

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

**Superexpressão do Gene *OsDof25* e Seus Efeitos Sobre a
Absorção e Assimilação de Amônio**

Vinícius Miranda de Souza

2014



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

**SUPEREXPRESSÃO DO GENE *OSDOF25* E SEUS
EFEITOS SOBRE A ABSORÇÃO E ASSIMILAÇÃO DE
AMÔNIO**

VINÍCIUS MIRANDA DE SOUZA

Sob a Orientação do Professor

Manlio Silvestre Fernandes

e Co-orientação da Professor

Leandro Azevedo Santos

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Fitotecnia**, no Programa de Pós-
Graduação em Fitotecnia, Área de
concentração em Fisiologia Vegetal.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2014

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

d719s Souza, Vinicius Miranda de, 1980-
Superexpressão do Gene OsDof25 e Seus Efeitos
Sobre a Absorção e Assimilação de Amônio. / Vinicius
Miranda de Souza. - 2014.
85 f.: il.

Orientador: Manlio Silvestre Fernandes.
Coorientador: Leandro Azevedo Santos.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em
Fitotecnia,2014.

1. Assimilação de amônio. 2. Transportadores de
amônio. 3.Fator de transcrição. 4. Glutamina sintetase
. I.Fernandes, Manlio Silvestre, 1939-, orient. II.
Santos, Leandro Azevedo, 1981-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso
de Pós-graduação em Fitotecnia. IV. Título.

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

VINÍCIUS MIRANDA DE SOUZA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Fitotecnia**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Área de concentração em Fisiologia Vegetal.

TESE APROVADA EM 27/02/2014

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

Marcia Soares Vidal. Dr.^a Embrapa Agrobiologia.

Stefan Schwab, Ph.D. Embrapa Agrobiologia.

Carlos Alberto Bucher. Dr. UFRRJ.

André Marques dos Santos. Dr. UFRRJ.

A Deus, pela presença e auxílios enviados todas as vezes que precisei para me manter forte na busca dos meus objetivos.

Aos meus amados pais, Raimundo Miranda de Souza e Wilma Lúcia Barbosa Trindade Nunes, que me proporcionaram as melhores condições e sempre me apoiaram.

Dedico

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente a Deus, pela força concedida a cada dia;
- Aos meus pais, Wilma Lúcia Barbosa Trindade Nunes e Raimundo Miranda de Souza;
- À família que sempre esteve torcendo por mim; Meus irmãos Vitor e Alessandra e minhas sobrinhas Camilla e Ana Luiza;
- A minha amiga e companheira, Joice Lemos de Jesus;
- Ao professor Manlio Silvestre Fernandes, pela orientação;
- Ao professor Leandro Azevedo, pela orientação, ensinamentos e amizade;
- Aos demais professores do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, Sonia Regina e Carlos Bucher;
- A toda equipe do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, pelo companheirismo na árdua jornada de trabalho;
- Aos amigos de longa data; Tiago, Frank, Paulo Henrique, André, Igor, Sidines, Evandro e Rodolfo;
- A todos os demais amigos, não menos importantes por não serem citados nome a nome;
- Aos colegas da pós-graduação e aos professores;
- Ao Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Curso de Pós Graduação em Fitotecnia - UFRRJ pelo suporte ao trabalho;
- Aos membros da banca, Márcia Vidal, Stefan Schwab, Carlos Bucher e André Marques, por aceitarem participar da banca e pelas valiosas colaborações;
- A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.
- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001;

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

Vinícius Miranda de Souza nasceu em 26 de outubro de 1980, na cidade de Itaguaí-RJ. Concluiu o ensino fundamental na cidade de nascimento e o ensino médio no Colégio Cunha Mello – RJ. Em 2001, ingressou no curso de graduação em Agronomia da UFRRJ, qual foi aprovado em segundo lugar. Durante a graduação, foi estagiário por três anos e meio no laboratório de Fertilidade do Solo sob a orientação do Prof. Luiz Rodrigues Freire, onde participou de trabalhos junto à equipe de estudos do núcleo de fertilidade do solo da UFRRJ. Obteve o título de Engenheiro Agrônomo em maio de 2006. Em junho de 2006, ingressou no programa de Residência ao nível de pós-graduação sob a orientação do Prof. Eduardo Lima, atuando como extensionista rural no município de Vassouras – RJ, até março de 2008. Em março de 2008, ingressou no programa de pós-graduação ao nível de mestrado, em Fitotecnia na UFRRJ e foi bolsista do CNPq concluído no ano de 2010, nesse mesmo ano foi aprovado no curso de pós-graduação em Fitotecnia na UFRRJ ao nível de doutorado.

RESUMO

SOUZA, Vinícius Miranda. **Superexpressão do Gene *OsDof25* e Seus Efeitos Sobre a Absorção e Assimilação de Amônio**. 2014. 103f. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Com o objetivo de aumentar a eficiência de absorção e assimilação de N em plantas de arroz, foram transformadas plantas de arroz (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare) com o fator de transcrição *OsDof25* sob o controle do promotor da ubiquitina e com o promotor do gene *OsDof25* fusionado aos genes repórteres GUS e EGFP, para identificar seus locais de expressão e sua possível correlação com as proteínas de transporte e assimilação de N. Todas as linhagens transformadas apresentaram menor ciclo de cultivo, entre dez e sete dias comparadas à plantas tipo selvagem. As linhagens L#5.1, L#9,6 e L#10.8 apresentaram maiores atividades das enzimas de assimilação de nitrogênio GS e NADH-GOGAT, tanto em folhas quando em raízes quando cultivadas com 2,0 mM de NH_4^+ , gerando maiores concentrações internas de aminoácidos totais. Foi verificado ainda um aumento na atividade da GDH aminação nas raízes, que pode estar associado ao fornecimento de 2-OG para manutenção da atividade do ciclo GS/GOGAT. Entretanto, menor atividade de ICDH, indicando maior homeostase nos níveis internos de glutamato. Os resultados apresentados evidenciam que as plantas transformadas com o gene *OsDof25* foram mais eficientes na assimilação de amônio

Palavras-chave: assimilação de amônio, fator de transcrição, transportadores de amônio.

ABSTRACT

SOUZA, Vinícius Miranda. **Overexpression of Gene *OsDof25* and The Effects on the Absorption and Assimilation of Ammonium**. 2014. 103f. Thesis (Doctor of Science in Fitotecnia). Institute of Agricultural Sciences, Department of Lands, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2014.

In order to increase the efficiency of use of nitrogen (NUE) in the crop production, rice plants (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare) were transformed with the transcription factor *OsDof25*. Were also transformed plants with *OsDof25* gene promoter fused to GUS and EGFP reporter genes to identify sites of expression and its possible correlation with protein transport and assimilation of N. The MultiSite Gateway® cloning technology was used to produced six independent transformants lines regenerated from calli of rice . All transformed lines showed lower crop cycle , between ten and seven days compared to WT plants. The lines L#1.1 , L#5.1 L#9.6 and L#10.8 showed higher enzyme activities of nitrogen assimilation (GS and NADH - GOGAT), both in leaves when roots when grown with 2.0 mM NH₄⁺, generating higher internal concentrations of total amino acids. An increase in the GDH activity in roots amination, which can be associated with the supply of 2-OG to maintain the GS / GOGAT cycle activity was also checked. However lowest ICDH activity , indicating greater internal homeostasis in glutamate levels . These results show that plants transformed with the gene *OsDof25* are more efficient in ammonium assimilation.

Key-words: Ammonium assimilation, transcription factor, ammonium transporters.

LISTA DE SÍMBOLOS

AMT1	Família gênica dos transportadores de NH_4^+ de alta afinidade
AMT2	Família gênica dos transportadores de NH_4^+ de baixa afinidade
ATP	Adenosina trifosfato
DAG	Dias Após a Germinação
DOF	Domínio de ligação ao DNA tipo dedo de zinco – (<u>D</u> N <u>A</u> -“ <i>binding with <u>o</u>ne <u>f</u>inger</i> ”)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
FT	Fatores de transcrição
HATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidade (“ <i>High Affinity Transport System</i> ”)
LATS	Sistema de Transporte de Baixa Afinidade (“ <i>Low Affinity Transport System</i> ”)
NRT1	Família gênica dos transportadores de NO_3^- de baixa afinidade
NRT2	Família gênica dos transportadores de NO_3^- de alta afinidade
OsDof25	Fator de transcrição <i>Dof25</i> de <i>Oryza sativa</i> L.
pb	Pares de bases
RNAm	Ácido Ribonucléico mensageiro (“ <i>Ribonucleic acid menseger</i> ”)
TRIS	2-(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol
WT	Tipo selvagem (“ <i>wild type</i> ”)

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Lista de genes da Família Dof de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) identificados por Kushwaha et al. (2010). *Gene do <i>OsDof25</i> foi nomeado por Kushwaha et al. (2010) como <i>OsDof18</i>	14
Tabela 2. Reações de recombinação entre os sítios <i>att</i> do fago λ em <i>E. coli</i>	17
Tabela 3. Sequências dos iniciadores para amplificação do promotor do fator de transcrição de arroz <i>OsDof25</i> com os sítios de recombinação <i>attB1</i> e <i>attB2</i> em duas reações.....	21
Tabela 4. Sequências dos indicadores (“forward e reverse”) usados nas reações de PCR em tempo real e as respectivas referências.....	33
Tabela 5. Segregação das linhagens superexpressando o fator de transcrição <i>OsDof25</i> na 2ª geração (UBIL: <i>OsDof25</i> :3xHA).	35
Tabela 6. Massa fresca (g planta ⁻¹) e razão raiz: parte aérea (R/PA) de plantas de arroz da cv. Nipponbare superexpressando o fator de transcrição <i>OsDof25</i> nas linhagens L#5.1, L#9.6 e L#10.8 e planta do tipo selvagem (WT) cultivadas com NH ₄ ⁺ seguindo o esquema experimental do item 3.10. Letras maiúsculas diferem entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Letras minúsculas diferem entre as linhagens pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....	48
Tabela 7. Sequencia de 50 aminoácidos conservador do domínio de ligação da proteína Dof de arroz (<i>Oryza sativa</i> sp japônica e indica) e dos genes <i>ZmDof1</i> , <i>ZmDof2</i> , <i>AtDof6</i> , <i>GmDof4</i> e <i>GmDof11</i>	83

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Modelo que representa um conjunto de mecanismos potenciais através do qual o DNA, os fatores de transcrição específicos (TF1-5) e RNA-polimerase (Pol II)/fatores de transcrição gerais (TFIIB, TFIID-TBP-TAFs, TFIIE e TFIIH) são reunidos para formar um complexo de transcrição. TF1 se liga perto do início da transcrição e é capaz de comunicar diretamente com os fatores de transcrição gerais. TF2 e TF3 se ligam ao DNA como um heterodímero com uma sequência distante do início da transcrição, tornando indireta (através de interações proteína-proteína com TF1, por exemplo), os contatos com Pol II e fatores de transcrição gerais. Formação de heterodímero e/ou transativação estão sujeitas à regulação por fosforilação induzidas. TF4 interage com complexo de transcrição através de outro fator de transcrição (TF5), que sofre modulação por ação de proteínas quinase. Figura adaptada de Papavassiliou (1997). 10
- Figura 2.** Estrutura proposta por Yanagisawa (2004) para o domínio de ligação Dof. Resíduos de cisteína altamente conservados coordenado por um íon de zinco e outros resíduos de aminoácidos conservados entre todas as proteínas de domínio Dof conhecidos são mostrados em vermelho e roxo respectivamente. Resíduos bem conservados são mostrados em azul e resíduos redundantes são mostrados em cinza. 11
- Figura 3.** Modelo para a evolução molecular dos genes da família Dof proposto por Shigyo (2007). A área de cada círculo representa o tamanho da família de genes de cada espécie. Os números dentro dos círculos indicam os números dos domínios Dof que são classificados nos grupos A, B ou C. Embora o padrão de ramificação dos três grupos é atualmente incerto, o esquema é uma hipótese de representação. 12
- Figura 4.** Esquema proposto por Yanagisawa (2002) para estrutura da proteína Dof. O domínio de ligação da proteína Dof é indicado em amarelo seguido do sinal de localização nuclear (NLS) em rosa e um domínio de ativação na cor lilás. O domínio de ligação apresenta 50 resíduos de aminoácidos conservados, coordenando através de resíduos de cisteína (C₂-C₂) com um átomo de zinco. A região em verde é referente a uma sequência de resíduos de serina. 13
- Figura 5.** Esquema ilustrativo da reação de recombinação BP para criação dos vetores de entrada, necessários para construção do vetor para expressão do *OsDof25*. 18

Figura 6. Reações BP e LR triplos para obtenção do vetor para superexpressão do gene de interesse. Promotor referente ao gene <i>UBIL1</i> (ubiquitina de milho) e <i>HA</i> (Hemaglutinina) fusionado ao gene <i>OsDof25</i>	19
Figura 7. Vetor pEN- <i>OsDof25</i> usado na reação de recombinação LR tripla para formação do clone de expressão. Sac I, Pst I e Ase I se referem aos sítios de clivagem das enzimas de restrição e Kan(R) gene de resistência a Kanamicina.	20
Figura 8. Sequência da região promotora do gene <i>OsDof25</i> LOC_Os08g38220.1. (http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/). Sublinhado representa o produto amplificado da região promotora contendo 1607pb.....	21
Figura 9. Vetor de expressão da construção P _{<i>OsDof25</i>} :EGFP:GUS usado para transformação das plantas de arroz via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Este vetor leva o gene de resistência a higromicina (<i>hyg</i>) para seleção das plantas transformadas.	22
Figura 10. Vetor de expressão UBIL: <i>OsDof25</i> :3xHA usado para transformação das plantas de arroz via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Este vetor leva o gene de resistência a higromicina (<i>hyg</i>) para seleção das plantas transformadas.....	24
Figura 11. Processo de indução de calos embriogênicos de arroz. a) Sementes de arroz cv. Nipponbare dispostas em meio indução de calos (N6D) contendo auxina (100 mg L ⁻¹ de 2,4D) como regulador para indução de calos embriogênicos; b) e c) Calos em estágio de desenvolvimento após 14 dias no meio N6D, alguns calos possuem a característica friável desejada. Fotos do autor.	25
Figura 12. Calos embriogênicos de arroz em contato com a solução contendo <i>A. tumefaciens</i> para que ocorra a transferência do gene de interesse. a) Três diferentes colônias positivas para construção gênica de interesse crescidas em meio YEB; b) Calos inoculados com <i>A. tumefaciens</i> em meio AAM; c) Calos embriogênicos oriundos de semente de arroz, colocados sobre papel filtro para drenagem do excesso de meio AAM contendo <i>A. tumefaciens</i> . Fotos do autor.....	27
Figura 13. Etapas do processo de transferência gênica para calos embriogênicos de arroz. a) Calos embriogênicos dispostos em meio N6D-As com <i>A. tumefaciens</i> contendo a construção gênica de interesse; b) Calos em meio de seleção N6D, contendo antibiótico carbenicilina (400 mg L ⁻¹), para a completa eliminação da <i>A. tumefaciens</i> e higromicina (50 mg L ⁻¹) para selecionar os calos que possuíam o gene resistente ao antibiótico. Fotos do autor.....	28

Figura 14. Regeneração de plantas de arroz a partir de calos embriogênicos transformados pela inserção do T-DNA. a) Formação dos “*greenspots*” indicando o início do processo de diferenciação dos calos embriogênicos. Meio de regeneração de parte aérea RE-III; b) Plântulas de arroz expressando o fator de transcrição *OsDof25*, regeneradas a partir de calos embriogênicos cultivados em meio de regeneração de parte aérea RE-III; c) Planta de arroz completamente regenerada em meio de indução de raízes HF. Fotos do autor..... 29

Figura 15. Esquema experimental usando plantas de arroz tipo selvagem cv. Nipponbare e linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* para análise da expressão dos transportadores de NH_4^+ e enzimas do metabolismo de Nitrogênio e de Carbono. 30

Figura 16. Sequência de germinação de plântulas de arroz em solução contendo antibiótico de seleção das linhagens transformadas. a) Sementes das linhagens transformadas em placa de *Petri* germinadas com algodão embebido em água destilada e Timetim (200 mg L^{-1}); b) Plântulas não transformadas com 14 DAG em placa de *Petri* contendo higromicina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e c) Plântulas homozigotas para a construção gênica de interesse. Fotos do autor..... 34

Figura 17. Expressão relativa do fator de transcrição *OsDof25* na parte aérea de plantas de arroz cultivadas em casa de vegetação da cv. Nipponbare transformadas (L#5.1, L#7.40, L#8.20, L#9.6 e L#10.8) geração T2 e não transformada (tipo selvagem, WT). O gene da *Actina* (OsAct11-NM_197297) foi utilizado como padrão interno nas reações de PCR..... 36

Figura 18. Comparação entre o sistema radicular de plantas de arroz tipo selvagem da cv. Nipponbare (WT) e linhagens transformadas (L#1.1, L#5.1, L#7.40, L#8.20, L#9.6 e L#10.8) transformadas com o gene *OsDof25*..... 37

Figura 19. Comparação entre massa fresca de raiz e da parte aérea de plantas de arroz tipo selvagem da cv. Nipponbare (WT) e linhagens transformadas com o gene *OsDof25* cultivadas por 14 dias em solução nutritiva contendo 1mM de NH_4NO_3 . Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de quatro repetições..... 38

Figura 20. Árvore de similaridade filogenética do gene de arroz *OsDof25* (subsp. *japonica* (LOC_Os08g38220.1) e subsp. *indica* (OsIBCD044075) e *OsDof26* (subsp. *japonica* (LOC_Os09g29960.1) e subsp. *indica* (OsIBCD044701), respectivamente, comparadas com os genes de milho, *ZmDof1* e *ZmDof2*. A árvore foi construída utilizando a sequência conservada de 50 aminoácidos do domínio de ligação da proteína Dof utilizando o método *neighbor-joining* com análise de *bootstrapping* igual a 1000. Valores de *bootstraps* são

indicados na árvore de similaridade quando superiores a 50%. Foram utilizadas as sequências de proteínas do site *Plant Transcription Factor database* (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>) 39

Figura 21. Efeito da superexpressão do gene *OsDof25* sobre a expressão do gene *OsDof26* em raízes de plantas de arroz (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare). Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de três repetições..... 40

Figura 22. Padrão de expressão do gene *OsDof25* durante o desenvolvimento do arroz em diferentes tecidos (A) Classificação quanto ao nível de expressão do gene *OsDof25* em diferentes regiões anatômicas de plantas de arroz. (B) Gráfico representando os diferentes níveis de expressão do gene *OsDof25* (LOC_Os08g38220) durante o desenvolvimento de plantas de arroz. Fonte Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/plant.jsp>) banco de dados sobre desenvolvimento. 41

Figura 23. Localização da expressão do gene *OsDof25* em diferentes fases de desenvolvimento de plantas de arroz. a) Plântula de arroz com aproximadamente 4 DAG, indicando alto nível de expressão no cotilédone; b) Parte aérea de plântula de arroz com aproximadamente 7 DAG apresentando coloração azul na região dos feixes vasculares; c) Pontuações de cor azul nas regiões de emissão de raízes laterais e zonas de alongamento radicular e d) região da proto-bainha..... 42

Figura 24. Cortes anatômicos de raízes e folha em plantas de arroz transformadas com a construção *P_{OsDof25}:EGFP:GUS*. (A-B) Corte transversal da raiz no campo claro (A), indicando a coloração azul devido à atividade da β-glucuronidase e campo escuro (B), excitando a proteína GFP nas regiões da exoderme (ex) e endoderme (en). (C-D) Corte transversal da folha no campo claro (C), indicando a coloração azul devido à atividade da β-glucuronidase e campo escuro (D), excitando a proteína GFP nas regiões da epiderme (ep), mesófilo foliar (mo) e periciclo (pc). Imagens capturadas em microscópio ótico. (E) Região do primórdio radicular e (F-G) indicando a expressão do gene na emissão de pelos radiculares (pr). Barras horizontais referem-se a medida de 100 μm. 43

Figura 25. Teores de N-NH₄⁺ em folha e raiz de plantas de arroz (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare) tipo selvagem (WT) e linhagens superexpressando o fator de transcrição *OsDof25* linhagens L#5.1, L#9.6 e L#10.8 submetidas a tratamento constante com 2,0 mM de N-NH₄⁺. Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de três repetições. ... 46

Figura 26. Expressão relativa dos transportadores de amônio *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* e das enzimas de assimilação de nitrogênio *OsGS1.2* e *OsNADH-GOGAT1* em raízes de plantas de arroz tipo selvagem cv. Nipponbare (WT) e linhagens transformadas L#9.6 e L#10.8 com o gene *OsDof25* submetidas a diferentes tratamentos: suprimento constante de 2,0 mM de NH_4^+ , deficiência de N por 74 horas e ressuprimento com 0,2 e 2,0 mM de NH_4^+ por 2 horas. Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de três repetições. 49

Figura 27. Expressão relativa dos transportadores de amônio *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2* e das enzimas de assimilação de nitrogênio *OsGS1.2*, *OsGS2* e *OsNADH-GOGAT1* em folhas de plantas de arroz tipo selvagem cv. Nipponbare (WT) e linhagens transformadas L#9.6 e L#10.8 com o gene *OsDof25* submetidas a diferentes tratamentos: suprimento constante de 2,0 mM de NH_4^+ , deficiência de N por 74 horas e ressuprimento com 0,2 e 2,0 mM de NH_4^+ por 2 horas. Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de três repetições. 53

Figura 28. Atividade da enzima Glutamina sintetase (GS) em plantas de arroz tipo selvagem cv. Nipponbare (WT) e nas linhagens transformadas L#5.1, L#9.6 e L#10.8 superexpressando o fator de transcrição *OsDof25* cultivadas com 2,0mM de NH_4^+ constante. Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de três repetições. Tratamentos identificados com asterisco (*) diferem entre as linhagens pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. 55

Figura 29. Atividade da enzima glutamato sintase NADH⁻ dependente (NADH-GOGAT) em raízes de plantas de arroz tipo selvagem cv. Nipponbare (WT) e nas linhagens transformadas L#5.1, L#9.6 e L#10.8 superexpressando o fator de transcrição *OsDof25* cultivadas com suprimento constante de 2,0 mM de NH_4^+ . Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de três repetições. Tratamentos identificados com asterisco (*) diferem entre as linhagens pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. 57

Figura 30. Atividade de glutamato desidrogenase (GDH) desaminação em raízes de plantas de arroz tipo selvagem cv. Nipponbare (WT) e nas linhagens transformadas L#5.1, L#9.6 e L#10.8 superexpressando o fator de transcrição *OsDof25* cultivadas com 2,0 mM de NH_4^+ . Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de três repetições. 58

Figura 31. Atividade da glutamato desidrogenase (GDH) aminação em plantas de arroz tipo selvagem cv. Nipponbare (WT) e nas linhagens transformadas L#5.1, L#9.6 e L#10.8 superexpressando o fator de transcrição *OsDof25* cultivadas com 2,0 mM de NH_4^+ constante. Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de três repetições. 59

Figura 32. Atividade de isocitrato desidrogenase NADP^+ (ICDH) e NAD^+ dependente (IDH) em plantas de arroz tipo selvagem cv. Nipponbare (WT) e nas linhagens transformadas L#5.1, L#9.6 e L#10.8 superexpressando o fator de transcrição *OsDof25* cultivadas com 2,0 mM de NH_4^+ . Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de três repetições. Tratamentos identificados com asterisco (*) diferem entre as linhagens pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. 61

Figura 33. Árvore de similaridade filogenética dos genes Dof de arroz (*Oryza sativa* sp japonica) com os genes ZmDof1, ZmDof2, AtDof6, GmDof4 e GmDof11. A árvore foi construída utilizando a sequencia conservada de 50 aminoácido do domínio de ligação da proteína Dof utilizando o método neighbor-joining com análise de *bootstrapping* igual a 1000. Valores de bootstraps são indicados na árvore de similaridade quando superiores a 50%. Foram utilizadas as sequencias da proteínas do site Plant Transcription Factor database (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>) 81

Figura 34. Árvore de similaridade filogenética dos genes Dof de arroz (*Oryza sativa* sp japonica e indica) com os genes ZmDof1, ZmDof2, AtDof6, GmDof4 e GmDof11. A árvore foi construída utilizando a sequencia conservada de 50 aminoácido do domínio de ligação da proteína Dof utilizando o método neighbor-joining com análise de *bootstrapping* igual a 1000. Valores de bootstraps são indicados na árvore de similaridade quando superiores a 50%. Foram utilizadas as sequencias da proteínas do site Plant Transcription Factor database (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>) 82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	Transportadores de Amônio (AMT).....	3
2.2	Glutamina Sintetase (GS)	5
2.3	Glutamato Sintase (GOGAT)	6
2.4	Isocitrato Desidrogenase (IDH)	7
2.5	Fatores de Transcrição	8
2.6	Características e Evolução dos Fatores de Transcrição da Família Dof.....	10
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Tecnologia Gateway® e Clonagem dos Genes Amplificados.....	17
3.2	Reação BP – Recombinação Entre os Sítios <i>attB</i> do Gene e <i>attP</i> do Vetor pDONR221 para a Obtenção do Vetor de Entrada.....	19
3.3	Amplificação da Região Promotora do Gene <i>OsDof25</i>	20
3.4	Localização Tecido-Específica do Gene <i>OsDof25</i>	22
3.5	Preparo de Células Competentes para Eletroporação (DH5 α).....	22
3.6	Reações de LR Triplo para Obtenção da Construção UBIL: <i>OsDof25</i> :3xHA	23
3.7	Preparo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Competente.....	24
3.8	Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
3.9	Transformação de Arroz Mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
3.10	Análise do Efeito do Fator de Transcrição <i>OsDof25</i> sobre a Expressão dos Transportadores de NH $_4^+$ e Enzimas do Metabolismo de N.....	29
3.11	Análise de Metabólitos Solúveis	30
3.12	Extração de Proteína.....	30
3.13	Determinação da Atividade de Glutamato Desidrogenase (GDH)-Aminação e Desaminação	30

3.14	Determinação da Atividade de Glutamina Sintetase (GS).....	31
3.15	Determinação da Atividade da Isocitrato Desidrogenase NAD ⁺ /NADP ⁺ - dependente	31
3.16	Extração de RNA total	31
3.17	Tratamento com DNase I, Síntese do cDNA e PCR em Tempo Real	32
3.18	Desenho dos Iniciadores para os Estudos de Expressão gênica.....	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	Testes de Segregação	34
4.2	Caracterização Genética e Morfológica das Plantas Transformadas	35
4.3	Efeito Antagonista da Superexpressão do <i>OsDof25</i> Sobre o <i>OsDof26</i>	39
4.4	Padrão de Expressão do Gene <i>OsDof25</i> no Desenvolvimento de Plantas de Arroz..	40
4.5	Localização Tecido-Específica da Atuação da <i>OsDof25</i> em Arroz	41
4.6	Efeito da Superexpressão do Gene <i>OsDof25</i> na Expressão dos Transportadores de Amônio e no Metabolismo de N.....	45
4.7	Efeito da Superexpressão do Gene <i>OsDof25</i> na Atividade de Enzimas do Metabolismo de N e Carbono.	54
5	CONCLUSÕES	63
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
7	ANEXOS	75
7.1	Meios Utilizados para a Transformação de plantas de Arroz.....	75
7.2	Meios para o Cultivo de <i>Agrobacterium</i>	80

1 INTRODUÇÃO

O crescimento acentuado da população mundial demanda aumento significativo na produção de alimentos. Portanto, o desafio para as próximas décadas será suprir as necessidades da população em expansão, desenvolvendo uma agricultura altamente produtiva e sustentável (Beek et al., 2010). O arroz tem grande importância na alimentação humana, sendo o principal componente na dieta básica de cerca da metade da população mundial (Lian et al., 2005). No Brasil, o arroz é consumido por uma ampla parcela da população, principalmente a menos favorecida, que utiliza este cereal como alimentação básica e diária. Com produção anual de 13 milhões de toneladas, o Brasil está entre os maiores produtores dos países ocidentais (IBGE, 2011).

Dentre os cereais cultivados, o arroz é uma fonte de proteína de qualidade, imprescindível em países onde grande parte da população não tem poder aquisitivo suficiente para se alimentar de outras fontes proteicas, o que justifica a busca de variedades com maiores teores de proteína nos grãos.

O nitrogênio (N) é o elemento mineral requerido pelas plantas em maiores quantidades e, conseqüentemente, o fornecimento de quantidades insuficientes ou de forma inadequada têm influência negativa e imediata no metabolismo vegetal, limitando seu crescimento e produtividade (Glass et al., 2003). Além disso, o N é um dos fertilizantes mais caros, contribuindo significativamente para o aumento dos custos de produção no cultivo de grãos (Good et al., 2004).

Estudos apontam para um desenvolvimento agrícola dependente de grandes aplicações de nitrogênio. Em 1930, aproximadamente 1,3 Mt de nitrogênio foram aplicados mundialmente, em 1960 esse valor subiu para 10,2 Mt (People et al., 1999) e, em 2004, o valor aplicado chegou ao montante de 85 a 90 Mt. Há uma projeção que esse valor chegue a 240 Mt em 2050 (Good et al., 2004). Além disso, dados experimentais apontam que por volta de 50 a 70% do nitrogênio aplicado no solo pode ser perdido do sistema solo-planta (Peoples et al., 1995).

A eficiência no uso de nitrogênio (EUN) tem sido definida como o rendimento de grãos por unidade de N disponível no solo (Lea & Azevedo, 2006) e esta EUN pode ser dividida em dois processos distintos: eficiência na absorção, que é a habilidade da planta em remover o N do solo normalmente presente nas formas de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) e, a eficiência na assimilação e remobilização, que é a habilidade da planta em assimilar o N inorgânico em formas orgânicas e transferir o N para os grãos, onde predomina na forma de proteínas. A contribuição do N remobilizado das folhas para o enchimento de grãos pode variar de 50 a 90% em cultivares de milho e trigo (Kichey et al., 2007).

Manipular a eficiência de uso de nitrogênio em culturas parece ser a melhor maneira de conciliar a segurança alimentar global, respeitando as políticas ambientais, e a necessidade de produzir biocombustíveis de forma satisfatória para suprir as necessidades de crescimento e desenvolvimento da população (Chardon et al., 2012). Porém o desenvolvimento de tais estratégias engloba parâmetros complexos, pois a EUN pode ser influenciada por inúmeros fatores genéticos e ambientais, como: arquitetura da raiz, razão C/N no solo e nos tecidos, tipo de solo, pluviosidade e temperatura (Kant et al., 2011).

Devido à grande importância do nitrogênio no metabolismo das plantas, ao longo do processo evolutivo esses vegetais se adaptaram aos ambientes com disponibilidade sazonal de nitrogênio e desenvolveram complexos sistemas de absorção, assimilação e remobilização desse nutriente, que convergiram para uma maior eficiência de uso (Souza & Fernandes, 2006). É importante entender a resposta das plantas a diferentes regimes de nitrogênio

disponibilizado, principalmente em condições de limitação do nutriente. Para isso podem ser utilizados métodos como análise transcricional, resposta de mutantes defectivos a limitação de N, e a análise de plantas que apresentem melhor crescimento sob condições limitantes (Kant et al., 2011).

A partir dos anos 80, ocorreu um grande avanço na área da biologia molecular, que tem proporcionado uma revolução de fatos e conceitos relacionados ao melhoramento vegetal, em função da aplicação das técnicas de manipulação do DNA, visando à obtenção de alimentos geneticamente modificados (Silva, 2009).

O uso da engenharia genética para a produção de plantas mais eficientes normalmente envolve características monogênicas como resistência a herbicidas ou insetos. Para se estudar a eficiência de uso de nitrogênio, uma característica controlada por vários genes, torna-se mais conveniente o estudo de fatores de transcrição, que são proteínas que regulam a transcrição, com isso são capazes de controlar a expressão de genes envolvidos em várias vias metabólicas. Estudos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa com o fator de transcrição *OsDof25* e sua influência na absorção e utilização de nitrogênio por plantas de *Arabidopsis* (Santos, 2009) demonstraram o envolvimento deste fator de transcrição no controle da expressão de genes envolvidos com vias do metabolismo de nitrogênio.

O presente trabalho teve por objetivo a produção de plantas de arroz geneticamente transformadas (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) por meio da inserção do fator de transcrição *OsDof25* visando caracterizar sua influência sobre o metabolismo de nitrogênio e carbono em comparação com plantas de arroz não transformadas (wt - tipo selvagem), além de identificar os locais de expressão do gene *OsDof25* nos diferentes tecidos em plantas de arroz.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A agricultura altamente produtiva necessita de grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados que representam uma parte considerável dos custos de produção, principalmente nas regiões tropicais. Melhorar a eficiência de utilização de nitrogênio (EUN) das plantas cultivadas é de fundamental importância para diminuir os impactos ambientais decorrentes do uso de fertilizantes. Esforços têm sido feitos para estudar as bases genéticas, na tentativa de desvendar os mecanismos bioquímicos envolvidos na absorção, assimilação e remobilização de nitrogênio em plantas. A detecção dos fatores limitantes que podem ser manipulados para aumentar a EUN é o principal objetivo de tais pesquisas.

O nitrogênio é um dos macronutrientes essenciais para as plantas e sua aquisição ocorre a partir de diversas fontes, principalmente na forma de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+), mas também como ureia, aminoácidos e peptídeos (Gojon et al., 2009). Esse nutriente associado a fatores como luz solar, água e temperaturas, aumenta o rendimento de matéria seca e de grãos. Além de seu papel como nutriente, as fontes orgânicas e inorgânicas de N têm um papel fundamental na sinalização que controla a expressão de diversos genes tanto em *Arabidopsis* como em outras espécies vegetais (Vidal & Gutiérrez, 2008).

2.1 Transportadores de Amônio (AMT)

O nitrogênio é um nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas e muitas vezes é o principal nutriente limitante para a sua produtividade (Sonoda et al., 2003a).

Nas últimas décadas, devido à introdução de variedades de alto rendimento produtivo, os fertilizante nitrogenado apresentaram um aumento significativo nos custos da produção agrícola (Good et al, 2004), no entanto, a eficiência de absorção pode variar de 30% a 80% (Hoque et al., 2006), essa baixa eficiência pode gerar danos ao meio ambiente. Por isso, é importante encontrar formas de melhorar a EUN.

Diferentemente do que ocorre com outras plantas, arroz prefere nitrogênio na sua forma amoniacal e, em geral, tende a não acumular altas concentrações desse íon (Lea & Azevedo, 2006). Sintomas de toxicidade são comumente observados em várias culturas cultivadas com amônio, porém o arroz parece ser uma exceção. O estudo dos eventos primários de aquisição de NH_4^+ em altas concentrações a nível celular em cevada e arroz demonstraram que o efluxo de NH_4^+ pode representar cerca de 80% do influxo primário, resultando em um ciclo fútil através da membrana plasmática da raiz. Tal ciclo demanda alto custo energético que é acompanhado do declínio no crescimento (Britto et al., 2001).

A absorção de amônio é promovida por uma família multigênica de transportadores AMT (“*Ammonium Transporter*”), por meio de um sistema de absorção bifásico. Quando os níveis de NH_4^+ no meio externo (solução nutritiva ou solução do solo) encontram-se abaixo de 1 mM, opera um sistema de absorção de alta afinidade (HATS), e em concentrações superiores a esta, opera o sistema de absorção de baixa afinidade (LATS) (Fernandes & Souza, 2006).

