uso da água é muito mais intenso do que há poucas décadas atrás. Atualmente, cerca de 70% destina-se à agricultura, 20% à indústria e 10% para o consumo humano. Esse uso intenso da água, principalmente na agricultura e na indústria, ocorre num ritmo mais acelerado do que a reposição feita pelo seu ciclo natural (GOMES et al., 2009).

A Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura (UNESCO), afirma que as reservas de água estão diminuindo, enquanto o consumo cresce, indicando que a longo prazo, bilhões de pessoas não terão acesso a água de boa qualidade. Segundo GOMES et al. (2009) os países que correm maior risco são aqueles em desenvolvimento, uma vez que a quase totalidade do crescimento populacional, previsto para os próximos cinquenta anos, acontecerá nessas regiões.

O setor agrícola é o maior consumidor de água. A agricultura mundial consome cerca de 70% de toda a água derivada das fontes (rios, lagos e aquíferos subterrâneos) e os outros 31% são consumidos pelas indústrias e uso doméstico (CHRISTOFIDIS, 2003). Sendo o consumo de água, portanto o elemento essencial ao desenvolvimento agrícola, sem o controle e a administração adequados e confiáveis, não será possível uma agricultura sustentável. Deste modo, o desenvolvimento de cultivares comerciais de arroz no sistema sequeiro, tolerantes à deficiência hídrica é um dos principais desafios da pesquisa agrícola mundial, sobretudo devido à redução das fontes de água potável e à competição da irrigação com o consumo humano.

Considerando-se as diferenças socioeconômicas regionais, os recursos naturais e as condições edafoclimáticas, a distribuição das áreas irrigadas no Brasil ocorre de forma desigual, e daí a escolha dos métodos e/ou sistemas de irrigação utilizados para o cultivo de arroz, os quais dependem, dentre outros fatores, do nível tecnológico compatível e acessível economicamente ao produtor. Para a agricultura irrigada, a expansão da área no mundo torna-se mais difícil devido às restrições de disponibilidade de recursos hídricos, às condições ambientais, às dificuldades econômicas e à degradação dos solos.

No Brasil o cultivo de arroz irrigado e inundado são os predominantes na região sul, em áreas sem restrições hídricas regionais, em áreas de solos férteis, não sendo sujeitos a adversidades climáticas recebendo assim maiores investimentos e altos índices de produtividade (KHUSH, 1997). O arroz irrigado é responsável por 65% da produção nacional, porém com alto custo de produção (PINHEIRO et al., 2006).

Em nosso país, em grande parte de seu território, a produção de arroz no sistema sequeiro (arroz de terras altas) ocorre em regiões que estão sujeitas a frequentes períodos de déficit hídrico, como entre o ciclo de chuvas de verão, conhecidos como “veranicos” (CONAB, 2011). Estes influenciam negativamente no rendimento produtivo de arroz, além de condições de solos de baixa fertilidade natural, temperaturas elevadas e baixo nível tecnológicos utilizados pelos produtores (EMBRAPA, 2011). As interações dos genótipos com as condições ambientais desfavoráveis também afetam negativamente o desenvolvimento vegetativo e conseqüentemente são expressas na forma de menores produtividades.

O cultivo de sequeiro tem maior relevância nas regiões nordeste e centro oeste; no entanto, estas regiões estão sujeitas a restrição hídrica. Contudo, estas regiões reúnem diversas

potencialidades para o cultivo do arroz, como posicionamento geográfico estratégico, infraestrutura de escoamento de produção e condições edafoclimáticas favoráveis, contribuindo para o desenvolvimento do agronegócio da cultura nestas regiões. Tais aspectos são decisivos ao desenvolvimento da economia agrícola, sobretudo no que se refere aos investimentos em produção (EMBRAPA, 2011).

Desta forma variedades tradicionais de arroz com alto potencial produtivo e com alta qualidade de grãos estão sendo estudadas especificamente para áreas de sequeiro. Utilizando variedades tradicionais de arroz sob manejo adequado é possível alcançar maiores índices de produtividade (ATLIN et al., 2006).

2.2 Citocininas

Os hormônios vegetais são substâncias químicas que regulam o desenvolvimento das plantas influenciando processos fisiológicos, e são ativos em baixas concentrações (DAVIES, 1995). As plantas utilizam uma ampla variedade de hormônios, dentre elas, membros das cinco classes de hormônios vegetais clássicos (auxinas, citocininas, ácido abscísico, etileno e giberelinas).

As citocininas merecem destaque nos estudos sobre hormônios vegetais e desenvolvimento, uma vez que diferem dos demais hormônios e agentes de sinalização em um aspecto importante: nenhum mutante com deficiência total deste hormônio é encontrado, elas são estritamente necessárias para a viabilidade, sugerindo que as mutações que eliminam tais hormônios são letais. Os demais hormônios vegetais parecem agir como chaves ligadas, reguladoras dos processos específicos do desenvolvimento. Já hormônios como as auxinas e citocininas parecem ser necessárias, em certo nível, mais ou menos continuamente (TAIZ & ZEIGER, 2004).

As citocininas foram descobertas durante pesquisas dos fatores que estimulam as células vegetais a se dividirem (sofrerem citocinese). A descoberta das citocininas ocorreu durante a década de 1950, quando a equipe do Dr. Folke Skoog, da Universidade de Winsconsin (Estados Unidos), estava à procura de uma substância que fosse responsável pela divisão celular em vegetais, utilizando nessa abordagem, como modelo experimental, o cultivo de extrato de culturas de células de tabaco *in vitro*.

Nessa época, já se conhecia o ácido indolil – 3 – acético (AIA), uma auxina isolada em 1934. A equipe já sabia, por exemplo, que, quando o AIA era utilizado em meios nutritivos juntamente com constituintes complexos, como extrato de levedura e água de coco, ocorria uma intensa proliferação das células, o que levou a admitir a existência, nessas substâncias, de algo também essencial a divisão celular. Essa substância foi finalmente isolada por Carlos Miller em 1955, um colaborador do Dr. Folke Skoog, e denominada cinetina (KERBAUY & PERES 2004).

Embora a descoberta e a conceituação de citocinina tenham ocorrido a partir de uma substância artificial descoberta na década de 1950, a primeira citocinina natural em plantas só foi isolada 20 anos mais tarde, por David Letham, em extrato de milho verde (*Zea mays*), denominando-a de zeatina (KERBAUY & PERES 2004).

Desde sua descoberta, citocininas têm sido relacionadas com quase todos os aspectos do desenvolvimento vegetal, incluindo divisão celular, iniciação e crescimento do caule, senescência foliar e fotomorfogênese (MOK et al., 1994). Citocininas também regulam o desenvolvimento das sementes (RIEFLER et al., 2006). Níveis endógenos reduzidos de citocinina inibem o desenvolvimento do caule e aumentam o crescimento e ramificação das raízes (WERNER et al., 2001), enquanto que elevados níveis de citocinina podem levar a redução na dominância apical e no desenvolvimento radicular, atraso na senescência e aumento na regeneração *in vitro* (GAN et al., 2002).

O tratamento de gemas laterais com citocinina causa quebra de dormência e o crescimento delas (PHILLIPS, 1975). A aplicação de citocinina em plantas inteiras ou em folhas destacadas tende a atrasar a senescência (GAN & AMASINO, 1996). Citocininas podem induzir a expressão de muitos genes regulados pela luz (CHEN et al., 1993; CROWELL, 1994). Plântulas estioladas crescidas na presença de citocinina adotam uma morfologia similar a plântulas crescidas na luz (CHORY et al., 1994). Citocininas influenciam ainda relações fonte/dreno, germinação, formação de tecidos vasculares e expansão do cotilédone em muitas espécies (MOK et al., 1994).

As citocininas naturais são derivadas de adeninas com distintas substituições ligadas a posição do carbono 6 da molécula (KIEBER et al., 2002). Outros compostos como o thidiazuron, também possuem atividade citocinínica (THOMAS & KATTERMAN, 1986). A classe mais comum de citocininas possui cadeias laterais de isoprenóides, incluindo a citocinina mais abundante em *Arabidopsis*, trans-zeatina. Nas plantas superiores, a zeatina ocorre tanto na forma cis quanto na forma trans, e essas formas podem ser interconvertidas por uma enzima conhecida como zeatina isomerase. Enquanto a maioria dos efeitos da zeatina é atribuída à forma trans, já se tem resultado de que a forma cis também pode ser biologicamente ativa (MARTIN et al., 2001). Hoje são conhecidos vários outros tipos de citocininas sintéticas com estruturas semelhantes.

A citocinina está presente em todos os tecidos vegetais, ocorrendo em maiores concentrações principalmente em ápices caulinares, radiculares e em sementes imaturas (NUNES, 2009). Estas podem atuar a longas distâncias próximas ou nas próprias células onde foram produzidas (SCHMULLING, 2004). Citocininas também podem ser sintetizadas por outros organismos, como: cianobactérias, algumas bactérias fitopatogênicas como *Agrobacterium tumefaciens* (AKIYOSHI et al., 2005), *Pseudomonas savastanoi* (AKIYOSHI et al., 1987) e, pelo fungo *Dictyostelium discoideum* (TAYA et al., 1978).

Ao contrário do que se acreditava no passado as citocininas podem ser produzidas em diversos órgãos da planta, mas o principal local de sua síntese são os ápices radiculares, de onde são transportadas para o caule via xilema. Análises de seiva bruta de plantas tem demonstrado que as citocininas estão presentes em boas quantidades. Com isso supõe-se que as citocininas são transportadas via xilema principalmente na forma de ribosídeos (LETHAM & PALNI, 1983). Estas ainda podem ser transportadas da parte aérea para as raízes via floema, mesmo que em menores quantidades. Desta forma as citocininas transportadas assumem um importante papel no desenvolvimento coordenado da raiz e da parte aérea, como, por exemplo, levando informações sobre a disponibilidade de nutrientes (SCHMULLING et al., 2003).

Grande parte das pesquisas feitas para determinar o papel das citocininas no desenvolvimento das plantas, tem visado o efeito da aplicação deste hormônio. Essas pesquisas são realizadas com diferentes espécies e delineamentos experimentais, o que de alguma forma pode dificultar a comparação em alguns casos. Assim não é sempre que fica evidente se os efeitos dos hormônios aplicados, são realmente um indicativo da real função fisiológica do hormônio.

Para tentar amenizar estes problemas pesquisadores estão propondo que os níveis endógenos de citocinina sejam alterados através da criação de plantas transgênicas, superexpressando genes sobre o controle de promotores específicos que levem ao controle endógeno da citocinina. Plantas com reduzido conteúdo de citocinina podem ser muito informativas sobre o papel das citocininas, pois a falta de citocinina pode causar um fenótipo de perda de função para traços fisiológicos e de desenvolvimento nos quais as citocininas são limitantes (NUNES, 2009)

As plantas possuem mecanismos de controle dos níveis endógenos de citocinina, um destes é a conjugação, onde citocininas podem ser conjugadas para formar um glicosídeo no

qual uma molécula de açúcar, normalmente a glicose, está vinculada a um anel purínico (na posição N³, N⁷ ou N⁹), ou ao oxigênio da cadeia lateral da zeatina ou da di-hidrozeatina (KIEBER, 2002).

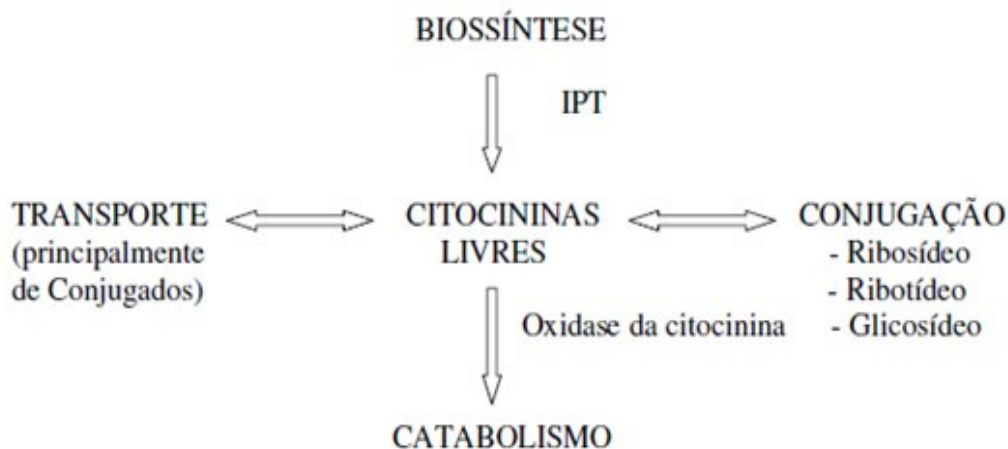


Figura 1. Representação esquemática do mecanismo de controle endógeno de citocinina por conjugação.

Outro mecanismo de controle endógeno de citocinina é a degradação. Muitos tecidos vegetais possuem enzimas específicas que estão relacionadas com a degradação de citocininas. Em relação a estas enzimas pode-se citar as citocininas oxidases, que são enzimas que degradam as cadeias laterais na posição N⁶ (JONES & SCHREIBER, 1997). As citocininas trans-zeatina têm cadeias laterais N⁶ insaturadas e são degradadas, enquanto di-hidrozeatina e 6- benzilamino purina (BAP) são resistentes à clivagem da citocinina oxidase (MOK & MOK, 2001). A enzima citocinina oxidase/desidrogenase (CKX) catalisa a degradação irreversível de citocininas e, em muitas plantas é responsável pela maioria da inativação metabólica de citocinina (MOK & MOK, 2001).

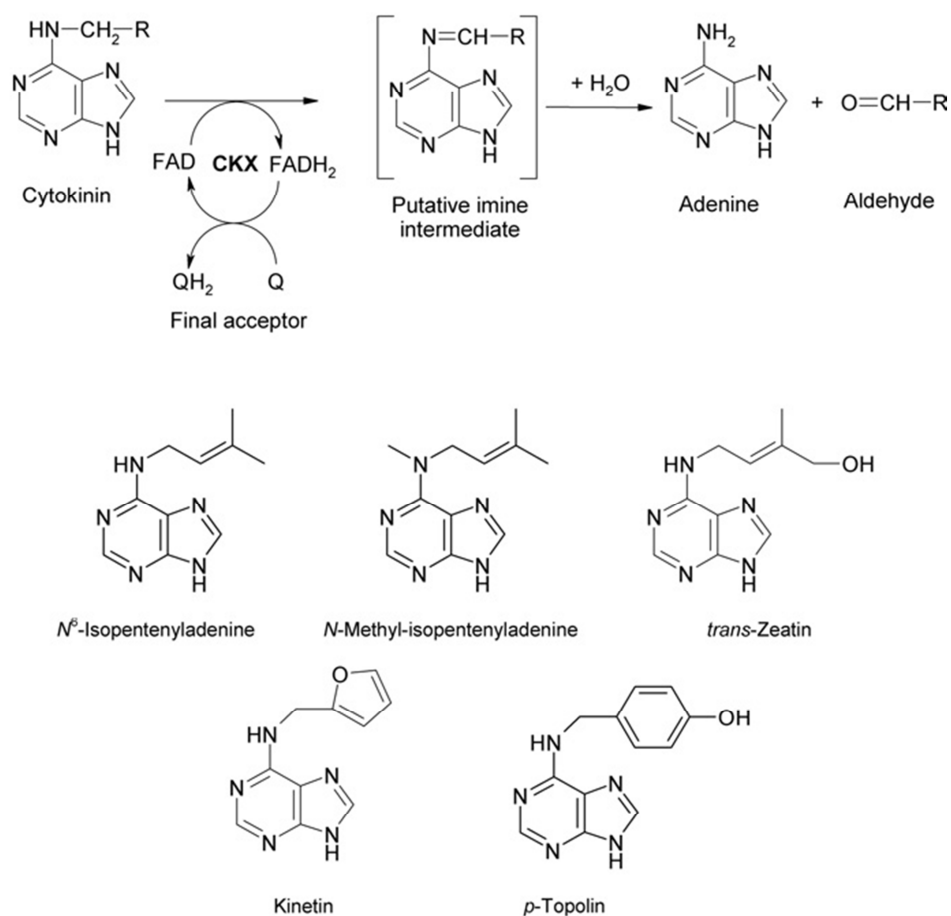


Figura 2. Estrutura molecular do hormônio citocinina e o mecanismo de degradação da enzima citocinina oxidase-desidrogenase (CKX) (POPELKOVÁ et al., 2006).

2.3 Função da Enzima Citocinina Oxidase/Desidrogenase (CKX) em Plantas

O primeiro relato da atividade da enzima citocinina oxidase/desidrogenase (CKX) foi no ano de 1971, quando Paces e colaboradores descreveram a conversão de isopenteniladenina à adenina, em extratos de culturas de células de tabaco. Mais tarde Whitty e Hall (1974) observaram atividade semelhante em sementes de milho, culminando no nome da enzima citocinina oxidase. Desde então, um grande número de publicações relataram a atividade da CKX em uma grande variedade de tecidos e espécies, incluindo o milho, trigo, feijão e soja (ARMSTRONG, 1994; GALUSZKA et al., 2001).

A lista de organismos que mostram atividade da CKX inclui duas espécies não vegetais como, *Dictyostelium discoideum* e *Saccharomyces cerevisiae* (VAN KAST, 1987). A degradação de citocinina por meio da enzima CKX não é a única via predominante de inativação de citocinina em todas as espécies e/ou órgãos vegetais. Por exemplo, nenhuma atividade da CKX foi detectada em rabanete (*Raphanus sativus*), onde a inativação de citocininas ocorre exclusivamente por meio de conjugação ao invés de degradação (SCHMULLING et al., 2003).

