

UFRRJ

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

DISSERTAÇÃO

**Silenciamento Gênico por AmiRNA do
Transportador *OsAMT1.3* e seu Efeito sobre a
Eficiência de Absorção de Amônio em Arroz (*Oryza
sativa* L.)**

Marcela Jacques de Lemos Neves

2014



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

**SILENCIAMENTO GÊNICO POR AMIRNA DO TRANSPORTADOR
OSAMT1.3 E SEU EFEITO SOBRE A EFICIÊNCIA DE ABSORÇÃO
DE AMÔNIO EM ARROZ (*Oryza Sativa* L.)**

MARCELA JACQUES DE LEMOS NEVES

Sob a Orientação da Professora
Sonia Regina de Souza

e Co-orientação do Professor
Leandro Azevedo Santos

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

Seropédica, RJ
Maio de 2014

633.18
N518s
T

Neves, Marcela Jacques de Lemos, 1983-
Silenciamento gênico por amiRNA do transportador OSAMT1.3 e seu efeito sobre a eficiência de absorção de amônio em arroz (*Oryza Sativa* L.) / Marcela Jacques de Lemos Neves. – 2014.
34 f.: il.

Orientador: Sonia Regina de Souza.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, 2014.
Bibliografia: f. 29-34.

1. Arroz – Cultivo – Teses. 2. Arroz – Genética - Teses. 3. Silenciamento gênico – Teses. 4. Amônio – Absorção e adsorção – Teses. 5. Plantas – Efeito do nitrogênio – Teses. 6. Expressão gênica – Teses. I. Souza, Sonia Regina de, 1962- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo. III. Título.

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

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

MARCELA JACQUES DE LEMOS NEVES

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 30/05/2014

Sonia Regina de Souza. Dra. UFRRJ
Orientadora

Munir Mauad. Dr. UNESP

Altamiro Souza de Lima Ferraz Júnior. Dr. UFRRJ

DEDICATÓRIA

A Deus, pela presença, por me iluminar e dar forças em todos os momentos da minha vida para que alcançasse os objetivos.

A minha querida mãe Zenilda Augusta Jacques de Souza e ao meu padrasto Wellington Souza do Nascimento que sempre estiveram ao meu lado e me deram apoio incondicional.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Antes de todos e acima de tudo, a Deus que esteve sempre presente em todos os momentos da minha vida.

A minha família que acreditou no meu potencial e me incentivou a seguir essa carreira profissional.

Ao meu amado, Marcus Sperandio, pelo incentivo, ajuda nos experimentos, atenção, amor e carinho durante esse período.

À professora Sonia Regina de Souza e a Elvia Marian Lis Martinez Stark pela oportunidade de iniciar minha vida científica ainda na graduação, orientação, ensinamentos, amizade e carinho durante esse tempo de convivência.

Ao professor Leandro Azevedo Santos pela orientação, amizade e apoio durante a execução dos experimentos e análises.

Ao professor Manlio Silvestre Fernandes por me ensinar o que é fazer pesquisa.

Aos amigos do laboratório, Vinícius Miranda de Souza, Rafael Passos Rangel, Leilson Arruda por me ajudarem e por esclarecerem minhas dúvidas sempre que precisei.

Aos meus eternos amigos Diego de Mello Conde de Brito e Osmário José Lima de Araújo que são como meus irmãos.

À minha grande amiga Luiziane Soares Alves pela convivência, pelos conselhos e por me acalmar em vários momentos dessa jornada.

Ao CPGA-CS, em especial ao Marquinhos, Michele.

À FAPERJ pelo auxílio financeiro, CNPQ, CAPES e PETROBRÁS pelo fomento.

A todos que de alguma forma ajudaram a elaborar este trabalho.

BIOGRAFIA

Marcela Jacques de Lemos Neves nasceu em 11 de maio de 1983 na cidade de Paracambi (RJ). Fez o ensino fundamental e ensino médio no Colégio Fernando Costa. Em 2002 ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica por três anos trabalhando no Laboratório de Bioquímica de Plantas. Em 2012 foi aprovada para o mestrado no Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo na UFRRJ, desenvolvendo trabalhos relacionados à absorção de amônio, sob a orientação da professora Sonia Regina de Souza.