Análises das sequências de DNA indicaram que os genes *OsAMT1;1*, *OsAMT1;2* e *OsAMT1;3* pertencentes ao sistema HATS, codificam 499, 497 e 498 resíduos de aminoácidos com massa molecular de 52,6, 52,2 e 53,1 KDa, respectivamente e, análises de sequências

hidrofóbicas de cadeias de aminoácidos indicam que os três transportadores *OsAMT1* provavelmente, possuem 11 domínios transmembrana (Sonoda et al., 2003b), e apresentam ampla variação no padrão de cinética de absorção, fato que demonstra a plasticidade das plantas para a aquisição de formas reduzidas de N abundantes durante um grande período da evolução das plantas superiores (Lea & Azevedo, 2006)

Uma família de cinco genes de transportadores de amônio (*AMT1;1* a *AMT1;5*) foi originalmente identificada em *A. thaliana*, enquanto que, em tomate apenas três genes foram isolados (Lea & Azevedo, 2006). Em arroz, pela análise de similaridade da sequência de aminoácidos do *OsAMT2.1* foram identificados dez diferentes genes envolvidos na absorção de amônio e podem ser divididos em quatro grupos (Suenaga et al., 2003). O número de transportadores da família AMT em arroz é maior do que em *Arabidopsis t.* e tomate, indicando a importância da nutrição amoniacal nesta cultura (Loqué & Von Wíren, 2004).

A expressão da isoforma *OsAMT1.1* foi detectada na parte aérea e raiz independentemente do suprimento de nitrogênio, apesar de maior expressão na presença de amônio, enquanto a expressão da isoforma *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* foi restrita para a raiz, sendo a da primeira fortemente induzida por amônio e a da segunda reprimida após a aplicação de nitrogênio (Sonoda et al., 2003). De acordo com Kumar et al. (2003) os três transportadores de alta afinidade em arroz respondem de forma expressiva quando as plantas são cultivadas em concentrações de 10 μM de NH_4^+ , reduzindo os níveis de expressão quando transferidas para uma solução de 10 mM de NH_4^+ .

Plantas de arroz transformadas superexpressando o transportador *OsAMT1;1* não apresentaram diferenças em arquitetura e morfologia do sistema radicular, entretanto apresentaram uma permeabilidade ao íon amônio duas vezes maior, aumentando os níveis internos de NH_4^+ tanto em raízes quanto na parte aérea. Isto promoveu também maiores níveis de expressão de genes da via de assimilação de nitrogênio, resultando em maiores teores de clorofila, amido, açúcares e rendimento de grãos em linhagens transgênicas quando comparadas a WT, em condições ótimas de nitrogênio (Ranathunge et al., 2014).

Sperandio et al. (2011) avaliaram a expressão genética dos transportadores de NH_4^+ *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* e mostraram que todos apresentaram repressão no ressurgimento com 2 mM de N- NH_4^+ e alta indução sob deficiência, sendo *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* os mais induzidos na deficiência. A repressão dos transportadores de NH_4^+ é provocada provavelmente pelo alto influxo e assimilação de NH_4^+ , gerando altos teores de N-amino livre nas raízes que reprimem a expressão dos transportadores responsáveis pela absorção de NH_4^+ . Esse efeito negativo está correlacionado diretamente aos níveis internos de glutamina nos tecidos (Sonoda et al., 2003a).

A isoforma *OsAMT1.1* é expressa predominantemente no córtex radicular, periciclo, epiderme e pêlos radiculares (Mayer & Ludewing, 2006), e mostrou-se um importante membro do sistema HATS, devido a redução de 70% na absorção de NH_4^+ em plantas contendo uma inserção de T-DNA no gene *AMT1.1* (Kaiser et al., 2002). Já a localização do transportador *OsAMT1.2*, detectada principalmente nas células do cilindro central das raízes, sugerem que este pode estar envolvido em duas funções distintas, tanto na absorção de amônio da solução do solo quanto na recuperação de amônio do sistema vascular. Como a principal forma de nitrogênio no sistema vascular de arroz é a glutamina, seus níveis podem regular diversos genes envolvidos na resposta das plantas ao NH_4^+ (Sonoda et al., 2003b).

Comparando com plantas transformadas superexpressando o gene *OsAMT1.3* sob o controle do promotor da *ubiquitina*, Ferreira (2012) observou uma forte indução do transportador *OsAMT1.3* na ausência de N, principalmente nas zonas de emissão de raízes laterais, nas pontas de raiz e na exoderme. A análise dos perfis de expressão dos transportadores *OsAMT1.1-1.3* indicaram que a superexpressão de *OsAMT1.3* afetou

positivamente a expressão do *OsAMT1.2*. Quando submetido a uma baixa concentração de N, plantas superexpressão do *OsAMT1.3* apresentaram redução nos parâmetros cinéticos K_m e $C_{mín}$, além de apresentarem raízes mais longas com maior área, volume e número de pontas. Os dados obtidos sugerem que o *OsAMT1.3* está envolvido na capacidade das plantas de arroz para se adaptar às baixas concentrações de amônio, atuando tanto na absorção de NH_4^+ como no controle da arquitetura radicular.

2.2 Glutamina Sintetase (GS)

Excesso de amônio é tóxico para a maioria das plantas (Kronzucker et al., 2001). Portanto, o transporte de amônio e sua subsequente assimilação devem ser eficientemente reguladas pelas raízes. O monitoramento em tempo real do transporte de NH_4^+ mostrou que a translocação de ^{13}N , absorvido pelas raízes e transportado para a parte aérea da planta, foi completamente inibida por sulfoximina metionina, um inibidor da glutamina sintetase (GS, EC 6.3.1.2) (Kiyomiya et al., 2001). Tomados em conjunto, estes resultados sugerem fortemente que a maior parte do NH_4^+ absorvido pelas raízes é assimilado nas raízes por ação da enzima GS (Funayama et al., 2013).

A absorção de NH_4^+ é realizada por transportadores de alta e baixa afinidade (HATS e LATS) que são codificados por uma família de genes. Após a absorção do amônio pelo sistema radicular, este deve ser rapidamente assimilado, evitando assim danos causados pela sua toxidez. Este processo ocorre principalmente via enzimas do ciclo glutamina sintetase (GS)/glutamato sintase (GOGAT) (Hirel & Lea, 2002).

Inicialmente acreditava-se que a principal enzima responsável pela assimilação de amônio seria a glutamato desidrogenase (GDH), via aaminação redutiva do α -cetoglutarato. Entretanto os altos valores de K_m e V_{max} para o íon amônio da enzima GDH indicavam que outra enzima teria o papel principal na assimilação de amônio (Souza & Fernandes 2006).

O NH_4^+ absorvido pelas raízes é assimilado em aminoácidos primariamente via GS/GOGAT, embora rotas alternativas, como, por exemplo, via GDH e asparagina sintase tenham sido propostas, mas não confirmadas (Hirel & Lea, 2002; Dubois et al., 2003).

A glutamina sintetase catalisa a conversão de glutamato e NH_4^+ em glutamina com gasto de ATP. Existem duas isoformas de GS: a GS citosólica (GS1), ocorrendo no citosol de raízes e células da parte aérea; e a GS plastídica (GS2), presente nos tecidos fotossintéticos, plastídio de raízes e outros tecidos não fotossintéticos. Enquanto que as enzimas GS2 e Fd-GOGAT parecem estar ligadas a reutilização de compostos nitrogenados provenientes da fotorrespiração, GS1.2 e NADH-GOGAT1 têm sua expressão aumentada em tecidos radiculares no ressurgimento de NH_4^+ , o que indica que esses genes podem ter um papel importante na assimilação de NH_4^+ em raízes de arroz (Lea & Miffin, 2003).

Em seu trabalho com mutantes de cevada para os genes GS2 ou Fd-GOGAT, Yamaya e Oaks (2004) verificaram que esses mutantes foram capazes de crescer normalmente em condições não-fotorrespiratórias. Isto sugere que a GS1 e NADH-GOGAT são aparentemente importantes para o desenvolvimento normal e o crescimento das plantas.

Assim como em outras plantas, uma família multigênica que codifica para GS1 tem sido identificada assim como NADH-GOGAT em arroz (Tabuchi et al. 2005). Esses genes são *OsGS1.1*, *OsGS1.2* e *OsGS1.3*, e *OsNADH-GOGAT1* e *OsNADH-GOGAT2*. A expressão desses genes apresenta perfis diferentes quanto à idade da planta e o tecido analisado, e responde a presença de NH_4^+ , indicando que cada gene apresenta uma função distinta em arroz.

Entre os três genes de GS1 encontrados em arroz, *OsGS1;1* apresenta expressão em todos os órgãos, isto é, raiz, folha e espiguetas, com maior expressão no limbo foliar durante a fase vegetativa de crescimento. Já a isoforma *OsGS1;2* teve maior expressão na raiz seguindo o fornecimento de NH_4^+ , enquanto o gene *OsGS1;3* foi especificamente expresso na espiguetas durante a fase reprodutiva (Tabuchi et al., 2005).

Seguindo a descoberta da importância da GS e da GOGAT na assimilação do amônio em plantas superiores, vários laboratórios têm concentrado esforços para entender os mecanismos que controlam esta rota (Good et al., 2004). A criação de mutantes ou plantas transgênicas com níveis alterados de GS/GOGAT tem sido utilizada para determinar os efeitos destas proteínas sobre o desenvolvimento das plantas e para estudar a expressão de diferentes membros da família multigênica da GS.

Comparando duas variedades de arroz, uma com alta EUN e outra com baixa EUN, Shi et al. (2010) observaram diferenças entre 20-30% na atividade de GS e NADH-GOGAT entre as variedades, o que sugere que GS e NADH-GOGAT possuem papel importante na assimilação de nitrogênio em plantas jovens de arroz sob baixas concentrações de nitrogênio. Entretanto, resultados da expressão por PCR em tempo real demonstraram que a regulação desses genes pode estar relacionada com um controle pós-transcricional.

Caracterizando plantas de arroz silenciadas para o gene *OsGS1;2* geradas pela inserção de um retrotransposon Tos17, Funayama et al (2013) verificaram uma acentuada redução no número de perfilhos e nos teores de glutamina, glutamato, asparagina e aspartato, seguidos de um grande aumento na concentração do íon amônio, indicando forte papel do gene *OsGS1;2* na assimilação de amônio.

2.3 Glutamato Sintase (GOGAT)

A transferência redutiva do grupo amida da glutamina para o 2-oxoglutarato (2-OG), para formar duas moléculas de glutamato pela enzima GOGAT é a segunda etapa do ciclo GS/GOGAT.

A glutamato sintase (GOGAT), catalisa a conversão de glutamina e 2-OG a duas moléculas de glutamato, podendo usar ferredoxina (Fd-GOGAT) ou NADH (NADH-GOGAT). Tanto a Fd- quanto a NADH-GOGAT aparentam estar localizadas somente em cloroplastos e plastídios, com uma atividade maior da Fd-GOGAT em tecidos fotossintéticos. Dois genes distintos que são diferencialmente expressos nas raízes e folhas foram identificados codificando para Fd-GOGAT (Lea & Mifflin, 2003) e NADH-GOGAT (*OsGLT1* *OsGLT2*) em arroz por Zhao & Shi (2006).

A NADH-GOGAT1 é expressa em níveis mais elevados nas raízes do que nas folhas. Este padrão de expressão contrasta com Fd-GOGAT1, que é altamente expresso nas folhas e está envolvido em fotorespiração. Este padrão distinto de expressão entre os órgãos sugere um papel fisiológico não redundante para os produtos de genes NADH-GOGAT e Fd-GOGAT (Lancien et al., 2002).

Estudos com diferentes espécies sugerem que, para concentrações não tóxicas de amônio, as raízes são o principal local de assimilação (Andrews et al., 2001). Geralmente as raízes apresentam altos níveis de GS e NADH-GOGAT e, além disso, ambas as enzimas são induzidas pelo aumento no suprimento de NH_4^+ (Hirel & Lea, 2002; Ishiyama et al., 2003).

Em comparação com a enzima GS, poucos estudos têm sido feitos com a produção de plantas transgênicas superexpressando genes da GOGAT (Good et al., 2004). Entretanto Yan et al. (2002), superexpressando a NADH-GOGAT em arroz sob o controle do seu próprio

promotor observaram que as plantas transgênicas aumentaram, por volta de 80%, a massa dos grãos. Este estudo mostrou que a superexpressão de NADH-GOGAT pode ser usada como uma etapa chave na EUN.

A redução na atividade da GS em transgênicos de *Lotus japonicus* foi também correlacionado com um aumento no conteúdo de asparagina (Harrison et al., 2003), apoiando a hipótese de que quando a GS se torna limitante, asparagina sintetase pode ser importante no controle do fluxo de N reduzido no interior da planta (Lam et al., 2003).

Analisando plantas de tabaco superexpressando uma isoforma NADH-GOGAT1 de alfafa, Chichkova et al. (2001) observaram um aumento de 15 a 40% na atividade enzimática em diferentes linhagens quando comparadas com plantas controle. Quando supridas com nitrato ou amônio, essas plantas apresentaram maior teor de carbono e nitrogênio na parte aérea e aumento de massa seca durante o início do estágio de florescimento, em comparação com plantas controle. Isto foi associado a uma maior capacidade de assimilação de nitrogênio devido a maior atividade da NADH-GOGAT1.

Caracterizando linhagens de *Arabidopsis thaliana* mutantes por inserção de T-DNA no gene NADH-GOGAT1, Lancien et al (2002) verificaram que o mutante *glt1-T* apresentou o fenótipo de deficiência no crescimento e biossíntese de glutamato quando cultivado em baixa concentração de CO₂. Sob estas condições, o mutante *glt1-T* apresentou uma diminuição de 20% no crescimento e uma dramática redução de 70% nos níveis de glutamato.

2.4 Isocitrato Desidrogenase (IDH)

A via GS/GOGAT requer 2-OG como substrato para a produção de glutamato. Por outro lado, o nível de 2-OG pode refletir o status de carbono e ser associado ao controle e equilíbrio C/N para o mecanismo de regulação da planta, sendo, portanto, uma molécula de sinalização crítica de ligação de carboidratos e metabolismo de nitrogênio (Hodges et al., 2003) sendo a enzima Isocitrato desidrogenase (IDH) é reconhecida como uma das principais atuantes na produção de 2-OG (Gálvez et al., 1999).

Foram identificados em plantas duas isoformas de Isocitrato desidrogenase (isocitrate dehydrogenase-IDH), que utilizam diferentes cofatores. Uma delas é uma enzima do ciclo de Krebs dependente de NAD⁺ (IDH; EC 1.1.1.41), localizada unicamente nas mitocôndrias, e outra que utiliza NADP⁺ (ICDH; EC 1.1.1.42) que existe em diversos compartimentos subcelulares, tais como: citosol, cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas (Lu et al., 2005).

Durante décadas a enzima do ciclo de Krebs IDH foi considerada como responsável pelo fornecimento de 2-OG na biossíntese de aminoácidos (Bray, 1983), enquanto que ICDH foi considerada como uma via alternativa quando grandes quantidades do cetóácido são necessários (Chen & Gadal, 1990; Gálvez & Gadal, 1995). Esta hipótese foi baseada nos resultados que ICDH representa 90% a 100% da atividade detectada em qualquer órgão da planta e ainda apresenta uma maior afinidade para os substratos, enquanto que a IDH apresenta baixa atividade (Gallardo et al., 1995).

Diferentemente do que ocorre em bactérias, leveduras e animais, ICDH de plantas não sofre regulação pós-traducional, embora ocorra inibição por NADPH. A atividade da ICDH de *Escherichia coli* é controlada pela fosforilação reversível de um resíduo de serina, sendo inativada quando este é fosforilado. Embora ICDHs de plantas possuam um resíduo equivalente não há nenhuma evidência substancial indicando que são regulados por um mecanismo desse tipo (Gálvez et al., 1996).

Embora a ICDH seja encontrado em plastídios, seu principal local de assimilação de amônio, sua atividade é muito baixa para sustentar a atividade do ciclo GS/GOGAT, com isso, foi proposto por Chen e Gadal (1990) que a ICDH citosólica poderia desempenhar um papel importante na produção de 2-oxoglutarato para a síntese de aminoácidos. Nesta hipótese, o citrato seria exportado a partir da mitocôndria para o citosol através de um transportador de citrato.

Analisando plantas mutantes para o gene da nitrato redutase (NR) de tabaco, Scheible, et al (1997) identificaram acúmulo de nitrato e 2-oxoglutarato, além de alterações nos níveis de transcrição, o que foi interpretado como uma coordenação funcional da ICDH1, GS2 e Fd-GOGAT devido ao papel de ICDH1 na produção de 2-oxoglutarato para assimilação do nitrato. Os autores ainda verificaram que os níveis de transcritos da ICDH citosólica e sua atividade foram mais elevados no final do dia/início da noite e isto pareceu ser coordenado com enzimas (piruvato-quinase e citrato sintase) envolvidos no fluxo de C para produzir 2-oxoglutarato, o que contribuiria para a assimilação de nitrogênio.

Durante a fase inicial de desenvolvimento do cloroplasto (início da formação do cotilédone) Palomo et al (1998) verificaram uma coordenação entre a expressão das enzimas ICDH, GS e Fd-GOGAT, no entanto, quando a diferenciação do cloroplasto foi concluída (cotilédone totalmente formado), a expressão de cada uma destas proteínas foi diferenciada, sugerindo que a ICDH estaria desempenhando um papel adicional não relacionado com o ciclo de GS / GOGAT.

Devido a enzima IDH utilizar NAD^+ ou NADP^+ , atuando na redução dessas moléculas, vários autores sugeriram que IDH é um dos mecanismos de geração de NADPH mais importantes, atuando na proteção das células contra a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS - reactive oxygen species) e manutenção da homeostase (Liu et al., 2009).

Em seu trabalho com mutantes de *Arabidopsis thaliana* defectivos para o gene da IDH, Lemaitre et al. (2007) verificaram que plantas com redução de até 90% na atividade da enzima IDH não apresentaram qualquer tipo de deficiência no seu desenvolvimento e crescimento ou sobre a atividade da ICDH, além de não alterarem os níveis de sacarose, glicose, frutose, citrato, amônio, e os níveis de aminoácidos solúveis totais. Esse fato indica que a enzima IDH não é limitante para o funcionamento do ciclo de Krebs e assimilação de nitrogênio.

2.5 Fatores de Transcrição

Avanços em pesquisas voltadas a genômica de plantas e sistemas biológicos, incluindo a disponibilidade de sequências genômicas completas de diferentes espécies cultivadas, além de plantas que atuam como modelos biológicos em estudos, têm oferecido uma oportunidade sem precedentes para identificar genes regulatórios e redes metabólicas importantes no seu desenvolvimento. Como fatores de transcrição (TF) atuam como reguladores diretos dos processos celulares espera-se que sejam excelentes candidatos para modificar as características complexas em plantas cultivadas garantindo maiores produtividades, além de maior estabilização da produção agrícola (Century et al., 2008).

Fatores de transcrição são geralmente definidos como proteínas que contêm um domínio de ligação ao DNA ao qual reconhecem uma sequência específica de DNA e controlam o passo mais importante da regulação gênica, a transcrição, uma vez que este controle assegura que nenhum intermediário supérfluo seja sintetizado e, obviamente, porque

sem transcrição ou sem síntese de RNA, não haverá síntese proteica (Mitsuda & Takagi, 2009).

Os fatores de transcrição são geralmente divididos em dois grupos: os fatores de transcrição gerais e os fatores de transcrição gene específicos.

O fatores de transcrição gerais são ubíquos (expressos em todos os tecidos e sob diferentes condições) sendo proteínas que se ligam ao DNA de células eucarióticas para permitir que haja uma ligação entre a enzima RNA polimerase II (enzima responsável pela síntese de RNAm) e o DNA, essencial para a transcrição de todos os genes.

Os fatores de transcrição específicos, que são necessários para a regulação de um grupo de genes, reconhecem e se ligam a uma região promotora secundária (tipicamente composta de sequências curtas de 6-12 pares de bases), localizado dentro de uma região de algumas centenas de pares de bases da iniciação da transcrição denominada região regulatória em *cis* (*cis-regulatory elements*). Essas regiões de controle podem ligar um grande número de fatores de transcrição específicos que apresentam efeitos sinérgicos ou antagônicos sobre a cinética de transcrição dos genes alvos (**Figura 1**). Assim, a ligação a um promotor específico que determina os padrões de expressão, espaciais e temporais, dos genes alvo durante o desenvolvimento e diferenciação, e a regulação homeostática do metabolismo celular durante o regime de uma variedade de estímulos ambientais e sinais intracelulares (Papavassiliou, 1997).

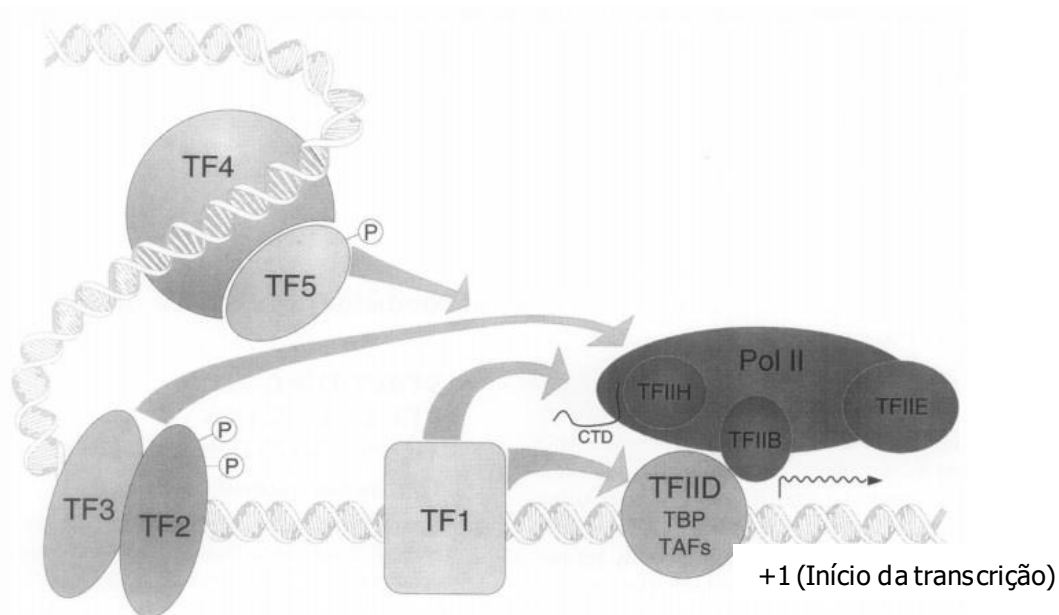


Figura 1. Modelo que representa um conjunto de mecanismos potenciais através do qual o DNA, os fatores de transcrição específicos (TF1-5) e RNA-polimerase (Pol II)/fatores de transcrição gerais (TFIIB, TFIID-TBP-TAFs, TFIIE e TFIIH) são reunidos para formar um complexo de transcrição. TF1 se liga perto do início da transcrição e é capaz de comunicar diretamente com os fatores de transcrição gerais. TF2 e TF3 se ligam ao DNA como um heterodímero com uma sequência distante do início da transcrição, tornando indireta (através de interações proteína-proteína com TF1, por exemplo), os contatos com Pol II e fatores de transcrição gerais. Formação de heterodímero e/ou transativação estão sujeitas à regulação por fosforilação induzidas. TF4 interage com complexo de transcrição através de outro fator de transcrição (TF5), que sofre modulação por ação de proteínas quinase. Figura adaptada de Papavassiliou (1997).

Além disso, a regulação da transcrição pode ocorrer pela interação com outros reguladores transcricionais promovendo o remodelamento da cromatina e modificações de proteínas, visando recrutar ou bloquear o acesso da RNA polimerase II a determinadas regiões do DNA.

2.6 Características e Evolução dos Fatores de Transcrição da Família Dof.

As proteínas de ligação Dof ("DNA-binding with one finger") são fatores de transcrição (TF) específicos de plantas com um domínio de ligação ao DNA altamente conservado que inclui o domínio de ligação único (C₂-C₂) do tipo dedo de zinco (Yanagisawa, 2004) (**Figura 2**).

Uma grande variedade de proteínas de domínio Dof foram identificadas tanto em monocotiledôneas quanto dicotiledôneas, incluindo milho, cevada, trigo, arroz, tabaco, *A. thaliana*, abóbora, batata e ervilha. Análises moleculares revelaram que as proteínas de domínio Dof funcionam como um ativador ou repressor transcricional, envolvidas em

diversos processos biológicos específicos de plantas. Atuando principalmente na regulação da transcrição de enzimas, crescimento e desenvolvimento (Yanagisawa, 2004).

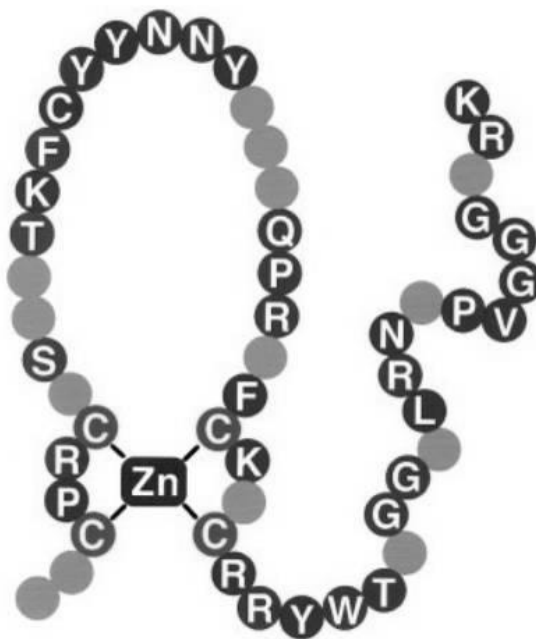


Figura 2. Estrutura proposta por Yanagisawa (2004) para o domínio de ligação Dof. Resíduos de cisteína altamente conservados coordenado por um íon de zinco e outros resíduos de aminoácidos conservados entre todas as proteínas de domínio Dof conhecidos são mostrados em vermelho e roxo respectivamente. Resíduos bem conservados são mostrados em azul e resíduos redundantes são mostrados em cinza.

Foram encontrados 19 genes candidatos para fatores de transcrição Dof no musgo *Physcomitrella patens* e apenas um na alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, entretanto, nenhum gene foi identificado na alga vermelha *Cyanidioschyzon merolae* ou na diatomácea *Thalassiosira pseudonana* (Figura 3), sugerindo que a origem dos fatores de transcrição Dof é anterior à divergência das algas verdes e os ancestrais das plantas terrestres (Shigyo et al., 2007). Isto indica que um pequeno número de genes *Dof* existia antes da divergência do musgo e do surgimento das angiospermas, e que um grande número de duplicações de genes Dof ocorreu durante a evolução das plantas superiores (Figura 3). Além disso, a diversificação estrutural dos fatores de transcrição Dof através de múltiplos ciclos de duplicação de genes pode estar estreitamente associada com o desenvolvimento de redes de regulação fisiológicas complexas durante a evolução da planta. Esta hipótese poderia ser a base para entender a relação entre diversificação funcional de fatores de transcrição específicos de plantas e sua evolução. Sendo necessário para isso uma avaliação profunda da função de cada proteína Dof.

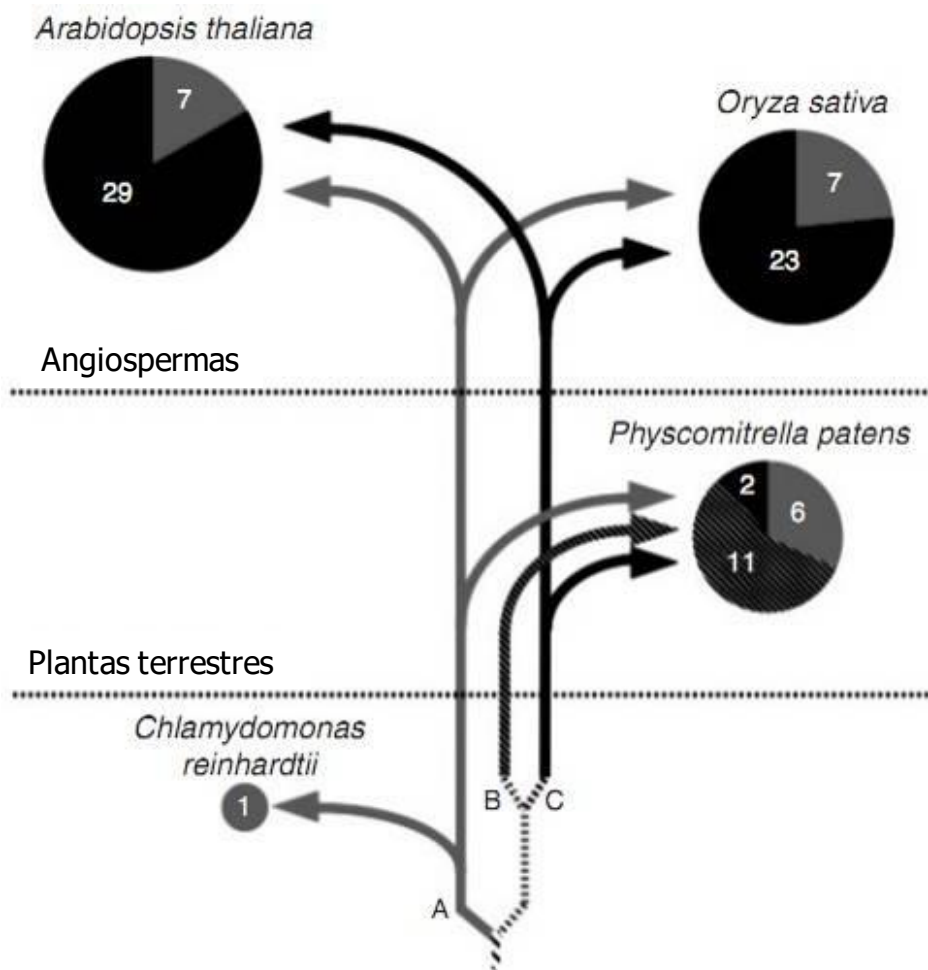


Figura 3. Modelo para a evolução molecular dos genes da família Dof proposto por Shigyo (2007). A área de cada círculo representa o tamanho da família de genes de cada espécie. Os números dentro dos círculos indicam os números dos domínios Dof que são classificados nos grupos A, B ou C. Embora o padrão de ramificação dos três grupos é atualmente incerto, o esquema é uma hipótese de representação.

Em *A. thaliana* há mais de 1.800 genes que codificam para FTs (Guo et al., 2005; Iida et al., 2005), no entanto, poucos destes FTs já foram caracterizados funcionalmente (Qu & Zhu, 2006). Além de um grande número de genes que codificam para FTs, em *Arabidopsis* há uma maior variedade de FTs que apresentam maior diversidade e especificidade de ligação ao DNA, quando comparado a outros organismos como *D. melanogaster* ou *C. elegans*.

A expressão de genes em plantas envolve classes de FTs que são especificamente relacionados, regulando genes específicos e/ou mediando uma variedade de sinais específicos, estes genes podem ser agrupados em diferentes famílias com base no domínio de ligação ao DNA e outras características conservadas (Century et al., 2008).

As proteínas de domínio Dof contêm uma classe particular de domínio de ligação ao DNA tipo dedo de zinco (Dof, "DNA one finger") e são membros de uma grande família de fatores de transcrição encontrados somente em plantas. Nas proteínas Dof, o domínio de ligação ao DNA é extremamente conservado, conferindo grande similaridade de ligação ao DNA entre as diferentes proteínas que compõem esta família, porém fora do domínio de

ligação as sequências de aminoácidos são divergentes e reflete a variedade de funções descritas para estes fatores (**Figura 4**) (Yanagisawa, 2002; Yanagisawa, 2004).

Os FTs reconhecem sequências regulatórias específicas situadas na região promotora dos genes à qual se ligam por intermédio do domínio de ligação. Por sua vez esta interação determina o início e a eficiência da transcrição. O domínio de ligação do tipo dedo de zinco é caracterizado por uma região de 50 aminoácidos altamente conservada, ao qual o íon zinco é coordenado por resíduos de cisteína (C₂-C₂), associados a uma região base que se liga à sequência de nucleotídeos AAAG ou o seu reverso complementar TTTC, denominadas motivos ou sítios de ligação ao DNA. As proteínas Dof geralmente aparecem compostas por dois domínios principais: um domínio conservado de ligação ao DNA na porção N-terminal e um domínio C-terminal de regulação da transcrição que pode fazer interação com outras proteínas (Yanagisawa, 2002).

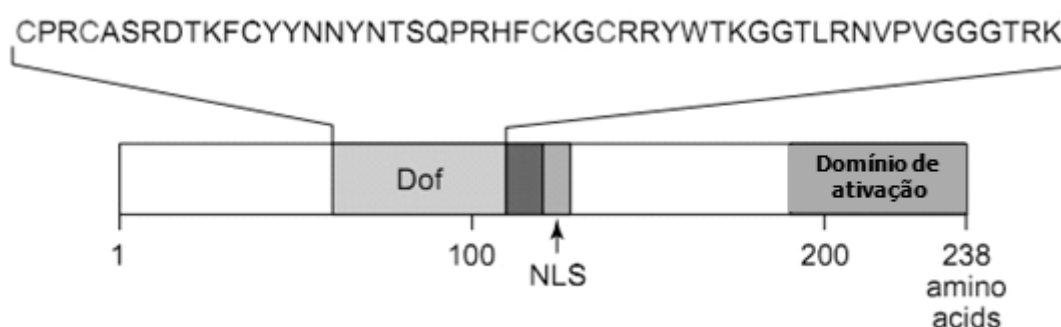


Figura 4. Esquema proposto por Yanagisawa (2002) para estrutura da proteína Dof. O domínio de ligação da proteína Dof é indicado em amarelo seguido do sinal de localização nuclear (NLS) em rosa e um domínio de ativação na cor lilás. O domínio de ligação apresenta 50 resíduos de aminoácidos conservados, coordenando através de resíduos de cisteína (C₂-C₂) com um átomo de zinco. A região em verde é referente a uma sequência de resíduos de serina.

O domínio de ligação Dof foi identificado inicialmente como um domínio de ligação ao DNA; entretanto, atualmente é considerado como um domínio bifuncional, com interação tanto com o DNA como interagindo com outras proteínas. O domínio de ligação Dof também está envolvido em interações proteína-proteína, incluindo outra classe de fatores de transcrição (*basic domain-leucine zipper proteins* - zíper de leucina, bZIP) e proteínas nucleares chamadas proteínas de alta mobilidade (HMG - "*high-mobility group*"). Contudo apenas algumas proteínas de domínio Dof apresentaram esse tipo de interação (Yanagisawa, 2004).

O número de genes que codificam para FTs da família *Dof* varia de espécie para espécie. Em *Arabidopsis* foram identificados 37 prováveis genes que codificam proteínas de domínio Dof; no genoma do arroz foram encontrados 30 genes (Tabela 1) (Yanagisawa, 2002; Lijavetzky et al., 2003; Kushwaha et al., 2010). Um mapa filogenético apresentando a distribuição dos membros da família *Dof* das subespécies índica e japonesa de arroz pode ser observada no apêndice (**Figura 33**) construída com a sequência de 50 aminoácidos conservados referentes ao domínio de ligação ao DNA (**Tabela 1**).

Tabela 1. Lista de genes da Família Dof de arroz (*Oryza sativa* L.) identificados por Kushwaha et al. (2010). *Gene do *OsDof25* foi nomeado por Kushwaha et al. (2010) como *OsDof18*.