Hoje se sabe que as CKXs apresentam um papel importante na regulação dos processos fisiológicos das plantas. Provavelmente suas possíveis funções biológicas vêm das diferentes localizações subcelulares. Um papel importante da CKX é que ela pode estar envolvida no controle da quantidade de citocinina que é importada de outros locais, a partir de um tecido ou órgão que produz citocinina. Por exemplo, a importação de citocininas de tecidos por vias apoplásticas, onde a CKX poderia controlar os níveis de citocininas fisiologicamente ativas,

ou a maior atividade da CKX no pedúnculo floral, controlando o teor de citocinina na formação de grãos de milho (JONES & SCHREIBER, 1997). No mesmo sentido TURNER et al., (1985) e MOK & MOK (2001) sugeriram que a atividade elevada da CKX em cascas de frutos de feijão (*Phaseolus vulgaris*) limitaria a circulação de citocinina a partir de embriões em desenvolvimento que não contenham níveis elevados de citocinina.

Em arroz pelo menos 11 genes da família *OsCKX* já foram caracterizados (*OsCKX1* a *OsCKX11*), sugerindo que estes genes divergem quanto a funcionalidade e padrões de expressão. ASHIKARI et al. (2005) estudando o perfil de expressão do gene *OsCKX2* observou que ele é preferencialmente expresso em folhas, colmos, inflorescência, meristemas e folhas, encontrando diferenças nas cultivares de arroz estudadas. Houve alto nível de expressão em inflorescências e meristemas em algumas cultivares e, em outras, foi muito baixo. Nestes estudos também foi realizada uma correlação entre o nível de expressão do gene *OsCKX2* e número de grão por panícula. Assim, eles sugeriram que as diferenças fenotípicas observadas podem ter sido causadas devido ao diferente padrão de transcrição do *OsCKX2*, o que levou a um maior número de grãos por panículas (ASHIKARI et al., 2005).

Em estudo de localização da enzima nos tecidos de arroz, quando o promotor do gene da β -glucuronidase (*GUS*) foi fusionado ao gene *OsCKX2*, a expressão do *GUS* foi observada principalmente no tecido vascular, raízes, meristemas e flores jovens. Assim a expressão do *OsCKX2* nos meristemas e inflorescências pode regular o nível de citocinina nas flores (ASHIKARI et al., 2005).

Esses estudos mostram que é possível, por meio de ferramentas moleculares, usar determinados genes de citocininas oxidase para regular o nível endógeno de citocinina em órgãos específicos.

2.4 Relação entre os Genes da Citocinina Oxidase (CKXs) e a Absorção de Nutrientes

O crescimento e desenvolvimento dos órgãos das plantas são controlados por fatores ambientais como disponibilidade de nutrientes e luz, e também fatores endógenos, como os hormônios vegetais. Os mecanismos de regulação de órgãos em plantas estão apenas começando a ser elucidados e poucos fatores genéticos que controlam o desenvolvimento e tamanho dos órgãos das plantas foram identificados (GONZALEZ et al., 2009; KRIZEK, 2009). Deste modo, uma melhor compreensão da regulação de crescimento de órgãos em plantas se torna adequada para uma melhor abordagem no melhoramento de plantas.

A maior parte dos estudos sobre controle hormonal no desenvolvimento e crescimento de órgãos é feito na parte aérea, enquanto que as raízes são raramente consideradas; no entanto, o bom desenvolvimento do sistema radicular desempenha funções essenciais, como a absorção de água e nutrientes, armazenamento de reservas, síntese de compostos específicos e o estabelecimento de interações bióticas na rizosfera (LOPEZ-BUCIO et al., 2003).

O tamanho e a arquitetura do sistema radicular determinam a capacidade da planta de ter o acesso à água e nutrientes, estes fatores são os principais limitantes ao crescimento das plantas, afetando o rendimento nos sistemas agrícolas (LYNCH, 1995).

Existe uma correlação entre o tamanho do sistema radicular e a maior eficiência na absorção de nutrientes em várias plantas cultivadas. Com isso vêm se buscando a obtenção de cultivares com sistema radicular mais desenvolvido (PRICE et al., 2002). Variedades de arroz resistentes à seca apresentam um sistema radicular profundo e altamente ramificado em comparação com variedades mais sensíveis a seca. Desta forma, plantas com sistema radicular mais desenvolvido têm maior capacidade de competição por nutrientes e maior capacidade de sobrevivência em condições de baixa disponibilidade de nutrientes (HODGE et al., 1999; LIAO et al., 2001; COQUE & GALLAIS, 2006).

Estudando *Arabidopsis thaliana* NARANG et al. (2000) verificaram que variedades com alta biomassa na raiz apresentaram maior absorção de fosfato, com aumento no acúmulo de nutrientes sendo correlacionados com maior razão raiz-parte aérea. Além disso, vários estudos apontam para sobreposição entre características de lócus quantitativos que determinam as características de raízes e a de produtividade de plantas, sugerindo uma ligação causal entre essas características (DORLODOT et al., 2007).

O desenvolvimento do sistema radicular é determinado por fatores genéticos e ambientais e modulado por numerosos sinais como a disponibilidade de água e de nutrientes. A arquitetura do sistema radicular, incluindo o alongamento da raiz e a formação de raízes laterais, é controlada por diversos genes que ainda permanecem não identificados (DORLODOT et al., 2007). A complexidade genética e dificuldade em selecionar características tornam difícil a seleção de variedades com sistema radicular melhorado.

O hormônio citocinina em plantas é reconhecido como um regulador essencial do sistema radicular das plantas (MOK & MOK, 2001; WERNER & SCHMULLING, 2009). Sabe-se que a citocinina inibe a ramificação e o alongamento radicular, (MOK & MOK, 2001; WERNER & SCHMULLING, 2009). Foi demonstrado que a diminuição nos teores de citocinina na raiz leva a um sistema radicular mais desenvolvido (WERNER et al., 2010). Diferentes abordagens têm sido empregadas para reduzir os teores de citocinina nas raízes das plantas, como a superexpressão de genes como a citocinina oxidase/desidrogenase (*CKX*) (WERNER et al., 2003, YANG et al., 2003), redução na biossíntese de citocinina (MIYAWAKI et al., 2006) ou ainda a supressão da via de sinalização da citocinina (MASON et al., 2005, HEYL et al., 2008).

Estudos demonstraram que a citocinina em um estado reduzido na raiz, leva a maior divisão de células no meristema radicular, aumentando assim o número de células neste meristema (WERNER et al., 2003; DELLO IOIÒ et al., 2008).

Trabalhos mostram que a citocinina é um regulador negativo no crescimento da raiz, e que sua concentração fisiológica é essencial no padrão de crescimento do sistema radicular (WERNER et al., 2008). A manipulação dos padrões de concentração de citocinina na raiz seria uma abordagem viável através da manipulação genética de plantas, para ter um sistema radicular mais desenvolvido. Entretanto, a citocinina é essencial para o crescimento de partes jovens da planta e a redução do estado sistêmico de citocinina reduziria o crescimento da parte aérea da planta (WERNER et al., 2008). Sobre este tema deve-se considerar que o crescimento de órgãos nas plantas está sob controle correlativo de crescimento, i.e., o crescimento de um órgão pode influenciar o crescimento de órgão distante (BOGRE et al., 2008). Logo, é incerto se as consequências da alteração nas concentrações de citocinina na raiz poderiam limitar o crescimento de outros órgãos ou tecidos na parte aérea (WERNER & SCHMULLING, 2009). Também não é claro até que ponto a planta se beneficiaria, a partir de sistema radicular mais desenvolvido, diante de limitação de nutrientes no solo.

Estudos feitos por WERNER et al. (2010) demonstraram por meio da expressão específica de genes da citocinina oxidase/desidrogenase (*CKX*) em raízes uma redução na biossíntese de citocinina específica em raízes, levando a produção de plantas transgênicas de *A. thaliana* com um sistema radicular mais desenvolvido, sem a inibição do crescimento dos órgãos aéreos. E desta forma, foi possível observar que plantas com sistema radicular mais desenvolvido foram mais eficientes na absorção de nutrientes, permitindo também a manutenção do teor de clorofila nas folhas em condições de limitações de nutrientes. Estes resultados estabelecem que plantas com arquitetura radicular mais desenvolvida podem ser úteis em ambientes agrícolas. Apesar do sucesso obtido com a expressão de *CKX* em raízes de plantas de *Arabidopsis*, não se sabe se esta mesma estratégia pode funcionar em plantas de arroz, uma monocotiledônea.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amplificação dos Genes *OsCKX2* e *OsCKX5* para Superexpressão em Raízes de Plantas de Arroz

Com base em análise prévia no perfil de expressão dos 11 genes pertencentes à família *OsCKX* de arroz na plataforma *Genevestigator* (<https://www.genevestigator.com/gv/plant.jsp>), verificou-se que os genes *OsCKX2* e *OsCKX5* são induzidos por citocinina em raízes de arroz, sugerindo assim sua participação na degradação desse hormônio na raiz. Com base nesta pesquisa estes dois genes foram selecionados para posteriores estudos.

Os genes foram amplificados a partir de cDNA oriundo de RNA total de raízes de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) da variedade Piauí, cultivada no sistema de sequeiro, em um ambiente com solos pobres e baixa disponibilidade de nutrientes (Maranhão). Para clonagem desse gene e superexpressão em raízes de arroz, foi utilizado o sistema Gateway de clonagem (Invitrogen), que se baseia em reações de recombinação sítios específica.

O promotor utilizado na construção gênica foi o *Rcc3*, um promotor forte e que dirige uma expressão específica em raízes de arroz (JEONG et al., 2010). Os iniciadores para amplificação dos genes inteiros, bem como para a formação do sítio de recombinação entre o início e o final de cada gene estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores (F: forward e R: reverse) utilizados para amplificação do promotor específico de raiz em arroz (*Rcc3*) e dos genes das citocininas oxidases de arroz *OsCKX2* e *OsCKX5* e construção dos sítios de recombinação attB1 e attB2.

Gene	Iniciadores	Sequência
Rcc3	Rcc3B4F	5'-ATAGAAAAGTTGTGGGTAACCTCAGGCTGGACGA-3'
	Rcc3B1R	5'-TGTACAAACTTGTGCTACGTACCCGAGATCGA-3'
Adaptadores B4F e B1R	B4F	5'-GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTG-3'
	B1R	5'-GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTG-3'
OsCKX2	OsCKX2B1F	5'-AAAAAGCAGGCTTAATGAAGCAAGAGCAGGTCAG-3'
	OsCKX2B2R	5'-AGAAAGCTGGGTATGCGAGTGGTGACGTGAA-3'
OsCKX5	OsCKX5B1F	5'-AAAAAGCAGGCTCAATGGCGTGGTGCTTGGT-3'
	OsCKX5B2R	5'-AGAAAGCTGGGTAGGACTCCGCCAAGAGC-3'
Adaptadores B1F e B2R	B1F	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'
	B2R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'

As reações de PCR para amplificação dos genes foram realizadas com uma enzima DNA polimerase de alta fidelidade, a Phusion DNA polimerase. As reações foram realizadas com a seguinte composição: tampão de amplificação Phusion 1X, dNTP 200 µM cada, iniciadores 0,5 µM e enzima Phusion DNA polimerase 0,02U/µl e amostra de cDNA 200 ng. A PCR prosseguiu com a seguinte programação: desnaturação inicial a 98°C por 30 seg e 25 a 35 ciclos de 10 seg de desnaturação a 98°C, 30 seg de anelamento a 57°C e 2,5 min de extensão a 72°C.

Depois da amplificação dos genes foram realizadas mais duas reações de PCR com iniciadores híbridos para a construção dos sítios de recombinação attB1 e attB2 (Tabela 1). Na primeira reação os iniciadores anelaram-se no início e final do gene e levaram metade do

sítio de recombinação, e na segunda reação os iniciadores adaptadores anelaram-se na primeira metade dos sítios *attB* e levaram a outra metade.

3.2 Clonagem do Promotor *Rcc3* no Vetor pDONRP4-P1R e dos Genes *OsCKX2* e *OsCKX5* no Vetor pDONR221; Reação BP

A reação BP foi realizada utilizando o kit “Gateway® BP Clonase II Enzyme Mix” (Invitrogen). Em um microtubo de 1,5 mL, foram adicionados: 5 µL do produto da PCR amplificado e purificado com PEG8000, contendo os sítios *attB*, 1 µL do vetor pDONRP4-P1R ou pDONR221, 2 µL do tampão de reação BP e 2 µL do mix de enzimas BP clonase. A mistura da reação foi homogeneizada por pipetagem, vagorosamente e a reação ocorreu à temperatura ambiente durante a noite. Depois deste período a reação foi paralisada pelo tratamento com 1 µL de Proteinase K a 37°C durante 10 min. Em seguida, este material da reação BP foi utilizado para transformação de células competentes de *E. coli* (DH5α), a fim de caracterizar os clones. Uma alíquota de 2 µL de cada reação BP foi misturada à 50 µL de células competentes, que permaneceram em repouso no gelo por 5 min. Após este período a mistura foi submetida a eletroporação a 1.700V e, logo em seguida misturada à 400 µL de meio SOC e cultivadas por 1 h a 37°C em agitador orbital a 200 rpm e, depois plaqueadas em meio LB contendo 50 mg L⁻¹ de canamicina para seleção dos clones positivos, pois as células transformadas com o vetor levando a construção gênica possuem o gene que confere resistência ao antibiótico canamicina, assim as células que sobrevivem possuem o vetor com a construção gênica.

O mesmo procedimento foi utilizado para a clonagem do promotor e do peptídeo de fusão ao gene. O gene foi fusionado ao "tag" de HA (3xHA) para posteriores análises da presença dos níveis da proteína nos tecidos da planta. Estes três vetores, constituem os vetores de entrada (pENTR-*Rcc3*; pENTR-*CKX2* ou 5; pENTR-3xHA) empregados posteriormente na montagem do cassete de expressão. Um esquema ilustrativo das reações de recombinação BP segue abaixo (Figura 3).

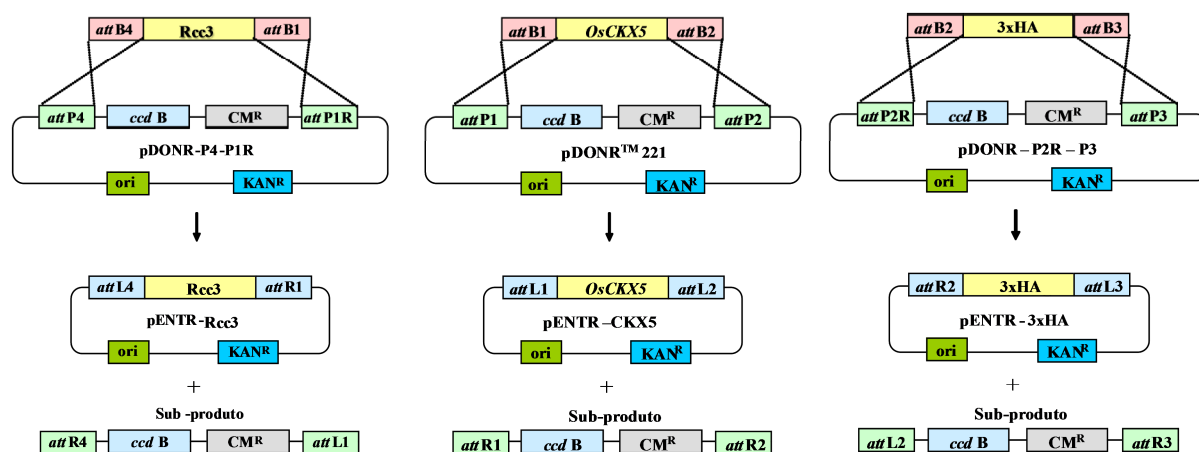


Figura 3. Representação esquemática da reação de recombinação BP (Recombinação entre os sítios *attB* do promotor, gene e *tag* e *attP* dos vetores pDONR-P4-P1R, pDONR-221 e pDONR-P2R-P3 para a obtenção dos vetores de entrada) necessários para a construção do vetor para superexpressão dos genes de interesse em arroz. Ori – origem de replicação; KAN^R- gene de resistência a canamicina; CM^R – gene de resistência ao clorafenicol; *attB*, *attP*, *attL* e *attR* – sítios de recombinação; *ccdB* – gene que codifica para uma proteína que interfere na atividade da DNA girase de *E. coli*, impedindo o seu crescimento; *Rcc3* – Promotor que dirige a expressão em raízes de arroz; 3xHA – peptídeo de fusão

3.3 Construção do Vetor de Expressão pH7m34GW; Reação de Recombinação Múltipla, LR

Após a obtenção de todos os vetores de entrada, por meio das reações BP, foi necessária a aquisição de um vetor de destino, ou seja, aquele que permitiu a recombinação coordenada dos três vetores de entrada na reação de recombinação múltipla, também chamada de reação LR, pois envolve a recombinação entre sítios de recombinação *attL* e *attR* entre os vetores doadores e o vetor de destino. O vetor de destino utilizado foi o pH7m34GW, que leva como agente de seleção das plantas transformadas, resistência ao antibiótico higromicina.

A reação de LR foi realizada utilizando o kit “Gateway LR Clonase II Plus Enzyme Mix” (Invitrogen). Em um microtubo de 1,5 mL foram adicionados: 25 fmoles do vetor de destino pH7m34GW, 12,5 fmoles do pENTR-*Rcc3*, 12,5 fmoles do pENTRCKX e 12,5 fmoles do pENTR-3xHA. O volume foi elevado para 8 µL com TE 1X pH 8,0 e adicionado 2 µL do mix de enzimas. A mistura da reação foi homogeneizada vagarosamente por pipetagem e a reação ocorreu à temperatura ambiente durante a noite. Depois deste período a reação foi paralisada pelo tratamento com 1 µL de Proteinase K a 37°C durante 10 min. Um esquema ilustrativo da reação LR pode ser observado na (Figura 4).