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Sequências dos iniciadores (primers) usados nas reações de PCR para montagem do microRNA artificial (amiRNA), com o objetivo de silenciar o gene *OsAMT1.3*. O amiRNA final após o processamento possuía a seguinte sequência TGTAAACCCGTACCACGCAA.....**9**
- Tabela 2.** Protocolo das reações de PCR usado para a construção do amiRNA no vetor pNW55.**9**
- Tabela 3.** Massa fresca de raiz e parte aérea e relação raiz/parte aérea (R/PA) das linhagens mutantes L1, L2 e L6 silenciando o gene *OsAMT1.3* (UBIL:amiRNA-*OsAMT1.3* e controle IRS154 (vetor vazio)**17**

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Árvore de similaridade obtida pelo método de agrupamento Neighbor-Joining com o programa MEGA (Multi Evolutionary Genomic Analysis). Comparação entre as seqüências das proteínas dos transportadores de amônio (AMTs) de arroz (*OsAMT*) e *Arabidopsis* (*AtAMT*). **5**
- Figura 2.** Ilustração do sistema de condução do experimento na câmara de crescimento utilizando plantas de arroz das linhagens transformadas 1, 2, 5, 6, 8 (com o amiRNA) e IRS 154 (vetor vazio). Aos 18 DAG as plantas foram colocadas em solução nutritiva desprovida de N e aos 21 DAG as plantas foram coletadas. **11**
- Figura 3.** Ilustração do sistema de condução do experimento na câmara de crescimento utilizando plantas de arroz das linhagens 1, 2, 6 e IRS 154. Aos 31 DAG foi aplicado os tratamentos de 0,15mM de $N-NH_4^+$, 2,0 mM de $N-NH_4^+$ e sem fonte de N. Após 3 horas da aplicação dos tratamento as plantas foram coletadas. **12**
- Figura 4.** Valores de massa fresca de raiz e de parte aérea das linhagem transformadas L1, L2, L5, L6 e L8 (UBIL:amiRNA-*OsAMT1.3*) e planta controle IRS154 (planta transformada com o vetor vazio) para avaliar diferenças de crescimento e selecionar as linhagens para análise do nível de expressão do transportador *OsAMT1.3*. **14**
- Figura 5.** Análise de PCR para detecção do gene da higromicina fosfotransferase usando DNA extraído das plantas transformadas e não transformadas (WT), permitindo identificar as plantas que possuem o vetor silenciando o transportador *OsAMT1.3*. Onde as linhagens são representadas pela letra L e suas repetições pela letra r. C+: controle positivo usando o vetor IRS154 vazio. C-: controle negativo usando plantas tipo selvagem. **15**
- Figura 6.** Expressão do gene *OsAMT1.3* nas linhagens de plantas transformadas com amiRNA (UBIL:amiRNA-*OsAMT1.3*) para silenciar o gene *OsAMT1.3* (L1, L2 e L6) e na planta controle IRS transformadas com vetor vazio. **16**
- Figura 7.** Fluxo de NH_4^+ nas linhagens mutantes L1, L2 e L6 silenciando o gene *OsAMT1.3* (UBIL:amiRNA-*OsAMT1.3*) e plantas controle IRS154 (vetor vazio) ressupridas com 0,15 mM de $N-NH_4^+$ e supridas com 2,0 mM de $N-NH_4^+$ **18**
- Figura 8.** Expressão do gene *OsAMT1.3* nas linhagens de plantas transformadas com amiRNA para silenciar o gene *OsAMT1.3* (L1, L2 e L6) (UBIL:amiRNA-*OsAMT1.3*) e na planta controle IRS transformadas com vetor vazio com os seguintes tratamentos: Sem N por três dias, ressuprimento com 0,15 mM de $N-NH_4^+$ e 2,0 mM de $N-NH_4^+$ **19**
- Figura 9.** Expressão dos genes *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2* nas linhagens de plantas transformadas com amiRNA para silenciar o gene *OsAMT1.3* (L1, L2 e L6) e na planta controle IRS transformadas com vetor vazio com os seguintes tratamentos: Sem N por três dias, ressuprimento com 0,15 mM de $N-NH_4^+$ e 2,0 mM de $N-NH_4^+$ **20**
- Figura 10.** Alinhamento dos genes da família *OsAMT1* com o reverso complementar do amiRNA para silenciar o gene *OsAMT1.3*. Bases marcadas de preto no gene não pareiam com o amiRNA. Bases marcadas em vermelho indicam o sítio de clivagem da enzima *Dicer-like 1* (DCL1). Em verde indica a região de anelamento do amiRNA no mRNA. Alinhamento feito no programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>). **21**
- Figura 11.** Teores de $N-NH_4^+$ nas linhagens de plantas transformadas com amiRNA para silenciar o gene *OsAMT1.3* (L1, L2 e L6) e na planta controle IRS transformadas com vetor vazio com os seguintes tratamentos: Sem N por três dias, ressuprimento com 0,15 mM de $N-NH_4^+$ e 2,0 mM de $N-NH_4^+$ **22**