Gene	Locus	Código	Cromossomo	Estrutura gênica
<i>OsDof1</i>	LOC_Os07g48570	Os07g48570.1	7	Um íntron
<i>OsDof2</i>	LOC_Os01g55340	Os01g55340.1	1	Sem íntron
<i>OsDof3</i>	LOC_Os01g15900	Os01g15900.1	1	Um íntron
<i>OsDof4</i>	LOC_Os01g17000	Os01g17000.1	1	Um íntron
<i>OsDof5</i>	LOC_Os03g16850	Os03g16850.1	3	Um íntron
<i>OsDof6</i>	LOC_Os03g07360	Os03g07360.1	3	Um íntron
<i>OsDof7</i>	LOC_Os10g26620	Os10g26620.1	10	Um íntron
<i>OsDof8</i>	LOC_Os05g36900	Os05g36900.1	5	Sem íntron
<i>OsDof9</i>	LOC_Os01g64590	Os01g64590.1	1	Sem íntron
<i>OsDof10</i>	LOC_Os07g32510	Os07g32510.1	7	Sem íntron
<i>OsDof11</i>	LOC_Os02g47810	Os02g47810.1	2	Um íntron
<i>OsDof12</i>	LOC_Os02g49440	Os02g49440.1	2	Sem íntron
<i>OsDof13</i>	LOC_Os03g38870	Os03g38870.1	3	Sem íntron
<i>OsDof14</i>	LOC_Os06g17410	Os06g17410.1	6	Sem íntron
<i>OsDof15</i>	LOC_Os01g09720	Os01g09720.1	1	Sem íntron
<i>OsDof16</i>	LOC_Os04g47990	Os04g47990.1	4	Um íntron
		Os04g47990.2		Sem íntron
<i>OsDof17</i>	LOC_Os02g45200	Os02g45200.1	2	Um íntron
		Os02g45200.2		Dois íntrons
		Os02g45200.3		Sem íntron
		Os02g45200.4		Um íntron
<i>OsDof18*</i>	LOC_Os08g38220	Os08g38220.1	8	Sem íntron
<i>OsDof19</i>	LOC_Os03g42200	Os03g42200.1	3	Dois íntrons
<i>OsDof20</i>	LOC_Os01g48290	Os01g48290.1	1	Sem íntron
<i>OsDof21</i>	LOC_Os12g38200	Os12g38200.1	12	Um íntron
<i>OsDof22</i>	LOC_Os07g13260	Os07g13260.1	7	Sem íntron
<i>OsDof23</i>	LOC_Os02g15350	Os02g15350.1	2	Um íntron
<i>OsDof24</i>	LOC_Os05g02150	Os05g02150.1	5	Um íntron
<i>OsDof25</i>	LOC_Os04g58190	Os04g58190.1	4	Um íntron
		Os04g58190.2		Dois íntrons
		Os04g58190.3		Dois íntrons
<i>OsDof26</i>	LOC_Os10g35300	Os10g35300.1	10	Um íntron
<i>OsDof27</i>	LOC_Os12g39990	Os12g39990.1	12	Sem íntron
<i>OsDof28</i>	LOC_Os03g55610	Os03g55610.1	3	Sem íntron
<i>OsDof29</i>	LOC_Os03g60630	Os03g60630.1	3	Sem íntron
<i>OsDof30</i>	LOC_Os09g29960	Os09g29960.1	9	Sem íntron

Os fatores de transcrição da família Dof são proteínas nucleares apresentando sinal de localização nuclear (NLS, "Nuclear Localization Signal"). Esses sinais são geralmente

caracterizados por uma curta sequência básica de aminoácidos que contém vários resíduos de lisina e arginina (Wang et al., 2007). Em plantas de milho, a proteína Dof1 foi identificada por um NLS rico em aminoácidos básicos (Yanagisawa, 2002).

A primeira proteína com domínio de ligação do tipo Dof (*ZmDof1*) foi clonada a partir do milho por Yanagisawa & Izui (1993). Desde então inúmeros membros da família em diversas espécies e envolvidos em diferentes processos fisiológicos foram caracterizados. Embora muitas das funções fisiológicas das proteínas de domínio Dof ainda não estejam esclarecidas devido ao grande número dessas proteínas nas plantas, já está evidente que desempenham um papel fundamental como reguladores de transcrição influenciando no crescimento e desenvolvimento das plantas cultivadas (Yanagisawa et al., 2004).

Devido à sua natureza imóvel, as plantas são suscetíveis a inúmeros fatores bióticos e abióticos, por isso possuem sistemas distintos de adaptação ao meio ambiente visando sua sobrevivência. Tais adaptações incluem defesas contra patógenos, predadores e o crescimento de órgãos específicos, como flores e sementes (Yamasaki et al., 2008). Contudo, o desenvolvimento e a diferenciação em plantas são programados primariamente em nível de transcrição gênica, que são controlados por FT (Udvardi et al., 2007).

A regulação da transcrição pode ocorrer a partir da ligação dos FT a sequências de bases específicas presente na região promotora do gene e/ou pela interação com outros reguladores transcricionais promovendo o remodelamento da cromatina e modificações de proteínas, visando recrutar ou bloquear o acesso da RNA polimerase (enzima responsável pela síntese de mRNA) a determinadas regiões do DNA (Grotewold, 2008; Udvardi et al., 2007).

A expressão de genes em plantas envolve classes de FTs que são especificamente relacionados com a regulação de genes específicos e/ou mediação de uma variedade de sinais específicos, estes genes podem ser agrupados em diferentes famílias baseadas no domínio de ligação ao DNA e outras características conservadas (Century et al., 2008). As proteínas de domínio Dof contêm uma classe particular de domínio de ligação ao DNA tipo dedo de zinco e são membros de uma grande família de fatores de transcrição encontrados somente em plantas. Nas proteínas Dof especificamente, o domínio de ligação ao DNA é extremamente conservado, conferindo grande similaridade de ligação ao DNA entre as diferentes proteínas que compõem esta família, porém fora do domínio de ligação as sequências de aminoácidos são divergentes e reflete a variedade de funções descritas para estes fatores (Yanagisawa, 2002; Yanagisawa, 2004a).

Em *Arabidopsis* foram identificados 37 prováveis genes que codificam proteínas de domínio Dof, no genoma do arroz foi encontrado um número similar de 30 genes (Yanagisawa, 2002; Lijavetzky et al., 2003), respectivamente.

Yanagisawa e Sheen (1998) já mostraram com o ensaio de mobilidade eletroforética que o *Dof1* de milho foi capaz de se ligar ao promotor da fosfoenolpiruvato carboxilase de milho e induzir a sua atividade. Já Santos (2009), estudando a superexpressão *ZmDof1* e seu ortólogo em arroz *OsDof25* em *Arabidopsis*, sugeriu que o aumento de expressão da fosfoenolpiruvato carboxilase e piruvato quinase pode ser uma estratégia das plantas transformadas para aumentar a produção de esqueletos de carbono, especialmente o 2-oxoglutarato, buscando a detoxificação do excesso de amônio absorvido. Outra possibilidade é que este fator de transcrição coordene a expressão conjunta dos transportadores de amônio e com enzimas do metabolismo de carbono e nitrogênio.

Estudos realizados por Yanagisawa et al (2004b), com fator de transcrição *Dof1* de milho em plantas transgênicas de *Arabidopsis* indicam que a expressão deste fator leva ao aumento da expressão de vários genes envolvidos na produção de esqueleto de carbono, além de aumento significativo da concentração de aminoácidos, especialmente glutamina, além de uma elevação no teor de nitrogênio. Segundo esses mesmo autores a superexpressão do *Dof1*

resultou em melhoria na assimilação de nitrogênio e no crescimento de plantas em baixas concentrações de nitrogênio.

Já em espécies de *Pinus pinaster* outro fator de transcrição da família *Dof* está relacionado à regulação transcricional antagônica entre duas isoformas da enzima glutamina sintetase citosólica (GS1) (Rueda-López et al., 2008). Estes autores mostram que a superexpressão do *PpDof5* sob o comando do promotor 35S, levou à repressão da GS1a, reduzindo o nível de expressão em torno de 40%, enquanto que na isoforma GS1b este FT causou o dobro de aumento da expressão.

Os FT *Dof* estão envolvidos em diversas funções ligados a diferentes tecidos, incluindo o desenvolvimento de sementes, cujo processo complexo exige inúmeras proteínas regulatórias. Estudos recentes utilizando análise *in silico* mostraram que mais de 50% dos genes *Dof* presentes no genoma de arroz, trigo e arábido participam no processo de desenvolvimento de sementes (Gaur et al., 2011). Foram analisados 30 genes *Dof*, e o padrão de expressão de 17 revelou o envolvimento destas proteínas em várias fases do desenvolvimento desde o florescimento à maturação das sementes.

Muitos trabalhos associam os fatores de transcrição *Dof* como um ativador transcricional ou um repressor de diversos processos biológicos específicos da planta, principalmente desempenhando papéis críticos como reguladores de transcrição no seu crescimento e desenvolvimento. Estudos apontam seus diversos papéis na expressão gênica associada a fenômenos específicos, incluindo respostas a luz, fitocromos, respostas de defesa e variações ambientais e no controle da germinação e desenvolvimento da planta (Yanagisawa, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tecnologia Gateway® e Clonagem dos Genes Amplificados

A tecnologia Gateway desenvolvida pela Invitrogen® é baseada na reação de recombinação sítio-específica mediada por fago lambda (λ), onde fragmentos de DNA flanqueado por sítios de recombinação (*att*), podem ser transferidos para vetores que contêm sítios de recombinação compatíveis (*attB* \times *attP* ou *attL* \times *attR*) (Karimi et al., 2002).

O bacteriófago lambda pode crescer como um fago lítico, onde a célula do hospedeiro é lisada com a liberação da progênie do vírus. Alternativamente, o fago λ pode integrar sítio especificamente dentro do genoma de *E. coli* por um processo chamado lisogenização.

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

As reações de recombinação integrativa e excisiva do fago λ são mediadas por proteínas codificadas pelo próprio fago λ e pela *E. coli*. Estas reações de recombinação, feitas *in vitro*, são à base da tecnologia de clonagem gateway (Tabela 2).

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

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

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

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

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

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

clonar os produtos de PCR flanqueados pelos sítios *attB* para gerar os clones de entrada. Portanto, devido a estes fragmentos serem flanqueados por diferentes sítios *att*, três diferentes vetores doadores são requeridos para possibilitar a geração de três tipos de clones de entrada requerido para o “*MultiSite Gateway*®”.

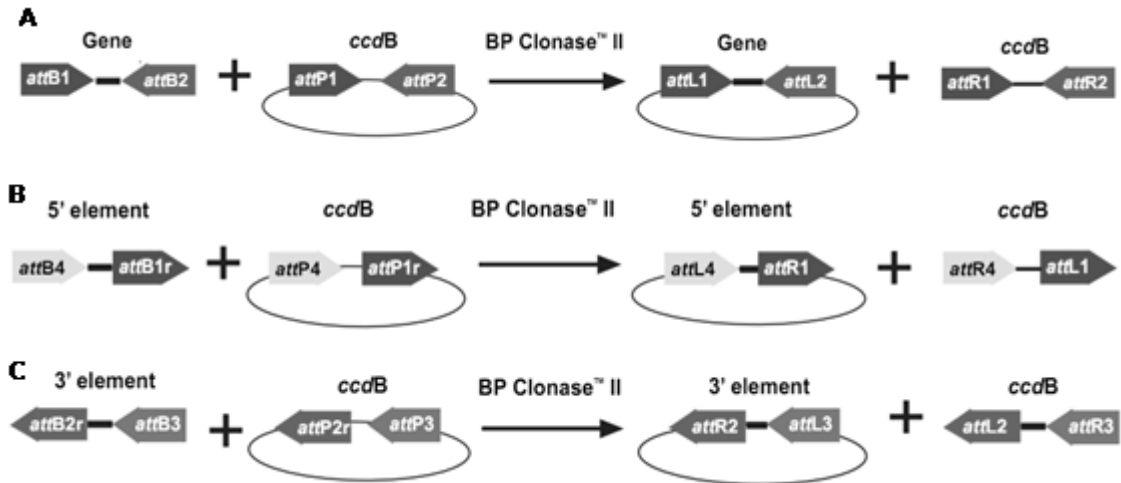


Figura 5. Esquema ilustrativo da reação de recombinação BP para criação dos vetores de entrada, necessários para construção do vetor para expressão do *OsDof25*.

Os vetor de entrada contendo o produto da clonagem do gene *OsDof25*, o promotor *UBIL1* e o peptídeo de fusão *HA* foram cedidos por Santos (2009).

Para obtenção do cassete de expressão é necessário à aquisição de um vetor de destino, ou seja, aquele que vai permitir a recombinação coordenada dos três vetores doadores na reação de recombinação múltipla, também chamada de reação LR, pois envolve a recombinação entre sítios *attL* e *attR* dos vetores de entrada e do vetor de destino respectivamente.

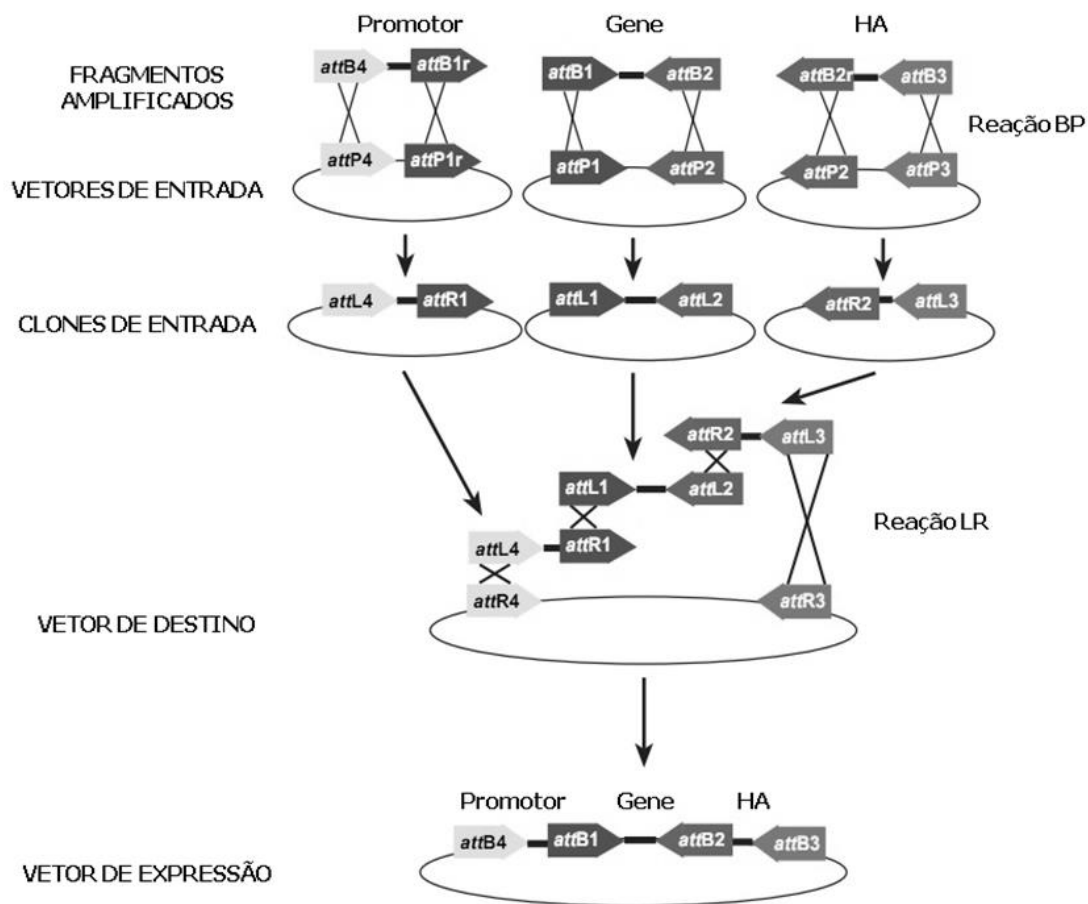


Figura 6. Reações BP e LR triplos para obtenção do vetor para superexpressão do gene de interesse. Promotor referente ao gene *UBIL1* (ubiquitina de milho) e *HA* (Hemaglutinina) fusionado ao gene *OsDof25*.

3.2 Reação BP – Recombinação Entre os Sítios *attB* do Gene e *attP* do Vetor pDONR221 para a Obtenção do Vetor de Entrada

A reação BP foi realizada com o gene amplificado levando os sítios de recombinação *attB1* e *attB2* e o vetor doador pDONR221 para criação do vetor de entrada pEN-*OsDof25* (Figura 7). Esse vetor participa na reação de LR tripla para formação da construção gênica utilizada na transformação das plantas. Nesta mesma reação de LR tripla estão também os vetores de entrada levando o promotor *UBIL*, promotor que confere forte expressão em monocotiledôneas, e o "tag" de 3xHA (peptídeo de fusão com o gene).

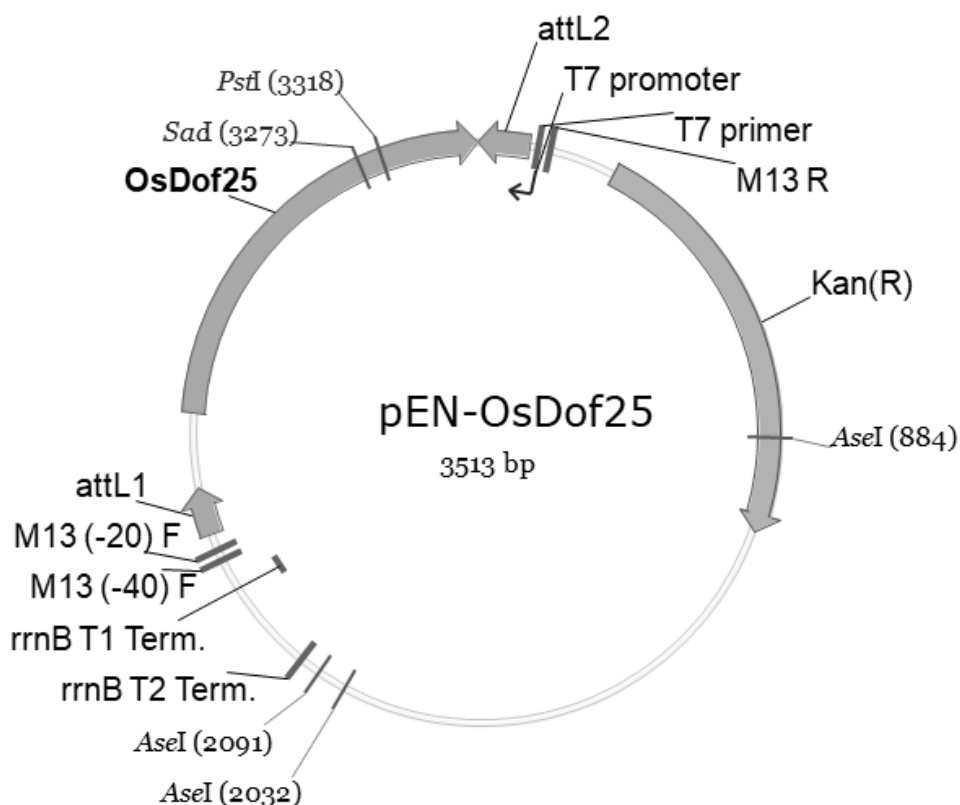


Figura 7. Vetor pEN-OsDof25 usado na reação de recombinação LR tripla para formação do clone de expressão. Sac I, Pst I e Ase I se referem aos sítios de clivagem das enzimas de restrição e Kan(R) gene de resistência a Kanamicina.

As reações BP foram realizadas utilizando o kit “Gateway® BP Clonase II Enzyme Mix” (Invitrogen). Em um microtubo de 1,5 mL, foram adicionados: 5 µL do produto amplificado, contendo os sítios *attB*, 1 µL do vetor pDONR211 e 2 µL do mix de enzimas BP clonase. A mistura da reação foi homogeneizada vagarosamente por pipetagem, e a reação ocorreu à temperatura ambiente durante a noite. Depois deste período a reação foi paralisada pelo tratamento com 1µL de Proteinase K a 37 °C durante 10 min.

O volume de 2 µL reação foi utilizado para transformação de células competentes de *E. coli* (DH5α). Misturou-se o produto da reação BP (2 µL), com 40 µL do estoque de células competentes (linhagem DH5α), o mix de transformação foi vagarosamente homogeneizado e deixado em descanso no gelo por 5 min. Após este período o mix foi submetida ao eletroporador a 1.700V e logo em seguida misturada com 400 µL de meio SOC (20 g.L⁻¹ Triptona, 5 g.L⁻¹ Extrato de levedura, 4,8 g.L⁻¹ MgSO₄, 3,603 g.L⁻¹ dextrose, 0,5 g.L⁻¹ NaCl e 0,186 g.L⁻¹ KCl). As bactérias, agora transformadas foram cultivadas por 1h a 37 °C em agitador orbital a 150 rpm. Para seleção das bactérias transformadas, 100 µL foi riscado em meio LB contendo 50 µg.mL⁻¹ de canamicina.

3.3 Amplificação da Região Promotora do Gene *OsDof25*

Com o objetivo de identificar os locais de atuação do gene *OsDof25* em plantas de arroz, um fragmento de DNA de 1607pb correspondentes ao sítio de iniciação da tradução

(Figura 8) (incluindo a região 5'-NTR), foi amplificado de plantas de arroz cv. Nipponbare com os iniciadores fusionados aos sítios de recombinação *attB1* e *attB2* em duas reações de PCR subsequentes. A 1ª reação foi realizada com os iniciadores *pOsDof25attB1* e *pOsDof25attB2* (Tabela 3), onde uma alíquota da primeira reação foi utilizada na 2ª reação (reação adpt).

Tabela 3. Sequências dos iniciadores para amplificação do promotor do fator de transcrição de arroz *OsDof25* com os sítios de recombinação *attB1* e *attB2* em duas reações.

Gene	Iniciadores	Sequência
Promotor	<i>pOsDof25B1</i>	5'-AAAAAGCAGGCTGCGGAGAGAGATGAGAGGAAC-3'
<i>OsDof25</i>	<i>pOsDof25B2</i>	5'-AGAAAGCTGGGTCTGGTCTGCTCTGGTCCCT-3'

O fragmento do promotor com os sítios de recombinação *attB1* e *attB2* foi clonado no vetor pDONR221 (Invitrogen®) e depois, por meio de uma reação LR o promotor foi clonado no vetor de destino pHFS7GW para fusão com a EGFP e GUS, dando origem a construção P_{OsDof25}:EGFP:GUS (Figura 9). Esse vetor foi posteriormente inserido em *Agrobacterium tumefaciens* e utilizado para transformação em arroz cv. Nipponbare. Foram obtidas 3 linhagens contendo a construção gênica de interesse. As sementes da 1ª geração foram colocadas para germinar para a obtenção da 2ª geração que foi utilizada para os experimentos de localização tecido-específica da atuação do *OsDof25* em diferentes estádios de desenvolvimento.

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCGGAGAGAGATGAGAGGAACCAATCCGATCCAGTCCAATCGGATCCGGTCACTCCGACTCCCGACG
 CGTCGCGTCGCGTCGCTGTTCGCGGAGATCGGTGGTGGTCTCCGCGTCGCTGCGCGCCGAGCCGTTCCGCCGTGTGCGCCGACGCGCAGCGGAC
 GCCGCACAGAGTTTACAAAACCGTACGATAATCTTCTCGGTTCTTAAGACCACGATATATCCGTACGATAATCTTCTCGGTTCTTAAGACCACG
 ATATATCTCACGGTAACCGCTAAACCGTGAGACGACGGTAAAGCTCGTCCCTAAACAATCCGATGGATTGCGTTGCGCGGGCGGACGCGGGCAG
 CATTGGCGCGCGCGGAGAGGCGGGGGGATTCGTTTCGGTTGCGTGATGCGCGCGCGGACAGGACAGCAAGGGTGGGGTGGGTGTGGG
 GGCCGCGTGCCTGCGGCGACCGAGACCACCGTCCATGGCCCGGGCGGGGGCCATGTGCTCGGCCGGGGAGGGGTTGGCCACGGGCGTACGGCC
 CATCCCGTTCTGATCCAGTGAATCCAGGCAGCTCGGCCACGCGCGCGGTCTCGCTACTGCGCCAGTGTACTACTACTGTACCACCTTGCC
 GGATTCGATTTTCGTCGATGTTTTTTTTTACATACGAGGTGGTATCCTCTCACTCTCACCCCTATCCACAGCTGGGCCGGTGAACCTTTGAATTTGA
 AGTGCACCTTGTGCAACAAAACGTTTAAATTTTTTCGTATTATTTCAAACGTTAGGAGGGGCTCAAAGAAGTCTCGGGTGATTGAACTGCTCGG
 CGGCAGCGGGAGCTGATAGGTGCGCGTTCGCGTTGAAACGGCTCGTTTGGTTTTTTTTATTGGGTTTTCGGTGGATTTCGCGTCTGTTGGGTTGGCCG
 CTGGGAGCGGGCAGGCAGGCGTCAACAGGGGTGGGGCCGCACACCGGCGTACGAGGTGGACCCCACTGGACAGACAGCTGCTTGCCTCACGAA
 GCATGGCTGCCAACTAATGCCGTCCGCCACGTGGCCAAACCGCGACACCCGCGCCGGTGGCCGACACGGCGCATAGTTCCTGCCCCGAGAC
 GATAAGTCCATCCGTCCGAACGGCTCCTCACCCGCGTGAACCAACCCACATCCGCTGACGCGTGGGCCACCACGGTGGTTGCCGCGCCCGC
 GTCATCGACGCGAGGAGGGGGGGTGGTAAAGTGGGTGGTGGGCCACAGGTGCGGTGCTGTCGTCCTCCCCCTTCGCTAGGCGCCACGCGCGC
 GTACGGCGGGCTAATCGCGGTTAACTGTACAAAATCATGGCCGATCTCGCACGGTGGACGTCGCTGACAGGTGGGACCCGTTGGACAGGATGAA
 CCGACCGCTGACCCGTTGGGCCCTGGGGGGCGGTGGTGGCGGTATGTATAGGAGTGGGGAGAGTGTACCTCGTGTACCACTTTCGTCGTCACC
 GCGACTGCGACCATAAGAGACTCCCGCTTCCGCCAACCGCCACCACCCGTTTCGACCATTTGCTTGGCCCGCTCCTCGGTTCTCCGACTCC
 ACCGCGCGCGCGCGGAGGGACAGAGCAGCCAGCCAGCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTCCCC

Figura 8. Sequência da região promotora do gene *OsDof25* LOC_Os08g38220.1. (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/>). Sublinhado representa o produto amplificado da região promotora contendo 1607pb.

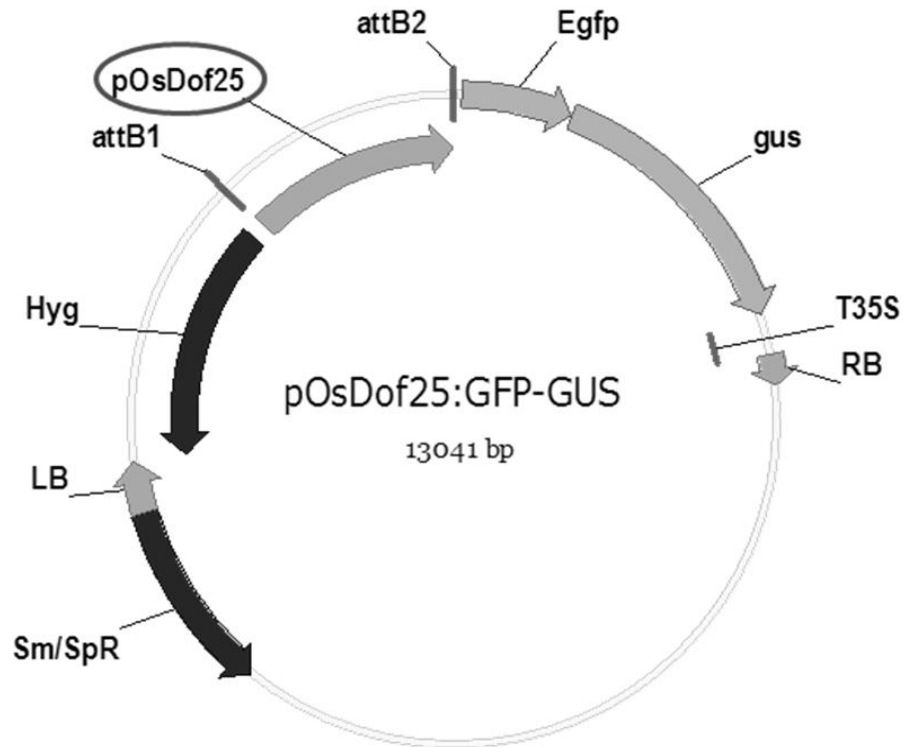


Figura 9. Vetor de expressão da construção $P_{OsDof25}:EGFP:GUS$ usado para transformação das plantas de arroz via *Agrobacterium tumefaciens*. Este vetor leva o gene de resistência a higromicina (*hyg*) para seleção das plantas transformadas.

3.4 Localização Tecido-Específica do Gene *OsDof25*

Com o objetivo de identificar os locais de atuação do produto gênico do *OsDof25* em plantas de arroz, plantas da Linhagem 5 (L#5) transformadas com a construção $P_{OsDof25}:GFP:GUS$ foram colocadas para germinar em placas de *Petri* contendo água. Foram realizados os estudos de localização ao longo do desenvolvimento das plantas.

As plantas foram coletadas e imergidas na solução de coloração de GUS composta por 0,5 mg.mL⁻¹ de X-gluc (ácido glucurônico); 50 mM de tampão fosfato pH 7,2; 1 mM de ferrocianeto de potássio (K₄[Fe(CN)₆]); 1 mM de ferricianeto de potássio (C₆N₆FeK₃), 0,05% de Triton X-100.

Após infiltrar a solução nos tecidos com o auxílio de uma seringa para remoção do oxigênio, as plantas foram incubadas no escuro a 37 °C por 3 horas e logo após, lavados com água destilada. As plantas foram separadas em raiz e parte aérea e fragmentos de 30 mm das regiões de interesse foram embebidos em solução fixadora de glutaraldeído onde permaneceram até a realização do emblocamento.

3.5 Preparo de Células Competentes para Eletroporação (DH5α)

O estoque de *E. coli* DH5α foi inoculado em meio LB sólido (10g.L⁻¹ triptona, 5 g.L⁻¹ extrato de levedura e 5 g.L⁻¹ NaCl) sólido e incubado durante 16 horas a 37 °C. No dia seguinte, uma colônia isolada foi selecionada e inoculada em 5 mL de meio LB líquido e

mantida sob agitação constante a 150 rpm durante 16 horas. No dia seguinte pela manhã, 3 mL da cultura fresca foi inoculada em 300 mL de meio LB líquido acondicionado em Erlenmeyer de 2 L, mantido a 37 °C sob agitação constante a 200 rpm até a cultura atingir uma DO₆₀₀ entre 0,5 a 0,8. Depois de atingida a DO₆₀₀, alíquotas de 50 mL da solução de cultura de células foram acondicionadas em seis tubos de fundo cônicos com capacidade de 50 mL e mantidas em descanso em banho de gelo por 30 min. Em seguida, as células foram sedimentadas a 4.000 g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas, cuidadosamente com 50 mL de água destilada estéril gelada, para retirada do excesso de sais. As células foram novamente sedimentadas como descrito acima e ressuspensas em 25 mL de água destilada estéril gelada. As células foram então acondicionadas em três tubos de fundo cônicos com capacidade de 50 mL e novamente sedimentadas como descrito acima. O sedimento de cada tubo foi cuidadosamente ressuspensado com 2 mL de solução de glicerol a 10% gelado e as células transferidas para um único tubo. Finalmente, as células foram sedimentadas como descrito acima e o sedimento ressolubilizado em 550 µL de solução de glicerol a 10% gelado. A suspensão de células foi dividida em alíquotas de 40 µL, acondicionadas em microtubos de 1,5 mL e mantidas em freezer -80 °C por até seis meses para uso.

3.6 Reações de LR Triplo para Obtenção da Construção UBIL:OsDof25:3xHA

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: 12,5 fmoles do pEN-UBIL, 12,5 fmoles do pEN-3xHA, 12,5 fmoles pEN-*OsDof25* e 25 fmoles do vetor de destino pH7m34GW. O volume foi elevado para 8 µL com TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) pH 8,0 e adicionado 2 µL da mistura 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 encerrada pela adição de 1 µL de solução de Proteinase K (Invitrogen) a 37 °C durante 10 min.

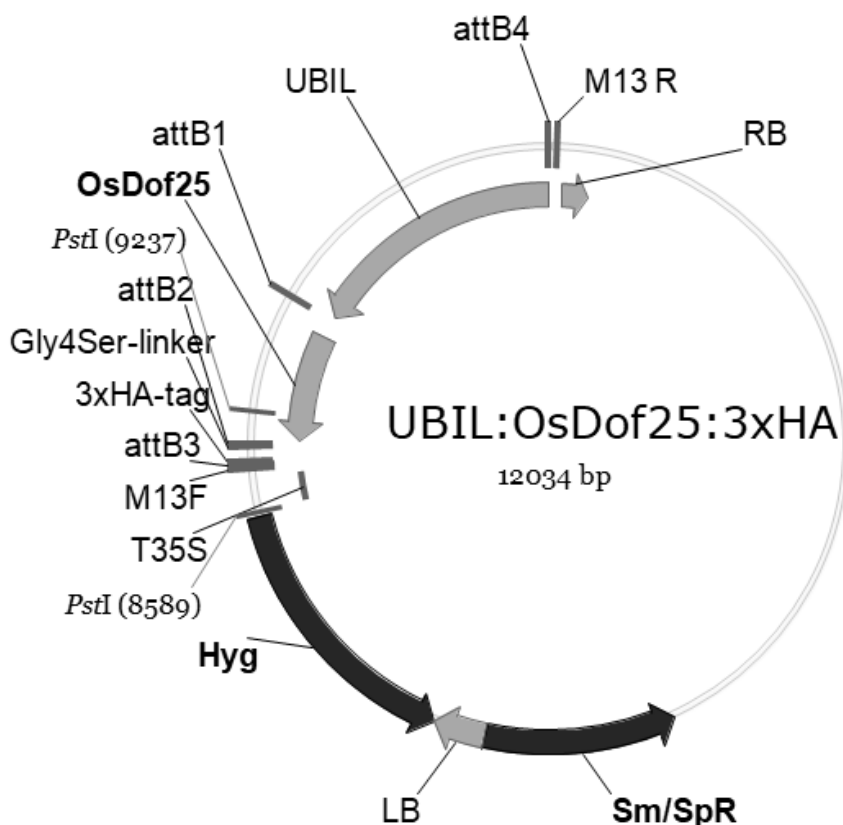


Figura 10. Vetor de expressão UBIL:OsDof25:3xHA usado para transformação das plantas de arroz via *Agrobacterium tumefaciens*. Este vetor leva o gene de resistência a higromicina (*hyg*) para seleção das plantas transformadas.

A fim de caracterizar os clones obtidos, foi realizada a transformação de *E.coli* como descrito anteriormente para a reação BP. O sistema em meio SOC, foi inoculado em meio LB sólido contendo Espectinomicina (Sp) 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e Estreptomicina (Sm) 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para seleção das células transformadas com o vetor levando a construção gênica. A confirmação da clonagem foi feita por digestão dos plasmídios com enzimas de restrição.