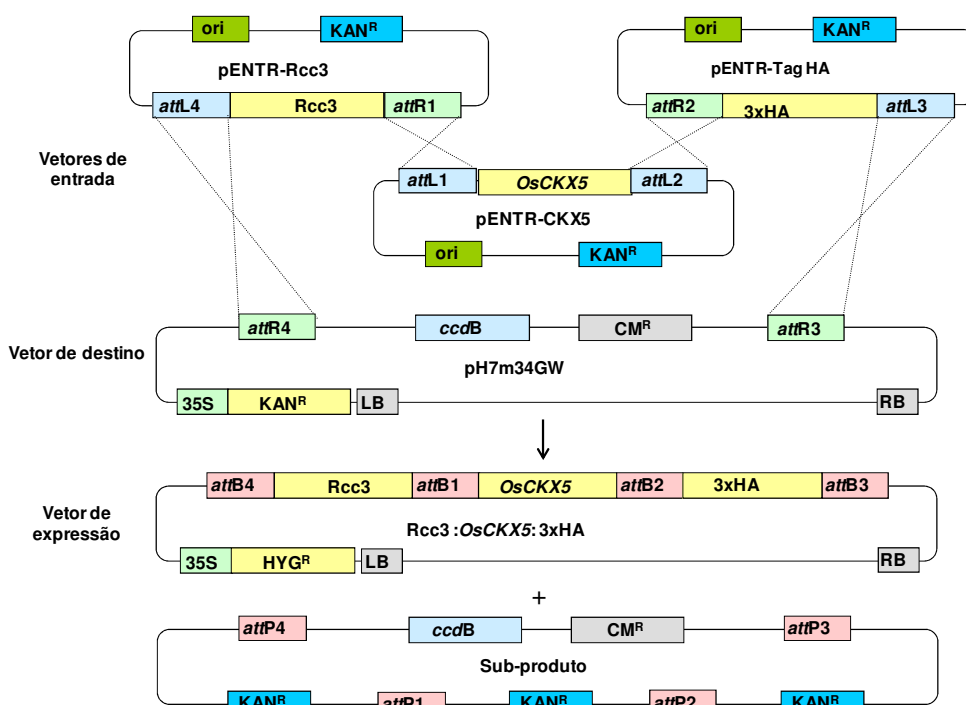


Figura 4. Representação esquemática da reação LR tripla para obtenção do vetor para superexpressão do *OsCKX2* ou *OsCKX5*. Neste trabalho foi empregado o promotor *Rcc3* e um *Tag-3xHA* fusionado ao gene. Ori – origem de replicação; KAN^R - gene de resistência a canamicina; *attB*, *attP*, *attL* e *attR* – sítios de recombinação; LB – borda esquerda; RB – borda direita; *Rcc3* – Promotor que dirige a expressão em raízes de arroz; 3xHA – peptídeo de fusão.

Para caracterizar os clones obtidos, foi realizada a transformação de *E. coli* como descrito anteriormente para a reação BP. O volume total obtido após transformação e cultivo foi plaqueado em meio LB contendo Espectinomicina (Sp) a 50 mg L⁻¹ e Estreptomicina (Sm) a 20 mg L⁻¹ para seleção das células transformadas com o vetor levando a construção gênica. A confirmação da clonagem foi feita por digestão dos plasmídios com as enzimas de restrição *SacI* e *PstI* que cortam dentro do inserto e no vetor.

3.4 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) com as Construções Obtidas

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

Foi adicionado 1 µg de plasmídio a 100 µL de *Agrobacterium*, em seguida a mistura foi homogeneizada suavemente e incubada no gelo por 30 minutos. As células com o plasmídio foram congeladas em nitrogênio líquido por cinco minutos, em seguida, incubada a 37°C em banho-maria por mais cinco minutos. Após este tempo, foi adicionado 1 mL de meio LB e as células mantidas a 28°C com agitação constante a 150 rpm durante duas horas. A transformação (1 mL) foi plaqueada em meio LB sólido com os antibióticos correspondentes a construção (Sp/Sm) mais Rf- Rifamicina (100 mg L⁻¹) e Gm- Gentamicina (40 mg L⁻¹). Estes dois últimos antibióticos são referentes à resistência genômica e plasmidial da *Agrobacterium* LBA4404, respectivamente. As placas foram incubadas a 28°C até o aparecimento de colônias (dois a três dias). A transformação foi confirmada por PCR de colônia.

3.5 Transformação de Plantas via *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação de arroz foi realizada com a variedade japonesa *Nipponbare*, de acordo com protocolo descrito por TOKI et al. (2006), com ajustes em algumas etapas. O detalhamento da transformação de arroz com os ajustes estão descritos brevemente nos resultados e discussão.

3.6 Seleção das Linhagens e Plantas Transformadas

A seleção das linhagens foi realizada após o cultivo em solução nutritiva e observação do crescimento do sistema radicular e parte aérea. Aquelas que apresentaram maior comprimento de raízes sem comprometimento do crescimento da parte aérea foram selecionadas para a condução dos experimentos.

Foram utilizadas sementes da geração T2 para a montagem dos experimentos listados a seguir. Como não foram utilizadas linhagens homozigotas, cada planta foi submetida ao tratamento com higromicina para confirmar a transformação. A seleção das plantas transformadas foi realizada pela adição de 1 µL de uma solução de higromicina (50 µg µL⁻¹) na ponta da folha recém-aberta aos 15 dias após germinação. As plantas que apresentaram necrose no local de aplicação do antibiótico foram descartadas e as que não apresentaram foram mantidas para montagem dos experimentos.

3.7 Avaliação do Sistema Radicular de Plantas de Arroz Superexpressando os Genes *OsCKX2* e *OsCKX5*

Plantas de arroz foram transformadas com as construções *Rcc3:OsCKX2/5:HA*, onde o *Rcc3* representa um promotor forte e específico de raiz em arroz. Duas linhagens de cada construção foram selecionadas e usadas para uma prévia caracterização dos genes quanto ao seu efeito sobre a morfologia e arquitetura do sistema radicular. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições. As plantas foram cultivadas na câmara de crescimento da UFRRJ, sob um fotoperíodo de 16h/8h (luz/escuro) com 500 µmol m⁻² s⁻¹ de fótons fotossinteticamente ativo, umidade relativa do ar de 70% e temperatura de 28°C/26°C (dia/noite). Além das plantas transformadas (com expressão aumentada dos genes *OsCKX2* e *OsCKX5* na raiz), foi utilizada uma planta não transformada da mesma variedade (*Nipponbare*) como controle. As sementes de arroz foram desinfestadas com uma solução de

hipoclorito de sódio 2% (v/v) e Tween 20 a 0,025% (v/v) por 15 minutos, em seguida foram lavadas por cinco vezes com água estéril, e colocadas para germinar em potes com água destilada sobre uma tela feita com gaze. Seis dias após a germinação (DAG), as plântulas foram transferidas para potes de 0,7 L com solução de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950) modificada contendo 3 mM de N (2,5 mM de N-NO_3^- e 0,5 mM de N-NH_4^+) a $\frac{1}{4}$ da força iônica total. Esta mesma solução foi ministrada a cada três dias até 20 DAG. Após esse período, as plantas foram coletadas. As raízes foram escaneadas e as imagens analisadas no programa WinRHIZO™, de onde foram obtidos os parâmetros: diâmetro médio de raízes, comprimento total de raiz, área de projeção das raízes, área de superfície, volume radicular e número de ápices.

3.8 Experimento para Avaliação da Expressão Gênica de Plantas de Arroz superexpressando *OsCKX5*

Após avaliar a morfologia das raízes e o crescimento da parte aérea das plantas transformadas verificou-se que não houve diferença entre plantas expressando os genes *OsCKX2* ou *OsCKX5*. Dessa forma, optou-se por prosseguir com os experimentos apenas com as linhagens expressando o gene *OsCKX5*.

Para a análise dos níveis de expressão do *OsCKX5* nas plantas mutantes ($\text{P}_{\text{Rcc3}}:\text{OsCKX5}:3\text{xHA}$) (L#48 e L#49) e plantas não transformadas, foi montado um experimento idêntico ao citado anteriormente (item 3.7). Aos 20 DAG as plantas foram coletadas e separadas em raiz e parte aérea e armazenadas em nitrogênio líquido para posterior análise.

3.8.1 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído utilizando tampão NTES (Tris-HCl (0,2 M) pH 8,0; EDTA (25 mM) pH 8,0; NaCl (0,3 M) e SDS (2%)). Amostras de raízes foram maceradas em N-líquido e homogeneizadas por 10 min em vórtex numa mistura contendo 800 μL de tampão NTES e 600 μL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. O homogeneizado foi centrifugado a 18.000 x g. por 20 min a 4°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo e novamente centrifugado por 20 min com 500 μL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Após o procedimento, o RNA total foi precipitado pela adição de 1/10 volume de acetato de sódio 3M ($\text{NaOAc}_{\text{DEPC}}$) pH 4,8 (70 μL) e 1 volume de isopropanol puro (700 μL). A seguir, a mistura foi mantida a -80°C por 1 hora seguida de centrifugação a 18.000 xg por 20 min a 4°C. Descartado o sobrenadante o precipitado foi lavado em etanol_{DEPC} (70%) e centrifugado a 18.000 xg por 10 min. O precipitado foi solubilizado em 600 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ e novamente precipitado com 600 μL de cloreto de lítio 4 M ($\text{LiCl}_{\text{DEPC}}$) pH 4,8 durante 16 horas a 4°C. Decorrido esse período, a solução foi centrifugada a 18.000 xg por 20 min a 4°C e o precipitado foi novamente solubilizado em 450 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$. Após a completa dissolução foi adicionado acetato de sódio 3M ($\text{NaOAc}_{\text{DEPC}}$) pH 4,8 (50 μL) e etanol absoluto (1000 μL). A mistura foi mantida por 45 min -80°C e centrifugada a 18.000 x g. por 20 min a 4°C. O precipitado foi lavado com etanol (70%) e após a secagem, o precipitado foi solubilizado com $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ (50 μL), para armazenamento a -80°C.

O RNA total foi quantificado em duplicata no aparelho NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Após a quantificação, foram corridas amostras de cada extração em gel de agarose (1%) com brometo de etídio, para detecção de possíveis sinais de degradação do RNA.

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

Amostras de 0,5 µg de RNA total foram tratadas com DNase I (“*DNase I Amplification Grade – Invitrogen™*”) seguindo as instruções do fabricante. A reação de síntese do cDNA foi realizada com o kit “*High Capacity RNA-to-cDNA*” (*Life Technologies*) seguindo as instruções do fabricante.

Os genes correspondentes ao fator de alongamento 1- α de arroz (*eEF1- α*) e da ubiquitina 5 de milho (*UBQ5*) foram utilizados como controle endógeno para normalização da expressão gênica (JAIN, 2009). As reações foram feitas no aparelho “*StepOne Plus Real-Time PCR System*” (*Applied Biosystems*) utilizando o “*kit Power SYBR® Green PCR Master Mix*” (*Applied Biosystems*) seguindo as recomendações do fabricante. Todas as reações foram feitas em duplicata. A reação foi montada em placas de PCR da seguinte maneira: 6 µL do tampão “*Power SYBR Green PCR Master Mix*” (2X), 3 µL de uma solução de *iniciadores* (3,6 µM cada) e 3 µL do cDNA diluído 10X, com volume final de 12 µL. A placa foi selada com filme óptico apropriado, agitada por três min em vórtex próprio e centrifugada a 3.000 xg por 3 min a 25°C. Cada reação foi realizada da seguinte maneira: dez min a 95°C, quarenta ciclos de amplificação com 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Uma curva de dissociação (*melting*) foi adicionada à programação para identificar possíveis amplificações inespecíficas.

3.8.3 Desenho dos *iniciadores* para os estudos de expressão gênica

Os *iniciadores* para os genes *OsCKX2* e *OsCKX5* foram obtidos com o uso do programa Primer Express 3.0 (*Applied Biosystem*). Os *iniciadores* para os genes de referência *eEF1- α* e *UBQ5* foram os mesmos usados por JAIN et al. (2009). A especificidade dos *iniciadores* foi analisada por alinhamento das sequências na ferramenta primer-BLAST (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) e experimentalmente ao fim da reação de PCR durante a curva de dissociação. Todos os *iniciadores* apresentaram especificidade para cada gene analisado.

Tabela 2. Sequências dos *iniciadores* utilizados para a avaliação da expressão gênica em tempo real das citocininas oxidases *OsCKX2* e *OsCKX5* de arroz e genes de referência: ubiquitina 5 (*UBQ5*) e fator de alongamento 1- α (*eEF1- α*).

Gene	<i>Iniciador Forward</i>	<i>Iniciador Reverse</i>	Nº acesso
<i>OsCKX2</i>	CCGCAACAAGTGGGACAGTA	CCCACCGTGTAGAACACCTC	AK243684.1
<i>OsCKX5</i>	GCCTGGAGGTCACCAAGAAT	CTAGGAAGTCCACGTACGGC	NM_001050944.1
<i>OsUBC5</i>	5'-ACCACTTCGACCGCCACTACT-3'	5'-ACGCCTAAGCCTGCTGGTT-3'	AK061988
<i>eEF-1α</i>	5'-TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT-3'	5'-GACTTCCTCACGATTTTCATCGTAA-3'	AK061464

3.9 Avaliação da Absorção de Nutrientes nas Plantas Transformadas superexpressando a Citocinina Oxidase *OsCKX5*

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na área experimental do Departamento de Solos da UFRRJ. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Foram empregadas plantas não transformadas e duas linhagens de plantas transformadas, L#48 e L# 49 com expressão aumentada dos genes *OsCKX5* na raiz. As parcelas foram confeccionadas através da utilização de canos de PVC de 20 cm de diâmetro com 60 cm de altura (Figura 5).



Figura 5. Vista geral e detalhes da montagem do experimento em tubos de PVC de 20 cm de diâmetro e 60 cm de altura para avaliação da absorção de nutrientes nas plantas transformadas para a expressão do gene da citocinina oxidase *OsCKX5* em comparação com plantas não transformadas.

Foi utilizada terra oriunda de um Planossolo de baixa fertilidade coletado no campus da UFRRJ. Uma análise de solo foi realizada para verificar suas características químicas, que estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Atributos químicos do Planossolo Háplico.

Atributos químicos														
Na	Ca	Mg	K	H+Al	Al	S	T	V	m	n	pH _{água}	Corg.	P	K
				mol _c dm ⁻³						1:2,5	%	mg L ⁻¹		
0,06	1,2	0,6	0,09	2,8	0,00	1,95	4,95	41	0	1	5,4	0,94	62	37

As sementes foram previamente desinfestadas com uma solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v) e Tween 20 a 0,025% (v/v) por 15 minutos, em seguida foram colocadas para germinar em potes com água destilada sobre uma tela feita com gaze. Após atingirem um par de folhas definitivas expandidas, foram transplantadas com raiz nua para as colunas. As plantas foram cultivadas no sistema sequeiro com irrigação. Cada parcela foi composta por duas plantas de arroz e com seis repetições de cada totalizando 18 parcelas.

A coleta foi realizada os 30 DAG, as plantas foram separadas em parte aérea e sistema radicular. As raízes coletadas foram destinadas para a caracterização morfológica, onde todo o

solo contendo o sistema radicular foi transferido para uma peneira de 20 mesh, sendo lavado com água corrente. Imediatamente após essa primeira lavagem foram utilizadas pinças e bandejas com água, para retirar pequenas impurezas mais aderidas às raízes que não foram descartadas na primeira lavagem. As plantas foram pesadas (matéria fresca) e avaliadas quanto ao acúmulo de massa de raiz e parte aérea, comprimento da raiz e relação raiz/parte aérea. Posteriormente foram acondicionadas em sacos de papel para secagem em estufa de ventilação forçada à 65°C. Após atingirem peso constante, foram trituradas para determinação dos teores de macro e micronutrientes.

Para a determinação dos macronutrientes (P, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺) e micronutrientes (Fe e Zn) no tecido vegetal, foi realizada uma digestão nítrica. Para tanto, toma-se 0,250 g de tecido vegetal em tubo de teflon de 75 ml, adiciona-se 9 ml de HNO₃, e após vedado, o tubo foi submetido a aquecimento por micro-ondas. O digestor utilizado foi da marca MARS XPRESS[®], programado de acordo com o método 3052A (USEPA, 1996) para potência de 1600 W, atingindo 180 °C em 5,5 minutos, permanecendo nesta temperatura por mais 9,5 minutos. Após digerida, a amostra foi diluída à 50 ml com água ultrapura, sendo realizadas as leituras de K⁺ por fotometria de emissão, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe e Zn por espectrofotometria de absorção atômica e o P por espectrofotometria do metavanadato (MALAVOLTA et al., 1997).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção das Construções Gênicas

Os genes *OsCKX2* e *OsCKX5* foram amplificados a partir de cDNA oriundo de RNA total de folhas de plantas de arroz (*Oryza sativa* L. cv Piauí) que passaram por um tratamento com citocinina sintética (*6-Benzylaminopurine* ou 6-BAP). Este tratamento foi necessário, pois os genes *OsCKXs* tem um significativo aumento de expressão quando as plantas são tratadas com esse hormônio. Nessas condições os genes foram amplificados com sucesso, apresentando tamanho esperado de 1695pb (*OsCKX2*) e 1602pb (*OsCKX5*) (Figura 5).

Para a superexpressão dos genes foi utilizado o promotor *Rcc3*, que dirige uma expressão forte e específica em raízes de arroz. O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%, e visualizado através de fotografia (Figura 6).

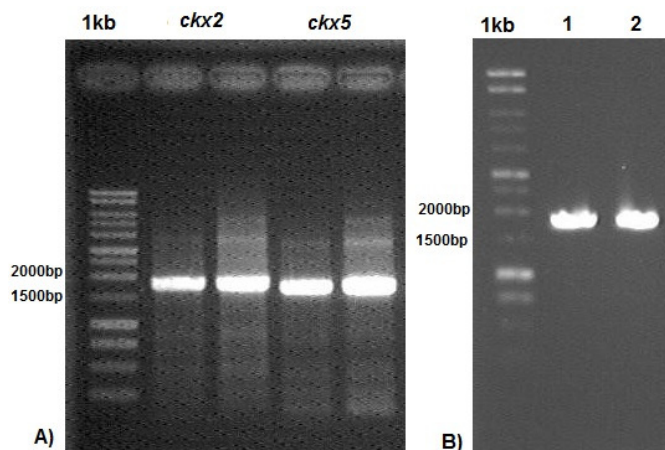


Figura 6. Produtos da amplificação dos genes *OsCKX2* e *OsCKX5* e do promotor *Rcc3* em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. A) Primeira e segunda amplificação dos genes *OsCKX2* (1695pb) e *OsCKX5* (1602pb); b) Primeira e segunda amplificação do promotor *Rcc3* (1731pb). M – marcador 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

Os fragmentos correspondentes a sequências codificantes dos genes *OsCKX2* e *OsCKX5* depois de amplificados foram inseridos no vetor pDONR221 pela "Reação BP" (Figura 7). O produto da reação BP foi usado para transformação de *E. coli*. A fim de caracterizar os clones obtidos, foram feitos pré-inóculos com os clones e a extração do DNA plasmidial. A confirmação dos clones foi realizada por restrição com a enzima *SacI* que resultou em fragmentos de restrição de tamanhos esperados para o pENTR:*OsCKX2* e pENTR:*OsCKX5* (Figura 8).