3.7 Preparo de *Agrobacterium tumefaciens* Competente

O estoque de *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) foi riscado em meio YEB sólido (5 g.L^{-1} extrato de carne, 1 g.L^{-1} extrato de levedura, 5 g.L^{-1} peptona, 5 g.L^{-1} sacarose, 0,5 g.L^{-1} MgCl_2 e bacto agar a 1.5%) contendo 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de rifamicina (Rf) e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina (Gm), e incubado a 28 °C por 24 horas. Foi transferida apenas uma colônia isolada para um tubo cônico de 50 mL contendo 3 mL de meio YEB (Rf/Gm) que foi incubado a 28°C com agitação de 150 rpm por 48 horas. Pela manhã do dia seguinte, 2 mL da cultura fresca foi inoculada em 50 mL de meio YEB contendo Rf e Gm em Erlenmeyer de 250 mL. A incubação foi realizada a 28 °C sob agitação constante de 150 rpm até atingir uma DO_{600} de aproximadamente 0,6. A cultura foi então dividida em dois tubos cônicos de 50 mL e incubada no gelo por 20 minutos. Em seguida, as células foram sedimentadas a 1.000g por 5 min. a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 500 μL de uma solução contendo 20 mM CaCl_2 e p/v de glicerol 10%. As células foram divididas em

alíquotas de 100 μL acondicionadas em microtubos estéreis de 1,5 mL e mantidas em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até um ano de uso.

3.8 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Depois de confirmadas as construções gênicas, estas foram transferidas para células de *A. tumefaciens* estirpe LBA4404 como descrito a seguir.

Foi adicionado 1 μg de plasmídio a 100 μL de suspensão de *A. tumefaciens* competente. A mistura foi homogeneizada suavemente e incubada no gelo por 30 min. As células com o plasmídio foram congeladas em nitrogênio líquido por cinco min. e, em seguida, incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em banho-maria por mais cinco min. Após este tempo, foi adicionado 1 mL de meio YEB e as células foram mantidas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, com agitação constante a 150 rpm durante duas horas. O sistema resultante (1 mL) foi inoculado em meio YEB sólido com os antibióticos correspondentes a construção (Sp/Sm) mais Rf ($100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e Gm ($40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). As placas foram incubadas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o aparecimento de colônias (dois a três dias depois). A transformação foi confirmada por PCR de colônia.

3.9 Transformação de Arroz Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Foi utilizado o protocolo descrito por Toki et al. (2006) para o processo de transformação de plantas de arroz cv. Nipponbare com as construções desejadas.

O método para transformação de arroz se baseia na produção de calos embriogênicos provenientes da região do escutelo de sementes de arroz germinadas em meio nutritivo N6D contendo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

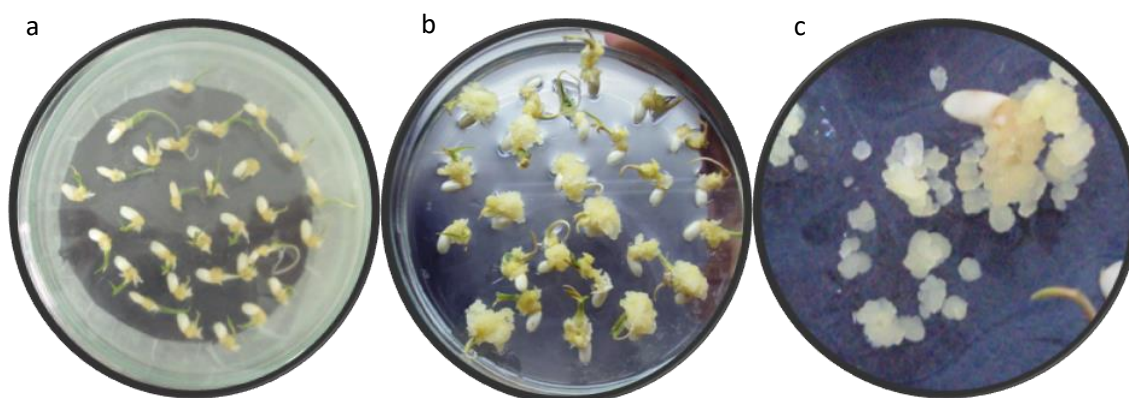


Figura 11. Processo de indução de calos embriogênicos de arroz. a) Sementes de arroz cv. Nipponbare dispostas em meio indução de calos (N6D) contendo auxina (100 mg L^{-1} de 2,4D) como regulador para indução de calos embriogênicos; b) e c) Calos em estágio de desenvolvimento após 14 dias no meio N6D, alguns calos possuem a característica friável desejada. Fotos do autor.

O método de cultura de tecidos facilita o processo de transformação de plantas via *A. tumefaciens*, proporcionando a obtenção de um grande número de eventos de transformação.

A embriogênese somática é um dos métodos de cultivo de tecidos para a obtenção de embriões onde se utiliza células somáticas (não reprodutivas) obtidas de tecido vegetal que ao passar por processo de diferenciação dão origem a células totipotentes (capazes de sofrer diferenciação). Hiei et al. (1994) foram os primeiros autores a demonstrar a eficiência da *A. tumefaciens* na transformação de arroz. Esses autores conseguiram um grande número de plantas de arroz transgênicas, morfológicamente normais, férteis por co-cultivo de tecidos de arroz com *A. tumefaciens*. Em particular, observaram que os calos induzidos a partir do escutelo de sementes de frutos maduros obteve-se melhores resultados em comparação com os diferentes tecidos analisados.

Para a transformação de plantas de arroz cv. Nipponbare, 300 sementes foram descascadas e submetidas à desinfestação descrita a seguir. Primeiramente, as sementes foram lavadas com etanol 70%, por inversão durante um minuto. Em seguida, foram realizadas duas lavagens de 15 min cada com hipoclorito de sódio a 2,5% p/v, onde a primeira recebeu Tween 20 a 0,05% v/v. Entre as lavagens com hipoclorito de sódio, foram realizadas lavagem com água destilada estéril por 5 vezes. Ao final da segunda lavagem com hipoclorito, as sementes foram lavadas com água estéril por 6 vezes de um min cada até a eliminação de todos e de qualquer resíduo de hipoclorito de sódio.

Foram distribuídas de 25 a 30 sementes por placas de *Petri* contendo o meio de cultivo para indução de calos embriogênicos N6D (Toki et al., 2006) modificado contendo 2,4D a 100 mg L^{-1} (Item 7.1). As sementes foram mantidas nesse processo de indução de calos embriogênicos em meio de cultivo N6D durante duas semanas a $32 \text{ }^\circ\text{C}$ com luz constante.

A formação de calos embriogênicos oriundos da região do escutelo a partir da germinação de sementes de arroz em meio N6D de indução com o regulador 2,4D, teve início entre 3 e 5 dias de cultivo (Figura 11a). Aos quatorze dias houve a formação de uma massa celular friável de coloração amarelo claro e estruturas globulares na superfície do calo, neste momento os calos já estão aptos para serem transformados através de *A. tumefaciens* (Figura 11b e c).

Após o período de indução, os calos formados são postos em meio líquido AAM (Item 7.2) na presença de *A. tumefaciens* diluída para a DO_{600} de 0,1 e após três minutos o excesso de meio foi drenado em papel filtro (Figura 12c). Foram utilizadas três colônias positivas crescidas em meio YEB para o processo de infecção. Após a remoção do excesso de meio AAM, os calos foram dispostos em meio N6D coberto com papel de filtro estéril e umedecido com meio AAM com adição de acetosseringona ($19,2 \text{ mg L}^{-1}$) que atua na ativação dos genes de virulência presentes na *A. tumefaciens* (Figura 13).

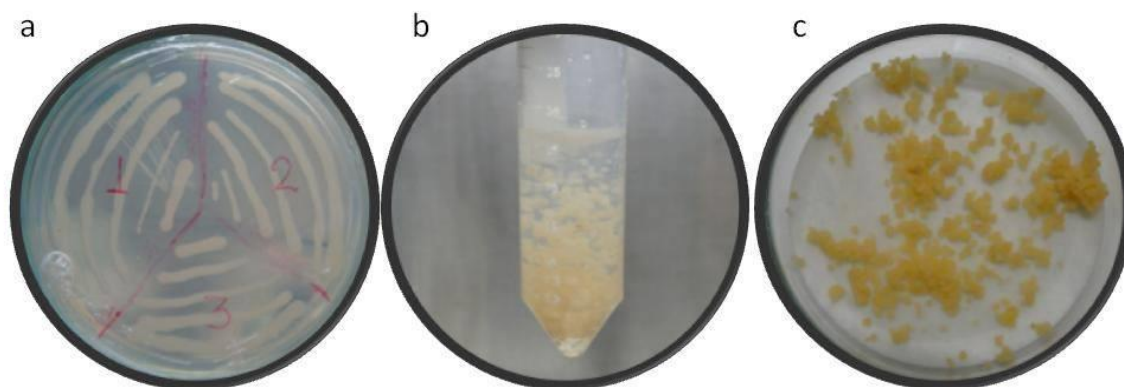


Figura 12. Calos embriogênicos de arroz em contato com a solução contendo *A. tumefaciens* para que ocorra a transferência do gene de interesse. a) Três diferentes colônias positivas para construção gênica de interesse crescidas em meio YEB; b) Calos inoculados com *A. tumefaciens* em meio AAM; c) Calos embriogênicos oriundos de semente de arroz, colocados sobre papel filtro para drenagem do excesso de meio AAM contendo *A. tumefaciens*. Fotos do autor.

A transformação gênica de monocotiledôneas e dicotiledôneas mediada por *A. tumefaciens* possui inúmeras vantagens sobre outros métodos de transformação, primeiramente pela integração do gene no genoma do hospedeiro ser precisa e a possibilidade de integração de segmentos relativamente grandes de T-DNA nos cromossomos da planta com a ocorrência de rearranjos mínimos, além de proporcionar a inserção de um pequeno número de cópias do gene, e uma alta eficiência de transformação com maior nível de expressão do transgene (Hiei et al., 1997; Vega et al., 2008).

Os calos retirados do meio de co-cultivo N6D-As (Item 7.1) e lavados com água destilada estéril e solução contendo carbenicilina (400 mg L^{-1}) para eliminação da *A. tumefaciens* foram transferidos para meio de seleção contendo higromicina (50 mg L^{-1}) para eliminar os calos que não possuíam a construção gênica (Figura 13b). Dessa forma apenas calos que receberam a construção gênica contendo o marcador de seleção a higromicina mantiveram o desenvolvimento e a proliferação no meio.

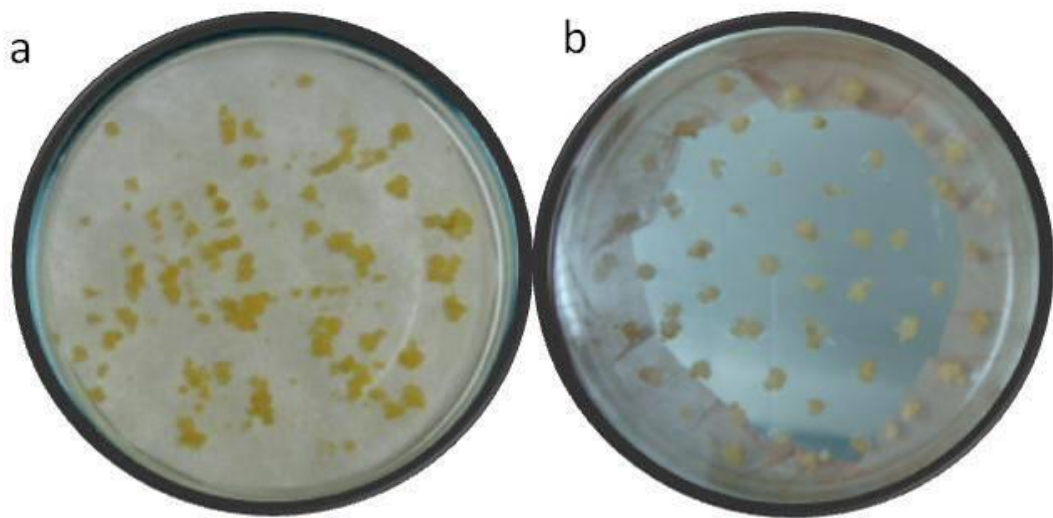


Figura 13. Etapas do processo de transferência gênica para calos embriogênicos de arroz. a) Calos embriogênicos dispostos em meio N6D-As com *A. tumefaciens* contendo a construção gênica de interesse; b) Calos em meio de seleção N6D, contendo antibiótico carbenicilina (400 mg L^{-1}), para a completa eliminação da *A. tumefaciens* e higromicina (50 mg L^{-1}) para selecionar os calos que possuíam o gene resistente ao antibiótico. Fotos do autor.

Os calos que permaneceram por duas semanas em meio de seleção contendo agente seletivo (higromicina 50 mg L^{-1}) e apresentaram desenvolvimento e coloração mais clara foram isolados em grupos mantendo os calos selecionados agrupados conforme o seu desenvolvimento e transferidos para um meio de regeneração RE-III (Item 7.1) por aproximadamente duas semanas, onde alguns apresentaram regeneração de parte aérea (Figura 14). Aos cinco a sete dias após a transferência dos calos pode-se observar o surgimento de pontuações de coloração verde clara, indicando início do processo de diferenciação dos calos denominados “*greenspots*” (Figura 14a). Na Figura 14b pode ser observada plântula com parte aérea totalmente regenerada apta para ser transferida para o meio de indução de raízes HF (Item 7.1). As plantas regeneradas foram numeradas conforme ordem de transferência para casa de vegetação onde permaneceram até o final do ciclo (Figura 14c).

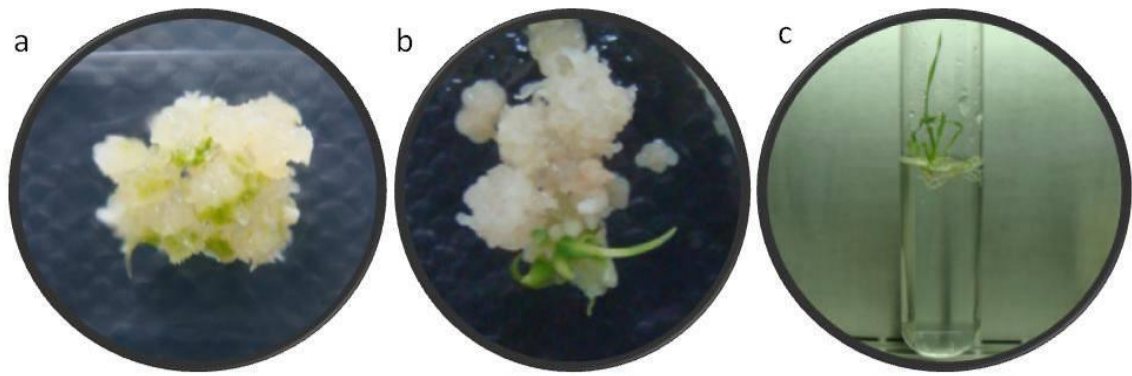


Figura 14. Regeneração de plantas de arroz a partir de calos embriogênicos transformados pela inserção do T-DNA. a) Formação dos “greenspots” indicando o início do processo de diferenciação dos calos embriogênicos. Meio de regeneração de parte aérea RE-III; b) Plântulas de arroz expressando o fator de transcrição *OsDof25*, regeneradas a partir de calos embriogênicos cultivados em meio de regeneração de parte aérea RE-III; c) Planta de arroz completamente regenerada em meio de indução de raízes HF. Fotos do autor.

Todas as linhagens transgênicas obtidas passaram por uma avaliação para identificar aquelas que apresentaram segregação 3:1 na geração T2 e possivelmente uma cópia do gene. As sementes das plantas que passaram pelo procedimento de transformação foram chamadas de T1, e as sementes das linhagens T1 deram origem à geração T2 onde já foi possível observar a segregação e separar as plantas homozigotas. Aproximadamente 20 a 30 plantas de cada linhagem que apresentaram desenvolvimento satisfatório foram cultivadas em vasos contendo 9 L e suas sementes foram coletadas individualmente. Foi realizado novo teste de segregação, onde apenas plantas com 100% de sobrevivência, ou seja, em homozigose para a construção de interesse foram selecionadas para obtenção da geração T3, das quais as sementes foram coletadas para posterior condução dos experimentos.

As linhagens obtidas e selecionadas durante o processo de transformação foram denominadas de L#1 a L#10 para a construção UBIL:*OsDof25*:3xHA e L#1 a L#5 para a construção *P_{OsDof25}*:GFP:GUS.

3.10 Análise do Efeito do Fator de Transcrição *OsDof25* sobre a Expressão dos Transportadores de NH_4^+ e Enzimas do Metabolismo de N

Plantas de arroz (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare), transformadas com a construção gênica UBIL:*OsDof25*:3xHA e tipo selvagem, foram cultivadas sob diferentes concentrações de N em solução. Para avaliação da absorção e assimilação foram utilizadas plantas com 21 DAG, considerando plantas em pleno crescimento vegetativo. As plantas de arroz foram cultivadas em meio hidropônico com concentrações constante de N. As plantas foram cultivadas inicialmente em soluções contendo 2 mM de N-NH_4^+ com trocas de solução sendo realizadas a cada três dias. Em ambos os tratamentos plantas foram mantidas nas condições de condução do experimento assim como outro grupo de plantas sofreram um período de depleção de N e sem seguida a outra parte recebeu ressuprimento simulando alta e baixa concentração de N por duas horas e depois coletadas, como pode ser verificado na Figura 15. Em ambos os casos, as plantas foram crescidas em solução de Hoagland e Arnon (1950) modificada com $\frac{1}{2}$ da força iônica, onde foram coletadas parte aérea e sistema radicular e

armazenadas em etanol 80% e nitrogênio líquido para avaliação de metabólitos solúveis, expressão gênica e atividade de enzimas do metabolismo de N e C. Detalhes destas análises estão descritas nos itens seguintes.

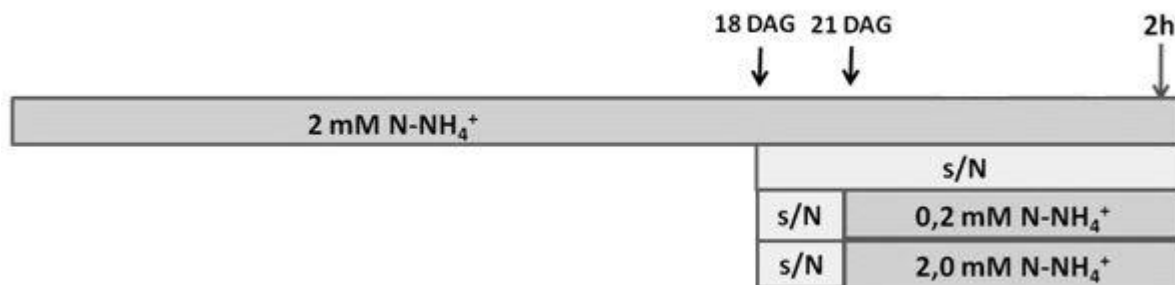


Figura 15. Esquema experimental usando plantas de arroz tipo selvagem cv. Nipponbare e linhagens expressando o fator de transcrição *OsDof25* para análise da expressão dos transportadores de NH₄⁺ e enzimas do metabolismo de Nitrogênio e de Carbono.

3.11 Análise de Metabólitos Solúveis

Amostras de material coletado de partes aérea e raiz de cada planta de arroz, foram trituradas e homogeneizadas em etanol 80% e, após filtragem foram submetidas a partição com clorofórmio (Fernandes, 1984). A fração hidrossolúvel obtida foi utilizada para a determinação dos teores de aminoácidos livres (Yemm & Cocking, 1955), N-NH₄⁺ (Felker et al., 1977) e açúcares solúveis (Yemm & Willis, 1957).

3.12 Extração de Proteína

As amostras obtidas de tecido vegetal foram maceradas em N₂ líquido e homogeneizadas em tampão de extração na proporção 3:1 (tampão:amostra). O tampão de extração foi composto por 50 mM de Tris-HCl pH 8,0; 1,0 de mM EDTA, 1,5% de polivinilpirrolidona (PVPP), 10 mM de dithiothreitol (DTT), 30% de glicerol e 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF). O homogenato foi centrifugado a 14.000g durante 30 min. e o sobrenadante armazenado no freezer – 80 °C para posterior análise. O conteúdo de proteína foi determinado como descrito por Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão.

3.13 Determinação da Atividade de Glutamato Desidrogenase (GDH)-Aminação e Desaminação

Os ensaios foram realizados como descrito por Turano et al. (1996). Na reação de aminação, a atividade da GDH foi determinada em 500 µL de solução contendo 100 mM de Tris-HCl pH 8,0; 50 mM de (NH₄)₂SO₄; 13 mM de α-cetoglutarato; 0,25 mM de NADH; 1 mM de CaCl₂ e 50 µg de proteína. A reação foi iniciada com a adição do extrato e a cinética da atividade foi determinada em dois minutos com registro a cada 5 segundos. A atividade foi

expressa pela taxa de decréscimo da absorbância com o tempo a 340 nm. Na reação de desaminação, a atividade da GDH foi determinada em 500 μ L de uma solução contendo 100 mM de Tris-HCl pH 9,3; 35 mM de L-glutamato; 0,25 mM de NAD^+ ; 1 mM de CaCl_2 e 50 μ g de proteína. A reação foi iniciada com a adição da proteína e a cinética a mesma da reação de aminação. A atividade foi expressa pela taxa de incremento da absorbância pelo tempo a 340 nm.

3.14 Determinação da Atividade de Glutamina Sintetase (GS)

Os ensaios foram realizados como descrito por Farnden e Robertsen (1980). Os ensaios foram realizados em 450 μ L de uma solução contendo 50 mM de imidazol-HCl pH 7,5; 5 mM de hidroxilamina neutralizada com Tris; 20 mM de MgCl_2 ; 25 mM de L-glutamato; 5 mM de β -mercaptoetanol e 5 mM de ATP. O controle da reação foi realizado sem a adição de ATP no meio de reação. A reação foi iniciada pela adição de 50 μ g de proteína totalizando 500 μ L de reação e conduzida a 30°C durante 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 350 μ L de uma solução composta por 4% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) e 3,2% (p/v) de cloreto férrico anidro (FeCl_3) preparada em 0,5 N de HCl. O γ -glutamil hidroxamato (GHD) foi colorimetricamente determinado em $\lambda=540$ nm. A atividade de GS foi determinada pela concentração de GHD por mg de proteína por minuto.

3.15 Determinação da Atividade da Isocitrato Desidrogenase $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ -dependente

Os ensaios da isocitrato desidrogenase NADP^+ -dependente foram realizados como descrito por Schiavon et al. (2008). A atividade foi determinada em 500 μ L de uma solução contendo 88 mM de Imidazol-HCl pH 8,0; 3,5mM de MgCl_2 ; 0,41 mM de NADP^+ ; 0,55 mM de isocitrato de sódio e 50 μ g de proteína. A reação foi iniciada com a adição do extrato proteico e uma cinética foi realizada a cada 5 segundo durante dois minutos. A atividade da Isocitrato Desidrogenase NAD^+ -dependente foi determinada em 500 μ L de uma solução contendo 88 mM de Imidazol-HCl pH 8,0; 3,5 mM de MgCl_2 ; 0,41 mM de NAD^+ ; 0,55 mM de isocitrato de sódio e 50 μ g de proteína. A atividade foi expressa pela taxa de acréscimo da densidade ótica a 340 nm pelo tempo.

3.16 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído utilizando tampão NTES (0,2 M de Tris-Cl pH 8,0; 25 mM de EDTA pH 8,0; 0,3 M de NaCl; 2% (p/v) de SDS). Amostras de folha e raiz foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em uma mistura contendo 600 μ L de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e 800 μ L de tampão NTES por 10 minutos em vortéx e posteriormente centrifugação a 18.000g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 500 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e novamente centrifugado por 20 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo vazio onde o RNA total foi precipitado pela adição de 1/10 volume de acetato de sódio 3 M pH 4,8 ($\text{NaOAc}_{\text{DEPC}}$) e 1 volume de isopropanol puro. A mistura foi mantida a -80 °C por 1 hora seguida de centrifugação a 18.000g por 20 min. Descartado o sobrenadante, o precipitado foi lavado em etanol 70% e centrifugado a 18.000g por 10 min. O precipitado foi solubilizado em

400 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ e novamente precipitado com 400 μL de cloreto de lítio 4 M pH 4,8 ($\text{LiCl}_{\text{DEPC}}$) durante 16 horas a 4°C. Decorrido esse período a solução foi centrifugada a 18.000g por 20 min e o precipitado foi novamente solubilizado em 450 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$. Após a completa dissolução foram adicionado 50 μL de acetato de sódio 3M pH 4,8 ($\text{NaOAc}_{\text{DEPC}}$) e 1000 μL de etanol absoluto. A mistura foi mantida por 60 minutos a -80 °C e centrifugada a 18.000g por 20 min. O precipitado foi lavado com etanol 70% e, após a secagem, solubilizado em 30 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ e o sistema foi armazenado a -80 °C.

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

3.17 Tratamento com DNase I, Síntese do cDNA e PCR em Tempo Real

Meio micrograma de RNA total foram tratados com DNase (“*DNase I Amplification Grade – Invitrogen™*”) seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente foi preparada uma solução estoque de 10 μL de RNA com concentração de 0,5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, para padronização das amostras. Um microlitro de solução contendo 0,5 μg de RNA foi misturado com 0,5 μL do tampão de reação da DNase I 10X, 0,5 μL da DNase I e avolumado para 5 μL . A incubação da reação foi conduzida a 25 °C por 15 min, seguida da adição de 0,5 μL de EDTA 25 mM (Solução de parada) e posterior inativação da DNase I a 70 °C por 10 minutos. A reação de síntese do cDNA foi realizada com o kit “*TaqMan® Reverse Transcription Reagents*” (Applied Biosystem) seguindo as instruções do fabricante.

Os genes da Actina (*Actin 11*) e $\alpha\text{EF-1a}$ (*Eukaryotic elongation factor1-alpha*) foram utilizados como padrão interno nas reações de PCR devido à sua maior estabilidade em diferentes tecidos (Jain et al., 2006). As reações foram efetuadas no aparelho “*StepOne Real-Time PCR System*” (“*Applied Biosystems*”) utilizando o “*kit Power SYBR® Green PCR Master Mix*” (“*Applied Biosystems*”) seguindo as recomendações do fabricante. Todas as reações foram feitas em duplicata referentes a quatro réplicas biológicas. A reação foi montada em placas de PCR da seguinte maneira: 4 μL do tampão “*Power SYBR Green PCR Master Mix*” 2X, 2 μL de uma solução de “*primers*” 3,6 μM cada e 2 μL do cDNA diluído, com volume final de 8 μL . A placa foi selada com filme óptico apropriado, agitada por três minutos em vórtex próprio e centrifugada a 3.000g por 3 min a 25 °C. Cada reação foi conduzida por: dez minutos a 95 °C, quarenta ciclos de amplificação com 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto. Uma curva de dissociação (“*melting*”) foi adicionada à programação para identificar possíveis amplificações inespecíficas.

3.18 Desenho dos Iniciadores para os Estudos de Expressão gênica

Foram sintetizados iniciadores para os genes que codificam para os transportadores de membrana de amônio (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*) (Duan et al., 2007). Além disso, foi analisada a expressão de genes chaves do metabolismo de N (*OsGS1,2*, *OsGS2* e *OsNADHGOGAT1*) (Tabela 4).

Tabela 4. Sequências dos iniciadores (“forward e reverse”) usados nas reações de PCR em tempo real e as respectivas referências.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Referência
<i>OsDof25</i>	5'-ACTCGTTCACGGACCTCCT-3'	5'-CTTGGTGATGGACGGGTAGT-3'	Santos (2009)
<i>OsAMT1.1</i>	5'-GGTCATCTTCGGGTGGGTCA-3'	5'-CGTGCCGTGTCAGGTCCAT-3'	Duan et al., (2007)
<i>OsAMT1.2</i>	5'-GAAGCACATGCCGCAGACA-3'	5'-GACGCCCGACTTGAACAGC-3'	Duan et al., (2007)
<i>OsAMT1.3</i>	5'-GCGAACGCGACGGACTA-3'	5'-GACCTGTGGACCTGCTTG-3'	Duan et al., (2007)
<i>OsGSI;2</i>	5'-TGATGTGCGACTGCTACACG-3'	5'-TACCATGGCACCTCAGCAAC-3'	Zhao et al. (2006).
<i>OsNADHGOGAT1</i>	5'-GTGCAGCCTGTTGCAGCATAAA-3'	5'-CGGCATTTCACCATGCAAATC-3'	Zhao et al. (2006).
<i>OsGs2</i>	5'-GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA-3'	5'-GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA-3'	Zhao et al. (2006).
<i>eEF-1a</i>	5'-TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT 3'	5'-GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA-3'	Jain et al., (2006)
<i>OsActin11</i>	5'-CAGCCACACTGTCCCATCTA-3'	5'-AGCAAGGTCGAGACGAAGGA-3'	Jain et al., (2006)

A especificidade dos iniciadores foi analisada por alinhamento das sequências nos bancos de dados (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e experimentalmente ao fim da reação de PCR durante a “curva de melting” onde todos os iniciadores apresentaram especificidade para cada gene analisado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes de Segregação

As sementes das diferentes linhagens com as construções Ubil:OsDof25:3xHA e P_{OsDof25}:EGFP:GUS foram utilizadas para a realização de testes de segregação a fim de identificar possíveis homozigotas entre as plantas obtidas.

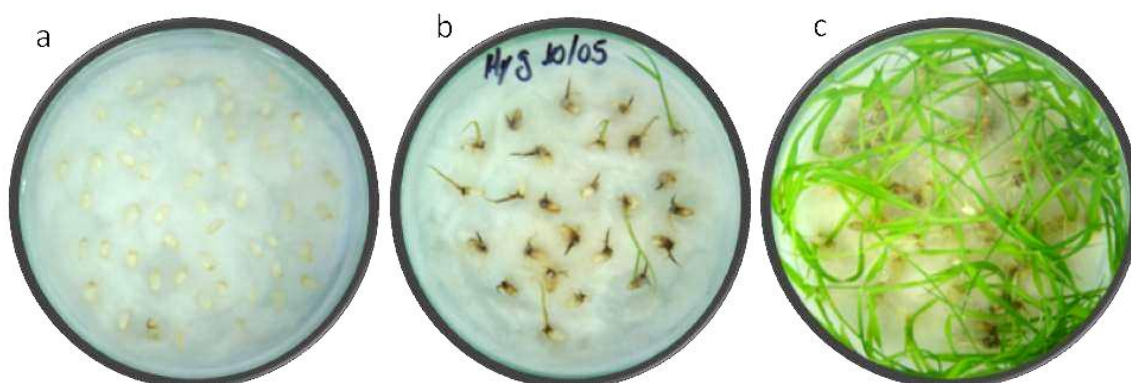


Figura 16. Sequência de germinação de plântulas de arroz em solução contendo antibiótico de seleção das linhagens transformadas. a) Sementes das linhagens transformadas em placa de *Petri* germinadas com algodão embebido em água destilada e Timetim (200 mg L^{-1}); b) Plântulas não transformadas com 14 DAG em placa de *Petri* contendo higromicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e c) Plântulas homozigotas para a construção gênica de interesse. Fotos do autor.

As sementes de cada linhagem foram previamente descascadas e desinfestadas com hipoclorito 2,5% e dispostas com aproximadamente 20 sementes por placa. Com cinco DAG, as plântulas foram transferidas para nova placa contendo Timetim (200 mg L^{-1}) e higromicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) para seleção apenas das plântulas transformadas. As plantas foram mantidas nessa condição durante 14 dias (Figura 16a). A partir daí procedeu-se a contagem das plantas vivas e plantas mortas. As plantas consideradas mortas apresentam, principalmente, necrose na região de emissão da parte aérea (Figura 16b).

Dentre as 10 linhagens obtidas transformadas com a construção Ubil:OsDof25:3xHA, as linhagens L#2, L#3, L#4 e L#6 foram desconsideradas por apresentarem problemas no seu desenvolvimento ou baixa produção de grãos. Sendo previamente selecionadas as linhagens L#5, L#7, L#8, L#9 e L#10.

Tabela 5. Segregação das linhagens superexpressando o fator de transcrição *OsDof25* na 2ª geração (UBIL:*OsDof25*:3xHA).

Linhagens T1	Linhagens T2	Vivas	Mortas	Segregação
L#5	L#5.1	23	0	0,00
	L#5.2	50	10	5,00
	L#5.3	21	9	2,33
L#7	L#7.22	47	10	4,70
	L#7.36	44	13	3,38
	L#7.37	35	11	3,18
	L#7.40	45	0	0,00
	L#7.41	48	0	0,00
L#8	L#8.4	38	0	0
	L#8.6	32	12	2,67
	L#8.20	33	0	0,00
L#9	L#9.1	33	0	0,00
	L#9.2	27	8	3,38
	L#9.3	11	6	1,83
	L#9.4	58	15	3,87
	L#9.6	35	0	0,00
	L#9.10	27	0	0,00
	L#9.12	23	9	2,56
L#10	L#10.1	25	8	3,13
	L#10.8	35	0	0,00

Durante a avaliação da segregação na geração T2, foram selecionadas apenas plantas que apresentaram 100% de sobrevivência, ou seja, em homozigose para a construção com o gene de interesse. Dentre elas foram selecionadas as linhagens L#1.1, L#5.1, L#7.40, L#7.41, L#8.4, L#8.20, L#9.1, L#9.6, L#9.10 e L#10.8 (Tabela 5).

As linhagens selecionadas foram cultivadas em casa de vegetação até a obtenção a terceira geração (T3), cujas sementes foram empregadas nas análises posteriores.

Para as plantas que receberam a construção para os estudos de localização a primeira geração de plantas transformadas com a construção *P_{OsDof25}:EGFP:GUS* foram multiplicadas em casa de vegetação, sendo utilizada a segunda geração para realização dos experimentos de localização. As três linhagens obtidas após o processo de transformação (L#1, L#3 e L#5) apresentaram uma baixa taxa de segregação na segunda geração o que pode indicar que estas plantas receberam mais de uma cópia do gene.

4.2 Caracterização Genética e Morfológica das Plantas Transformadas

Com a finalidade de verificar o nível de expressão do fator de transcrição *OsDof25* nas plantas transformadas, foram coletadas amostras de tecido da parte aérea das plantas cultivadas em casa de vegetação ao final do período vegetativo da geração T2. Considerando que o promotor da Ubiquitina1 de milho utilizado na construção gênica se caracteriza como um promotor forte e constitutivo, ou seja, possui alta afinidade de ligação dos fatores de Transcrição gerais a sequência promotora e direciona a expressão para todos os tecidos da planta durante os vários estádios de desenvolvimento.

As linhagens L#8 e L#5 apresentaram os maiores níveis de expressão do fator de transcrição *OsDof25*, com valores de 8 e 4 vezes superiores da planta tipo selvagem, respectivamente, as linhagens L#9, L#10 e L#7 apresentaram aumento de expressão de 4 a 2 vezes em comparação com o tipo selvagem (Figura 17).

Além dos níveis de expressão, foram considerados outros padrões morfológicos na seleção das linhagens. As linhagens L#5.1 e L#7.40 apresentaram desenvolvimento inferior à planta tipo selvagem, tanto para a massa da parte aérea quando para massa de raízes (Figura 18 e Figura 19).

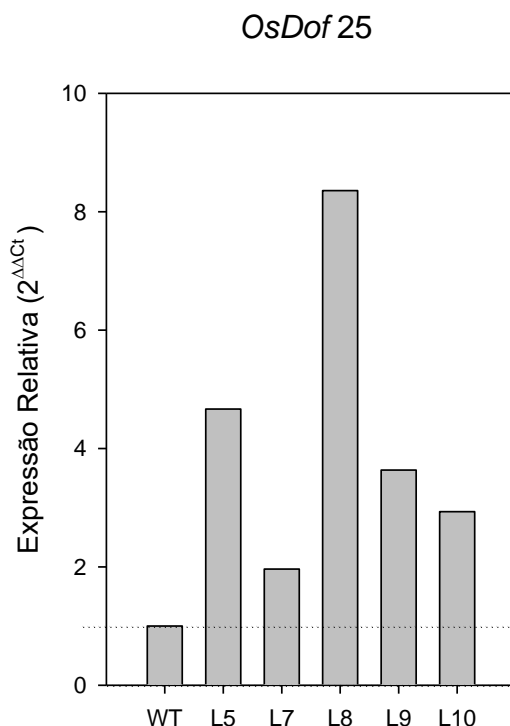


Figura 17. Expressão relativa do fator de transcrição *OsDof25* na parte aérea de plantas de arroz cultivadas em casa de vegetação da cv. Nipponbare transformadas (L#5.1, L#7.40, L#8.20, L#9.6 e L#10.8) geração T2 e não transformada (tipo selvagem, WT). O gene da *Actina* (*OsAct11-NM_197297*) foi utilizado como padrão interno nas reações de PCR.

Analisando o efeito do fator de transcrição *ZmDof1* em plantas de arroz, Kurai et al. (2011) não foram capazes de selecionar linhagens homocigotas nas gerações T₁ e T₂ devido à alta instabilidade nos níveis de expressão e à presença de indivíduos heterocigotos. Os autores ainda verificaram que apenas plantas com múltiplas inserções apresentavam altos níveis de expressão e que na maioria dos casos geravam linhagens de baixo rendimento produtivo. O que levou a seleção de linhagens que apresentavam nível de expressão mediano em comparação com as demais linhagens.

Avaliando a segregação entre plantas de arroz geneticamente modificadas e plantas de arroz vermelho, uma praga comum em regiões de cultivo de arroz, Serrat et al. (2013) verificaram que o cruzamento entre ambas as variedades suprimia as características fenotípicas que diferem o arroz vermelho da variedade geneticamente modificada. Dessa forma somente na segunda geração após o cruzamento foi possível observar as características do arroz vermelho, indicando que indivíduos heterocigotos podem apresentar uma supressão de algumas características.

Com base nestes resultados descritos na literatura, no presente trabalho buscou-se selecionar linhagens transgênicas homozigóticas de arroz de modo a garantir a estabilidade do transgene e sua expressão.



Figura 18. Comparação entre o sistema radicular de plantas de arroz tipo selvagem da cv. Nipponbare (WT) e linhagens transformadas (L#1.1, L#5.1, L#7.40, L#8.20, L#9.6 e L#10.8) transformadas com o gene *OsDof25*.

Neste trabalho, todas as linhagens transformadas apresentam um retardo na germinação, gerando um atraso de dois a três dias quando comparadas com as plantas WT. Como esse efeito esteve presente em todas as linhagens, foi considerado como uma característica da transformação com o gene *OsDof25* sob o controle do promotor *UBI1*, e/ou um efeito do marcador de seleção presente no cassete de expressão das linhagens transformadas.

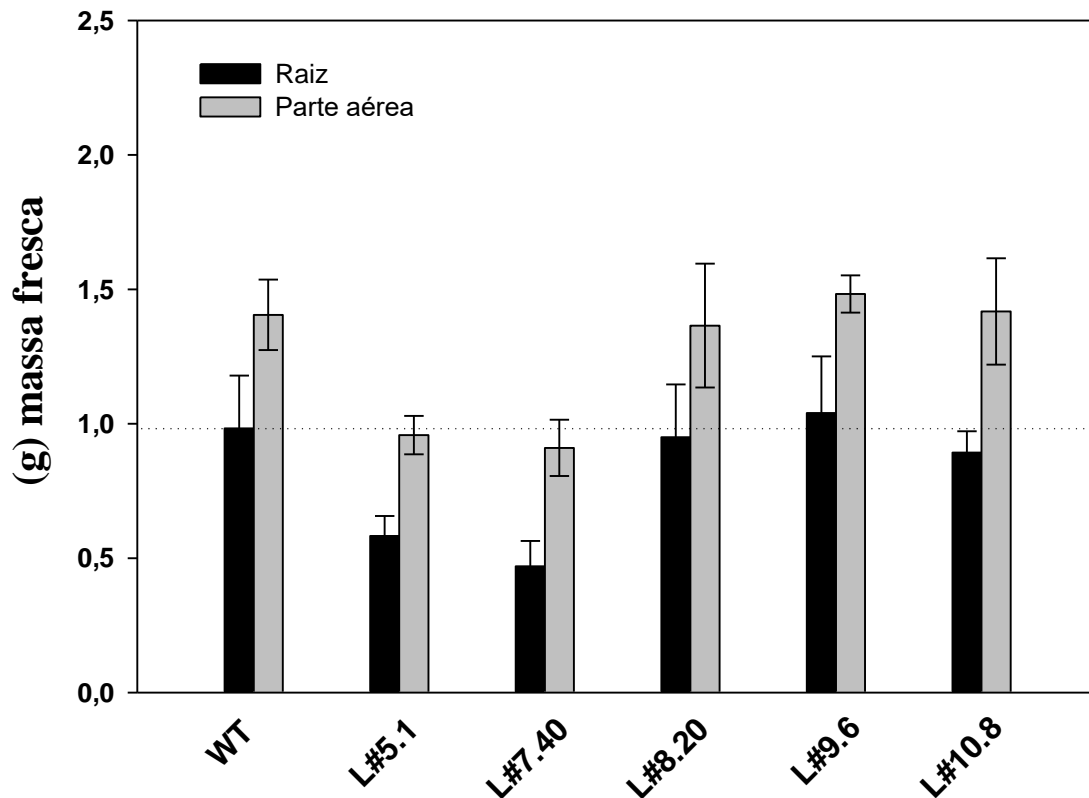


Figura 19. Comparação entre massa fresca de raiz e da parte aérea de plantas de arroz tipo selvagem da cv. Nipponbare (WT) e linhagens transformadas com o gene *OsDof25* cultivadas por 14 dias em solução nutritiva contendo 1mM de NH_4NO_3 . Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de quatro repetições.

Outra característica verificada entre as linhagens transformadas com o gene *OsDof25* foi que todas as linhagens apresentaram uma antecipação do período reprodutivo de sete a dez dias quando comparadas a tipo selvagem. Esse período de antecipação acompanhou o período de enchimento e maturação dos grãos. De forma geral, a L#1.1 teve o início do período reprodutivo aos 73 DAG, enquanto as demais linhagens iniciaram o período reprodutivo aos 76 DAG. Já as plantas tipo selvagem atingiram o período reprodutivo aos 83 DAG.

Todas as linhagens atingiram a maturação dos grãos aos 109 DAG, já as plantas tipo selvagem atingiram a maturação dos grãos aos 116 DAG.

4.3 Efeito Antagonista da Superexpressão do *OsDof25* Sobre o *OsDof26*.

O perfil antagonista de genes da família *Dof* tem sido demonstrado em diversos trabalhos, atuando diretamente em alterações no desenvolvimento das plantas e em diferentes fases do seu ciclo. Os genes da família *Dof* *DAG1* e *DAG2* foram identificados atuando no controle da germinação apresentando características antagônicas (Gualberti et al., 2002), assim como os genes *ZmDof1* e *ZmDof2* no controle de genes envolvidos no metabolismo de carbono (Yanagisawa, 2000).

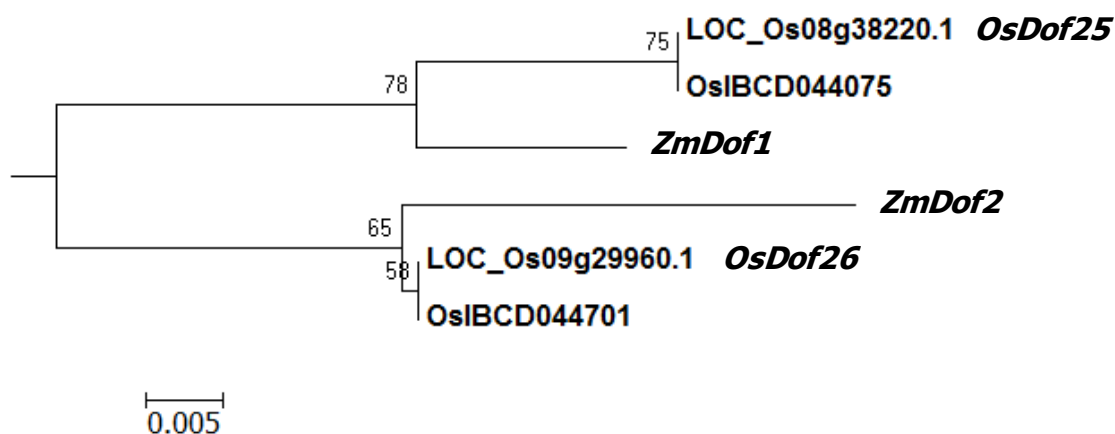


Figura 20. Árvore de similaridade filogenética do gene de arroz *OsDof25* (subsp. *japonica* (LOC_Os08g38220.1) e subsp. *indica* (OsIBCD044075) e *OsDof26* (subsp. *japonica* (LOC_Os09g29960.1) e subsp. *indica* (OsIBCD044701), respectivamente, comparadas com os genes de milho, *ZmDof1* e *ZmDof2*. A árvore foi construída utilizando a sequência conservada de 50 aminoácidos do domínio de ligação da proteína Dof utilizando o método *neighbor-joining* com análise de *bootstrapping* igual a 1000. Valores de *bootstraps* são indicados na árvore de similaridade quando superiores a 50%. Foram utilizadas as sequências de proteínas do site *Plant Transcription Factor database* (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>)

Os genes *ZmDof1* e *ZmDof2* foram identificados atuando de forma antagônica no controle das enzimas Fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), Piruvato ortofosfato diquinase (PPDK) e na piruvato quinase (PK), modificando a atividade da proteína repórter CAT (*Chloramphenicol Acetyltransferase*) em ensaios no sistema de co-transfecção utilizando diferentes plasmídios efetores em protoplastos de milho (Yanagisawa, 2000).

A identificação dos prováveis ortólogos dos fatores de transcrição de milho, *ZmDof1* e *ZmDof2*, em arroz foi proposta por Santos (2009). Quando foram comparadas as sequências das proteínas dos membros da família *Dof* em arroz com os genes descritos por Yanagisawa (2000). O gene *OsDof25* foi identificado como provável ortólogo do gene *ZmDof1* e o gene *OsDof26* do gene *ZmDof2* como pode ser verificado na Figura 20.

A expressão do gene *OsDof26*, provável par antagonista do gene *OsDof25*, foi verificada em raízes de arroz (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare) e nas linhagens transformadas L#9.6 e L#10.8. A transformação das plantas de arroz com a construção gênica UBIL:OsDof25:3xHA levou a uma repressão do gene *OsDof26* (Figura 21), indicando um comportamento semelhante ao perfil de expressão observado por Yanagisawa (2000) entre os genes *ZmDof1* e *ZmDof2*.

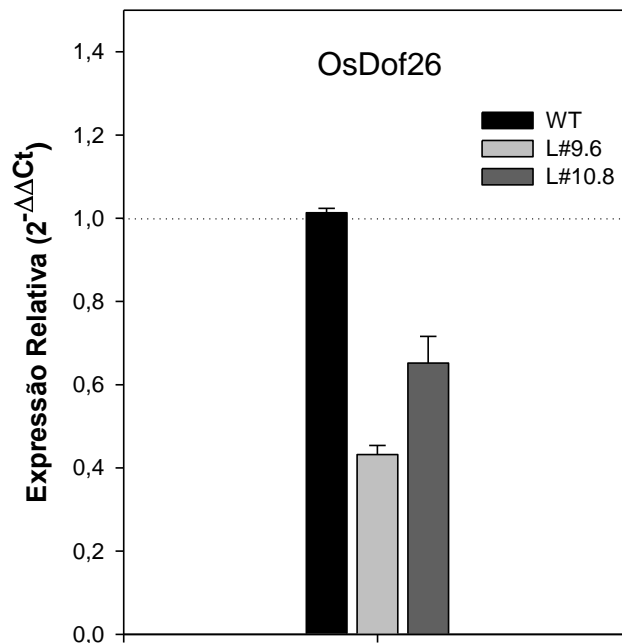


Figura 21. Efeito da superexpressão do gene *OsDof25* sobre a expressão do gene *OsDof26* em raízes de plantas de arroz (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare). Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de três repetições.

4.4 Padrão de Expressão do Gene *OsDof25* no Desenvolvimento de Plantas de Arroz.

Atualmente existem bancos de dados disponíveis para consulta de grandes bibliotecas genômicas, que fornecem um elevado número de informações sobre localização e níveis de expressão gênica em diversos organismos. Esses bancos de informações acumulam dados de diversos experimentos de expressão gênica em larga escala, fornecendo dados referentes a regiões anatômicas de expressão de genes, seu padrão de expressão durante o desenvolvimento do organismo, além de uma gama de experimentos realizados em diferentes situações. Utilizando a base de dados do Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/plant.jsp>), foi verificado o padrão de expressão do gene *OsDof25* em duas situações distintas.

Inicialmente foi verificado o padrão de expressão do gene *OsDof25* durante o desenvolvimento da planta de arroz, verificando em que fases do desenvolvimento da planta o gene apresenta maiores e menores níveis de expressão (Figura 22B). Com isso, foi possível observar um aumento progressivo durante a fase de germinação e desenvolvimento inicial das plântulas com uma redução acentuada até o início do período de perfilhamento. Durante o perfilhamento o níveis de expressão do gene *OsDof25* se encontram altos, atingindo o seu máximo durante o início da fase reprodutiva.

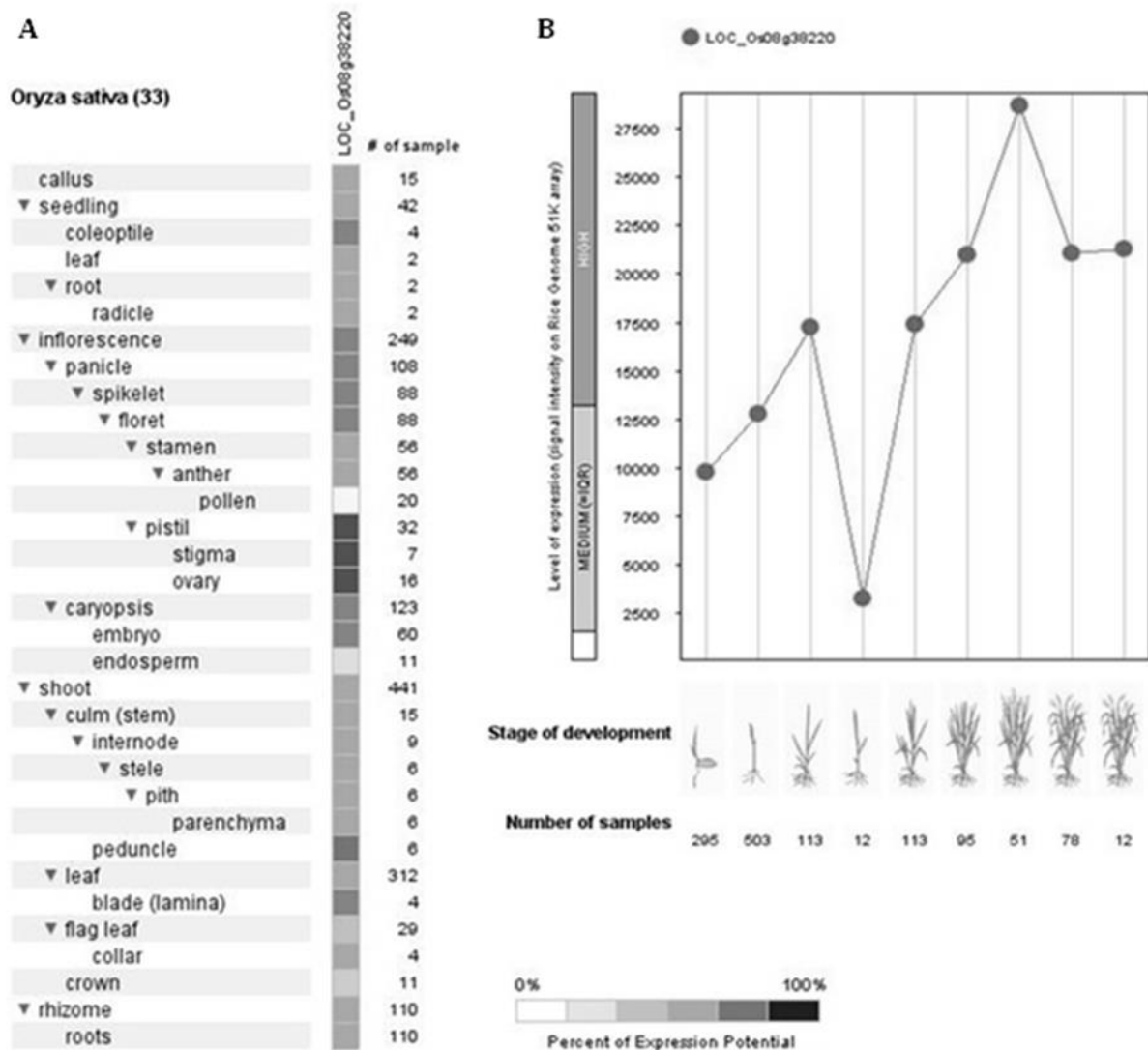


Figura 22. Padrão de expressão do gene *OsDof25* durante o desenvolvimento do arroz em diferentes tecidos (A) Classificação quanto ao nível de expressão do gene *OsDof25* em diferentes regiões anatômicas de plantas de arroz. (B) Gráfico representando os diferentes níveis de expressão do gene *OsDof25* (LOC_Os08g38220) durante o desenvolvimento de plantas de arroz. Fonte Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/plant.jsp>) banco de dados sobre desenvolvimento.

Outra estratégia adotada foi verificar os distintos níveis de expressão do gene *OsDof25* em regiões anatômicas distintas, indicando os órgãos onde o gene é expresso (Figura 22A).

4.5 Localização Tecido-Específica da Atuação da *OsDof25* em Arroz

Com o objetivo de identificar os locais de expressão do fator de transcrição *OsDof25*, sementes de arroz das linhagens transformadas L#3 e L#5 para a construção *P_{OsDof25}:EGFP:GUS* foram germinadas em placas de *Petri c* contendo água destilada, sendo coletadas durante

a fase de desenvolvimento inicial. Após a coleta essas plantas foram infiltradas em solução de coloração de GUS.

Após o período de incubação de três e seis horas, nota-se o aparecimento de um precipitado azul nos locais de expressão do gene, devido a atividade da enzima da enzima β -glucuronidase (GUS) nos tecidos sob o controle do promotor do *OsDof25*.

Foram identificados inicialmente uma forte atividade da enzima nas regiões do cotilédone, regiões próximas aos feixes vasculares na parte aérea e nas raízes principalmente na emissão de raízes laterais (Figura 23c).

Foi observado que tanto em raízes quando na parte aérea houve o aparecimento da cor de azul, principalmente na região de formação dos feixes vasculares (**Figura 23**). Para uma melhor percepção dos locais de expressão do fator de transcrição *OsDof25*, foram utilizadas cortes histológicos tanto de regiões das raízes quando da parte aérea para visualização em microscópio ótico no campo claro e no campo escuro excitando a proteína GFP (Figura 24).

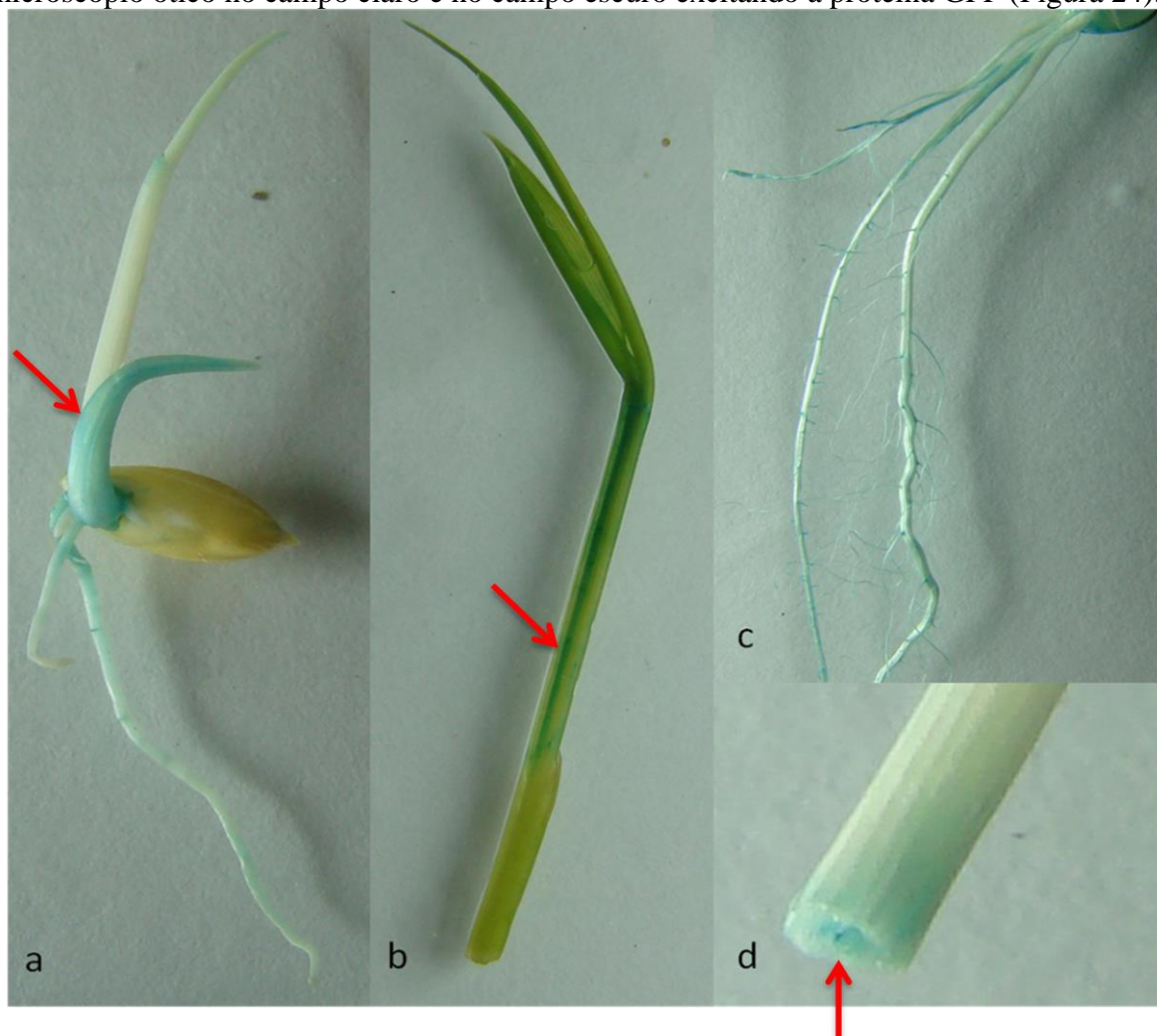


Figura 23. Localização da expressão do gene *OsDof25* em diferentes fases de desenvolvimento de plantas de arroz. a) Plântula de arroz com aproximadamente 4 DAG, indicando alto nível de expressão no cotilédone; b) Parte aérea de plântula de arroz com aproximadamente 7 DAG apresentando coloração azul na região dos feixes vasculares; c) Pontuações de cor azul nas regiões de emissão de raízes laterais e zonas de alongamento radicular e d) região da proto-bainha.

Observando os cortes transversais das folhas, verifica-se uma acentuada expressão do gene *OsDof25* na epiderme superior das folhas (ep), no mesófilo (mo) e na região do periciclo (pc) (Figura 24 C e D).

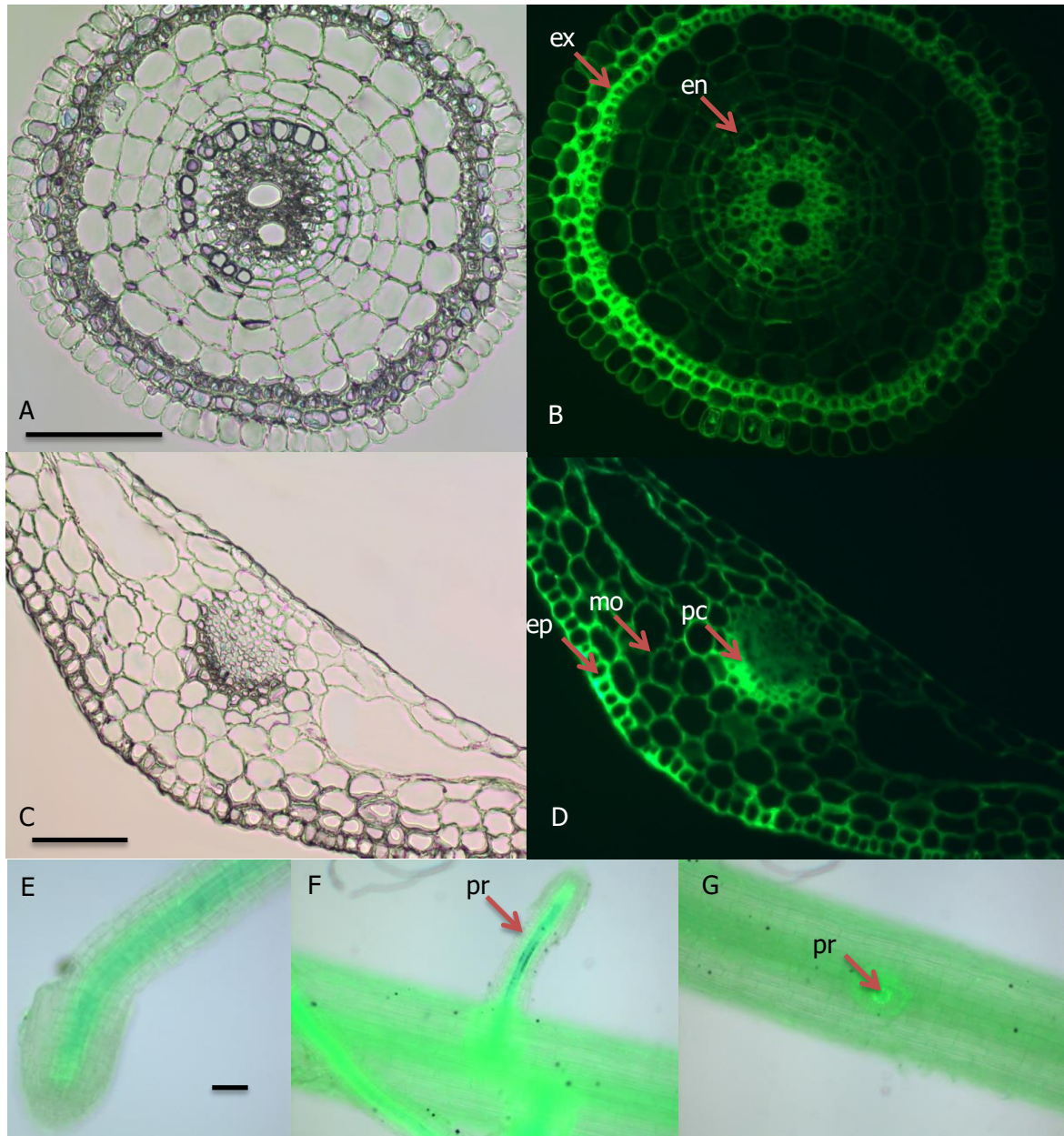


Figura 24. Cortes anatômicos de raízes e folha em plantas de arroz transformadas com a construção *P_{OsDof25}: EGFP:GUS*. (A-B) Corte transversal da raiz no campo claro (A), indicando a coloração azul devido à atividade da β -glucuronidase e campo escuro (B), excitando a proteína GFP nas regiões da exoderme (ex) e endoderme (en). (C-D) Corte transversal da folha no campo claro (C), indicando a coloração azul devido à atividade da β -glucuronidase e campo escuro (D), excitando a proteína GFP nas regiões da epiderme (ep), mesófilo foliar (mo) e periciclo (pc). Imagens capturadas em microscópio ótico. (E) Região do primórdio radicular e (F-G) indicando a expressão do gene na emissão de pelos radiculares (pr). Barras horizontais referente a medida de 100 μ m.

Nas raízes, verifica-se uma forte expressão do gene *OsDof25* nas regiões da exoderme (ex) e da endoderme (en) (Figura 24F), regiões conhecidas por forte atuação dos transportadores de amônio e ação das enzimas de assimilação OsGS1;2 e NADH-GOGAT1 (Tabuchi et al., 2007). Outra região de expressão é a dos feixes vasculares, identificadas por Kichey et al., (2005) em plantas de trigo, como região de acúmulo da proteína NADH-GOGAT.

4.6 Efeito da Superexpressão do Gene *OsDof25* na Expressão dos Transportadores de Amônio e no Metabolismo de N.

Devido à especialização das células das raízes em absorver nutrientes e sua integração em corresponder à demanda metabólica de todo o organismo, a coordenação entre o transporte de nutrientes pelas raízes e os fotoassimilados produzidos pela fotossíntese na parte aérea é a principal característica de integração na absorção de nutrientes (Lejay et al., 2003).

Devido às várias etapas do seu desenvolvimento e às alterações ambientais, contribuindo para um fluxo sazonal de N, as plantas desenvolveram um sistema sofisticado e complexo de percepção que se coordena para regular a assimilação, metabolismo e transporte. Esse sofisticado controle possui diversos níveis de regulação, incluindo controle pós-transcricional por micro-RNA e pós-traducional (Gutiérrez et al., 2007; Vidal et al., 2010). Já foi provado o controle coordenado dos níveis de C e N celular alterando a expressão de genes envolvidos em diversos processos como fotossíntese, respiração e assimilação de N (Stitt e Krapp, 1999, Gutiérrez et al., 2007).

Yanagisawa et al (2004) analisando plantas de *A. thaliana* superexpressando o fator de transcrição *ZmDof1*, apontaram aumento na quantidades de enzimas envolvidas na produção de esqueletos de carbono e um aumento acentuado no teor de aminoácidos, principalmente glutamina. Isto promoveu aumento na EUN das plantas quando cultivadas em condições limitantes de N (Yanagisawa et al., 2004). Santos et al. (2012) verificaram que o fornecimento de N afetou positivamente a expressão do gene *OsDof25* nas raízes de plantas de *A. thaliana* transformadas, o que indica uma provável correlação da expressão do gene *OsDof25* com os níveis internos de C e N.

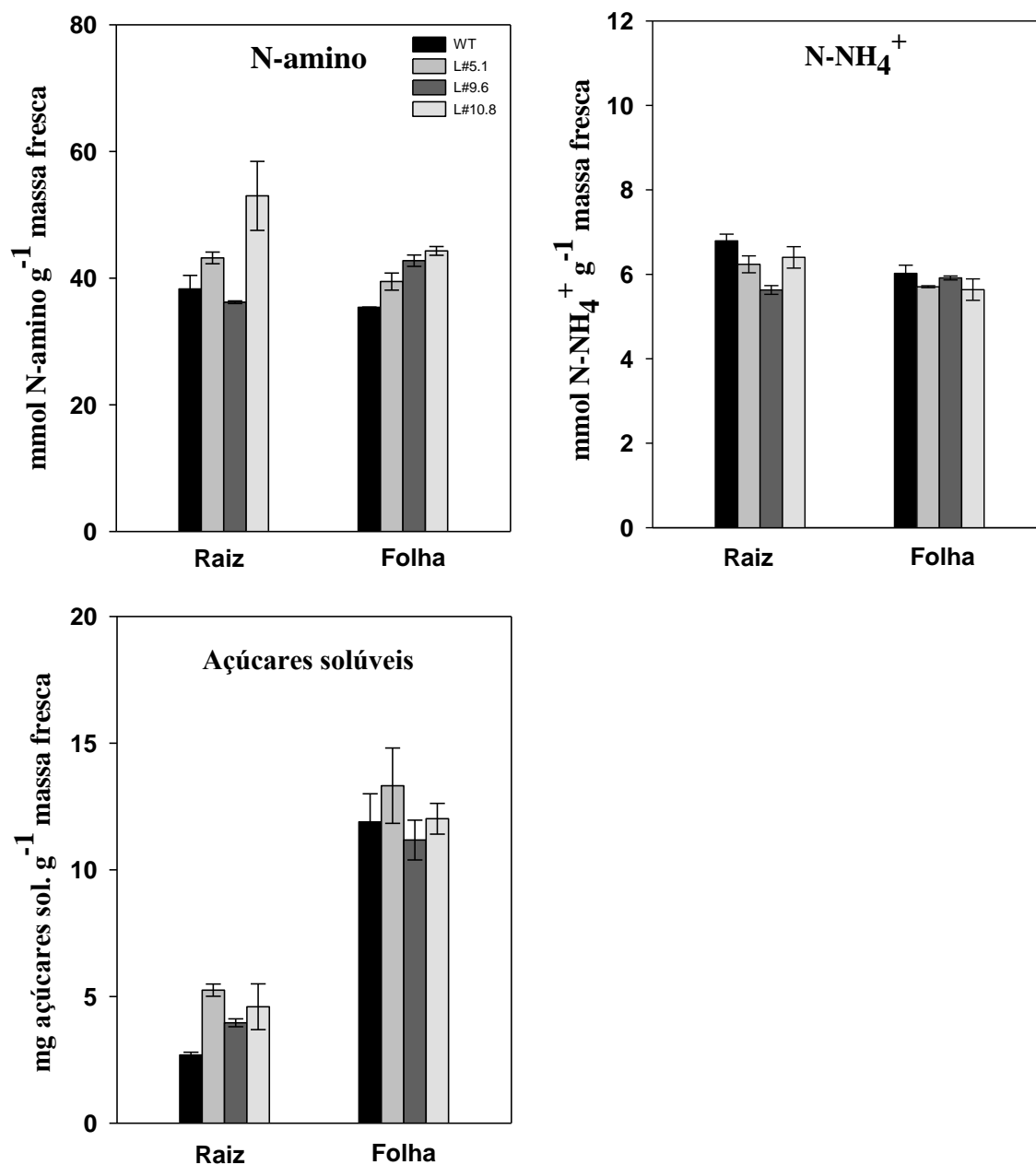


Figura 25. Teores de N-NH₄⁺ em folha e raiz de plantas de arroz (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare) tipo selvagem (WT) e linhagens superexpressando o fator de transcrição *OsDof25* linhagens L#5.1, L#9.6 e L#10.8 submetidas a tratamento constante com 2,0 mM de N-NH₄⁺. Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de três repetições.

Os teores de N-NH₄⁺ nos tecidos de raízes apresentaram uma pequena redução nas linhagens transformadas quando comparadas a tipo selvagem. O que indica que o gene *OsDof25* não interfere diretamente na permeabilidade do amônio nas membranas de raízes de arroz. Da mesma forma, Silva (2012) comparando duas linhagens de arroz superexpressando o gene *OsDof25*, verificou que não houve diferença de influxo de amônio nas raízes após o ressurgimento com 2,0 mM de NH₄⁺, além de repressão do transportador *OsAMT1;2*, que é induzido ao ressurgimento de amônio, quando comparado com plantas WT.