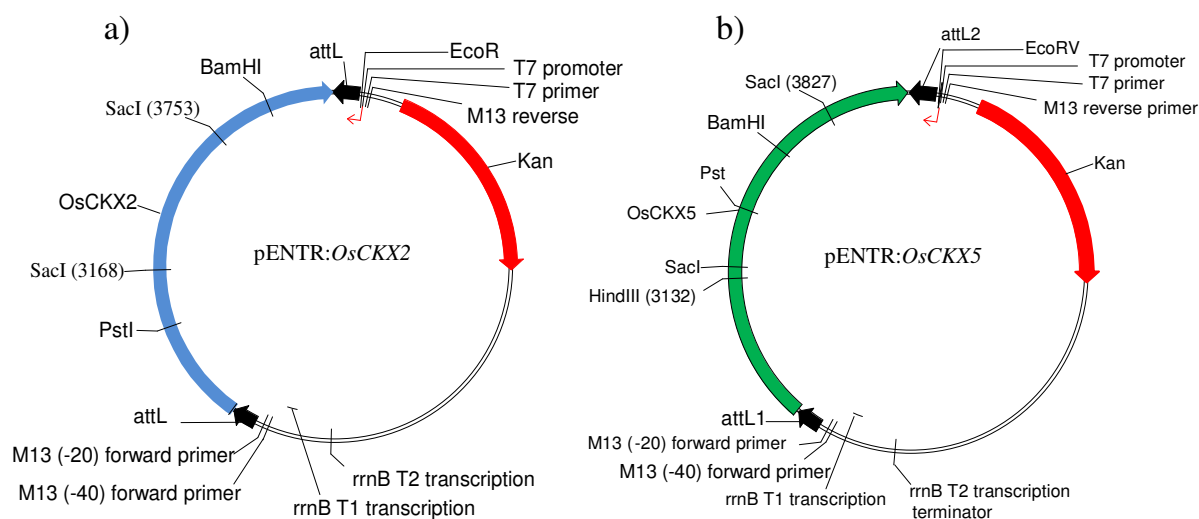


Figura 7. Ilustração dos vetores de entrada para os genes *OsCKX2* e *OsCKX5*. Mapa de restrição dos vetores de entrada pENTR:*OsCKX2* (a) e pENTR:*OsCKX5* (b).

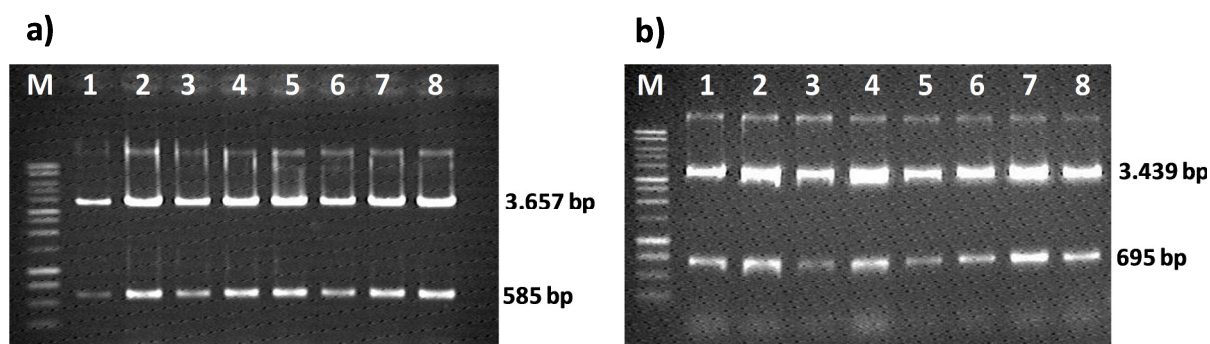


Figura 8. Fragmentos de restrição após digestão do DNA plasmidial dos clones pENTR:*OsCKX2* (A) e pENTR:*OsCKX5* (B) com a enzima *SacI*; Eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Após a obtenção de todos os vetores de entrada através das reações BP, foi necessária a construção do vetor de expressão através de uma recombinação múltipla, chamada de reação LR. O vetor de destino utilizado foi o pH7m34GW.

Da mesma forma que na reação BP, foram feitos pré-inóculos e extração do DNA plasmidial, o qual foi utilizado na reação de restrição, com a enzima *PstI* para confirmação da construção. Através da reação LR foi possível a obtenção do cassete de expressão para a superexpressão dos genes de interesse em raízes de arroz (Figura 9).

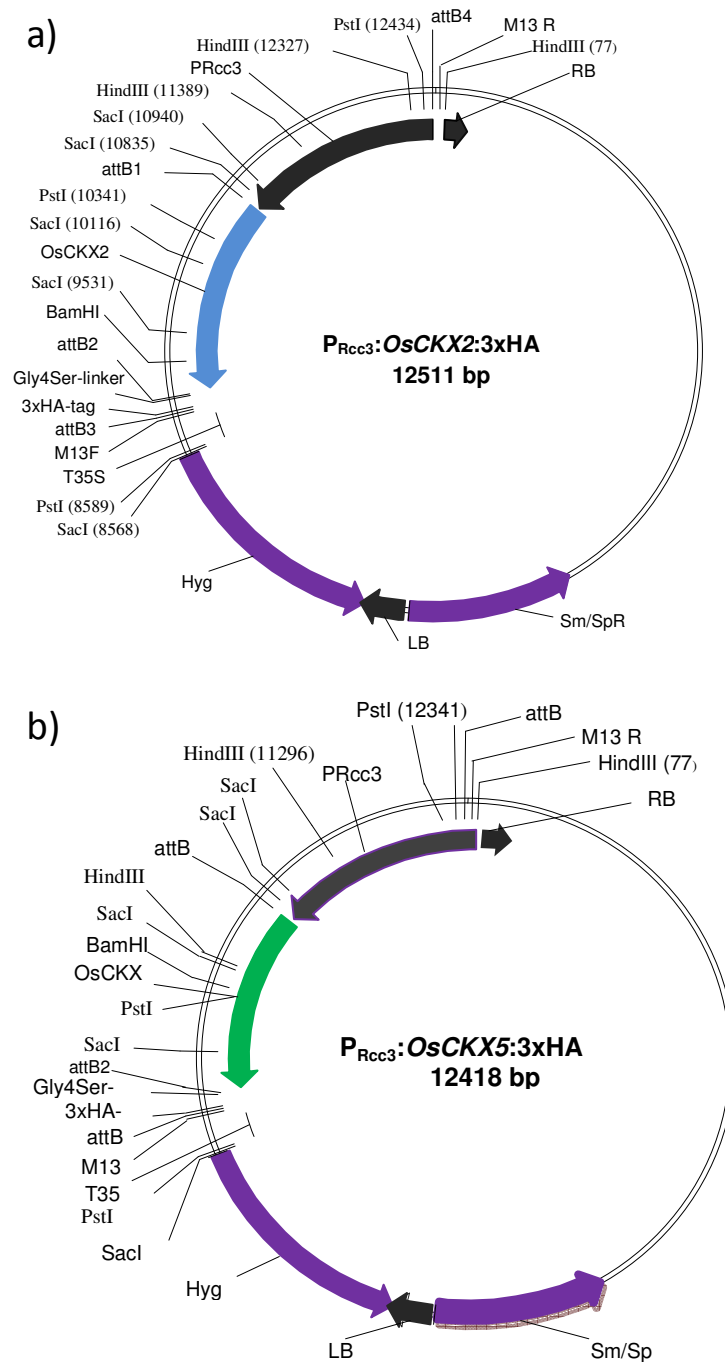


Figura 9. Esquema ilustrativo do vetor de expressão pH7m34GW com o cassete de expressão; a) $P_{Rcc3}:OsCKX2:3xHA$; e b) $P_{Rcc3}:OsCKX5:3xHA$. LB e RB - bordas direita e esquerda, reconhecidas pela *Agrobacterium* para transferência da construção gênica; Hyg - gene da higromicina fosfortransferase, que confere resistência a higromicina nas plantas transformadas; P_{Rcc3} - promotor que dirige a expressão em raízes de arroz.

4.2 Transformação de Plantas de Arroz: Destaque para as Alterações em Relação ao Protocolo Original

Após a confirmação das construções gênicas, os vetores foram inseridos em *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe LBA 4404, para transformação de plantas de arroz.

A transformação genética de arroz com a construção para superexpressão das *OsCKXs* foi realizada com a variedade japônica *Nipponbare* seguindo protocolo proposto por TOKI et

al. (2006) com algumas alterações. Essas alterações aumentaram a eficiência de transformação do arroz e serão discutidas a seguir.

Dentre as alterações realizadas está o processo de desinfestação das sementes que foi feito com uma lavagem inicial em etanol 70% por um minuto, seguido de duas lavagens com hipoclorito de sódio a 2% e *tween* 20 0,05% por 30 minutos cada (Figura 10a). Depois das lavagens com solução de hipoclorito de sódio as sementes foram lavadas por sete vezes em água destiladas estéril. No protocolo original as lavagens com hipoclorito são feitas por apenas 15 minutos, entretanto em procedimentos anteriores feitos no laboratório de nutrição de plantas da UFRRJ, verificou-se que o aumento do tempo de desinfestação com hipoclorito para 30 minutos aumentou o percentual de sementes que deram origem a calos embriogênicos.

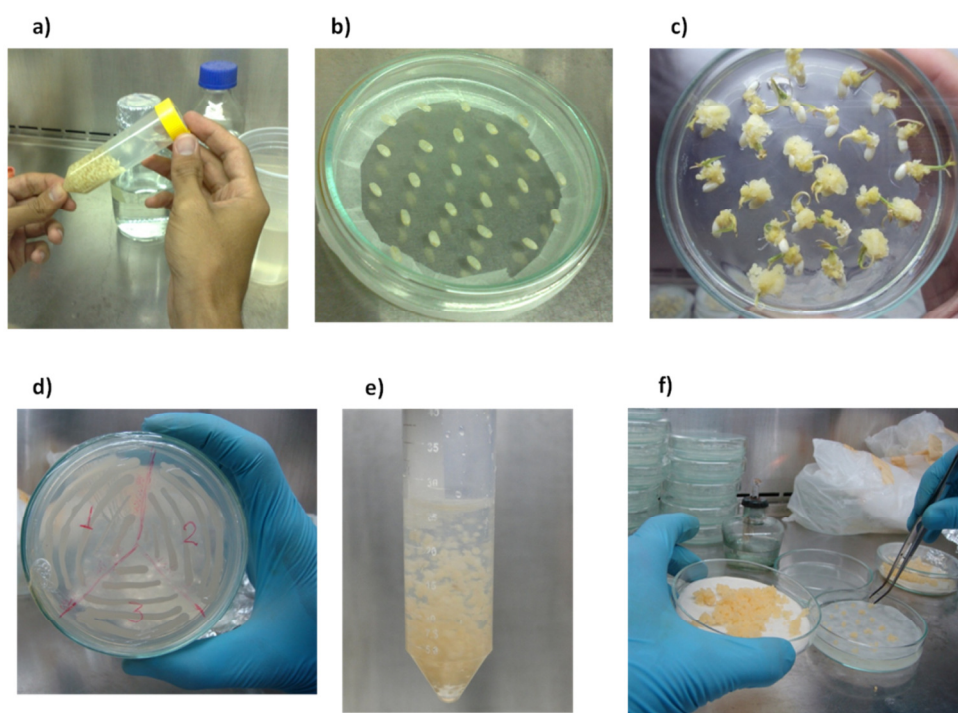


Figura 10. Ilustração das etapas iniciais da transformação genética de arroz. a) desinfestação das sementes; b) sementes dispostas no meio de indução de calos N6D; c) calos produzidos depois de duas semanas no meio de indução de calos; d) *Agrobacterium* crescida por 3 dias em meio AAM; e) Inoculação dos calos com *Agrobacterium* em meio AAM-As; f) calos com excesso de *Agrobacterium* drenado em papel de filtro sendo dispostos no meio de co-cultivo.

Após desinfestadas, as sementes foram colocadas em meio N6D (ANEXO item 1) contendo 2 mg L^{-1} de ácido diclorofenoxiacético (2,4 D) (TOKI et al., 2006) para indução de calos embriogênicos (Figura 10b). No protocolo original, as sementes permanecem nesse meio por apenas cinco dias, enquanto que no protocolo adaptado, esse tempo foi estendido para 14 dias. Ao aumentar o tempo de indução de calos no meio N6D, foram obtidas um maior número de calos e também calos friáveis e com boa atividade de divisão celular, condição muito importante para uma eficiente transformação (Figura 10c). O trabalho clássico de transformação de arroz desenvolvido por HIEI et al. (1994) emprega um período de indução de três semanas para obtenção de calos competentes para transformação mediada por *Agrobacterium*. Com o período de 14 dias de indução, foi possível obter plantas transgênicas morfológicamente normais e férteis após o processo de transformação *in vitro*. Além do maior tempo de indução de calos, a adaptação envolve uma repicagem dos calos para um novo meio N6D por mais três dias para elevar a atividade de divisão celular dos calos antes da infecção

com a *Agrobacterium*. Após o período de indução, os calos foram transferidos para o meio de co-cultivo N6-As (ANEXO, item 2), onde os calos e a *Agrobacterium* são cultivados juntos.

A estirpe LBA4404 de *A.tumefaciens*, contendo as construções gênicas de interesse foram crescidas por três dias a 28°C em meio AB (ANEXO, item 3) (TOKI et al., 2006) com os antibióticos de seleção para as construções (50 µg mL⁻¹ de canamicina) (Figura 10d). Uma solução da *Agrobacterium* em meio AMM (ANEXO, item 4) (TOKI et al., 2006) com DO de aproximadamente 0,1 foi colocada em contato com os calos embriogênicos por aproximadamente dez minutos para dar início ao processo de infecção dos calos (Figura 10e). Após o mergulho dos calos no meio AAM, o excesso de *Agrobacterium* foi drenado em placa de Petri com papel de filtro por um período de 10 min. O protocolo original não estabelece o tempo para drenagem, entretanto, foi verificado que para uma ótima drenagem do excesso de bactéria é necessário um tempo mínimo de 10 min. Depois de drenado, os calos são cultivados junto com a *Agrobacterium* no meio N6D-As (ANEXO, item 2) (TOKI et al., 2006) por um período de quatro dias a 25°C no escuro para que ocorra a transferência da construção gênica da *Agrobacterium* para as células dos calos (período de co-cultivo) (Figura 10 f).

No protocolo original o período de co-cultivo é de apenas três dias. A acetoseringona (As) colocada no meio N6D é um elicitador de virulência importante para ativar os genes Vir da *Agrobacterium*, responsáveis pela execução do processo de transferência da construção gênica para as células vegetais. Foi importante para o sucesso na transformação do arroz, que a solução de acetoseringona fosse preparada no momento de seu uso.

Após o período de co-cultivo, os calos foram lavados por diversas vezes com uma solução do antibiótico timentin (150 mg L⁻¹) para total eliminação da *Agrobacterium*, não mais permitida a partir desse ponto. As lavagens foram repetidas até que a solução resultante ficasse totalmente sem turbidez. O protocolo original usa o antibiótico carbenicilina (500 mg L⁻¹). O timentin substituiu muito bem a carbenicilina, pois também não apresentou fitotoxidez para os calos de arroz. O timentin é um antibiótico usado para eliminar a *Agrobacterium* em protocolos de transformação de muitas outras espécies vegetais. Esta etapa é também importante, uma vez que a *Agrobacterium* pode contaminar os meios a partir dessa etapa, resultando em calos falso-resistentes.

Depois de lavados com a solução de timentin, os calos foram novamente drenados em placas de Petri com papel de filtro para remoção do excesso de solução sobre o calo. Os calos permaneceram sobre o filtro de papel por um período de 10min. Logo em seguida, os calos foram para o meio N6DH (ANEXO, item 5) contendo os antibióticos: timentin (150 mg L⁻¹) para não permitir o crescimento que *Agrobacterium* que por ventura não tenha sido eliminada durante as lavagens, e higromicina (50 mg L⁻¹) para seleção dos calos transformados com a construção gênica de interesse. Os calos permaneceram nesse meio por duas semanas, período em que os calos não resistentes iniciam uma necrose, enquanto os resistentes permanecem com coloração amarelo-claro e proliferam.

Apenas os calos com boa atividade de divisão são transferidos para o meio de regeneração de plantas, REIII (ANEXO, item 6) (TOKI et al., 2006). Essa é a etapa mais crítica de todo o processo de transformação de plantas de arroz e necessita de atenção para alguns pontos que não estão esclarecidos no protocolo original: primeiro, o meio REIII deve estar bem solidificado, pois a umidade excessiva forma um filme de água sobre o calo e impede o processo de regeneração; segundo, os reguladores de crescimento devem ser preparados na mesma semana do uso; terceiro, é necessário trocar o meio de regeneração a cada semana durante o período de regeneração das plantas, que pode ser de até três semanas. Cada plântula formada a partir de um calo isolado é considerada uma linhagem diferente, já que a posição das inserções das construções gênicas no genoma da planta é um fenômeno aleatório.