Os teores de N-amino foram superiores nas linhagens transformadas quando comparadas com a planta tipo selvagem, tanto nas raízes quanto nas folhas (**Figura 25**), indicando uma maior taxa de assimilação de nitrogênio pelas plantas transformadas. Resultados também encontrados por Santos et al. (2012) em plantas de *A. thaliana* superexpressando o gene *OsDof25* e por Yanagisawa et al. (2004) com o gene *ZmDof1*. Indicando uma possível ortologia entre os genes de arroz e milho citados.

Plantas cultivadas com alto suprimento de nitrogênio amoniacal tendem a apresentar uma forte redução nos teores de açúcares solúveis, visto que a assimilação do amônio na formação de aminoácidos se dá pela incorporação desse íon em esqueletos de carbono, proporcionando forte correlação negativa entre esses metabólitos (Souza e Fernandes, 2006) levando a um aumento na relação de N na forma de amidas em relação a N na forma de aminoácidos, entretanto não houve diferença entre as linhagens transformadas e não transformadas.

Os teores de açúcares solúveis foram muito superiores nas raízes das linhagens transformadas, chegando a duas vezes os teores encontrados em plantas tipo selvagem (**Figura 25**). Isto está associado aos maiores teores de N na forma de aminoácidos encontrado nas folhas, isto indicam uma maior coordenação das enzimas do metabolismo de carbono, fornecendo um maior aporte de esqueletos de carbono para as raízes, aumentando a assimilação de amônio.

Durante a condução do experimento esquematizado na Figura 15 foram mensurados a massa fresca das raízes, colmo e folhas, além de determinado a relação entre massa fresca de raiz e massa fresca da parte aérea (**Tabela 6**).

Tabela 6. Massa fresca (g planta⁻¹) e razão raiz: parte aérea (R/PA) de plantas de arroz da cv. Nipponbare superexpressando o fator de transcrição *OsDof25* nas linhagens L#5.1, L#9.6 e L#10.8 e planta do tipo selvagem (WT) cultivadas com NH₄⁺ seguindo o esquema experimental do item 3.10. Letras maiúsculas diferem entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Letras minúsculas diferem entre as linhagens pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tratamento	WT	L#5.1	L#9.6	L#10.8
	Massa fresca Raiz (g. planta ⁻¹)			
2,0 mM Const	1,583 Aa	1,580 Aa	1,277 Ab	1,330 Ab
0 mM Def.	2,050 Ba	1,640 Ab	1,645 Bb	2,060 Ba
Tratamento	WT	L#5.1	L#9.6	L#10.8
	Massa fresca Colmo (g. planta ⁻¹)			
2,0 mM Const	2,747 Aa	2,427 Ab	2,347 Ab	2,283 Ab
0 mM Def.	2,400 Ba	2,067 Bb	1,925 Bb	2,067 Bb
Tratamento	WT	L#5.1	L#9.6	L#10.8
	Massa fresca Folha (g. planta ⁻¹)			
2,0 mM Const	1,600 Aa	1,440 Ab	1,217 Ab	1,287 Ab
0 mM Def.	1,410 Ba	1,113 Bb	1,030 Bb	1,053 Bb
Tratamento	WT	L#5.1	L#9.6	L#10.8
	Razão raiz: parte aérea (R/PA)			
2,0 mM Const	0,364 Aa	0,409 Aa	0,358 Aa	0,373 Aa
0 mM Def.	0,538 Ba	0,516 Ba	0,557 Ba	0,660 Ba

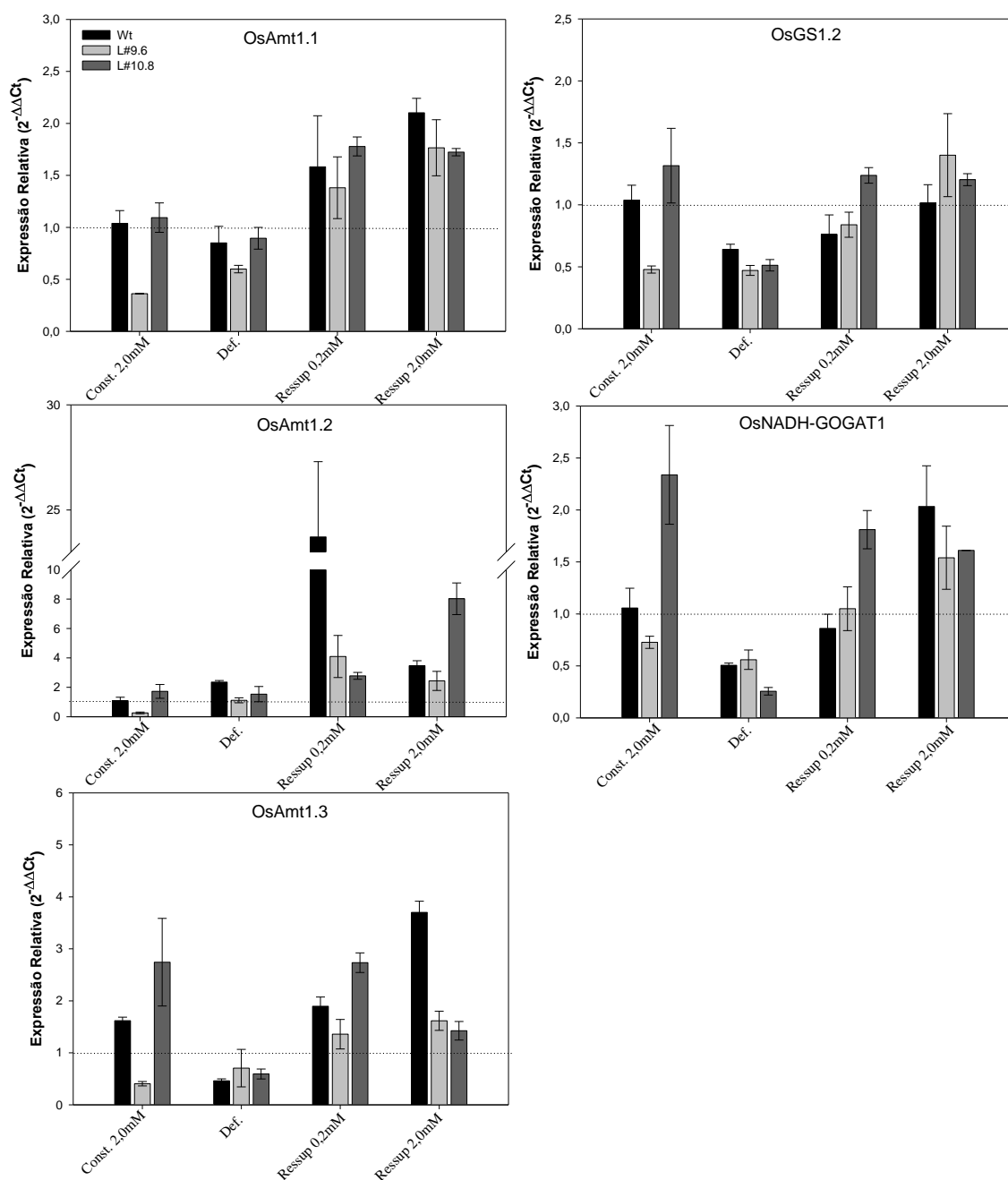


Figura 26. Expressão relativa dos transportadores de amônio *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* e das enzimas de assimilação de nitrogênio *OsGS1.2* e *OsNADH-GOGAT1* em raízes de plantas de arroz tipo selvagem cv. Nipponbare (WT) e linhagens transformadas L#9.6 e L#10.8 com o gene *OsDof25* submetidas a diferentes tratamentos: suprimento constante de 2,0 mM de NH_4^+ , deficiência de N por 74 horas e ressuprimento com 0,2 e 2,0 mM de NH_4^+ por 2 horas. Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de três repetições.

A expressão do transportador de NH_4^+ de alta afinidade (AMT1) é sensível a concentrações muito baixas de amônio, tendo forte indução em concentrações entre 0,2 e 0,3 mM de nitrogênio na forma amoniacal (Sonoda et al., 2003b) tendo sua máxima indução as

duas horas após tratamento. De acordo com Kumar et al. (2003) os três transportadores de alta afinidade de NH_4^+ em arroz respondem de forma acentuada quando as plantas são cultivadas em concentrações de 10 μM de N-NH_4^+ , reduzindo os níveis de expressão quando transferidas para uma solução de 10mM de N-NH_4^+ .

O transportador *OsAMT1;1* foi caracterizado com o padrão constitutivo de expressão em variedades de arroz (Sonoda et al., 2003a) além de ser o transportador que mais contribui para a absorção de NH_4^+ , entretanto, nas condições experimentais foi possível verificar diferenças de expressão entre as plantas e os tratamentos. No tratamento de deficiência de N, as plantas apresentaram uma pequena repressão quando comparadas com o tratamento constante. Já nos tratamentos de ressuprimento com 0,2 mM e 2,0 mM de NH_4^+ foi possível verificar indução de até duas vezes, tanto para as linhagens quando para as plantas WT.

O transportador *OsAMT1;2* foi caracterizado por Tabuchi et al (2007) atuando coordenadamente com o transportador *OsAMT1;1* no processo de absorção de NH_4^+ pelas raízes de arroz sendo induzido quando a concentração de NH_4^+ no meio externo encontra-se elevada e atuando como transportador, célula a célula. O aumento da expressão gênica do *OsAMT1;2* ocorre aos 30 minutos após o fornecimento de NH_4^+ , sendo essa expressão observada em tipos específicos de células como nas pontas das raízes, exoderme, esclerênquima, endoderme e periciclo (Sonoda et al., 2003a).

O transportador *OsAMT1;2* responde positivamente ao ressuprimento de NH_4^+ ; no entanto, em elevadas doses, apresentam uma repressão de transcritos (Sonoda et al., 2003a; Kumar et al. 2003; Sperandio et al., 2011).

As linhagens transformadas apresentaram um aumento de expressão modesto para o transportador *OsAMT1;2* quando comparadas com a variedade WT, o que pode estar ligado a uma menor alteração nos teores de aminoácidos após o ressuprimento, que nas linhagens L#9.6 e L#10.8 sofreriam menores oscilações. Mantendo níveis de expressão semelhantes ao tratamento controle.

Comparando plantas de arroz quanto ao comportamento dos transportadores de amônio sob diferentes tratamentos, Sperandio et al. (2011) verificaram uma forte repressão dos transportadores de amônio quando plantas que ficaram sob a privação de N por 72 horas foram transferidas para solução nutritiva contendo 2,0 mM de NH_4^+ , indicando controle transcricional dos transportadores *OsAMT1* no influxo de NH_4^+ das plantas através da repressão desses transportadores quando submetidas a doses elevadas de NH_4^+ . Entretanto essas mesmas plantas apresentaram alta indução dos transportadores quando mantidas sob deficiência de N.

Nas raízes, o transportador *OsAMT1;1* desempenha um importante papel na absorção de NH_4^+ na endoderme e exoderme onde a via apoplástica é bloqueada pelas estrias de Caspary (Ranathunge et al., 2003). Quando a via apoplástica é bloqueada, o NH_4^+ para ser absorvido tem que atravessar essa barreira, unicamente, através da via simplástica para atingir o xilema da raiz. Por outro lado, a proteína *OsAMT1;2*, um outro membro da família *OsAMT1*, localiza-se preferencialmente no córtex radicular (Sonoda et al., 2003). Isto sugere que esta proteína desempenha um papel no transporte de NH_4^+ do córtex para o sistema vascular do cilindro central das raízes proporcionando seu transporte pelo xilema (Tabuchi et al., 2007).

O aumento da expressão do transportador *OsAMT1;1* em plantas de arroz superexpressando esse gene, levou a um aumento nas concentrações de NH_4^+ tanto nas raízes quanto nas folhas, levando as plantas transformadas a uma estratégia de aumentar a expressão dos genes envolvidos na via de assimilação de NH_4^+ (Ranathunge et al., 2014). Resultados semelhantes foram observados pelas linhagens transformadas com o gene *OsDof25*, sendo observada não só um aumento na assimilação de amônio em raízes, mas também, na parte

aérea. Indicando uma coordenação no aumento da expressão do gene *OsAMT1;1* e a enzima de assimilação GS para os tratamentos de ressuprimento com 0,2 e 2,0 mM de NH_4^+ como visto pela linhagens L#9,6.

A expressão das enzimas de assimilação *OsGS1;2* e *OsNADH-GOGAT1* indicam um perfil semelhante aos observados pelos transportadores de amônio, para os deferentes tratamentos e linhagens (**Figura 26**). A expressão desses genes também é induzida pelo fornecimento de amônio, atuando de forma coordenada no processo de absorção e assimilação.

Plantas de arroz possuem três isoformas de GS1, dentre essas a *OsGS1;1* é expressa em todos os órgãos da planta, ou seja, de raiz, lâmina foliar, bainha, e espiguetas, com maior expressão no limbo durante a fase vegetativa de crescimento das plantas (Tabuchi et al., 2005) atuando principalmente durante a fase de senescência na recuperação do amônio produzido na degradação de compostos. A isoforma *OsGS1;2* teve transcritos também detectados em todos os órgãos, com maior expressão na raiz seguindo do fornecimento de NH_4^+ durante o início do período vegetativo, enquanto *OsGS1;3* foi especificamente expresso na espiguetas (Tabuchi et al., 2007). Além disso, Ishiyama et al., (2004) verificaram que os genes *OsGS1;1* e *OsGS1;2* apresentaram expressão recíprocas ao fornecimento de NH_4^+ raízes.

Diferentemente do que ocorre quando há fornecimento nitrato, quando a fonte de nitrogênio é a amoniacal a maior parte do NH_4^+ e absorvido pelas raízes é assimilado rapidamente por ação das enzimas do ciclo GS/GOGAT (Funayama et al., 2013). Dessa forma o nitrogênio absorvido é transportado para a parte aérea na forma de aminoácidos e amidas, o que leva a uma menor influência dos transportadores de amônio na parte aérea.

O transportador *OsAMT1;1* apresentou pouca alteração no tratamento constante em comparação entre as linhagens, entretanto nos tratamentos onde houve o período de deficiência houve um aumento de expressão. A expressão de alguns genes da família AMT podem aumentar rapidamente no início do período de deficiência de N, enquanto outros podem aumentar só após uma deficiência muito prolongada (Loqué & Von Wirén., 2004).

Em estudos com *Arabidopsis*, Lejay et al. (1999) identificou que dois genes que codificam para os transportadores de nitrato, *AtNRT1.1* e *AtNRT2.1*, e que apresentaram regulação na presença de luz, aumentando o número de transcritos durante o dia, seguido de uma redução durante o período noturno. O Fornecimento de sacarose durante o início do período noturno evitou a redução dos transcritos para esses transportadores, contribuindo para um aumento no influxo de nitrato. Indicando que o suprimento de açúcares pode afetar a resposta a fotossíntese sobre a expressão dos transportadores de nitrato. Resultados semelhantes foram encontrados por Lejay et al. (2003) para os genes que codificam os transportadores de amônio de *Arabidopsis* *AtAMT1.1*, *AtAMT1.2* e *AtAMT1.3*, além de transportadores de alta afinidade de SO_4^{2-} *AtHst1*, de fosfato *AtPT1* e *AtPT2* e de potássio *AtKup2*.

Muito autores relatam um controle coordenado do metabolismo de nitrogênio e de carbono, onde o aumento do suprimento de carbono para as raízes promove uma maior absorção e assimilação de nutrientes (Lejay et al., 1999; Lejay et al., 2003; Coruzzi & Bush, 2001).

A localização de uma Pirofosfatase tipo 1, da família da AVP1 (*Arabidopsis Vacuolar Pyrophosphatase 1*) localizada na plasmalema, foi caracterizada atuando no complexo formado pelas células companheiras e células do elemento de seiva no floema em folhas de *Arabidopsis*. (Paez-Valencia et al., 2011) sendo associada com fenótipos de plantas com elevado desenvolvimento e alta atividade fotossintética (Gaxiola et al., 2001; Yang et al., 2007). A maior atividade fotossintética resultou num maior fornecimento de fotoassimilados

para o sistema radicular, o que promoveu um aumento da absorção de nitrogênio e maior EUN.

Comparando plantas superexpressando o fator de transcrição *OsDof25* e plantas tipo selvagem de arroz, Silva (2012) observou um aumento de duas vezes na expressão dos transportadores *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e da proteína *OsNAR2.1*, quando ressupridas com 0,2 mM de NO_3^- . Esse fato pode estar associado às maiores concentração de açúcares solúveis presente nas raízes das plantas transformadas (duas vezes maior). Dessa forma o fator de transcrição *OsDof25* atuaria no maior fornecimento de fotoassimilados para as raízes, promovendo a expressão de transportadores e o influxo do nutriente.

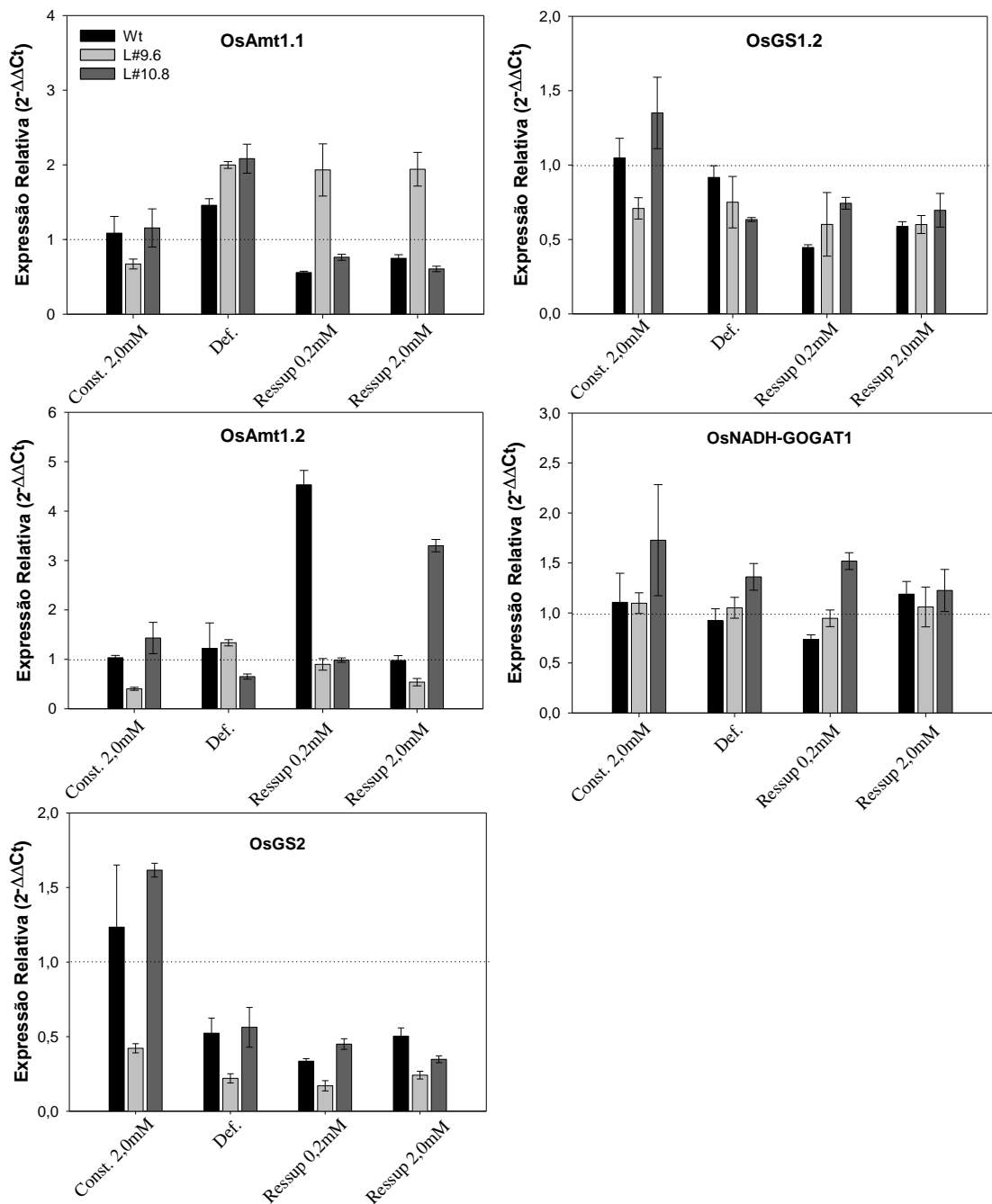


Figura 27. Expressão relativa dos transportadores de amônio *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2* e das enzimas de assimilação de nitrogênio *OsGS1.2*, *OsGS2* e *OsNADH-GOGAT1* em folhas de plantas de arroz tipo selvagem cv. Nipponbare (WT) e linhagens transformadas L#9.6 e L#10.8 com o gene *OsDof25* submetidas a diferentes tratamentos: suprimento constante de 2,0 mM de NH_4^+ , deficiência de N por 74 horas e ressuprimento com 0,2 e 2,0 mM de NH_4^+ por 2 horas. Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de três repetições.

A isoforma *GSI;2* é o mais expressa em folhas, contudo, a sua expressão no sistema radicular é fortemente induzida pelo suprimento de amônio. Verificando os locais de expressão do gene *OsGS1;2*, Lothier et al. (2011) identificou que o promotor do gene *OsGS1;2* dirige a expressão para pequenos feixes vasculares em folhar de arabis e em

menor intensidade para o parênquima de folhas maduras. Interferindo no acúmulo de biomassa de plantas submetidas a alto fornecimento de nitrogênio.

Os maiores níveis de expressão do gene *OsGS1;2* foram observados no tratamento constante 2,0 mM de NH_4^+ , sendo reprimida nos tratamentos de deficiência, isso se deve pelo fato do pico de expressão, ocorrer tardiamente em relação os transportadores de amônio ocorrendo entre três e quatro horas após o fornecimento de N (Tabuchi et al., 2005).

4.7 Efeito da Superexpressão do Gene *OsDof25* na Atividade de Enzimas do Metabolismo de N e Carbono.

Organismos fotossintéticos são os principais conversores da energia solar em moléculas orgânicas, sustentando a vida na Terra. Apesar de sua importância, pouco se sabe sobre a capacidade das plantas em perceber e adaptarem-se as alterações de dia e noite, ou como elas se adaptam a estresses ambientais que comprometem a fotossíntese e a produção de energia (Baena-González et al., 2007).

Plantas possuem sistemas distintos de sinalização de carbono e nitrogênio, aparentemente controlados por diversos metabolitos como glicose, sacarose, NO_3^- , NH_4^+ , 2-oxoglutarato, glutamina e glutamato (Foyer et al., 2006).

Entre as três isoformas da glutamina sintetase citosólica (*OsGS1;1*, *OsGS1;2* e *OsGS1;3*) em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.), o gene da *OsGS1;2* é conhecido por ser expresso principalmente em células da superfície das raízes, tendo um aumento rápido, mas transitório, ao fornecimento de NH_4^+ , entretanto uma menor expressão desse gene foi observada em outros órgãos (Tabuchi et al. 2007).

Cultivadas sobre o suprimento constante de 2,0 mM de NH_4^+ , as plantas de arroz transformadas com o gene *OsDof25* apresentaram maior atividade da enzima GS, principal enzima de assimilação do metabolismo de nitrogênio, tanto nas raízes quanto na parte aérea (**Figura 28**), o que contribuiu para os maiores teores de N-amino totais encontrados nas folhas. Curiosamente os teores de açúcares solúveis nas raízes foram maiores entre as linhagens transformadas, diferentemente do que ocorre com o alto suprimento de amônio, onde a necessidade de rápida assimilação leva ao maior consumo de esqueletos de carbono pela assimilação no ciclo da GS/GOGAT. O que indica uma maior atividade das enzimas do metabolismo de carbono no fornecimento de esqueletos de carbono, principalmente 2-OG para a manutenção da assimilação. Sendo sugerido por alguns autores as enzimas isocitrato desidrogenase NAD^+ dependente como um candidato para gerar 2-OG para esta reação (Abiko et al., 2005) e ainda a isocitrato desidrogenase NADPH dependente (Santos et al., 2012).

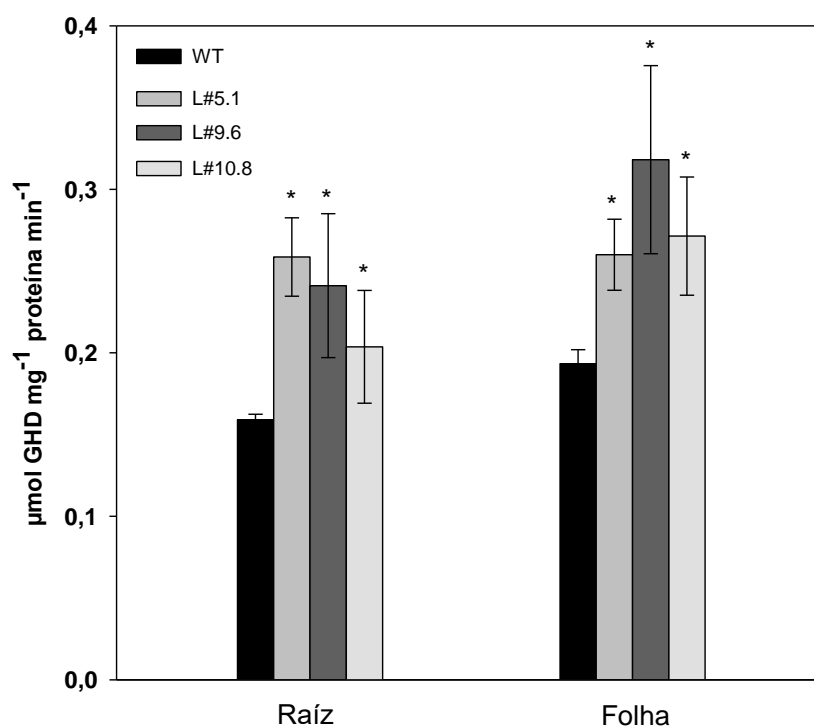


Figura 28. Atividade da enzima Glutamina sintetase (GS) em plantas de arroz tipo selvagem cv. Nipponbare (WT) e nas linhagens transformadas L#5.1, L#9.6 e L#10.8 superexpressando o fator de transcrição *OsDof25* cultivadas com 2,0mM de NH_4^+ constante. Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de três repetições. Tratamentos identificados com asterisco (*) diferem entre as linhagens pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Outros fatores de transcrição já foram identificados com reguladores da GS. Avaliando a influência do gene *PpDof5*, sobre a expressão das isoformas de GS1, GS1a e GS1b de pinus, Rueda-López et al. (2008) verificou um perfil antagonista na regulação da expressão das isoformas de GS1. Identificando o gene *PpDof5* como um repressor da isoforma GS1a e um promotor da isoforma GS1b. Esses resultados fornecem uma nova ideia de como um componente transcricional pode controlar a distribuição espacial de isoformas diferentes atuando no processo de assimilação de amônio (Rueda-López et al., 2008).

Em plantas de *A. thaliana*, expressão do gene *ZmDof1* induziu um aumento notável do teor de glutamina, o que provocou um aumento do teor de aminoácidos livres (Yanagisawa et al., 2004). Resultados semelhantes aos encontrados por Santos et al (2012), que verificou aumento no teor do aminoácidos livres, aumento na expressão das isoformas *AtGS1;1* e *AtGS1;3* além de maior atividade de GS nos folhas de arabidopsis cultivadas alto suprimento de N. Gerando um fenótipo de clorose quando crescidas em meio MS. Contudo quando essas mesmas plantas foram cultivadas em subtrato pobre em nitrogênio apresentaram maior acúmulo de massa.

O amônio absorvidos pelas raízes é assimilado pela enzima GS produzindo glutamina a partir da incorporação do NH_4^+ absorvido a molécula de glutamato. Dessa forma para fornecer glutamato para a reação da GS1, é necessário a ação conjunta da enzima GOGAT. Além do gene *NADH-GOGAT1* do arroz, Outro gene, *OsNADH-GOGAT2*, foi identificado. O gene *OsNADH-GOGAT2* foi expresso, principalmente, na lâmina de folhas maduras e bainha. Enquanto o gene *NADH-GOGAT1* foi identificado sendo expresso em raízes (Ishiyama et al., 2003) e em órgãos em desenvolvimento (Hayakawa et al., 1994). Nas

raízes, a proteína NADH-GOGAT1 foi detectada em platídeos (Hayakawa et al., 1999) e na epiderme e exoderme de células de raiz após o fornecimento de NH_4^+ (Ishiyama et al., 2003).

Dessa forma os genes da família de transportadores *OsAMT1* e as enzimas de assimilação *OsGS1;2*, e *OsNADH-GOGAT1* apresentam rápido e sequencial aumento de expressão após o fornecimento de NH_4^+ nas duas camadas de células da superfície da raiz, epiderme e exoderme. Isto ocorre porque a estria de caspary está localizada entre essas camadas de células e o córtex radicular (Morita et al., 1996), sendo esse provavelmente a principal região de assimilação de NH_4^+ (Tabuchi et al., 2007). Este fato está totalmente de acordo com o perfil apresentado por esses genes em todos os tratamentos. É possível verificar uma total coordenação entre a expressão dos transportadores *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*; e as enzimas de assimilação *OsGS1;2* e *OsNADH-GOGAT1*.

Observando o local da expressão do gene *OsDof25* em plantas transformadas com a construção gênica *P_{OsDof25}:EGFP:GUS*, por meio do gene repórter da EGFP em cortes do sistema de radicular (**Figura 24F**), foi verificado que o gene *OsDof25* se expressa justamente nessa região anatômica, formando uma conexão direta entre os genes das enzimas de assimilação e a expressão do *OsDof25*.

Quando ocorre uma deficiência na assimilação, principalmente, em situação de fornecimento de NH_4^+ em elevadas concentrações ou quando do acúmulo de NH_4^+ proveniente de outras reações, *OsGS1;1* associado a *OsFd-GOGAT* pode ser responsável pela assimilação de NH_4^+ em outros tecidos (Ishiyama et al., 2003) como ocorre na região dos feixes vasculares, outro local de expressão do gene *OsDof25* (**Figura 24 F**).

A atividade da Glutamato Sintase (NADH-GOGAT) foi superior nas raízes das linhagens transformadas em comparação a WT (**Figura 29**), indicando uma coordenação entre as atividades das enzimas de assimilação de N do ciclo GS/GOGAT. Entretanto não foi possível verificar atividade da enzima NADH-GOGAT nas folhas (dados não apresentados), isso ocorre porque a isoforma de GOGAT predominante em tecidos fotossinteticamente ativos é a Fd-GOGAT.

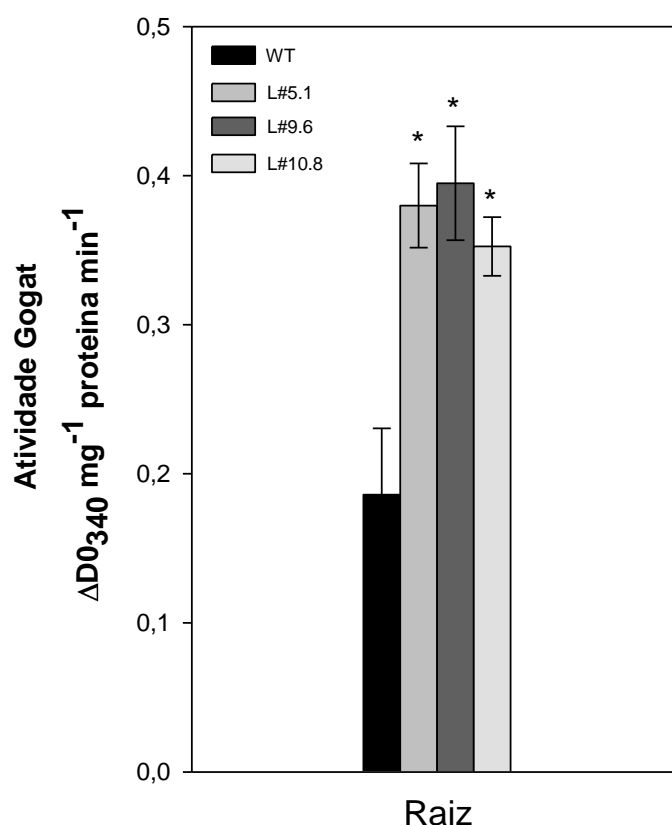


Figura 29. Atividade da enzima glutamato sintase NADH⁻ dependente (NADH-GOGAT) em raízes de plantas de arroz tipo selvagem cv. Nipponbare (WT) e nas linhagens transformadas L#5.1, L#9.6 e L#10.8 superexpressando o fator de transcrição *OsDof25* cultivadas com suprimento constante de 2,0 mM de NH₄⁺. Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de três repetições. Tratamentos identificados com asterisco (*) diferem entre as linhagens pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Folhas de arroz possuem tanto NADH-GOGAT quanto Fd-GOGAT. Entretanto a diferença entre a quantidade de cada isoenzima é alterada dependendo do seu desenvolvimento e apresentam diferenças entre os locais de expressão (Tobin et al., 2001). Foi observado que altos níveis de NADH-GOGAT foi encontrando no início do desenvolvimento das folhas, quando estas ainda se encontram sem clorofila e reduzindo sua expressão com o desenvolvimento da folha (Yamaya et al., 1992). Já a isoforma Fd-GOGAT possui comportamento antagônico, tendo maior expressão em folhas verdes e maduras.

Comparando duas variedades de arroz identificadas com alta e baixa eficiência no uso de nitrogênio, Shi et al. (2008) verificou que as enzimas GS e NADH-GOGAT foram importantes na assimilação de N em plântulas de alta eficiência no uso de N em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio. Sendo que os mecanismos de regulação da GS e NADH-GOGAT não ocorrem no nível de transcrição, podendo ocorrer o controle pos-transcricional ou pos-traducional. Já o transportador *OsAMT1;1* desempenhou papel importante na aquisição de arroz N em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio.

Comparando diferentes linhagens de tabaco superexpressando o gene da *NADH-GOGAT* denominadas GOS, Chichkova et al. (2001) verificou que as raízes das linhagens de GOS mostraram uma maior atividade enzimática (15-40%), em comparação com as plantas de

controle, tendo maior teor de carbono e nitrogênio na parte aérea e maior peso seco. Ele ainda associa a enzima NADH-GOGAT como uma enzima chave na EUN.