Após a formação das plântulas, essas foram transferidas para o meio de indução de raízes HF (ANEXO, item 7) (TOKI et al., 2006), onde permanecem por uma semana (Figura 11c). Apenas após a formação de um bom volume de raízes, as plantas foram transferidas para casa de vegetação (Figura 11d).

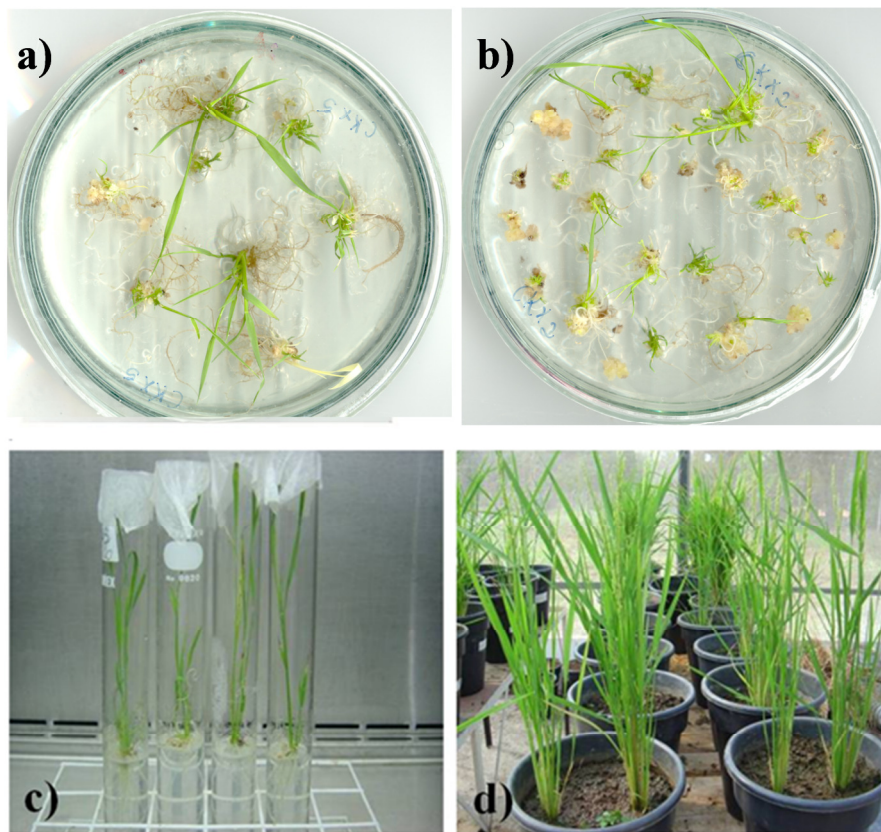


Figura 11. Ilustração das etapas finais da transformação genética de arroz. A e B) calos com as construções $P_{Rcc3}:OsCKX2:3xHA$ e $P_{Rcc3}:OsCKX5:3xHA$ respectivamente em meio de regeneração de plantas, com detalhe para plântulas recém formadas; C) plântula no meio de indução de raízes; D) plantas transformadas em casa de vegetação.

Foram obtidas várias linhagens de plantas de arroz transformadas com as construções gênicas $P_{Rcc3}:OsCKX2:3xHA$ e $P_{Rcc3}:OsCKX5:3xHA$. Cada plântula regenerada a partir de um calo independente no cultivo *in vitro* representou uma linhagem independente (L#1, L#2, L#3 e assim por diante). As linhagens diretamente obtidas após regeneração são denominadas geração (T1).

A geração T1 foi então cultivada em casa de vegetação para a obtenção de sementes.. As sementes obtidas de cada linhagem foram secas em estufa a 37 °C por duas semanas e depois armazenadas em geladeira a aproximadamente 10 °C para uso posterior.

Como não foram obtidas plantas homocigotas, um teste com antibiótico higromicina foi necessário para selecionar as plantas transformadas da geração T2, usadas para montagem dos experimentos. O teste consiste em colocar um fragmento de folha em uma solução contendo o antibiótico higromicina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 6-benzilaminopurina (6-BAP-1 mg L^{-1}) a um fotoperíodo de 16h/8h (luz/escuro) por um período de sete dias. Aos sete dias após o início do teste, observou-se que as plantas transgênicas permaneciam com as folhas ainda verdes ou com necrose somente nas bordas, enquanto as plantas não transformadas apresentaram necrose bem característica no fragmento foliar por inteiro (Figura 12).

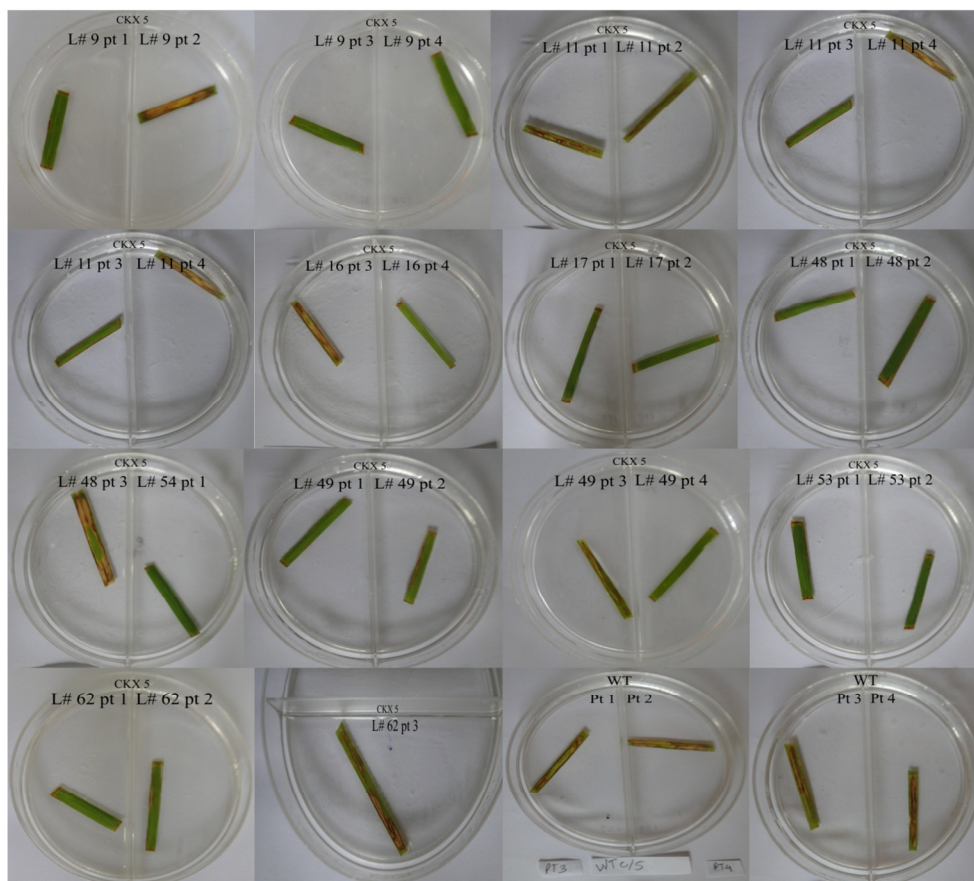


Figura 12. Teste com higromicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 6-BAP (1 mg L^{-1}) para seleção das plantas transformadas ($P_{\text{Rec3}}:OsCKX2:3xHA$ e $P_{\text{Rec3}}:OsCKX5:3xHA$).

Baseado na observação de características fenotípicas como: altura, perfilhamento e número de panículas, foram selecionadas as linhagens L#30 e L#38 da construção $P_{\text{Rec3}}:OsCKX2:3xHA$ e L# 48 e L#49 da construção $P_{\text{Rec3}}:OsCKX5:3xHA$ para montagem dos experimentos de caracterização da morfologia radicular, análise da expressão gênica e avaliação da eficiência na absorção de nutrientes.

Na Figura 13 pode-se observar que o diâmetro médio de raízes das plantas superexpressando o gene *OsCKX2* não foi alterado quando comparado as plantas tipo selvagem (WT). Por outro lado, nas plantas superexpressando o gene *OsCKX5*, houve uma leve redução do diâmetro médio das raízes Figura 13 (A). Apesar dessa pequena diferença entre as linhagens dos dois genes estudados, todos os outros parâmetros radiculares analisados mostraram o mesmo comportamento entre as plantas transformadas e não transformadas.

A superexpressão de ambos os genes (*OsCKX2* e *OsCKX5*) em raízes de arroz resultaram em aumento do comprimento total de raízes, área de projeção, área de superfície, volume total do sistema radicular e número de ápices (Figura 13B-F). Segundo ATKINSON (2000), esses parâmetros estão relacionados com a geometria radicular, e tem um importante papel nos mecanismos de interação solo planta.

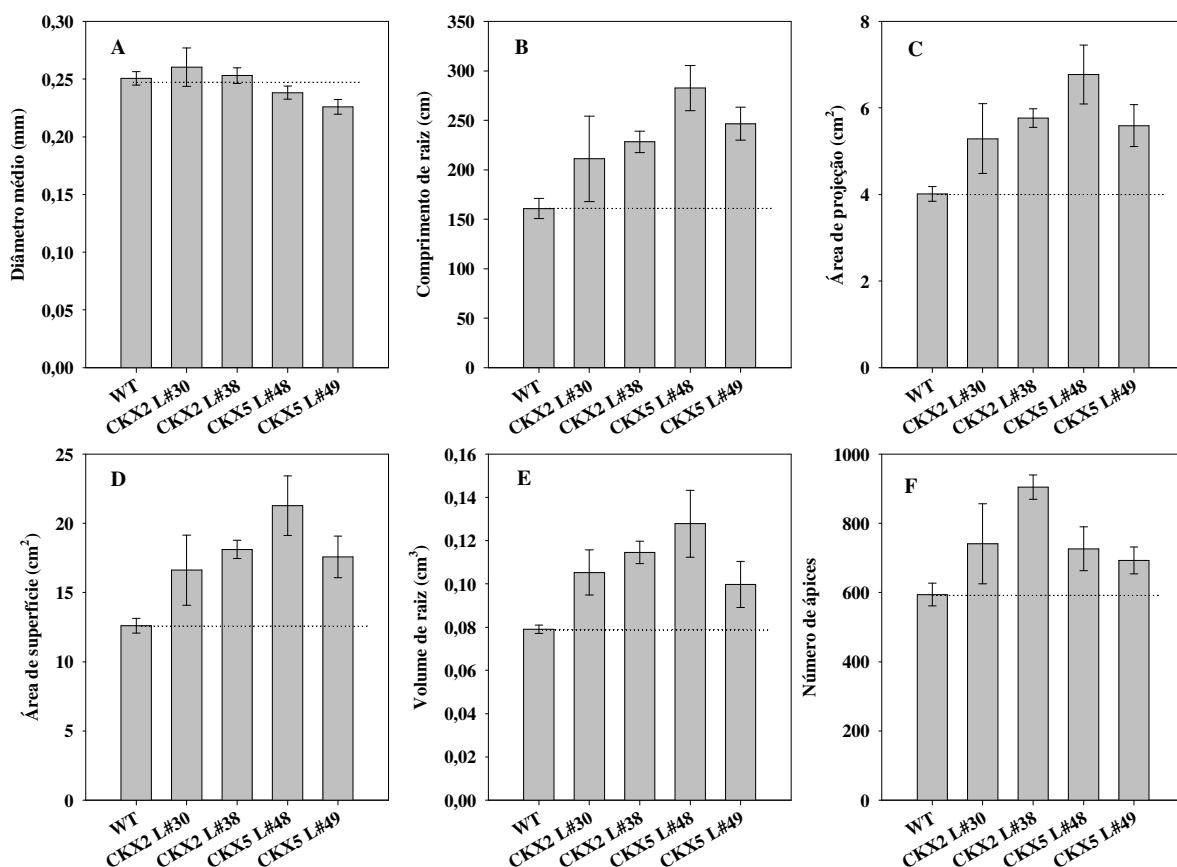


Figura 13. Parâmetros morfológicos de raízes de plantas não transformadas (WT) e plantas superexpressando os genes *OsCKX2* (linhagens L#30 e L#38) e *OsCKX5* (linhagens L#48 e L#49). Diâmetro médio (mm) (A); Comprimento total (cm) (B); Área de projeção (cm²) (C); Área de superfície (cm²) (D); Volume total (cm³) (E) e número de ápices (F).

Após verificar que não houve diferenças entre plantas expressando o *OsCKX2* ou *OsCKX5*, optou-se por prosseguir o trabalho apenas as plantas P_{Rcc3}:*OsCKX5*:3xHA. A partir desse ponto os resultados mostrados são referentes às linhagens L#48 e L#49 da construção P_{Rcc3}:*OsCKX5*:3xHA. As linhagens transformadas apresentaram bom desenvolvimento de parte aérea (Figura 14). O fato de estas linhagens transformadas terem bom desenvolvimento de parte aérea nos leva a concluir que a construção gênica usada na transformação foi apropriada para reduzir os níveis de citocinina na raiz, estimulando seu crescimento, sem contudo, prejudicar o crescimento da parte aérea. O promotor utilizado na construção gênica foi o *Rcc3*, um promotor forte e específico de raízes em arroz (JEONG et al., 2010). Nesse caso, um promotor específico de raiz foi necessário, uma vez que a expressão da CKX em toda planta poderia ocasionar um diminuição nos teores de citocinina em todas as partes da planta, comprometendo assim o seu desenvolvimento.

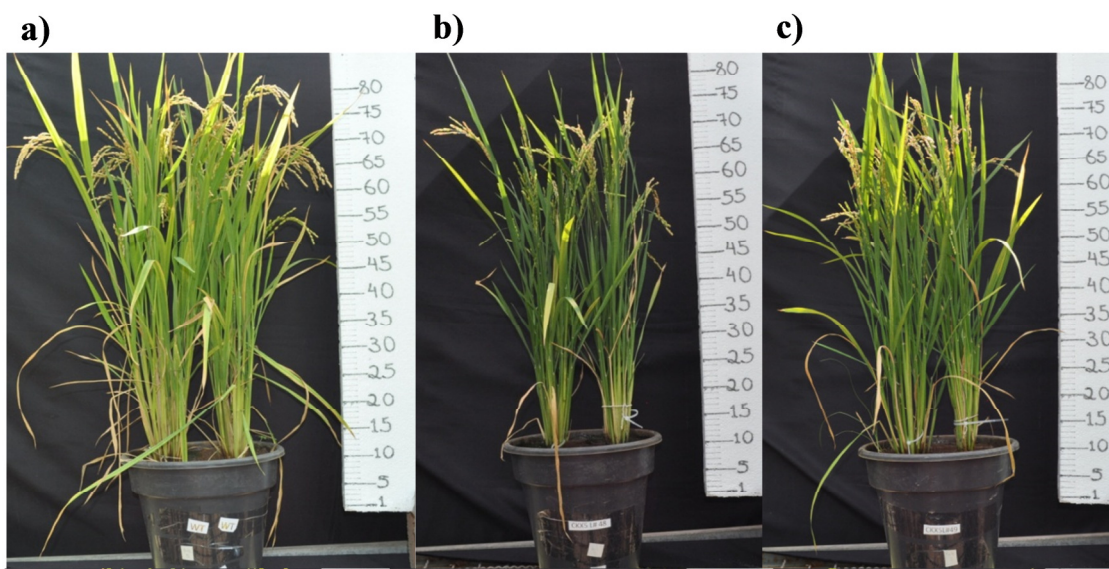


Figura 14. Morfologia da parte aérea de plantas não transformada (a), plantas superexpressando os genes *OsCKX5* das linhagens L#48 (b) e L#49 (c).

Este fato foi relatado por WERNER et al. (2010) onde a transformação de plantas de tabaco, utilizando um promotor constitutivo 35s fusionado ao gene *CKX*, levou a expressão do gene em todas as partes das plantas, ocasionando a degradação de citocinina em todos os órgãos da mesma, resultando em prejuízo severo do crescimento da parte aérea. Com base nisso pode-se afirmar que o promotor *Rcc3* levou a uma diminuição específica nos teores de citocinina nas raízes de arroz sem o comprometimento da parte aérea.

Quando avaliados alguns parâmetros fenológicos como número de perfilhos, altura de plantas e número de panículas por plantas foi verificado que não houve diferenças significativas entre plantas transformadas e não transformadas (WT) (Figura 15).

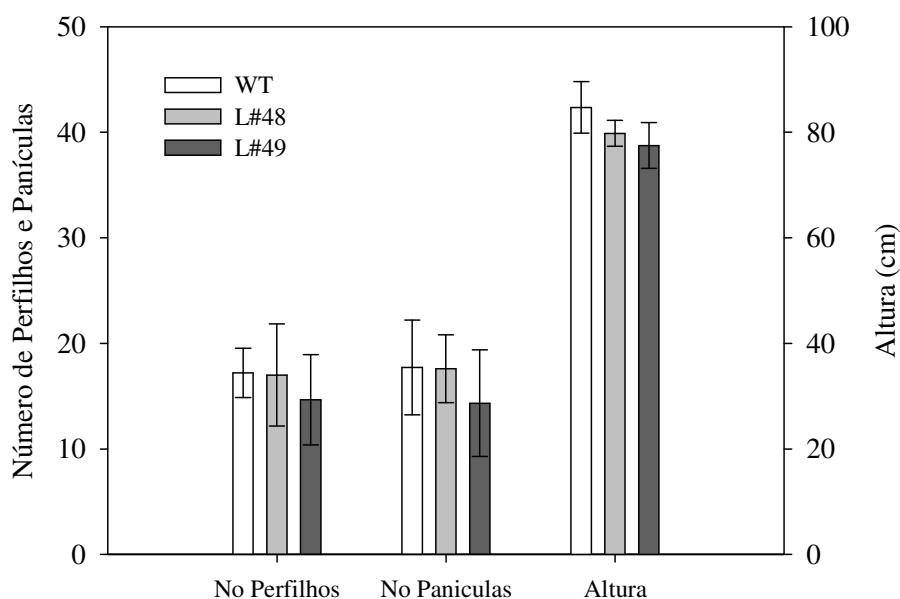


Figura 15. Parâmetros fenológicos de plantas não transformadas (WT) e plantas $P_{Rcc3}:OsCKX5:3xHA$, linhagens L#48, L#49.