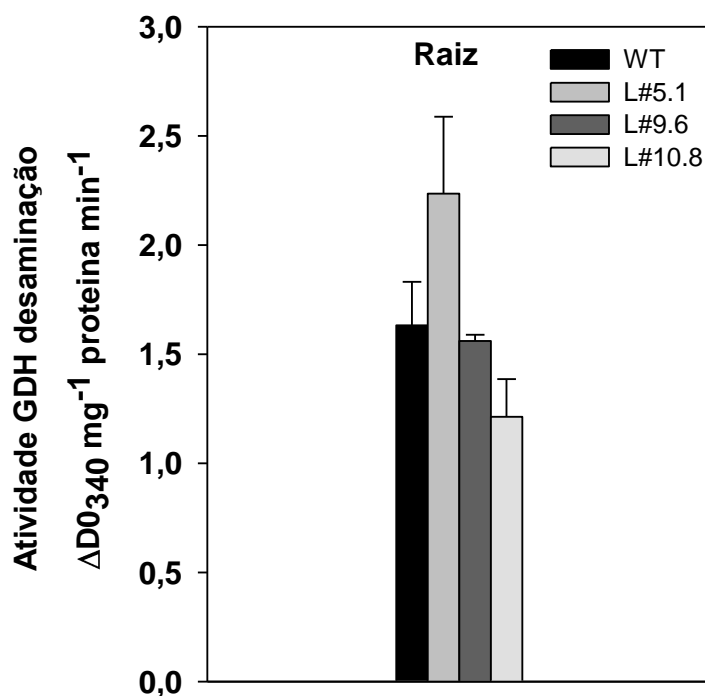


Figura 30. Atividade de glutamato desidrogenase (GDH) desaminação em raízes de plantas de arroz tipo selvagem cv. Nipponbare (WT) e nas linhagens transformadas L#5.1, L#9.6 e L#10.8 superexpressando o fator de transcrição *OsDof25* cultivadas com 2,0 mM de NH_4^+ . Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de três repetições.

Embora a maioria dos estudos indique que 95% do amônio disponível para as plantas superiores é assimilado através do ciclo GS/GOGAT (Lea e Mifflin, 2011), alguns autores têm argumentado que NADH-GDH poderiam participar até certo ponto em na assimilação de amônio. Tal reação pode ocorrer quando a concentração de NH_4^+ na célula é aumentada consideravelmente, quer após a aplicação externa ou como resultado das perturbações metabólicas causadas, por exemplo, por estresse salino (Skopelitis et al., 2006). Contudo, grande parte dos trabalhos indicam que a reação preferencial ocorra no sentido de desaminação (Stewart et al., 1995; Masclaux-Daubresse et al., 2006).

Nas plantas de arroz transformadas com o gene *OsDof25*, não foram observadas diferenças na atividade da enzima GDH desaminação nas raízes em relação a tipo selvagem para o suprimento constante de 2,0 mM de NH_4^+ (**Figura 30**). Além disso, a atividade da enzima não foi detectada nas folhas (dados não apresentados).

Resultados com um triplo mutante de *A. thaliana* para os genes *gdh1-2-3* submetidos ao tratamento de ausência de luz por dias em comparação a plantas WT, Fontaine et al (2012) sugere que a principal função da enzima GDH é fornecer 2-OG para alimentar o ciclo de Krebs, alterando principalmente os teores de aminoácidos, reduzindo os teores de glutamato e glutamina em contra partida aumentando os teores de aspartato, asparagina e alanina, indicando uma ausência de esqueletos de carbono para a assimilação de N. Resultados semelhantes foram encontrados por Miyashita et al. (2008).

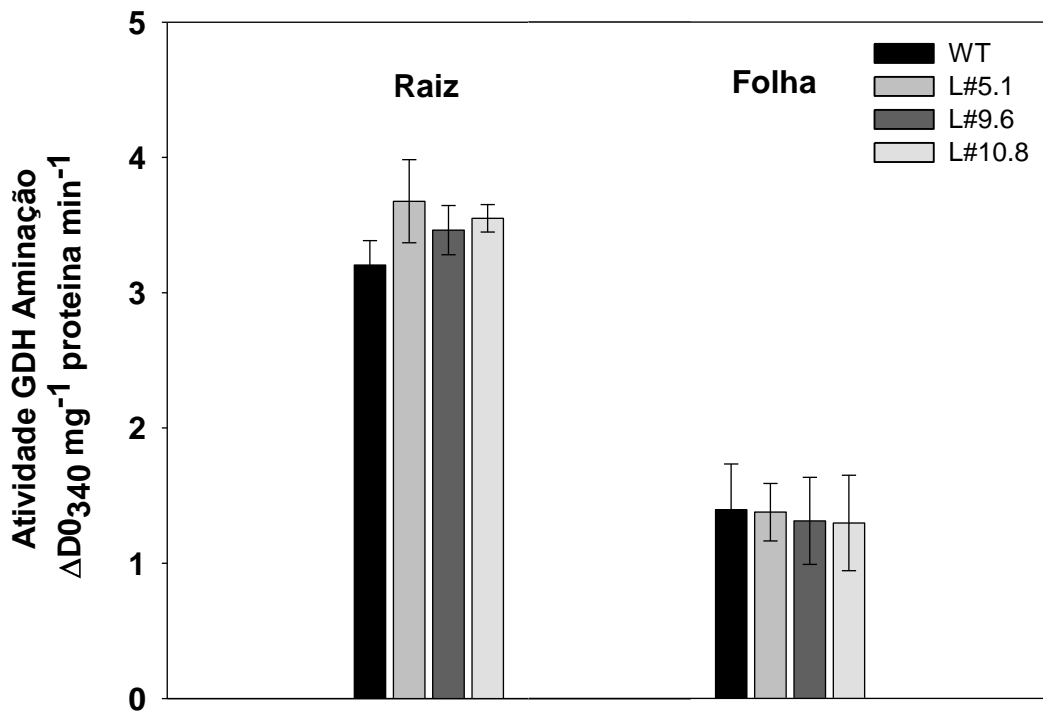


Figura 31. Atividade da glutamato desidrogenase (GDH) aminação em plantas de arroz tipo selvagem cv. Nipponbare (WT) e nas linhagens transformadas L#5.1, L#9.6 e L#10.8 superexpressando o fator de transcrição *OsDof25* cultivadas com 2,0 mM de NH_4^+ constante. Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de três repetições.

A enzima GDH possui uma estrutura hexamérica constituída por duas subunidades (α e β). Essas duas subunidades pode se associar como homo-hexameros das subunidades α e β ou hetero-hexâmeros compostos por diferentes proporções das subunidades, gerando assim uma combinação de sete enzimas diferentes (Roubelakis-Angelakis, 1992; Fontaine et al. 2006).

Utilizando a técnica de ressonâncias magnética nuclear, Labboun et al (2009) pode verificar em vivo e em tempo real que plantas de tabaco superexpressando as duas subunidades de GDH não foram capazes de sintetizar glutamato quando a enzima GS foi inibida. Dessa forma o autor atribui a ação de desaminação como uma estratégia das plantas em manter a homeostase de glutamato, que estaria envolvido na síntese de outros aminoácidos.

Dessa forma pode-se associar a maior atividade da enzima GDH aminação nas raízes (**Figura 31**), atua como uma estratégia das plantas transformadas com o gene *OsDof25*. Dessa foram, contribuindo para um maior fornecimento de glutamato, promovendo a atividade da enzima GS (**Figura 28**), principal enzima de assimilação de N, juntamente com a enzima NADH-GOGAT (**Figura 29**).

A via de assimilação de nitrogênio via GS/GOGAT, requer 2-OG como substrato para a produção de glutamato. Sendo a enzima Isocitrato desidrogenase (IDH) reconhecida como uma das principais atuantes na produção de 2-OG (Chen & Gadal, 1990; Gálvez & Gadal, 1995; Gálvez et al., 1999; Santos et al., 2012).

Duas isoformas da isocitrato desidrogenase são encontradas em plantas, sendo uma delas é uma enzima do ciclo de Krebs dependente de NAD^+ (IDH; EC 1.1.1.41), localizada unicamente nas mitocôndrias, e outra que utiliza NADP^+ (ICDH; EC 1.1.1.42) que existe em diversos compartimentalizações subcelulares, tais como: citosol, cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas (Lu et al., 2005).

As plantas transformadas com o gene *OsDof25* apresentaram menores valores de atividade da enzima IDH (Isocitrato desidrogenase NAD^+ dependente) nas raízes, exceto para a linhagens L#5.1, comparadas a WT (**Figura 32**), e não foi detectado atividade nas folhas (dados não apresentados). Normalmente, os tecidos apresentam baixa atividade da IDH (Gallardo et al., 1995).

Em plantas de *A. thaliana* mutantes para o gene da IDH com redução de até 92% na atividade dessa enzima não apresentaram qualquer tipo de alteração no crescimento e no desenvolvimento, nem na composição dos metabólitos como glicose, sacarose, citrato e aminoácidos quando cultivadas em solo. Esse dados indicam que a enzimas IDH não foi limitante para a assimilação de nitrogênio (Lemaitre et al., 2007).

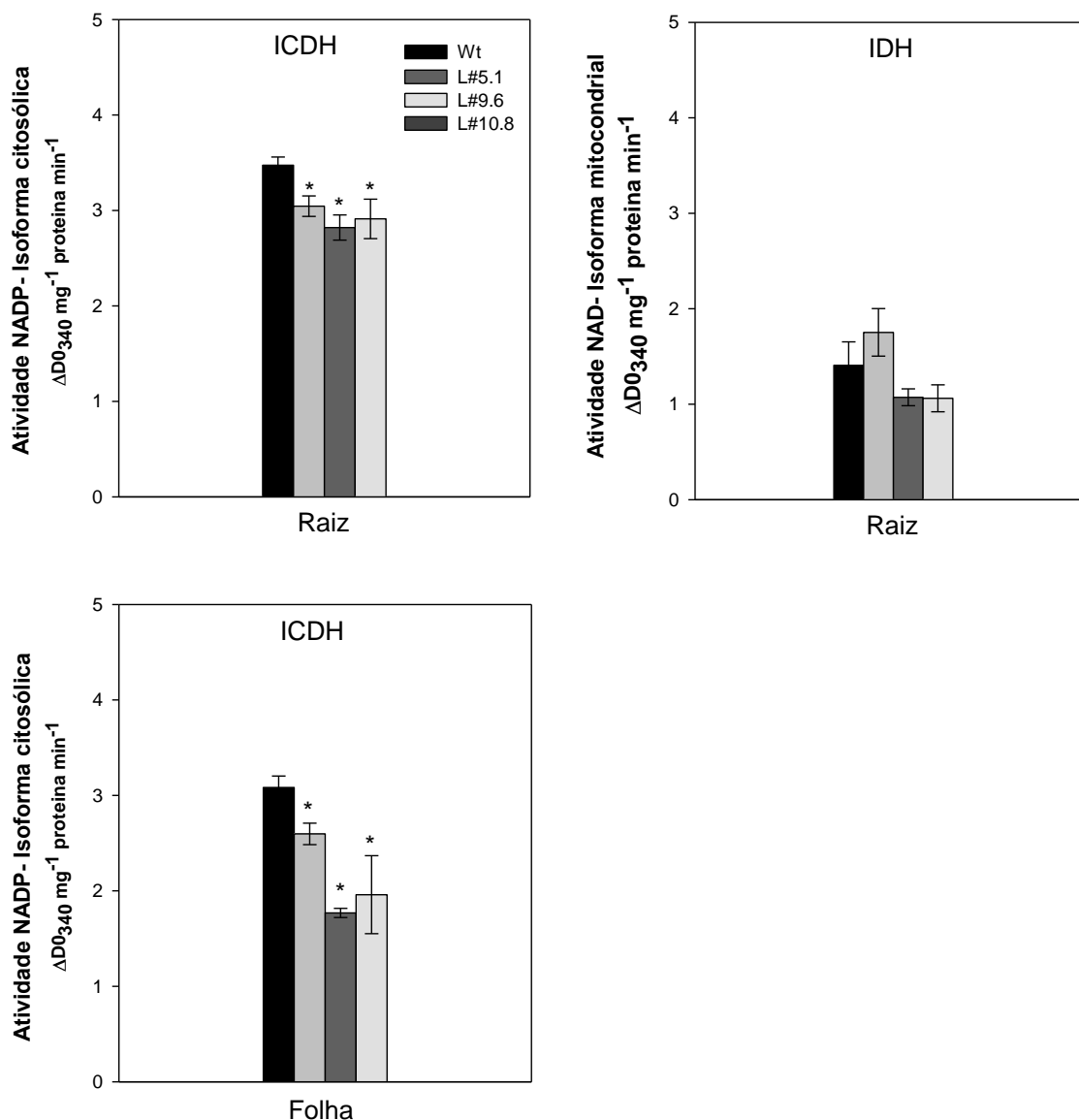


Figura 32. Atividade de isocitrato desidrogenase NADP⁺ (ICDH) e NAD⁺ dependente (IDH) em plantas de arroz tipo selvagem cv. Nipponbare (WT) e nas linhagens transformadas L#5.1, L#9.6 e L#10.8 superexpressando o fator de transcrição *OsDof25* cultivadas com 2,0 mM de NH₄⁺. Barras verticais representam o erro padrão referentes à média de três repetições. Tratamentos identificados com asterisco (*) diferem entre as linhagens pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A enzima IDH é capaz de reduzir NAD⁺ ou NADP⁺, sugerindo que a atividade da IDH atua como mecanismo de proteção das células contra a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS - Reactive Oxygen Species) e manutenção da homeostase de glutamato e 2-OG (Liu et al., 2009).

A atividade da enzima ICDH foi menor nas linhagens transformadas em comparação a plantas WT, tanto nas folhas, com exceção para a L#1.1, quanto nas raízes (**Figura 32**). Indicando que a enzima ICDH pode não estar relacionada com o fornecimento de esqueletos

de carbono para a assimilação de nitrogênio pela via GS/GOGAT, já que as linhagens apresentaram maiores atividades de GS (**Figura 28**) e GOGAT (**Figura 29**) nessas condições.

Muitos autores sugerem que a ICDH pode desempenhar um papel na produção de antioxidante durante o estresse oxidativo, atuando no fornecimento de NADPH necessário para as plantas. As plantas expostas a estresses abióticos, metais pesados, como níquel ou cádmio, mostram maior atividade ICDH (Daniel et al 2007; Gálvez et al 2005).

Dessa forma, os menores valores da atividade da isocitrato desidrogenase podem estar associados a um menor estresse das plantas, principalmente, pela concentração de amônio em solução, indicando maior homeostase na assimilação desse elemento.

5 CONCLUSÕES

Plantas transformadas com o gene *OsDof25* apresentaram maiores atividades das enzimas de assimilação de nitrogênio, GS e NADH-GOGAT, elevando os teores internos de aminoácidos totais.

A localização tecido específica da proteína *OsDof25* em plantas transformadas com os genes repórteres GUS e EGFP ligadas ao seu promotor mostraram-se semelhantes aos encontrados pelas enzimas de assimilação de nitrogênio, indicando uma coordenação entre o fator de transcrição *OsDof25* e as enzimas do metabolismo de N.

A maior atividade das enzimas do metabolismo de N mostram maior eficiência na assimilação de NH_4^+ das plantas transformadas com o gene *OsDof25*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIKO, T.; OBARA, M.; USHIODA, A.; HAYAKAWA, T.; HODGES, M.; YAMAYA, T. Localization of NAD-isocitrate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase in rice roots: candidates for providing carbon skeletons to NADH-glutamate synthase. **Plant and Cell Physiology**, v.46, n.10, p.1724-1734, 2005.

ANDREWS, M.; RAVEN, A.J.; SPRENT, I.J. Environmental effects of dry matter partitioning between shoot and root of crop plants: relations with growth and shoot protein concentration. **Annals of Applied Biology**, v.138, p.57-68, 2001.

BAENA-GONZÁLEZ, E., ROLLAND, F., THEVELEIN, J.M., SHEEN, J. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. **Nature**, v.448, p.938-994, 2007.

BARBIER-BRYGOO, H.; ANGELI, A.DE.; FILLEUR, S.; FRACHISSE, J-M, GAMBALE, F.; THOMINE, S.; WEGE, S. Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks. **Annual Review of Plant Biology**, v.62, p.25-51, 2011.

BEEK, C.L.V.; MEERBURG, B.G.; SCHILS, R.L.M.; VERHAGEN, J.; KUIKMAN, P.J. Feeding the world's increasing population while limiting climate change impacts: linking N₂O and CH₄ emissions from agriculture to population growth. **Environmental Science & Policy**, v.13, p.89-96, 2010.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAY C.M. **Nitrogen Metabolism in Plants**. Longman, London, 1983.

BRITTO, D.T.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M.; KRONZUCKER, H.J. Futile transmembrane NH₄⁺ cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, p.4255-4258, 2001.

CATALDO, D.; HARRON, M.; SCHARADER, E.L.; YOUNGS, L.V. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v.6, p.853-855, 1975.

CHARDON, F.; NOËL, V.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Exploring NUE in crops and in *Arabidopsis* ideotypes to improve yield and seed quality. **Journal of Experimental Botany**, p.1-12, 2012.

CENTURY, K.; REUBER, T.L.; RATCLIFFE, O.J. Regulating the regulators: the future prospects for transcription-factor-based agricultural biotechnology products. **Plant Physiology**, v.147, p.20-29, 2008.

CHEN, D.R., GADAL, P. Do mitochondria provide the 2-oxoglutarate needed for glutamate synthesis in higher plant chloroplasts? **Plant Physiology and Biochemistry**, v.28, p.141-145, 1990.

CHEN, R.; GREER, A.; DEAN, A.M. A highly active decarboxylating dehydrogenase with rationally inverted coenzyme specificity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.92, n.25, p.11666-11670, 1995.

- CHICHKOVA, S.; ARELLANO, J.; VANCE, C.P.; HERNANDEZ, G. Transgenic tobacco plants that overexpress alfalfa NADH-glutamate synthase have higher carbon and nitrogen content. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.2079-2087, 2001.
- CORUZZI G., BUSH D.R. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. **Plant Physiology**, v.125, p.61-64, 2001.
- CRAWFORD, N.M & GLASS, A.D.M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science**, v.3, n.10, p.389-395, 1998.
- DANIEL, M.; GONZÁLEZ, E.M.; FRENDON, P.; PUPPO, A.; ARRESE-IGOR, C. NADPH recycling systems in oxidative stressed pea nodules: a key role for the NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. **Planta**, v.225, p.413-421, 2007.
- DECHORGNAT, J.; NGUYEN, C.T.; ARMENGAUD, P.; JOSSIER, M.; DIATLOFF, E.; FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, F. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.4, p.1349-1359, 2011.
- DUAN, Y.H.; ZHANG, Y.L.; YE, L.T.; FAN, X.R.; XU, G.H.; SHEN, Q.R. Responses of rice cultivars with different nitrogen use efficiency to partial nitrate nutrition. **Annals of Botany**, v.99, p.1153-1160, 2007.
- DUBOIS, F.; TERCÉ-LAFORGUE, T.; GONZALEZ-MORO, M-B.; ESTAVILLO, J-M.; SANGWAN, R.; GALLAIS, A.; HIREL, B. Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? **Plant Physiology and Biochemistry**, p.41, 565-576, 2003.
- FARNDEN, K.J.F.; ROBERTSON, J.G. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogen. In: BERGSEN, F. J. Ed. **Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation**, 1980.
- FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v.49, p.1980, 1977.
- FERNANDES, M.S. N-Carriers, light and temperature influences on the free amino acid pool composition of rice plants. **Turrialba**, v.33, n.3, p.297-301, 1984.
- FERNANDES, M.S & SOUZA, S.R. Absorção de Nutrientes. In: Fernandes M. S. (Org.). **Nutrição Mineral de Plantas**. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006, v.1, p.115-152.
- FONTAINE, J.X.; SALADINO, F.; AGRIMONTI, C.; BEDU, M.; TERCÉ-LAFORGUE, T.; TÉTU, T.; DUBOIS, F. Control of the synthesis and subcellular targeting of the two GDH genes products in leaves and stems of *Nicotiana plumbaginifolia* and *Arabidopsis thaliana*. **Plant and cell physiology**, v.47, n.3, p.410-418, 2006.
- FONTAINE, J.X.; TERCÉ-LAFORGUE, T.; ARMENGAUD, P.; CLÉMENT, G.; RENOU, J.P.; PELLETIER, S.; DUBOIS, F. Characterization of a NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of *Arabidopsis* demonstrates the key role of this enzyme in root carbon and nitrogen metabolism. **The Plant Cell Online**, v.24, n.10, p.4044-4065, 2012.
- FORDE, B.G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1465, p.219-235, 2000.
- FOYER, C.H.; NOCTOR, G.; VERRIER, P. Photosynthetic carbon-nitrogen interactions: modelling inter-pathway control and signalling. In **Annual Plant Reviews**, 2006.

- FUNAYAMA, K.; KOJIMA, S.; TABUCHI-KOBAYASHI, M.; SAWA, Y.; NAKAYAMA, Y.; HAYAKAWA, T.; YAMAYA, T. Cytosolic glutamine synthetase1, 2 is responsible for the primary assimilation of ammonium in rice roots. **Plant and Cell Physiology**, v.54, n.6, p.934-943, 2013.
- GALLARDO, F.; GÁLVEZ, S.; GADAL, P.; CÁNOVAS, F.M. Changes in NADP1-linked isocitrate dehydrogenase during tomato fruit ripening. Characterization of the predominant cytosolic enzyme from green and ripe pericarp. **Planta**, v.196, p.148-154, 1995.
- GÁLVEZ, S.; HODGES, M.; DECOTTIGNES, P.; BISMUTH, E.; LANCIEN, M.; SANGWAN, R.S.; DUBOIS, F.; LEMARECHAL, P.; CRÉTIN, C.; GADAL, P. Identification of a tobacco cDNA encoding a cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase. **Plant Molecular Biology**, v.30, p.307-320, 1996.
- GÁLVEZ, L.; GONZÁLEZ, E.M.; ARRESE-IGOR, C. Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. **Journal of Experimental Botany**, v.56, n.419, p.2551-2561, 2005.
- GÁLVEZ, S.; LANCIEN, M.; HODGE, M.S. Are isocitrate dehydrogenases and 2-oxoglutarate involved in the regulation of glutamate synthesis? **Trends in Plant Science**, v.4, p.484-490, 1999.
- GAUR, V.S.; SINGH, U.S.; KUMAR, A.L. Transcriptional profiling and in silico analysis of Dof transcription factor gene family for understanding their regulation during seed development of rice *Oryza sativa* L. **Molecular Biology Reports**, v.38, p.2827-2848, 2011.
- GAXIOLA, R.A.; LI, J.; UNDURRAGA, S.; DANG, L.M.; ALLEN, G.J.; ALPER, S.L.; FINK, G.R. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, p.11444-11449, 2001.
- GLASS, A.D.M.; SHAFF, J.E.; KOCHIAN, L.V. Studies of the uptake of nitrate in Barley. **Plant Physiology**, v.99, p.456-463, 1992.
- GOJON, A.; NACRY, P.; DAVIDIAN, J-C. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, p.328-338, 2009.
- GOOD, A.G.; SHRAWAT, A.K.; MUENCH, D.G. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? **Trends in Plant Science**, v.9, n.12, p.597-605, 2004.
- GROTEWOLD, E. Transcription factors for predictive plant metabolic engineering: are we there yet? **Current opinion in biotechnology**, v.19, n.2, p.138-144, 2008.
- GROTEWOLD, E. Transcription factors for predictive plant metabolic engineering: are we there yet? **Current Opinion in Biotechnology**, v.9, p.138-144, 2008.
- GUALBERTI, G.; PAPI, M.; BELLUCI, L.; RICCI, I.; BOUCHEZ, D.; CAMILLERI, C.; COSTANTINO, P.; VITTORIOSO, P. Mutations in the Dof zinc finger genes *DAG2* and *DAG1* influence with opposite effects the germination of *Arabidopsis* seeds. **Plant Cell**, v.14, p.1253-1263, 2002.
- GUO, A.; HE, K.; LIU D.; BAI, S.; GU, X.; WEI, L.; LUO, J. DATF: a database of *Arabidopsis* transcription factors. **Bioinformatics**, v.21, p.2568-2569, 2005.
- GUTIÉRREZ, R.A.; LEJAY, L.V.; DEAN, A.; CHIAROMONTE, F.; SHASHA, D.E.; CORUZZI, G.M. Qualitative network models and genome-wide expression data define

- carbon/nitrogen-responsive molecular machines in *Arabidopsis*. **Genome Biology**, v.8, p.17, 2007.
- HARRISON, J.; CRESCENZO, M.-A.P. DE; SENÉ, O.; HIREL, B. Does Lowering glutamine synthetase activity in nodules modify nitrogen metabolism and growth of *Lotus japonicus*? **Plant Physiology**, v.133, p.253-262, 2003.
- HAYAKAWA, T.; HOPKINS, L.; PEAT, L.J.; YAMAYA, T.; TOBIN, A.K. Quantitative intercellular localization of NADH-dependent glutamate synthase protein in different types of root cells in rice plants. **Plant Physiology**, v.119, n.2, p.409-416, 1999.
- HIEI, Y. & KOMARI, T. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. **Nature Protocol**, v.3, n.5, p.824-834, 2008.
- HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUBO, T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology**, v.35, p.205-218, 1997.
- HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **The Plant Journal**, v.6, n.2, p.271-282, 1994.
- HIREL, B.; GOUIS, J.L.; NEY, B.; GALLAIS, A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal of Experimental Botany**, p.1-19, 2007.
- HIREL, B.; LEA, P.J. Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon and respiratory metabolism, (eds. FOYER, C.H.; NOCTOR, G.). The biochemistry, molecular biology and genetic manipulation of primary ammonia assimilation, **Kluwer Academic**, p.71-92, 2002.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural of Experimental Stn. Bull**, v.347, p.1-32, 1950.
- HODGES, M.; FLESCHE, V.; GÁLVEZ, S.; BISMUTH, E. Higher plant NADP⁺ dependent isocitrate dehydrogenases, ammonium assimilation and NADPH production. **Plant Physiology. Biochemistry**, v.41, p.577-585, 2003.
- HOQUE, M.S.; MASLE, J.; UDVARDI, M.K.; RYAN, P.R.; UPADHYAYA, N.M. Over-expression of the rice *OsAMT1-1* gene increases ammonium uptake and content, but impairs growth and development of plants under high ammonium nutrition. **Functional Plant Biology**, v.33, p.153-163, 2006.
- IBGE. Produção e área plantada de cereais, leguminosas e oleaginosas 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>. Acesso em: 12 de janeiro de 2012.
- IIDA, K.; SEKI, M.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; AKIYAMA, K.; TOYODA, T.; KONAGAYA, A.; SHINOZAKI, K. RARF: database and tools for complete sets of *Arabidopsis* transcription factors. **DNA Research**, v.12, p.247-256, 2005.
- ISHIYAMA, K.; KOJIMA, S.; TAKAHASHI, H.; HAYAKAWA, T.; YAMAYA, T. Cell type distinct accumulation of mRNA and protein for NADH-dependent glutamate synthase in rice roots in response to the supply of NH₄⁺. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.643-647, 2003.

- JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A.K.; KHURANA, J.P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.345, n.2, p.646-651, 2006.
- KAISER, B.N.; RAWAT, S.R.; SIDDIQI, M.Y.; MASLE, J.; GLASS, A.D.M. Functional analysis of an *Arabidopsis* T-DNA 'Knockout' of the high-affinity NH₄⁺ transporter *AtAMT1;1*. **Plant Physiology**, v.130, p.1263-1275, 2002.
- KANT, S.; BI, Y-M.; ROTHSTEIN, S.J. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.4, p.1499-1509, 2011.
- KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. Gateway-vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Trends in Plant Science**, v.7, n.5, p.193-195, 2002.
- KICHEY, T.; LE GOUIS, J.; SANGWAN, B.; HIREL, B.; DUBOIS, F. Changes in the cellular and subcellular localization of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase during flag leaf senescence in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant and Cell Physiology**, v.46, n.6, p.964-974, 2005.
- KIYOMIYA, S.; NAKANISHI, H.; UCHIDA, H.; TSUJI, A.; NISHIYAMA, S.; FUTATSUBASHI, M.; TSUKUDA, H.; ISHIOKA, N.S.; WATANABE, S.; ITO, T.; MIZUNIWA, C.; OSA, A.; MATSUHASHI, S.; HASHIMOTO, S.; SEKINE, T.; MORI, S. Real time visualization of ¹³N-translocation in rice under different environment conditions using position emitting tracer imaging system. **Plant Physiology**, v.125, p.1743-1754, 2001.
- KRONZUCKER, H.J.; BRITTO, D.T.; DAVENPORT, R.J.; TESTER, M. Ammonium toxicity and the real cost of transport. **Trends in Plant Science**, v.6, p.335-337, 2001.
- KUMAR, A.; SILIM, S.N.; OKAMOTO, M.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M. Differential expression of three members of the *AMT1* gene family encoding putative high-affinity NH₄⁺ transporters in roots of *Oryza sativa* subspecies indica. **Plant Cell and Environment**, v.26, p.907-914, 2003.
- KURAI, T.; WAKAYAMA, M.; ABIKO, T.; YANAGISAWA, S.; AOKI, N.; OHSUGI, R. Introduction of the *ZmDof1* gene into rice enhances carbon and nitrogen assimilation under low-nitrogen conditions. **Plant Biotechnology Journal**, v.9, n.8, p.826-837, 2011.
- KUSHWAHA, H.; GUPTA, S.; SINGH, V.K.; RASTOGI, S.; YADAV, D. Genome wide identification of Dof transcription factor gene family in sorghum and its comparative phylogenetic analysis with rice and *Arabidopsis*. **Molecular Biology Reports**, v.38, p.5037-5053, 2010.
- LABBOUN, S.; TERCÉ-LAFORGUE, T.; ROSCHER, A.; BEDU, M.; RESTIVO, F.M.; VELANIS, C.N.; HIREL, B. Resolving the role of plant glutamate dehydrogenase. I. in vivo real time nuclear magnetic resonance spectroscopy experiments. **Plant and Cell Physiology**, v.50, n.10, p.1761-1773, 2009.
- LEA, P.J. & MIFLIN, B.J. Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement. **Nitrogen metabolism in plants in the post-genomic era**. Chichester, UK: Wiley-Blackwell, p.1-40, 2011.
- LEA, P.J. & MIFLIN, B.J. Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.555-564, 2003.

- LEA, P.J. & AZEVEDO, R.A. Nitrogen use efficiency. Uptake of nitrogen from the soil. **Annals of Applied Biology**, v.149, n.3, p.243-247, 2006.
- LEJAY, L.; GANSEL, X.; CERESO, M.; TILLARD, P.; MULLER, C.; KRAPP, A.; VON WIREN, N.; DANIEL-VEDELE, F.; GOJON, A. Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. **Plant Cell** v.15, p.2218-2232, 2003.
- LEJAY, L.; TILLARD, P.; LEPETIT, M.; OLIVE, F.D.; FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, F.; GOJON, A. Molecular and functional regulation of two NO₃-uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v.18, p.509-519, 1999.
- LEMAITRE, T.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; FLESCHE, V.; BISMUTH, E.; FERNIE, A.R.; HODGES, M. NAD-dependent isocitrate dehydrogenase mutants of *Arabidopsis* suggest the enzyme is not limiting for nitrogen assimilation. **Plant Physiology**, v.144, n.3, p.1546-1558, 2007.
- LIAN, X.; XING, Y.; XU, H.Y.C.; LI, X.; ZHANG, Q. QTLs for low nitrogen tolerance at seedling stage identified using a recombinant inbred line population derived from an elite rice hybrid. **Theoretical and Applied Genetics**, v.112, p.85-96, 2005.
- LIJAVETZKY, D.; CARBONERO, P.; VICENTE-CARBAJOSA, J. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and *Arabidopsis* Dof gene families. **BMC Evolutionary Biology**, v.23, p.3-17, 2003.
- LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_T$ method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.
- LÓPEZ-GÁLVEZ, G.; SALTVEIT, M.; CANTWELL, M. Wound-induced phenylalanine ammonia lyase activity: factors affecting its induction and correlation with the quality of minimally processed lettuces. **Postharvest Biology and Technology**, v.9, n.2, p.223-233, 1996.
- LOQUÉ, D & WIRÉN, N.V. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.401, p.1293-1305, 2004.
- LOTHIER, J.; GAUFICHON, L.; SORMANI, R.; LEMAÎTRE, T.; AZZOPARDI, M.; MORIN, H.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. The cytosolic glutamine synthetase GLN1,2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in *Arabidopsis* rosettes when nitrate supply is not limiting. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.4, p.1375-1390, 2011.
- LU, B.; YUAN, Y.; ZHANG, C.; OU, J.; ZHOU, W.; LIN, Q. Modulation of key enzymes involved in ammonium assimilation and carbon metabolism by low temperature in rice (*Oryza sativa* L.) roots. **Plant Science**, v.169, n.2, p.295-302, 2005.
- LUDEWIG, U.; NEUHAUSER, B.; DYNOWSKI, M. Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. **FEBS Letters**, v.581, p.2301-2308, 2007.
- MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; REISDORF-CREN, M.; PAGEAU, K.; LELANDAIS, M.; GRANDJEAN, O.; KRONENBERGER, J.; SUZUKI, A. Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. **Plant Physiology**, v.140, n.2, p.444-456, 2006.
- MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in

- plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany**, v.105, p.1-17, 2009.
- MILLER, A.J & CRAMER, M.D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, v.274, p.1-36, 2004.
- MITSUDA, N.; OHME-TAKAGI, M. Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. **Plant and Cell Physiology**, p.50, n.7, p.1232-1248, 2009.
- MIYASHITA, Y.; GOOD, A.G. NAD (H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation. **Journal of Experimental Botany**, v.59, n.3, p.667-680, 2008.
- MORITA, S.; LUX, A.; ENSTONE, D.E.; PETERSON, C.A.; ABE, J. Re-examination of rice seminal root ontogeny using fluorescence microscopy. **Japanese Journal of Crop Science**, v.65, p.37-38, 1996.
- PAEZ-VALENCIA, J.; PATRON-SOBERANO, A.; RODRIGUEZ-LEVIZ, A.; SANCHEZ-LARES, J.; SANCHEZ-GOMEZ, C.; VALENCIA-MAYORAL, P.; GAXIOLA, R. Plasma membrane localization of the type I H⁺-PPase AVP1 in sieve element-companion cell complexes from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, v.181, n.1, p.23-30, 2011.
- PALOMO, J.; GALLARDO, F.; SUAREZ, M.F.; CANOVAS, F.M., Purification and characterization of NADP-linked isocitrate dehydrogenase from scots pine. Evidence for different physiological roles of the enzyme in primary development. **Plant Physiology**, v.118, p.617-626, 1998.
- PAPAVASSILIOU, A.G. Transcription factor-based drug design in anticancer drug development. **Molecular Medicine**, v.3, n.12, p.799-810, 1997.
- PEOPLES, M.B.; HERRIDGE, D.F.; LADHA, J.K. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? **Plant Soil**, v.174, p.3-28, 1995.
- QU, L-J. & ZHU, Y-X. Transcription factor families in *Arabidopsis*: major progress and outstanding issues for future research. **Current Opinion on Plant Biology**, v.9, p.544-549, 2006.
- RANATHUNGE, K.; EL-KEREAMY, A.; GIDDA, S.; BI, Y.M.; ROTHSTEIN S.J. *OsAMT1*, 1 transgenic rice plants with enhanced NH₄⁺ permeability show superior growth and higher yield under optimal and suboptimal NH₄⁺ conditions. **Journal of Experimental Botany**, v.4, n.65, p.965-979, 2014.
- RANATHUNGE, K.; STEUDLE, E.; LAFITTE, R. Control of water uptake by rice (*Oryza sativa* L.): role of the outer part of the root. **Planta**, v.217, n.2, p.193-205, 2003.
- RAWAT, S.R.; SILIM, S.N.; KRONZUCKER, H.J.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M. *AtAMT1* gene expression and NH₄⁺ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. **The Plant Journal**, v.19, p.143-152, 1999.
- ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.; KLIEWER, W.M. Nitrogen metabolism in grapevine. **Horticultural Reviews**, v.14, p.407-452, 1992.
- RUEDA-LÓPEZ, M.; CRESPILO, R.; CÁNOVAS, F.M.; ÁVILA, C. Differential regulation of two glutamine synthetase genes by a single Dof transcription factor. **The Plant Journal**, v.56, p.73-85, 2008.