A ausência de mudanças morfológicas expressivas na parte aérea das plantas transformadas indica que a citocinina produzida na raiz não foi totalmente degradada, o que houve foi uma diminuição nos seus níveis levando a uma alteração do balanço hormonal em favor da auxina o que gerou um estímulo no crescimento das raízes. Estes resultados demonstram e afirmam a idéia de que ocorre o transporte de citocinina via xilema da raiz para parte aérea e vice-versa, mas que cada órgão tem a capacidade de regular em grande parte seu crescimento de forma autônoma.

4.3 Análise do Efeito da Superexpressão do e *OsCKX5* sobre o Desenvolvimento Radicular das Plantas de Arroz

O comprimento radicular é um fator determinante do potencial de absorção de água e nutrientes do solo, e é também um indicador da interação das raízes com os microrganismos do solo (ATKINSON, 2000). Geralmente, quanto maior o comprimento total do sistema radicular, maior é a capacidade de absorção de água e nutrientes e maior o volume de solo explorado FRANÇA et al. (1999) relatam que em estudos sobre o influxo líquido de nutrientes deve ser considerada a influência do diâmetro radicular e da distância média entre as raízes.

É possível observar na Figura 16 (a), a morfologia do sistema radicular de plantas não transformadas e plantas $P_{Rcc3}:OsCKX5:3xHA$. Nota-se que as plantas transformadas apresentam maior comprimento de raízes principal e laterais. Ainda é possível observar que nas plantas transformadas, há presença de raízes laterais longas, grupo de raízes não observadas nas plantas não transformadas (Figura 16 b).

Segundo BONSER et al. (1996), um sistema radicular eficiente é aquele que otimiza a relação entre quantidade de recursos adquiridos e empregados para sua obtenção, e que a arquitetura do sistema radicular assume papel relevante na aquisição de recursos do solo.

A formação das raízes laterais é um processo multifásico que inclui a iniciação, emergência dos primórdios da raiz e ativação dos meristemas das raízes laterais. Vários autores indicam que a auxina seria necessária para a iniciação e crescimento de raízes laterais (REED et al., 1998). Sendo assim um balanço favorável para a síntese endógena de auxina resulta em um aumento significativo no número de raízes laterais (Figura 16 b).

A citocinina, atuando em conjunto com a auxina, teria importante atuação na morfogênese da planta, influenciando a formação da raiz e da parte aérea e seu crescimento relativo (BOERJAN et al., 1995). Vários trabalhos indicam que citocininas formadas nas pontas das raízes interagem com auxina na regulação da formação das raízes laterais, tendo ação inibitória em relação à emergência de raízes laterais (DEBI et al., 2005). Estes resultados demonstram que uma diminuição nos níveis de citocinina na raiz leva a alteração nesta ação inibitória, levando a maior formação de raízes laterais e com isso um sistema radicular mais desenvolvido.

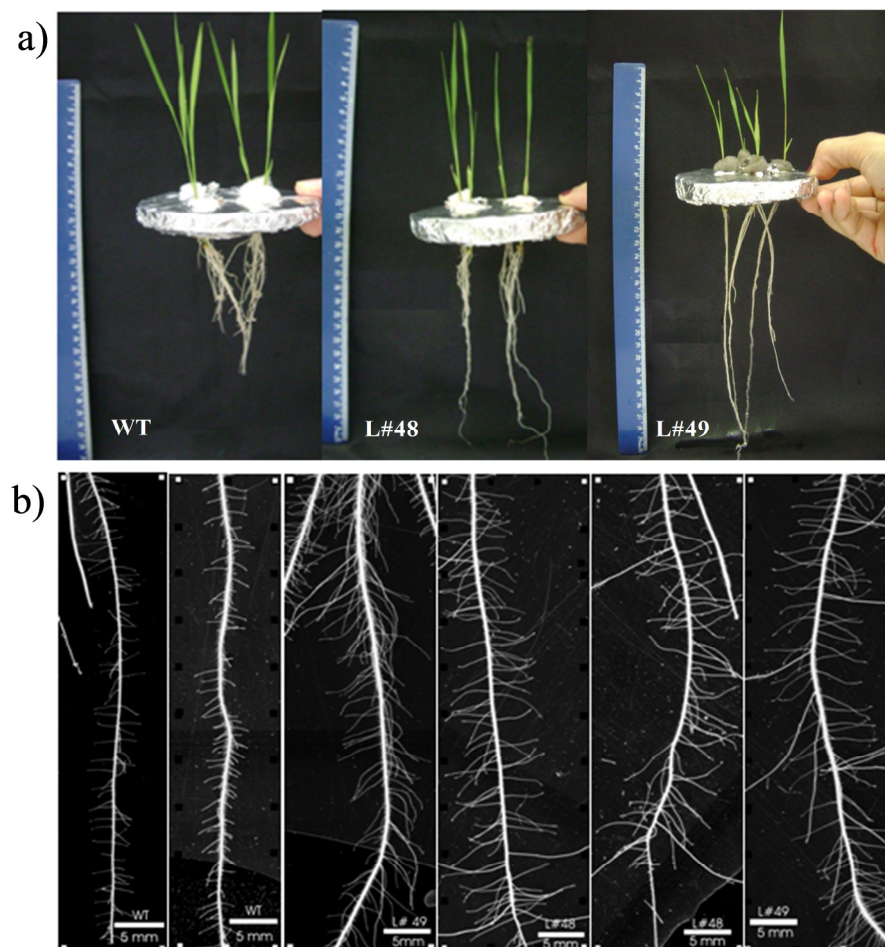


Figura 16. Morfologia do sistema radicular de plantas transgênicas $P_{Rcc3}:OsCKX5:3xHA$ (L#48 e L#49) e plantas não transformadas (WT). a) vista mostrando o comprimento das raízes principais; b) vista do comprimento das raízes laterais.

4.4 Análise do Efeito da Superexpressão do *OsCKX5* em Plantas de Arroz Sobre a Eficiência na Absorção de Nutrientes

Após verificar as alterações de morfologia e arquitetura de raízes em favor das plantas transformadas, um experimento foi conduzido para avaliar o desempenho dessas plantas quanto cultivadas em solo de baixa fertilidade.

As plantas $P_{Rcc3}:OsCKX5:3xHA$ apresentaram maiores níveis de expressão do *OsCKX5* em raiz em condições de cultivo em solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950) modificada contendo 3 mM de N a $\frac{1}{4}$ da força iônica total (Figura 17).

É importante ressaltar que o valor da expressão observada para o gene *OsCKX5* nas linhagens transformadas é reflexo da expressão sobre o controle do promotor forte de raiz *Rcc3* somado a expressão natural do gene. Nas linhagens transformadas houve um aumento de 150 vezes na expressão relativa deste gene, quando comparadas com plantas não transformadas (Figura 17 A).

É possível notar que a expressão do *OsCKX5* não alterou o perfil de expressão do *OsCKX2* nas raízes (Figura 17 B). Por outro lado, as folhas da L#48 apresentaram níveis de expressão do gene *OsCKX2* superiores às plantas não transformadas.

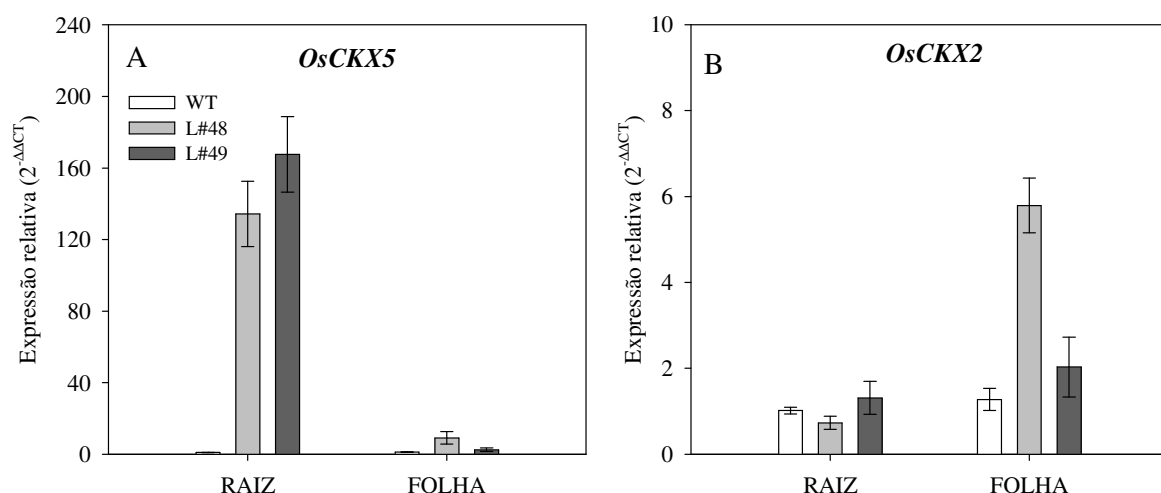


Figura 17. Expressão relativa dos genes *OsCKX5* e *OsCKX2* em raízes e folhas de plantas transgênicas de arroz $P_{Rcc3}:OsCKX5:3xHA$ das linhagem L#48 e L#49 e plantas não transformadas (WT).

O efeito da expressão do *OsCKX5* nas linhagens transgênicas de arroz também levou à mudança na morfologia do sistema radicular em condições de cultivo no solo, como pode ser observado na Figura 18, onde linhagens de plantas superexpressando o gene *OsCKX5* (L#48 e L#49) quando cultivadas em um solo de baixa fertilidade (Planossolo Háplico, sem adubação), em sistema de sequeiro com irrigação, apresentaram maiores valores de massa de raiz, relação raiz/ parte aérea e profundidade do sistema radicular quando comparadas com plantas não transformadas (WT) cultivadas nas mesmas condições Figura 19.

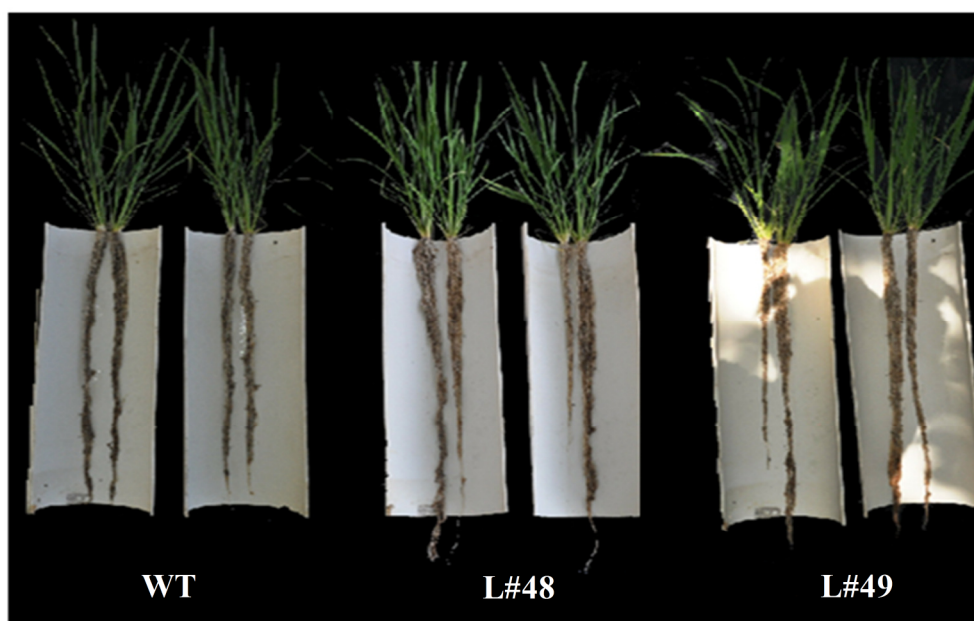


Figura 18. Morfologia do sistema radicular de plantas não transformadas (WT), e plantas $P_{Rcc3}:OsCKX5:3xHA$ (linhagens L#48 e L# 49) cultivadas em terra de um Planossolo sem adubação.

Desta forma a proporção de biomassa de raiz- parte aérea teve um ganho significativo pela expressão específica na raiz do gene *OsCKX5*, indicando que a capacidade da parte aérea

como fonte, foi suficiente para fornecer um ganho de massa para as raízes com o carbono que foi fixado.

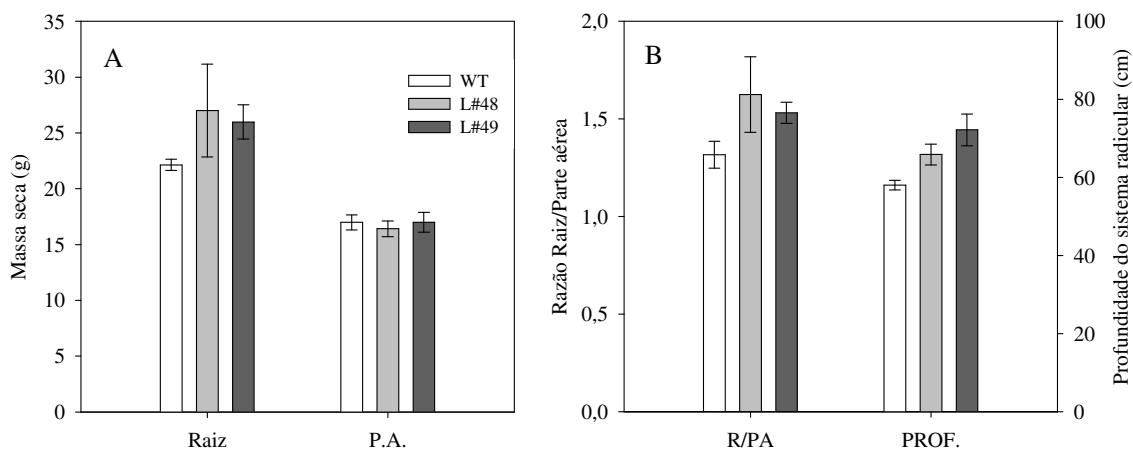


Figura 19. Massa seca de raiz e parte aérea (A) e razão raiz/parte aérea e profundidade do sistema radicular (B) de plantas não transformadas (WT), e plantas superexpressando *OsCKX5* (linhagens L#48 e L# 49).

MARCELIS & HEUVELINK (2007) propõem que a alocação de carbono é regulada por um equilíbrio entre a atividade da raiz e parte aérea, o que implica que a raiz só pode aumentar seu crescimento em detrimento a parte aérea e vice-versa, entretanto, sob condições limitantes de água e/ou nutrientes, um sistema radicular mais desenvolvido pode também resultar em benefícios para a parte aérea.

Na Figura 20 estão apresentados os teores dos principais macronutrientes presentes na planta (N, P, K, Ca e Mg). É possível notar que as plantas $P_{Rcc3}:OsCKX5:3xHA$ (L#48 e L#49) apresentaram teores mais elevados de P e K nas raízes, Ca nas raízes e parte aérea e Mg na parte aérea quando comparadas com as plantas não transformadas.

Mesmo com a massa do sistema radicular superior nas plantas transformadas, os teores de P, K, Ca e Mg nesse órgão foi sempre superior nas plantas transformadas, não havendo portanto, efeito de diluição. Estes resultados indicam uma maior eficiência das linhagens transformadas na aquisição destes nutrientes.

Em solos oxídicos, comuns nas regiões tropicais, o P é um dos elementos menos disponíveis às plantas, uma vez que esse elemento pode ser fortemente adsorvido por óxidos e hidróxidos de Fe e Al, bem como reagir com Al, Fe, e Ca em solução, resultando em produtos de baixa solubilidade. Dessa forma, o P é um elemento muito pouco móvel no solo e o mecanismo de contato íon-raiz para esse elemento é a difusão. Assim, com a absorção do P pelas plantas, há formação de uma "zona de depleção" ao redor das raízes, caracterizada pela baixa concentração desse elemento. Um sistema radicular com maior comprimento de raízes laterais mais finas pode transpor essa zona de depleção gerando maior influxo desse elemento, explicando, portanto, o maior influxo de P observado nas plantas transformadas.

O fato das linhagens apresentarem menor diâmetro radicular faz com que o volume de solo seja mais bem explorado pelas raízes, pois raízes mais finas exploram maior volume de solo por unidade de massa radicular. O solo usado para o experimento apresenta baixa disponibilidade de P (62 mg L^{-1}) e não foi feita nenhuma adubação, sendo assim, um sistema radicular com raízes mais finas pode ser considerado mais eficiente para absorção de P.

O aumento da concentração de raízes laterais finas (Figura 16 b) também pode ser apontado como uma das respostas para o melhor desempenho das linhagens transformadas na aquisição de P e de outros nutrientes, pois estas aumentam a eficiência com que o sistema radicular explora o solo. O fato das raízes laterais apresentarem pequeno raio e maior

crescimento perpendicular em relação ao eixo radicular faz com que a concentração de P na superfície da raiz lateral decresça mais lentamente e o influxo de P permaneça mais elevado (BARBER, 1984). Dentre várias estratégias para aumentar a superfície radicular, aquela que proporciona a mudança na morfologia dos pêlos radiculares e raízes laterais finas são consideradas a de menor gasto metabólico para a planta (GAHOONIA & NIELSEN, 2004).

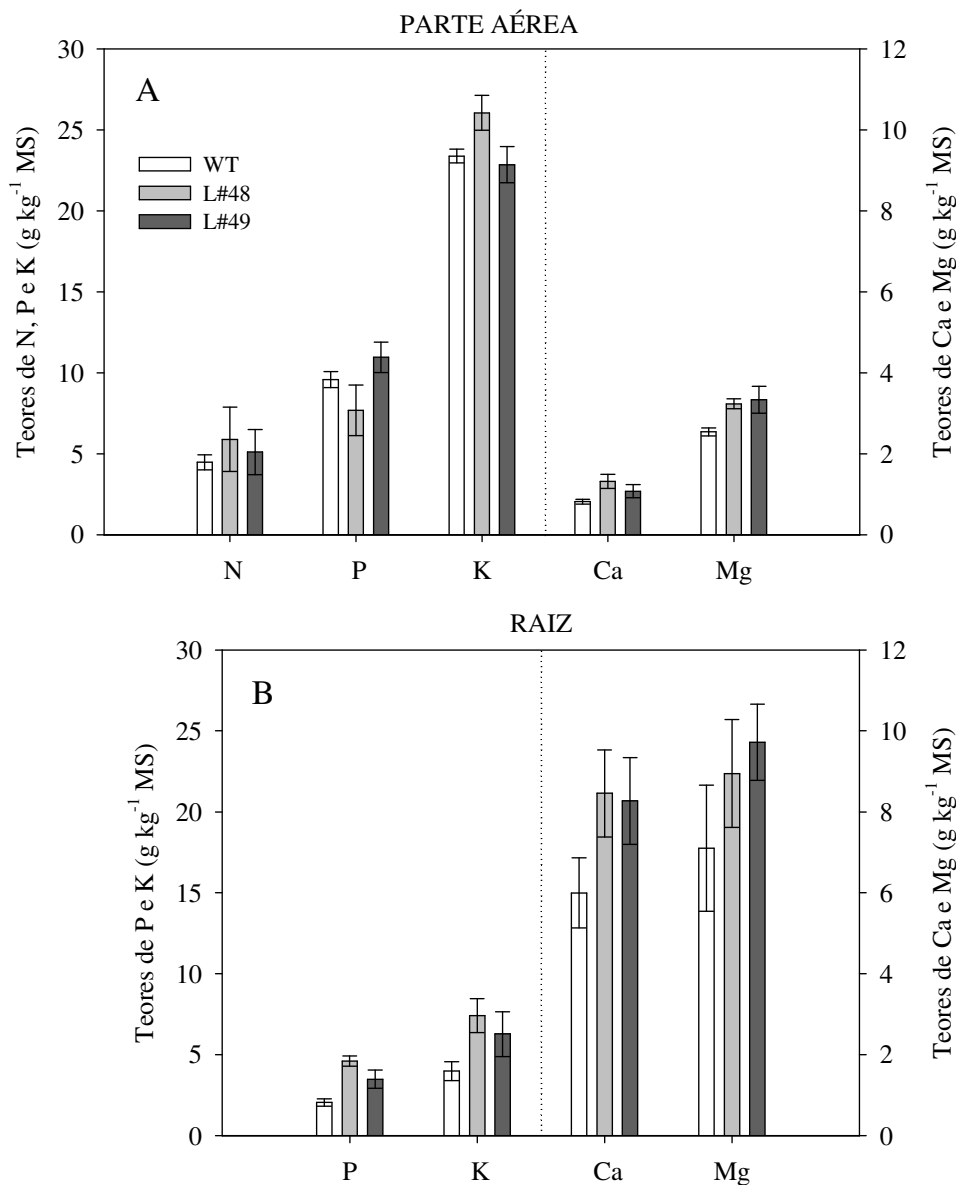


Figura 20. Teores de macronutrientes N, P, K, Ca e Mg expressos em g kg^{-1} MS na parte aérea (A) e raízes (B) de plantas não transformadas (WT) e plantas $P_{\text{Rcc3}}:OsCKX5:3xHA$ (linhagens L#48 e L# 49). *, **: diferença significativa entre as plantas transformadas e WT, pelo teste F com $P < 0,05$ e $< 0,01$, respectivamente.

O K também foi um nutriente absorvido eficientemente pelas plantas transformadas. Este nutriente é abundante na planta e sua principal função está relacionada com as funções osmorregulatórias das plantas, translocação e armazenamento de fotoassimilados, fotossíntese, controle de pH citoplasmático e manutenção de água nos tecidos. O K encontra-se como um íon livre na planta, podendo ser facilmente deslocado na planta, entre células e tecidos (LINDHAUER, 1985). Sendo assim é o principal íon neutralizador de cargas e um importante regulador osmótico (CLARKSON & HANSON, 1980).

O K é absorvido muito rapidamente pelas raízes na solução do solo, de forma que, mesmo sendo um elemento móvel no solo, há também a formação de uma zona de depleção ao redor do sistema radicular para o K, fazendo da difusão também um dos principais mecanismos de contato íon-raiz para esse elemento.

A absorção do K pelas raízes exaure este nutriente na solução do solo e o K trocável rizosférico sem que ocorra a alteração de K do solo não rizosférico (KUCHENBUCH & JUNGK, 1982). Quando ocorre a exaustão do K rizosférico cria-se assim gradiente de concentração que provoca a liberação de K não trocável (HINSINGER & JAILLARD, 1993). Desta forma um sistema radicular mais desenvolvido com maior volume de solo explorado, pode ter facilitado este mecanismo de difusão, pois com o aumento da absorção pode ter levado a exaustão do K trocável no solo, gerando assim gradiente de concentração liberando o K não trocável, aumentando a absorção e os teores de K nas plantas transformadas.

O fluxo de massa também é um importante mecanismo de transporte do K até a superfície das raízes. Este é dependente da quantidade de água no solo, e a quantidade de água que é transpirada pela planta.

Ao contrário do que ocorre com K, o Ca encontra-se na planta em formas não solúveis, e uma grande parte deste nutriente encontra-se na parede celular na forma de pectato de Ca como principal componente da lamela média, o que faz com que ela aumente sua rigidez e dificulte a aumento do tamanho da célula (EVANS et al., 1991). A absorção do Ca e do Mg se dá de forma semelhante a do K. O contato destes nutrientes com a superfície radicular também pode ser por difusão ou por fluxo de massa, sendo este último mecanismo responsável pelo contato de maior proporção de contatos de cátions bivalentes, Ca e Mg com a raiz (HEENAN & CAMPBELL, 1981). A interceptação radicular também é uma forma destes nutrientes serem absorvidos. Assim este mecanismo também pode ter sido facilitado nas linhagens transformadas, já que essas plantas apresentaram um maior número de ápices radiculares e maior profundidade do sistema radicular, o que pode ter facilitado a interceptação da raiz pelo nutriente.

Na Figura 21 pode-se analisar os valores dos conteúdos de macronutrientes (N, P, K, Ca e Mg) presentes na parte aérea e nas raízes das plantas de arroz transformadas e não transformadas. O conteúdo desses elementos mostrou comportamento bastante semelhante ao observado para os teores; entretanto, como a massa do sistema radicular foi maior nas plantas $P_{Rcc3}:OsCKX5:3xHA$, os conteúdos de P, K, Ca e Mg foram marcadamente superiores nessas plantas comparada as plantas não transformadas. Estes resultados demonstram que não houve um efeito de diluição dos nutrientes, ou seja, pode-se afirmar que as linhagem transformadas absorveram mais nutrientes e com isso, apresentaram um maior ganho de massa, comprovando assim a maior eficiência de absorção de nutrientes das linhagens transformadas expressando o gene *OsCKX5* nas raízes.

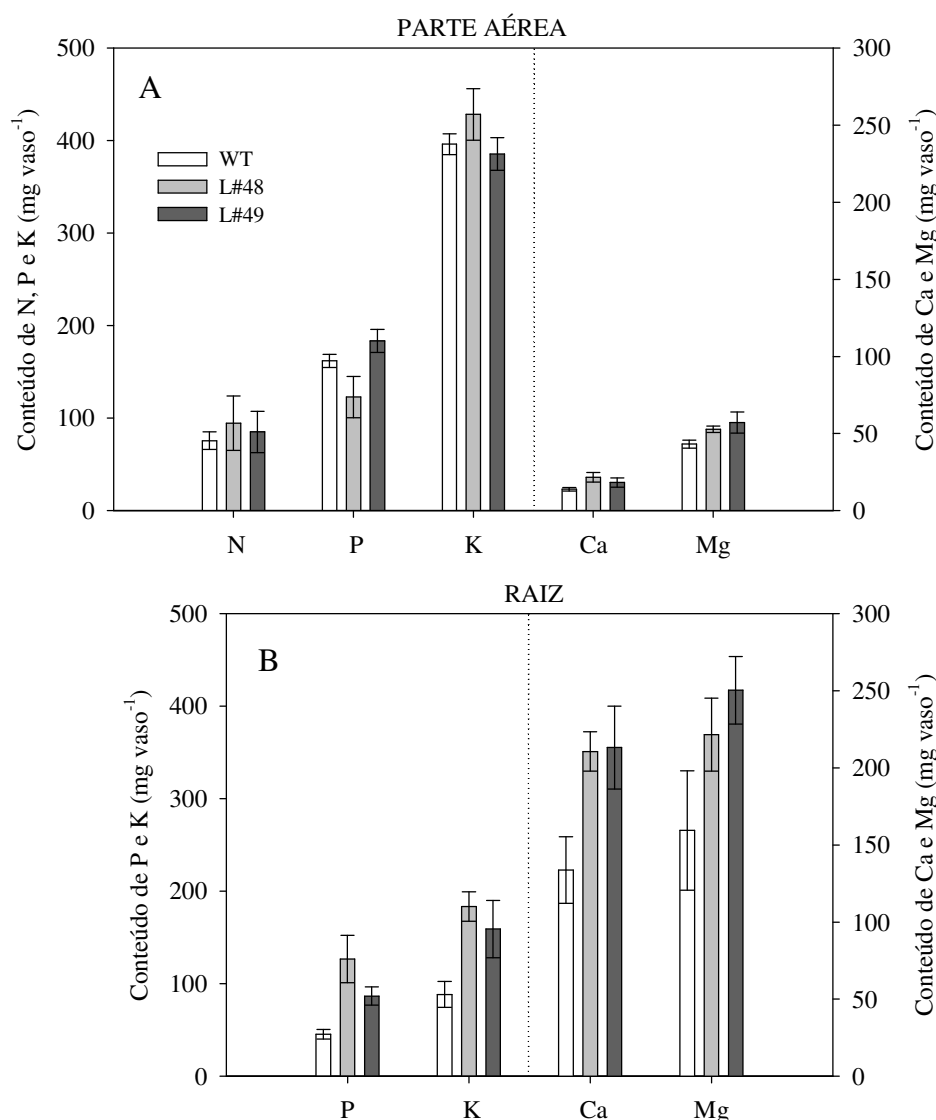


Figura 21. Conteúdo de macronutrientes N, P, K, Ca e Mg expressos em mg vasa⁻¹ na parte aérea (A) e raízes (B) de plantas não transformadas (WT) e plantas superexpressando *OsCKX5* (L#48 e L#49). *, **: diferença significativa entre as plantas transformadas e WT, pelo teste F com $P < 0,05$ e $< 0,01$, respectivamente.

Os micronutrientes são elementos essenciais para o desenvolvimento das plantas, fazendo parte de constituições de enzimas ou como ativadores destas. Eles se caracterizam por serem absorvidos em pequenas quantidades. De acordo com a Figura 22 (B e D) nota-se que os teores e conteúdo de Zn na raiz, também foram mais elevados nas linhagens transformadas em comparação com as plantas WT.

Na parte aérea, os teores e conteúdo de Fe foram levemente maiores nas plantas $P_{Rcc3}:OsCKX5:3xHA$ (Figura 22 A e C). O Fe desempenha um importante papel no metabolismo das plantas, pois atua principalmente na ativação de enzimas, participa de reações de oxirredução, ferredoxina e enzimas redutases, como nitrato redutase, nitrogenase e sulfato redutase. O Fe pode ser absorvido na forma de Fe^{2+} ou Fe^{3+} dependendo do estado de oxirredução do sistema, ou ainda pode ser absorvido na forma de quelatos sendo sua absorção metabolicamente controlada (EPSTEIN & BLOOM, 2005). No caso do arroz que é uma monocotiledônea ocorre a extrusão compostos orgânicos pelas raízes e, logo após, formam complexos com Fe^{3+} , sendo transportados para o interior das células das raízes (EPSTEIN &

BLOOM, 2005). Isto indica que este mecanismo de absorção de Fe também pode ter sido facilitado nas linhagens transformadas, pois com um maior volume de raízes pode ter aumentado também a extrusão destes compostos orgânicos pelas raízes, acarretando no aumento da absorção deste nutriente.

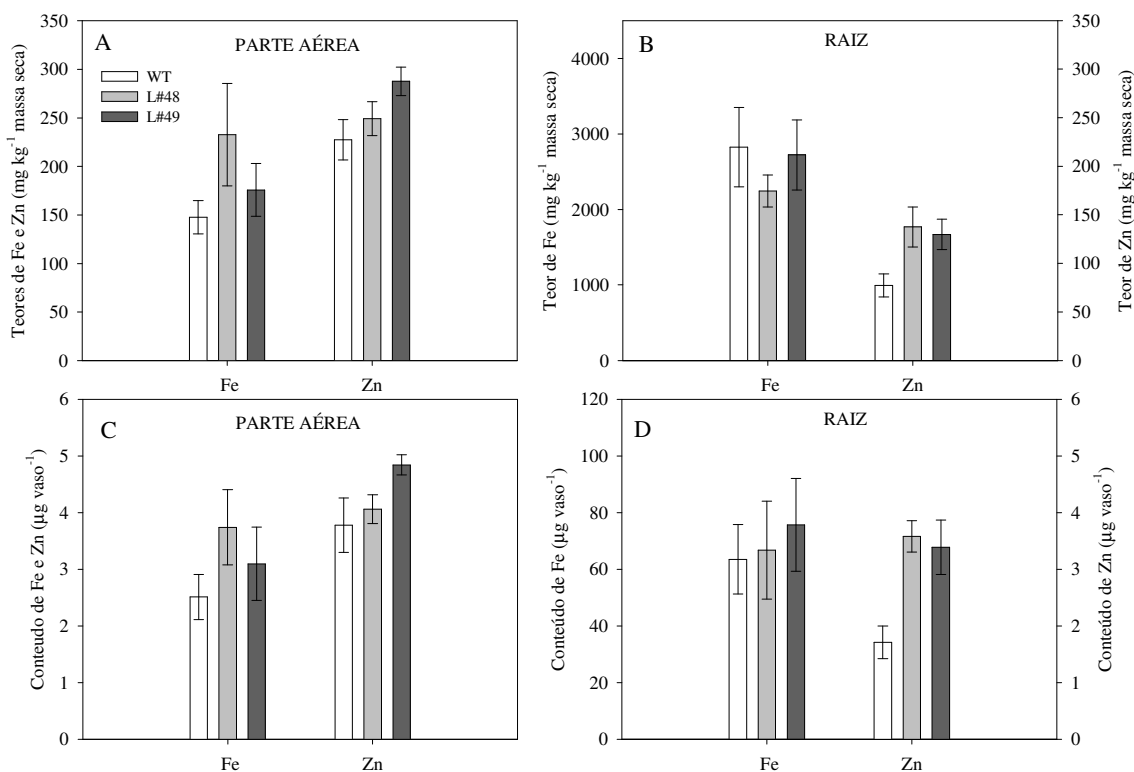


Figura 22. Teores (A e B) expressos em g kg⁻¹ e conteúdos (C e D) expressos em µg vaso⁻¹ de Fe e Zn na parte aérea e raízes de plantas não transformadas (WT) e plantas superexpressando *OsCKX5* (L#48 e L#49). *, **: diferença significativa entre as plantas transformadas e WT, pelo teste F com P <0,05 e <0,01, respectivamente.

O Zn é outro micronutriente que desempenha importantes funções na planta principalmente atuando como co-fator enzimático, participação de ativações enzimáticas, síntese e conservação de auxinas, etc. Esse é um dos micronutrientes cuja deficiência é muito comum no centro-oeste brasileiro, já que os solos dessa região apresentam minerais de argila capazes de adsorver fortemente esse elemento, fazendo da difusão o principal mecanismo de contato íon-raiz para esse elemento, a exemplo do P. Estes resultados indicam que a estratégia de mudança na morfologia e arquitetura do sistema radicular, tem demonstrado ser viável para melhoria da absorção de micronutrientes, principalmente Zn, melhorando assim a oferta deste micronutriente para as plantas e conseqüentemente para os grãos (WERNER et al. 2010).

Uma das vantagens que deve ser apontada em relação as linhagens transformadas apresentarem um sistema radicular mais desenvolvido, é seu potencial para a diminuição do uso de fertilizantes, ou a diminuição de suas perdas no solo, uma vez que os resultados demonstraram que com um sistema radicular mais desenvolvido promove melhor exploração do solo, possibilitando assim a maior eficiência na absorção de nutrientes. É possível também, que essas plantas possuam maior tolerância à seca. Em regime de sequeiro, um sistema radicular mais desenvolvido pode apresentar vantagens na captação de água em camadas mais profundas do solo.

5 CONCLUSÕES

A superexpressão do gene *OsCKX5* com o promotor *Rcc3* resultou em sistema radicular com maior comprimento, área, volume e número de ápices radiculares comparado às plantas não transformadas. A expressão do *OsCKX5* sobre o controle do promotor *Rcc3* não comprometeu o crescimento da parte aérea.

Quando cultivadas em solo de baixa fertilidade sob regime de sequeiro, as plantas $P_{Rcc3}:OsCKX5:3xHA$ apresentaram maior massa de raiz, comprimento do sistema radicular, maior relação raiz/parte aérea e, maiores teores e conteúdo de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg) e micronutrientes (Fe e Zn).