SANTOS, L.A., DE SOUZA, S.R., FERNANDES, M.S. *OsDof25* expression alters carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis* under high N-supply. **Plant Biotechnology Reports**, v.6, n.4, p.327-337, 2012.

SANTOS, L.A. **Efeito da Superexpressão dos Fatores de Transcrição *ZmDof1* e *OsDof25* sobre a Eficiência de Uso de Nitrogênio em *Arabidopsis thaliana* L.** 2009. 81f. (Tese de Doutorado em Ciência do Solo) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

SCHEIBLE, W.R.; GONZALEZ-FONTES, A.; LAUERER, M.; MULLER-ROBER, B.; CABOCHE, M.; STITT, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. **The Plant Cell Online**, v.9, p.5, p.783-798, 1997.

SCHIAVON, M.; ERTANI, A.; NARDI, S. Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in *Zea mays* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.24, p.11800-11808, 2008.

SERRA, T. X.; ESTEBAN, R.; PEÑAS, G.M.; CATALÀ, M.; MELÉ, E.; MESSEGUER, J. Direct and reverse pollen-mediated gene flow between GM rice and red rice weed. **AoB Plants**, v.5, p.50, 2013.

SHANAHAN, J.F.; KITCHEN, N.R.; RAUN, W.R.; SCHEPERS, J.S. Responsive in-season nitrogen management for cereals. **Computers and Electronics in Agriculture**, v.61, n.1, p. 51-62, 2008.

SHI, W.M.; XU, W.F.; LI, S.M.; ZHAO, X.Q.; DONG, G.Q. Responses of two rice cultivars differing in seedling-stage nitrogen use efficiency to growth under low-nitrogen conditions. **Plant and Soil**, v.326, n.1-2, p.291-302, 2010.

SHIGYO, M.; TABEL, N.; YONEYAMA, T.; YANAGISAWA, S. Evolutionary processes during the formation of the plant-specific Dof transcription factor family. **Plant Cell Physiology**, v.48, n.1, p.179-185, 2007.

SILVA, R.A.C. **Efeito da superexpressão do fator de transcrição *OsDof25* sobre a eficiência de absorção de nitrogênio em *Oryza sativa* L.** 2012. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

SILVA, M.R. de. **Embriogênese somática, melhoramento da resposta in vitro e transformação de milho (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*.** 2009.196f. (Dissertação de mestrado em Produção vegetal), Passo Fundo: UPF.

SKOPELITIS, D.S.; PARANYCHIANAKIS, N.V.; PASCHALIDIS, K.A.; PLIAKONIS, E.D.; DELIS, I.D.; YAKOUMAKIS, D.I.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. **The Plant Cell Online**, v.18, n.10, p.2767-2781, 2006.

SONODA, Y.; IKEDA, A.; SAIKI, S.; von WIRÉN, N.; YAMAYA, T.; YAMAGUCHI, J. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1,1-1,3*) in rice. **Plant Cell Physiology**, v.44, p.726-734, 2003a.

- SONODA, Y.; IKEDA, A.; SAIKI, S.; YAMAYA, T.; YAMAGUCHI, J. Feedback regulation of the ammonium transporter gene family *AMT1* by glutamine in rice. **Plant Cell Physiology**, v.44, p.1396-1402, 2003b.
- SOUZA & FERNANDES. Nitrogênio. In: FERNANDES, M.S. **Nutrição de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.215-252.
- SOUZA, V.M. **Avaliação dos parâmetros cinéticos de absorção de amônio entre variedades locais e melhoria de arroz (*Oryza sativa* L.) e expressão em real-time RT-PCR dos transportadores *OsAMT1***. 2010. 57f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- SPERANDIO, M.V.L.; SANTOS, L.A.; BUCHER, C.A.; FERNANDES, M.S.; SOUZA, S.R. Isoforms of plasma membrane H⁺-ATPase in rice root and shoot are differentially induced by starvation and resupply of NO₃⁻ or NH₄⁺. **Plant Science**, v.180, p. 251-258, 2011.
- STEWART, G.R.; SHATILOV, V.R.; TURNBULL, M.H.; ROBINSON, S.A.; GOODALL, R. Evidence that glutamate dehydrogenase plays a role in the oxidative deamination of glutamate in seedlings of *Zea mays*. **Functional Plant Biology**, v.22, n.5, p.805-809, 1995.
- STITT, M.; KRAPP, A. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. **Plant, Cell & Environment**, v.22, n.6, p.583-621, 1999.
- SUENAGA, A.; MORIYA, K.; SONODA, Y.; IKEDA, A.; VON WIRÉN, N.; HAYAKAWA, T.; YAMAGUCHI, J.; YAMAYA, T. Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter *OsAMT2* in rice plants. **Plant and Cell Physiology**, v.44, p.206-211, 2003.
- TABUCHI, M.; SUGIYAMA, K.; ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; SATO, T.; TAKAHASHI, H.; YAMAYA, T. Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking *OsGS1,1*, a cytosolic glutamine synthetase1,1. **The Plant Journal**, v.42, n.5, p.641-651, 2005.
- TABUCHI, M.; ABIKO, T.; YAMAYA, T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.9, p.2319-2327, 2007.
- TOBIN, A.K.; YAMAYA, T. Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.356, p.591-604, 2001.
- 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.
- UDVARDI, M.K.; KAKAR, K.; WANDREY, M.; MONTANARI, O.; MURRAY, J.; ANDRIANKAJA, A.; ZHANG, J.-Y.; BENEDITO, V.; HOFER, J.M.I.; CHUENG, F.; TOWN, C.D. Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. **Plant Physiology**, v.144, p.538-549, 2007.
- VEGA, J.M.; YU, W.; KENNON, A.R.; CHEN, X.; ZHANG, Z.J. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays* L.) using standard binary vectors. **Plant Cell Reports**, v.27, p.297-305, 2008.
- VIDAL, E.A. & GUTIÉRREZ, R.A. A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in *Arabidopsis*. **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, p.521-529, 2008.

- WANG, H.W.; ZHANG, B.; HAO, Y.J.; HUANG, J.; TIAN, A.G.; LIAO, Y.; ZHANG, J.S.; CHEN, S.Y. The soybean Dof-type transcription factor genes, *GmDof4* and *GmDof11*, enhance lipid content in the seeds of transgenic *Arabidopsis* plants. **Plant Journal**. v.52, n.4, p.716-729, 2007.
- YAMASAKI, K.; KIGAWA, T.; INOUE, M.; WATANABE, S.; TATENO, M.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YOKOYAMA, S. Structures and evolutionary origins of plant-specific transcription factor DNA-binding domains. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.46, n.3, p.394-401, 2008.
- YAMAYA, T.; HAYAKAWA, T.; TANASAWA, K.; KAMACHI, K.; MAE, T.; OJIMA, K. Tissue distribution of glutamate synthase and glutamine synthetase in rice leaves occurrence of NADH-dependent glutamate synthase protein and activity in the unexpanded, nongreen leaf blades. **Plant Physiology**, v.100, n.3, p.1427-1432, 1992.
- YAMAYA, T.; OAKS, A. Metabolic regulation of ammonium uptake and assimilation. In Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants. **Kluwer Academic Publishers**, v.I, p.35-63, 2004.
- YAN, F.; ZHU, Y.; MULLER, C.; ZORB, C.; SCHUBERT, S. Adaptation of H⁺-pumping and plasma membrane H⁺ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. **Plant Physiology**, v.129, p.50-63, 2002.
- YANAGISAWA, S.; AKIYAMA, A.; KISAKA, H.; UCHIMIYA, H.; MIWA, T. Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.101, n.20, p.7833-7838, 2004a.
- YANAGISAWA, S. & SHEEN, J. Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. **The Plant Cell**, v.10, p.75-89, 1998.
- YANAGISAWA, S. Dof domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. **Plant Cell Physiology**, v.45, n.4, p.386-391, 2004b.
- YANAGISAWA, S. *Dof1* and *Dof2* transcriptional factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. **The Plant Journal**, v.21, n.3, p.281-288, 2000.
- YANAGISAWA, S. The Dof family of plant transcription factors. **TRENDS in Plant Science**, v.7 n.12, p.555-560, 2002.
- YANAGISAWA, S.; IZUI, K. Molecular cloning two DNA-binding proteins of maize that are structurally different but interact with the same sequence motif. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268, n.21, p.16028-16036, 1993.
- YANG H., KNAPP J., KOIRALA P., RAJAGOPAL D., PEER W. A., SILBART L. K., MURPHY A., GAXIOLA R. A. Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H⁺-pyrophosphatase. **Plant Biotechnology Journal**, v.5, p.735-745, 2007.
- YAO, S-G.; SONODA, Y.; TSUTSUI, T.; NAKAMURA, H.; ICHIHAWA, H.; IKEDA, A.; YAMAGUCHI, J. Promoter analysis of *OsAMT1.2* and *OsAMT1.3* implies their distinct roles in nitrogen utilization in rice. **Breeding Science**, v.58, p. 201-207, 2008.
- YEMM, E.W. & COCKING, E. C. The determination of amino-acid with ninhydrin. **Analytical Biochemistry**, v.80, p.209-213, 1955.

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

ZHANG, Y.H.; ZHANG, Y.L.; SHEN Q.R. Nitrogen accumulation and translocation of different Japonica rice cultivars under different nitrogen application rates. **Pedosphere**, 2007.

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

7 ANEXOS

7.1 Meios Utilizados para a Transformação de plantas de Arroz

Meios de cultivo utilizados para transformação de arroz de acordo com o protocolo modificado de Toki et al. (2006).

Meio de Indução de Calos - N6D – 1 L

- 2,830 mg L⁻¹ KNO₃
- 463 mg L⁻¹ (NH₄)₂SO₄
- 185 mg L⁻¹ MgSO₄·7H₂O
- 166 mg L⁻¹ CaCl₂·2H₂O
- 400 mg L⁻¹ KH₂PO₄
- 37,3 mg L⁻¹ Na₂EDTA
- 27,8 mg L⁻¹ FeSO₄·7H₂O
- 4,4 mg L⁻¹ MnSO₄·4H₂O
- 1,5 mg L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O
- 0,8 mg L⁻¹ KI
- 1,6 mg L⁻¹ H₃BO₃
- 37,3 mg L⁻¹ Fe-EDTA
- 0,10 g Mio-inositol
- 2 mg L⁻¹ 2,4D
- 300 mg L⁻¹ Casaminoácidos
- 2,878 mg L⁻¹ Prolina
- 30 mg L⁻¹ Sacarose
- Ajustar pH para 5,8 com KOH 1M
- Avolumar para 1 L com H₂O destilada
- 4 g de gelrite
- Autoclavar a 121 °C por 15min

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

Meio de Co- Cultivo de Calos - N6D-As – 500 mL

- 2,830 mg L⁻¹ KNO₃
- 463 mg L⁻¹ (NH₄)₂SO₄
- 185 mg L⁻¹ MgSO₄·7H₂O
- 166 mg L⁻¹ CaCl₂·2H₂O
- 400 mg L⁻¹ KH₂PO₄
- 37,3 mg L⁻¹ Na₂EDTA
- 27,8 mg L⁻¹ FeSO₄·7H₂O
- 4,4 mg L⁻¹ MnSO₄·4H₂O
- 1,5 mg L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O
- 0,8 mg L⁻¹ KI
- 1,6 mg L⁻¹ H₃BO₃
- 37,3 mg L⁻¹ Fe-EDTA
- 0,10 g Mio-inositol
- 2 mg L⁻¹ 2,4D
- 300 mg L⁻¹ Casaminoácidos
- 2,878 mg L⁻¹ Prolina
- 30 mg L⁻¹ Sacarose
- Ajustar pH para 5,8 com KOH 1M
- Avolumar para 1 L com H₂O destilada
- 4 g de gelrite
- Autoclavar a 121 °C por 15 minutos

Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar acetoseringona (conc. final de 19,2 mg L⁻¹).

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

Meio de Seleção dos Calos - N6D- 500 mL

- 2,830 mg L⁻¹ KNO₃
- 463 mg L⁻¹ (NH₄)₂SO₄
- 185 mg L⁻¹ MgSO₄·7H₂O
- 166 mg L⁻¹ CaCl₂·2H₂O
- 400 mg L⁻¹ KH₂PO₄
- 37,3 mg L⁻¹ Na₂EDTA
- 27,8 mg L⁻¹ FeSO₄·7H₂O
- 4,4 mg L⁻¹ MnSO₄·4H₂O
- 1,5 mg L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O
- 0,8 mg L⁻¹ KI
- 1,6 mg L⁻¹ H₃BO₃
- 37,3 mg L⁻¹ Fe-EDTA
- 0,10 g Mio-inositol
- 2 mg L⁻¹ 2,4D
- 300 mg L⁻¹ Casaminoácidos
- 2,878 mg L⁻¹ Prolina
- 30 mg L⁻¹ Sacarose
- Ajustar pH para 5,8 com KOH 1M
- Avolumar para 1 L com H₂O destilada
- 4 g de gelrite
- Autoclavar a 121 °C por 15min

Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar 0,5 mL de Higromicina 1000X (conc. final de 50 mg L⁻¹), 1mL de carbenicilina 500X (conc. final 400 mg L⁻¹).

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

Meio de Regeneração de parte aérea (RE-III) – 1 L

- 1,900 mg L⁻¹ KNO₃
- 1,650 mg L⁻¹ NH₄NO₃
- 370 mg L⁻¹ MgSO₄·7H₂O
- 440 mg L⁻¹ CaCl₂·2H₂O
- 170 mg L⁻¹ KH₂PO₄
- 37,3 mg L⁻¹ Na₂EDTA
- 27,8 mg L⁻¹ FeSO₄·7H₂O
- 22,3 mg L⁻¹ MnSO₄·4H₂O
- 8,6 mg L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O
- 0,025 mg L⁻¹ CuSO₄·5H₂O
- 0,025 mg L⁻¹ CoCl₂·6H₂O
- 0,83 mg L⁻¹ KI
- 6,2 mg L⁻¹ H₃BO₃
- 0,25 Na₂MoO₄·2H₂O
- 2,0 g Casaminoácidos
- 30 g Sacarose
- 30 g Sorbitol
- Ajustar pH para 5,8 com KOH
- Avolumar para 1 L com H₂O destilada
- 4 g gelrite
- Autoclavar 121 °C por 15 mim
- Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar 0,5 mL de cinetina 1000X (conc. final de 2 mg L⁻¹), 0,5 mL de ANA 1000X (conc. final de 0,02 mg L⁻¹), 0,5 mL de Higromicina 1000X (conc. final de 50µg L⁻¹).

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

Meio de Regeneração de raiz (HF) – 500 mL

- 1,900 mg L⁻¹ KNO₃
- 1,650 mg L⁻¹ NH₄NO₃
- 370 mg L⁻¹ MgSO₄·7H₂O
- 440 mg L⁻¹ CaCl₂·2H₂O
- 170 mg L⁻¹ KH₂PO₄
- 37,3 mg L⁻¹ Na₂EDTA
- 27,8 mg L⁻¹ FeSO₄·7H₂O
- 22,3 mg L⁻¹ MnSO₄·4H₂O
- 8,6 mg L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O
- 0,025 mg L⁻¹ CuSO₄·5H₂O
- 0,025 mg L⁻¹ CoCl₂·6H₂O
- 0,83 mg L⁻¹ KI
- 6,2 mg L⁻¹ H₃BO₃
- 0,25 Na₂MoO₄·2H₂O
- 2,0 g Casaminoácidos
- 30 g Sacarose
- Ajustar pH para 5,8 com KOH
- Avolumar para 500 mL com H₂O destilada
- 2g de gelrite

Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar 0,5 mL de Higromicina 1000X (conc. final de 50µg L⁻¹).

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

7.2 Meios para o Cultivo de *Agrobacterium*

Meio AAM para Ressuspensão da *Agrobacterium* – 1 L

- 250 mg L⁻¹ MgSO₄ · 7H₂O
- 150 mg L⁻¹ CaCl₂ · 2H₂O
- 150 mg L⁻¹ NaH₂PO₄ · 2H₂O
- 3 mg L⁻¹ KCl
- 40 mg L⁻¹ Fe-EDTA
- 10 mg L⁻¹ MnSO₄ · 6H₂O
- 2.0 mg L⁻¹ ZnSO₄ · 7H₂O
- 0.025 mg L⁻¹ CuSO₄ · 5H₂O
- 0.025 mg L⁻¹ CoCl₂ · 6H₂O
- 0.75 mg L⁻¹ KI
- 3.0 mg L⁻¹ H₃BO₃
- 0.25 mg L⁻¹ Na₂MoO₄ · 2H₂O
- 500 g Casaminoácidos
- 7,5 g Glicina
- 176,7 g L-Arginina
- 900 g L-Glutamina
- 300 g L-Ácido aspártico
- 0,10 g Mio-inositol
- 1 g Ácido nicotínico
- 1 g Piridoxina HCl
- 10 Tiamina HCl
- 68,5 g Sacarose
- 36 g Glicose
- Ajustar pH para 5,2 com KOH 1M
- Avolumar para 200 mL com H₂O destilada
- Autoclavar a 121 °C por 15 min

Após autoclavagem, esfriar o meio a 60 °C e adicionar acetoseringona 19,2 mg L⁻¹.

Análises de comparação filogenéticas dos genes *Dof*.

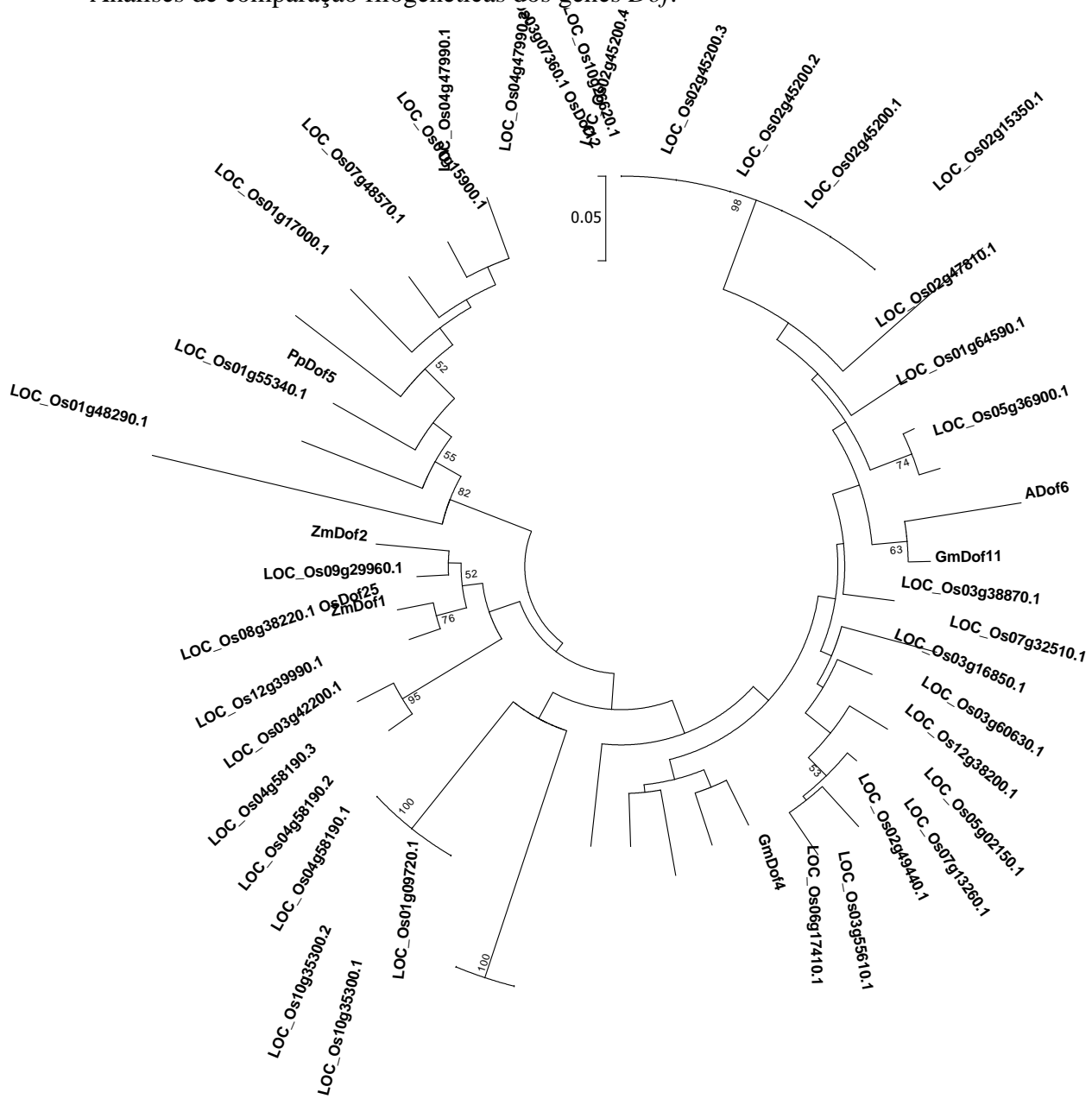


Figura 33. Árvore de similaridade filogenética dos genes *Dof* de arroz (*Oryza sativa* sp japonica) com os genes *ZmDof1*, *ZmDof2*, *AtDof6*, *GmDof4* e *GmDof11*. A árvore foi construída utilizando a sequência conservada de 50 aminoácido do domínio de ligação da proteína *Dof* utilizando o método neighbor-joining com análise de *bootstrapping* igual a 1000. Valores de bootstraps são indicados na árvore de similaridade quando superiores a 50%. Foram utilizadas as sequências das proteínas do site Plant Transcription Factor database (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>)

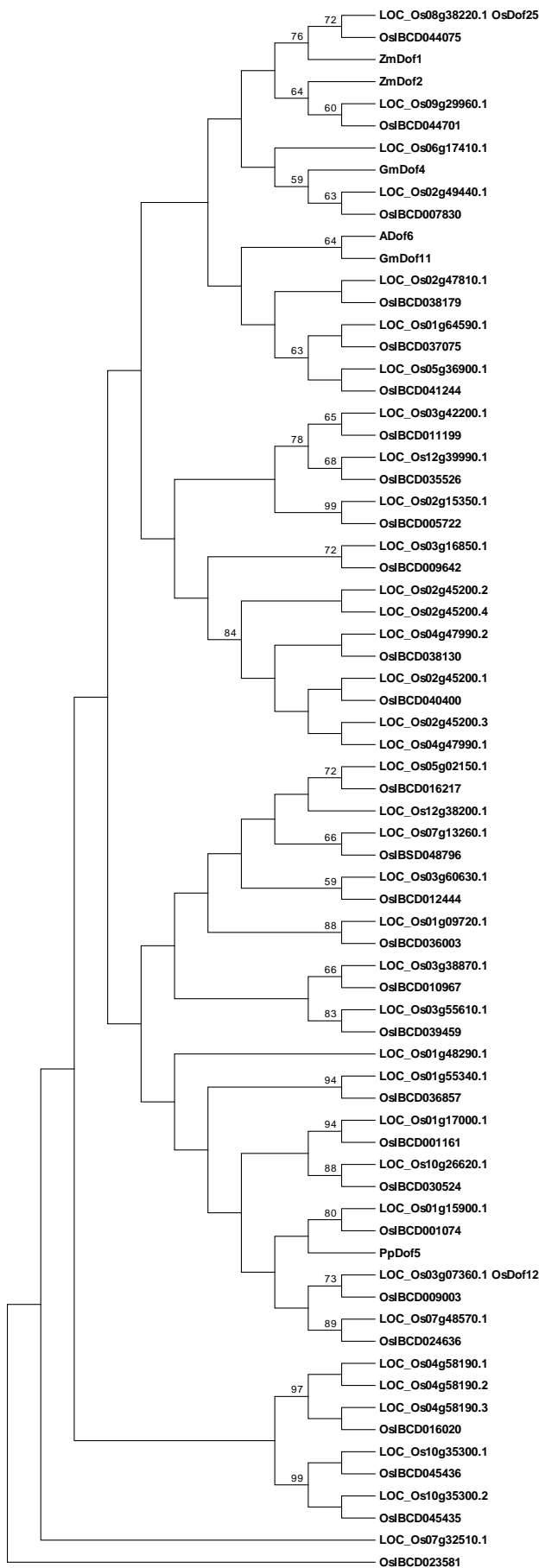


Figura 34. Árvore de similaridade filogenética dos genes Dof de arroz (*Oryza sativa* sp japonica e indica) com os genes ZmDof1, ZmDof2, AtDof6, GmDof4 e GmDof11. A árvore foi construída utilizando a sequência conservada de 50 aminoácido do domínio de ligação da proteína Dof utilizando o método neighbor-joining com análise de *bootstrapping* igual a 1000. Valores de bootstraps são indicados na árvore de similaridade quando superiores a 50%. Foram utilizadas as sequências da proteínas do site Plant Transcription Factor database (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>)

Tabela 7. Sequencia de 50 aminoácidos conservador do domínio de ligação da proteína Dof de arroz (*Oryza sativa* sp japonica e indica) e dos genes *ZmDof1*, *ZmDof2*, *AtDof6*, *GmDof4* e *GmDof11*.

>AtDof6	CPRCDSTNTKFCYNNYSLSQPRYFCKSCRRYWTGGILRNPIGGAYRK
>GmDof11	CPRCDSTNTKFCYNNYSLSQPRYFCKSCRRYWTGGTLRNVPVGGGCRK
>GmDof4	CPRCDLNTKFCYNNYNLSQPRHFCKNCRRYWTGGVLRNVPVGGGCRK
>LOC_Os01g09720.1	CPRCESTNTKFCYNNYNLAQPRHFCKACRRYWTRGGALRNVPVGGGTR-
>LOC_Os01g15900.1	CPRCNSMDTKFCYNNYNVNQPRHFCKNCQRYWTAGGTMRNVP-VGAGR
>LOC_Os01g17000.1	CPRCNSMETKFCYFNNTNVHQPRHFRCNCQRYWTAGGAMRNVP-VGAGR
>LOC_Os01g48290.1	CPRCGSRETKFCYFNNTNVRQPRHLRCRRYWTAGGALRRVASASPGRR
>LOC_Os01g55340.1	CPRCRSRDTKFCYFNNTNVNQPRHFCKACHRYWTAGGALRNVP-VGAGR
>LOC_Os01g64590.1	CPRCDSPNTKFCYNNYSLSQPRYFCKGCRRYWTGGSLRNVPVGGGCRK
>LOC_Os02g15350.1	CPRCNSIKTKFCYNNYSMAQPRYFCRECRRYWTQGGSLRNVPVGGGCRK
>LOC_Os02g45200.1	CPRCNSTNTKFCYNNYSLQQPRYFCKTCRRYWTEGGSLRNVPVGGGSRK
>LOC_Os02g45200.2	CPRCNSTNTKFCYNNYSLQQPRYFCKTCRRYWTEGGSLRNVPVGGGSRK
>LOC_Os02g45200.3	CPRCNSTNTKFCYNNYSLQQPRYFCKTCRRYWTEGGSLRNVPVGGGSRK
>LOC_Os02g45200.4	CPRCNSTNTKFCYNNYSLQQPRYFCKTCRRYWTEGGSLRNVPVGGGSRK
>LOC_Os02g47810.1	CPRCESTHTKFCYNNYSLSQPRYFCKTCRRYWTGGSLRNVPVGGGCRK
>LOC_Os02g49440.1	CPRCESTNTKFCYNNYNLSQPRHFCKSCRRYWTGGVLRNVPVGGGCRK
>LOC_Os03g07360.1	CPRCSSMDTKFCYNNYNINQPRHFCKNCQRYWTAGGAMRNVP-VGAGR
>LOC_Os03g16850.1	CPRCDSTNTKFCYNNYSLSQPRHFCKTCRRYWTRGGSLRNVPVGGGCRK
>LOC_Os03g38870.1	CPRCDSPNTKFCYNNYSLSQPRHFCKTCRRYWTGGALRNVPVGGGCRK
>LOC_Os03g42200.1	CPRCASHDTKFCYNNYNTSQPRHFRCACRRYWTGGSLRNVPVGGGSTRK
>LOC_Os03g55610.1	CPRCNSSNTKFCYNNYNLTQPRHFCKTCRRYWTGGALRNVPVGGGCRK
>LOC_Os03g60630.1	CPRCESTNTKFCYFNNTSLSQPRHFCKTCRRYWTRGGALRNVPVGGGCRK
>LOC_Os04g47990.1	CPRCNSTNTKFCYNNYSLQQPRYFCKTCRRYWTEGGSLRNVPVGGGSRK
>LOC_Os04g47990.2	CPRCNSTNTKFCYNNYSLQQPRYFCKTCRRYWTEGGSLRNVPVGGGSRK
>LOC_Os04g58190.1	CPRCRSTNTKFCYNNYSTSQPRHFRCACRRYWTHGGTLRDVPVGGASRR
>LOC_Os04g58190.2	CPRCRSTNTKFCYNNYSTSQPRHFRCACRRYWTHGGTLRDVPVGGASRR
>LOC_Os04g58190.3	CPRCRSTNTKFCYNNYSTSQPRHFRCACRRYWTHGGTLRDVPVGGASRR
>LOC_Os05g02150.1	CPRCDSTNTKFCYFNNTSLSQPRHFRCACRRYWTRGGALRNVPVGGGYRR
>LOC_Os05g36900.1	CPRCESPNTKFCYNNYSLSQPRYFCKGCRRYWTGGSLRNVPVGGGCRK
>LOC_Os06g17410.1	CPRCDSSNTKFCYNNYNLSQPRHFCKACRRYWTGGLLRNVPVGGGCRK
>LOC_Os07g13260.1	CPRCDSTNTKFCYFNNTSLTQPRHFCKACRRYWTRGGALRNVPVGGGFRR
>LOC_Os07g32510.1	CPRCDSANTKFCYNNYSLSQPRHFCKACKRYWTRGGTLRNVPVGGGCRK
>LOC_Os07g48570.1	CPRCNSMDTKFCYNNYNINQPRHFCKSCQRYWTAGGSMRNLP-VGAGR
> OsDof25	CPRCESRDTKFCYNNYNTSQPRHFCKCCRRYWTGGTLRNVPVGGGTRK
>OsDof26	CPRCESRDTKFCYNNYNTSQPRHFCKSCRRYWTGGSLRNVPVGGGSRK
>LOC_Os10g26620.1	CPRCSSMDTKFCYFNNTNVNQPRHFCKHCQRYWTAGGAMRNVP-VGAGR
>LOC_Os10g35300.1	CPRCGSANTKFCYNNYSRTQPRYLCKACRRHWTEGGTLRDVPVGGGRKN
>LOC_Os10g35300.2	CPRCGSANTKFCYNNYSRTQPRYLCKACRRHWTEGGTLRDVPVGGGRKN
>LOC_Os12g38200.1	CPRCDSTNTKFCYFNNTSLSQPRHFCKACRRYWTRGGALRNVPVGGGCRK
>LOC_Os12g39990.1	CPRCASRDTKFCYNNYNTAQPRHFRCACRRYWTGGSLRNVPVGGGSTRK
>OsIBCD001074	CPRCNSMDTKFCYNNYNVNQPRHFCKNCQRYWTAGGTMRNVP-VGAGR
>OsIBCD001161	CPRCNSMETKFCYFNNTNVHQPRHFRCNCQRYWTAGGAMRNVP-VGAGR

>OsIBCD005722	CPRCNSIKTKFCYNNYSMAQPRYFCRECRRYWTQGGSLRNPVGGGCRK
>OsIBCD007830	CPRCESTNTKFCYNNYNLSQPRHFCKSCRRYWTKGGVLRNPVGGGCRK
>OsIBCD009003	CPRCSSMDTKFCYNNYNINQPRHFCKNCQRYWTAGGAMRNVP-VGAGR
>OsIBCD009642	CPRCDSTNTKFCYNNYSLSQPRHFCKTCRRYWTRGGSLRNPVGGGCRK
>OsIBCD010967	CPRCDSPTNTKFCYNNYSLSQPRHFCKTCRRYWTKGGALRNPVGGGCRK
>OsIBCD011199	CPRCASHDTKFCYNNYNNTSQPRHFCKRACRRYWTLGGSLRNPVGGGSTRK
>OsIBCD012444	CPRCESTNTKFCYFNNYSLSQPRHFCKTCRRYWTRGGALRNPVGGGCRK
>OsIBCD016020	CPRCRSTNTKFCYNNYSTSQPRHFCKRACRRYWTHGGTLRDVPVGGASRR
>OsIBCD016217	CPRCDSTNTKFCYFNNYSLSQPRHFCKRACRRYWTRGGALRNPVGGGYRR
>OsIBCD023581	-----MARCYHDSTTTPLPRHFCKACKRYWTRGGTLRNPVGGGCRK
>OsIBCD024636	CPRCNSMDTKFCYNNYNINQPRHFCKSCQRYWTAGGSMRNLN-VGAGR
>OsIBCD030524	CPRCSSMDTKFCYFNNYNVNQPRHFCKHCQRYWTAGGAMRNVP-VGAGR
>OsIBCD035526	CPRCASRDTKFCYNNYNTAQPRHFCKRACRRYWTLGGSLRN-----
>OsIBCD036003	CPRCESTNTKFCYNNYNLAQPRHFCKACRRYWTRGGALRNPVGGGTR-
>OsIBCD036857	CPRCRSRTDKFCYFNNYNVNQPRHFCKACHRYWTAGGALRNP-VGAGR
>OsIBCD037075	CPRCDSPTNTKFCYNNYSLSQPRYFCKGCRRYWTKGGSLRNPVGGGCRK
>OsIBCD038130	CPRCNSTNTKFCYNNYSLQQPRYFCKTCRRYWTEGGSLRNPVGGGSRK
>OsIBCD038179	CPRCESTHTKFCYNNYSLSQPRYFCKTCRRYWTKGGSLRNPVGGGCRK
>OsIBCD039459	CPRCNSSNTKFCYNNYNLTQPRHFCKTCRRYWTKGGALRNPVGGGCRK
>OsIBCD040400	CPRCNSTNTKFCYNNYSLQQPRYFCKTCRRYWTEGGSLRNPVGGGSRK
>OsIBCD041244	CPRCESPNTKFCYNNYSLSQPRYFCKGCRRYWTKGGSLRNPVGGGCRK
>OsIBCD044075	CPRCESRDTKFCYNNYNNTSQPRHFCKCRRYWTKGGTLRNPVGGGTRK
>OsIBCD044701	CPRCESRDTKFCYNNYNNTSQPRHFCKSCRRYWTKGGSLRNPVGGGSRK
>OsIBCD045435	CPRCGSANTKFCYNNYSRTQPRYLCKACRRHWTEGGTLRDVPVGGGRKN
>OsIBCD045436	CPRCGSANTKFCYNNYSRTQPRYLCKACRRHWTEGGTLRDVPVGGGRKN
>OsIBSD048796	CPRCDSTNTKFCYFNNYSLTQPRHFCKACRRYWTRGGALRNPVGGGFRR
>PpDof5	CPRCDSLETKFCYNNYNINQPRHFCKNCQRYWTAGGTLRNP-VGAGR
>ZmDof1	CPRCASRDTKFCYNNYNNTSQPRHFCKGCRRYWTKGGTLRNPVGGGTRK
>ZmDof2	CPRCGSRDTKFCYNNYNNTSQPRHLCKSCRRYWTKGGSLRNPVGGGTRK