6 PERSPECTIVAS

Há indícios de que as plantas PRcc3:*OsCKX5*:3xHA possam ser mais tolerantes ao estresse hídrico, uma vez que estas apresentaram um sistema radicular mais desenvolvido, com maior profundidade do sistema radicular, comprimento total de raízes, volume, área e maior número de ápices radiculares. Estes resultados demonstram que com a melhor exploração do solo pelas raízes, as plantas podem apresentar maior potencial para resistência ao estresse hídrico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIYOSHI, D. E.; REGIER, D. A.; GORDON, M. P. Cytokinin production by *Agrobacterium* and *Pseudomonas* spp. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 169, p. 4242-4248, 1987.
- ARMSTRONG, D. J. Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. In: Mok DWS, Mok MC (eds) Cytokinin: chemistry, activity, and function. **CRC, Boca Raton**, p.139-154, 1994.
- ASHIKARI, M.; SAKAKIBARA, H.; LIN, S.; YAMAMOTO, T.; TAKAHASHI, T.; NISHIMURA, A.; ANGELES, E.R.; QIAN, Q.; KITANO, H.; MATSUOKA, M. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. **Science**, 309, 741-745, 2005.
- ATKINSON, D. Root characteristics: Why and what to measure. In: SMIT, A.L.; BENGOUGH, A. G.; ENGELS, C.; van NOORDWIJK, M.; PELLERIN, S.; van de GEIJN, S, C eds. **Root methods: a handbook**. Berlin, Springer- Verlag, p 305-341, 2000.
- ATLIN, G. N.; LAFITTE, H. R.; TAO, D.; LAZA, M.; AMANTE, M.; COURTOIS, B. Developing rice cultivars for high-fertility upland systems in the Asian tropics. **Field Crops Research**. v. 97, p. 43-52, 2006.
- BARBER, S.A. Soil nutrient bioavailability: **A mechanistic approach**. New York, Wiley-Interscience, 398p, 1984.
- BOERJAN, W.; CERVERA, M. T.; DELARUE, M.; BECKMAN, T.; DEWITE, W.; BELLINI, C.; CABOCHE, M.; ONCKELEN, H. V.; MONTAGU, M. V.; INZE, D. Superrrot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. **Plant cell**, 7: 1405-1419, 1995.
- BOGRE, L.; MAGYAR, Z.; LOPEZ-JUEZ, E. New clues to organ size control in plants. **Genome Biology**, 9: 226, 2008.
- BONSER, A. M.; LYNCH, J.; SNAPP, S. Effect of phosphorus deficiency on grow angle of basal roots in *Phaseolus vulgaris*. **New Phytology**, 32:281-288, 1996.
- CARY, A. J.; LIU, W.; HOWELL, S. H. Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Plant Physiology**. 107: 1075-1082. 1995
- CHEN, C. M.; JIN, G.; ANDERSON, B. R.; ERTL, J. Modulation of plant gene expression by cytokinins. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 20, p. 609-619, 1993.
- CHORY, J.; REINECKE, D.; SIM, S.; WASHBURN, T.; BRENNER, M. A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis det* mutants have an altered response to cytokinins. **Plant Physiology**, Rockville, v.104, p. 339-347, 1994.
- CHRISTOFIDIS, D. “**Recursos Hídricos, irrigação e segurança alimentar**”, em O Estado das águas no Brasil 2001-2002, p.111a 134, MMA/ANA, Brasília, 2003.
- CLARKSON, D. T; HANSON, J. B. The mineral nutrition of higher plants. **Ann. Rev. Plant Physiology**, 31: 239-298, 1980.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Avaliação da Safra Agrícola 2010/11 – www.conab.gov.br Acesso em: 26 de Julho de 2011.

- COQUE, M.; GALLAIS, A. Genomic regions involved in response to grain yield selection at high and low nitrogen fertilization in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, 112: 1205–1220, 2006.
- CROWELL, D. N.; AMASINO, R.M. Cytokinins and plant gene regulation. In: MOK, D.W.S.; MOK, M.C. (Ed.). **Cytokinins: chemistry, activity and function**. Boca Raton: CRC Press, p 233-242, 1994.
- DAVIES, P. J. **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. 2. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers., 833p., 1995
- DEBI, B.R.; TAKETA, S & MASAHIKO, I. Cytokinin inhibits lateral root initiation but stimulates lateral root elongation in rice *Oriza Sativa*. **J. Plant Physiology**., 162:507, 2005.
- DELLO IOIO, R.; LINHARES, F. S.; SCACCHI, E.; CASAMITJANA-MARTINEZ, E.; HEIDSTRA, R.; COSTANTINO, P.; SABATINI, S. Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. **Current. Biology**. 17: 678–682, 2008.
- DORLODOT, S.; FORSTER, B.; PAGES, L.; PRICE, A.; TUBEROSA, R.; DRAYE, X. Root system architecture: Opportunities and constraints for genetic improvement of crops. **Trends Plant Science**. 12: 474–481, 2007.
- DUAN, Y. H.; ZHANG, Y. L.; YE, L. T.; FAN, X. R.; XU, G. H.; SHEN, Q. R. Responses of rice cultivars with different nitrogen use efficiency to partial nitrate nutrition. **Annals of Botany**, v. 99, p.1153–1160, 2007.
- EPSTEIN, E & BLOOM, A, J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 2.ed Sunderland, Sinauer Associates, 380p, 2005.
- EVANS, D. E.; BRIARS, S. A.; WILLIAMS, L.E. Active calcium transport by plant cell membranes. **Journal of Experimental Botany**., 42:285-303, 1991.
- FRANÇA, M. G. C.; ROSSIELO, R. O. P.; ZONTA, E.; ARAÚJO, A. P; RAMOS. F.T. Desenvolvimento radicular e influxo de nitrogênio em duas cultivares de arroz. **Pesquisa Agropecuária. Brasileira**., 34:1845-1853, 1999.
- GAHOONIA, T. S. & NIELSEN, A. Mobilization of phosphate in different soils by ryegrass. **Plant Soil**, 260:47-57, 2004.
- GALE, M. D.; DEVOS, K. M. Plant comparative genetics after 10 years. **Science**, 282 (5389): 656-659, 1998.
- GALUSZKA, P.; FRÉBORT, I.; EBELA, M.; SAUER, P.; JACOBSEN, S. Cytokinin oxidase or dehydrogenase Mechanism of cytokinin degradation in cereals. **European Journal of Biochemistry** 268:450–46 2001.
- GAN, S.; AMASINO, R. Cytokinins in plant senescence: from spay and pray to clone and play. **Bioessays**, Cambridge, v. 18, p. 557-565, 1996.
- GOMES, M. A. F. A água nossa de cada dia. **Revista Panorama Rural**. Ano XI, n.122, p 44-48, 2009.
- GONZALEZ, N.; BEEMSTER, G. T. S.; INZE, D. David and Goliath: What can the tiny weed Arabidopsis teach us to improve biomass production in crops **Curr. Opin. Plant Biology**. 12: 157–164. 2009.
- HEENAN, D. P. & CAMPBELL, L. C. Influence of potassium and manganese on growth and uptake of magnesium by soybeans. **Plant soil**, 61:447456, 1981

- HENRY, A.; CAL A. J.; BATOTO, T. C.; TORRES, R.O. Root attributes affecting water uptake of rice (*Oryza sativa*) under drought **Journal of Experimental Botany**. 63: 4751-4763 2012.
- HEYL, A., RAMIREDDY, E., BRENNER, W. G., RIEFLER, M., ALLEMEERSCH, J.; SCHMULLING, T. The transcriptional repressor ARR1-SRDX suppresses pleiotropic cytokinin activities in Arabidopsis. **Plant Physiology**. 147: 1380–1395. 2008.
- HINSINGER, P. & JAILLARD, B. Root-induced irreversible transformation of a trioctahedral mica in the rizosphere of rape. **European Journal of Soil Science**., 44:525-534, 1993.
- 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.
- HODGE, A., ROBINSON, D., GRIFFITHS, B. S.; FITTER, A. H. Why plants bother: Root proliferation results in increased nitrogen capture from an organic patch when two grasses compete. **Plant Cell Environ**. 22:811–820, 1999.
- IBGE. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/> Acessado em 17/01/2013.
- JEONG, J. S.; KIM, Y. S.; BAEK, K. H.; JUNG, H. HA, S.; CHOI, Y. D.; KIM, M. REUZEAU, C.; KIM, J. K. Root-Specific expression of *OsNAC10* improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. **Plant Physiology**. V. 153, p. 185–197, 2010.
- JONES, R. J.; SCHREIBER, B. M. N. Role and function of cytokinin oxidases in plants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 23, p. 122-134, 1997.
- JUNGK, A. Soil-root interactions in the rhizosphere affecting plant availability of phosphorus. **Journal Plant Nutrition**., p. 10:1197-1224, 1987.
- KERBAUY, & PEREZ, L. **Fisiologia Vegetal**; Editora Guanabara Koogan / RJ. 2004.
- KHUSH, G. S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. **Plant molecular biology**. v. 35, p. 25-34. 1997
- KIEBER, J. J. Cytokinins. **The Arabidopsis book**. Rockville: **American Society of Plant Biologists**, 2002. Disponível em: <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis>. Acesso em: 22 abr. 2013.
- KUCHENBUCH. R & JUNGK, A. A method for determining concentration profiles at the soil-root interface by thin slicing rhizosferic soil. **Plant Soil**, 68:391-394, 1982.
- LETHAM, D. S.; PALNI, L. M. S. The biosynthesis and metabolism of cytokinins. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 34, p. 163-197, 1983.
- LI, Y.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. J. Altered morphology in transgenic tobacco plants that overproduce cytokinins in specific tissues and organs. **Developmental Biology**, New York, v. 153, p. 386-395, 1989.
- LIAO, H., RUBIO, G.; YAN, X.; CAO, A.; BROWN, K.M.; LYNCH, J.P. Effect of phosphorus availability on basal root shallowness in common bean. **Plant Soil** 232: 69–79. 2001.
- LINDHAUER, M. G. The role of potassium in the plant with emphasis on stress conditions (water, temperature, salinity). Pretoria. Proceeding, International **Potash Institute and Fertilizer Society of South Africa**, 1985. P 95-113, 1985.

- LOPEZ-BUCIO, J.; CRUZ-RAMIREZ, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biology*. 6: 280–287, 2003.
- LYNCH, J. Root architecture and plant productivity. *Plant Physiology*. 109: 7–13, 1995.
- MALAVOLTA, E., VITTI, G. C., OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2 ed., ver. E atual. Piracicaba: Potafos, 1997.
- MARCELIS, L. F. M.; HEUVELINK, E. Concepts of modelling carbon allocation among plant organs. **In:** J. Vos, L.F.M. Marcelis, P.H.B. de Visser, P.C. Struik, and J.B. Evers, eds **Functional-Structural Plant Modelling in Crop Production** (Dordrecht, The Netherlands: Springer), pp. 103–111, 2007.
- MARTIN, R. C.; MOK, M. C.; HABBEN, J. E.; MOK, D.W.S. A maize cytokinin gene encoding an *O*-glucosyltransferase specific to *cis*-zeatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 98, p. 5922-5926, 2001.
- MASON, M. G.; MATHEWS, D. E.; ARGYROS, D. A.; MAXWELL, B. B.; KIEBER, J. J.; ALONSO, J. M.; ECKER, J. R.; SCHALLER, G. E. Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in Arabidopsis. **Plant Cell** 17: 3007–3018, 2005.
- MEURER, E.J. **Disponibilidade de potássio para as plantas e sua relação com formas, mineralogia e cinética de liberação no solo**. Tese de doutorado. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do sul. 137p, 1991.
- MILLER, C.O.; SKOOG, F.; VON SALTZA, M. H.; STRONG, F. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 77, p. 1392-1293, 1955.
- MIYAWAKI, K.; TARKOWSKI, P.; MATSUMOTO-KITANO, M.; KATO, T.; SATO, S.; TARKOWSKA, D.; TABATA, S.; SANDBERG, G.; AKAKIMOTO, T. (Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Sci. USA 103: 16598–16603. 2006.
- MOK, D. W. S.; MOK, M. C. Cytokinin metabolism and action. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 89-118, 2001.
- MOK, M. C. Cytokinin and plant development – An overview. **In:** MOK, D.W.S.; MOK, M.C.(Ed.). Cytokinins: chemistry, activity and function. Boca Raton: **CRC Press**,. p. 155-166, 1994.
- NARANG, R. A., BRUENE, A.; ALTMANN, T. Analysis of phosphate acquisition efficiency in different Arabidopsis accessions. **Plant Physiology**. 124: 1786–1799. 2000.
- NUNES, L. E. P.; **Controle do desenvolvimento vegetal pela interação auxina-citocinina. Uma nova abordagem baseada no estudo de mutantes de tomateiro**. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2009.
- PACES, V.; WERSTIUK, E.; HALL, R. H. Conversion of N⁶-(D²-isopentenyl) adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. **Plant Physiology** 48:775–778, 1971.
- PHILLIPS, I. Apical dominance. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 26, p.3341-3367, 1975.
- PINHEIRO, B. S.; CASTRO, E. M.; GUIMARÃES, C.M. Sustainability and profitability of aerobic rice production in Brazil. **Field Crops Research**. v. 97, p. 34, 2006.

- POPELKOVÁ, H.; FRAAIJE, M. W.; NOVÁK, O.; FRÉBORTOVÁ, J.; BILYEU, K. D.; FRÉBORT, I. Kinetic and chemical analyses of the cytokinin dehydrogenase-catalysed reaction: correlations with the crystal structure. **Biochemical Society**, v. 398, p. 113-124, 2006.
- PRICE, A. H.; CAIRNS, J. E.; HORTON, P.; JONES, H. G.; GRIFFITHS, H. Linking drought-resistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach: Progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 989-1004, 2002.
- PRICE, A. H.; TOMOS, A. D.; VIRK, D. S. Genetic dissection of root growth in rice (*Oryza sativa* L.) I: A hydroponic screen. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 132-142, 1997.
- PRICE, A. H.; TOWNEND, J.; JONES, M. P.; AUDEBERT, A.; COURTOIS, B. Mapping QTLs associated with drought avoidance in upland rice grown in the Philippines and West Africa. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 683-695. 2002.
- REED, R. C.; BRADY, S. R.; MUDAY, G.K. Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in Arabidopsis. **Plant Physiology**, 1118:1369-1378, 1998.
- RIEFLER, M.; NOVAK, O.; STRNAD, M.; SCHMULLING, T. Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 18, p. 40-54, 2006.
- SAEG **Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes- UFV- Viçosa, 2007.
- SAKAKIBARA, H.; KASAHARA, H.; UEDA, N.; KOJIMA, M.; TAKEI, K.; HISHIYAMA, S.; ASAMI, T.; OKADA, K.; KAMIYA, Y.; YAMAYA, T.; YAMAGUCHI, S. *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 102, p. 9972-9977, 2005.
- SALAMINI, F. Plant Biology. Hormones and the green revolution. **Science**, v. 302, p. 71-72, 2003.
- SCHMULLING, T. Cytokinin. In: LENNARZ, W., LANE, M.D. (Ed.). **Encyclopedia of Biological Chemistry**. Amsterdam: Elsevier, p. 562-567, 2004.
- SCHMULLING, T.; WERNER, T.; RIEFLER, M.; KRUPKOVA, E.; BARTRINA Y MANN, I. Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in maize, rice, Arabidopsis and other species. **Journal of Plant Research**, 116, 2003.
- SILVA, D. N.; MEURER, E. J.; KAMPF, N; BORKET, C. M. Mineralogia e formas de potássio em dois latossolos do estado do Paraná e suas relações com a disponibilidade para as plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 19:433-439, 1995.
- SMIGOCKI, A. Cytokinin content and tissue distribution in plants transformed by a reconstructed isopentenyl transferase gene. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.16, p.105-115, 1991.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, Tradução de: Elaine R. Santarém, 3ª ed., Porto Alegre, Artimed, 719p., 2004.
- TAYA, Y.; TANAKA, Y.; NISHIMURA, S. 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. **Nature**, London, v. 271, p. 545-547, 1978.

THE RICE ANNOTATION PROJECT. Curated genome annotation of *Oryza sativa* ssp. Japonica and comparative genome analysis with *Arabidopsis thaliana*. **Genome Research**, 17: 175- 183, 2007.

THOMAS, J. C.; KATTERMAN, F.R. Cytokinin activity induced by thidiazuron. **Plant Physiology**, Rockville, v. 81, p. 681-683, 1986.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res** 22:4673–4680,1994.

TOKI, S.; HARA, N.; ONO, K.; ONODERA, H.; TAGIRI, A.; OKA, S.; TANAKA, H. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. **The Plant Journal**, v.47, p.969-976, 2006

TURNER, J. E.; MOK, M. C.; MOK, D. W. S. Zeatin metabolism in fruits of *Phaseolus*: comparison between embryos, seed coat and pod tissues. **Plant Physiol** 79:321–322, 1985.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. Method 3052 - Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. 1996. 20p. Disponível em: <<http://www.epa.gov/epawaste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3052.pdf>. Acessado em: 25 de junho de 2012.

VAN KASTCA, C. A.; LATEN, H. M. Cytokinin utilization by adenine requiring mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Plant Physiology** 83:726–727, 1987.

WERNER, T.; HOLST, K.; PORS, Y.; GUIVARCH, A.; MUSTROPH, A.; CHRIQUI, D.; GRIMM, B.; SCHMULLING, T. Cytokinin deficiency causes distinct changes of sink and source parameters in tobacco shoots and roots. **Journal of Experimental Botany**. 59: 2659–2672, 2008.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; LAUCOU, V.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.; ROOT ENHANCEMENT BY EXPRESSION OF CKX GENES 3919 SCHMULLING, T. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. **Plant Cell** 15: 2532–2550, 2003.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; STRNAD, M. SCHMÜLLING, T. Regulation of plant growth by cytokinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, p. 10487-10492, 2001.

WERNER, T.; NEHNEVAJOVA, E.; KOLLMER, I.; NOVAK, O.; STRNAD, M.; KRAMER, U.; SCHMULLING, T. Root-Specific Reduction of Cytokinin Causes Enhanced Root Growth, Drought Tolerance, and Leaf Mineral Enrichment in *Arabidopsis* and Tobacco. **The Plant Cell**, v. 22, p. 3905–3920, 2010.

WERNER, T.; SCHMULLING, T. Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biology*, 12:527–538, 2009.

WHITTY, C. D.; HALL, R. H. A. Cytokinin oxidase in *Zea mays*. **Canadian Journal of Biochemistry** 52:787–799, 1974.

YANG, S.; YU, H.; XU, Y.; GOH, C. J. Investigation of cytokinin-deficient phenotypes in *Arabidopsis* by ectopic expression of orchid DSKX1. **FEBS Lett**. 555: 291–296, 2003.

ZUBKO, E.; ADAMS, C. J.; MACHAEKOVA, I.; MALBECK, J.; SCOLLAN, C.; MEYER, P. Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 29, p. 797-808, 2002.