- Figura 12.** Teores de N-amino livre nas linhagens de plantas transformadas com amiRNA para silenciar o gene *OsAMT1.3* (L1, L2 e L6) e na planta controle IRS transformadas com vetor vazio com os seguintes tratamentos: Sem N por três dias, ressuprimento com 0,15 mM de N-NH₄⁺ e 2,0 mM de N-NH₄⁺. **23**
- Figura 13.** Teores de açúcares livres nas linhagens de plantas transformadas com amiRNA para silenciar o gene *OsAMT1.3* (L1, L2 e L6) e na planta controle IRS transformadas com vetor vazio com os seguintes tratamentos: Sem N por três dias, ressuprimento com 0,15 mM de N-NH₄⁺ e 2,0 mM de N-NH₄⁺. **25**

LISTA DE SÍMBOLOS

AGO 1	Argonauta 1
AMT	Transportador de amônio (<i>Ammonium Transporter</i>)
AMT1	Família de genes para os transportadores de NH_4^+ de alta afinidade
AMT2	Família de genes para os transportadores de NH_4^+ de Baixa afinidade
AS	Asparagina sintetase
DAG	Dias Após a Germinação
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
GDH	Glutamato desidrogenase
GOGAT	Glutamina oxidoglutarato aminotransferase
GS	Glutamina sintetase
HATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidade (<i>High Affinity Transport System</i>)
IRS 154	Vetor cedido pelo CIRAD (França), sendo a sigla <i>Institut de Recherche Scientifique</i>
LATS	Sistema de Transporte de Baixa Afinidade (<i>Low Affinity Transport System</i>)
miRNA	Micro RNA
OsAMT 1.3	Transportador de NH_4^+ de alta afinidade em arroz
RNAi	RNA interferente
RNAm	Ácido Ribonucléico mensageiro
UBIL	Ubiquitina de milho
WMD3	Web MicroRNA Designer

RESUMO

JACQUES, Marcela de Lemos Neves. **Silenciamento gênico por miRNA do transportador *OsAMT1.3* e seu efeito sobre a eficiência de absorção de amônio (*Oryza sativa* L.).** 2014. 34f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do silenciamento do gene do transportador *OsAMT1.3* em arroz sobre a habilidade das plantas em absorver o N-NH_4^+ através do sistema de alta afinidade, bem como os reflexos sobre o metabolismo de nitrogênio. Para o silenciamento do gene *OsAMT1.3* foi usada a tecnologia do miRNA artificial (amiRNA). Para tanto, a sequência codante do gene (cds) *OsAMT1.3* é inserida no sistema WMD3 que indica sequências de amiRNA's para silenciar o próprio *OsAMT1.3*. A inserção do amiRNA foi feita por PCR usando o vetor pNW55 como molde. O miRNA foi inserido no vetor IRS154 por corte e ligação usando a enzima T4 DNA ligase. O produto da ligação foi introduzido em *E. coli* por eletroporação. Após a transformação de arroz da variedade Nipponbare mediada por *Agrobacterium*. A seleção das plantas transformadas foi feita com o antibiótico Higromicina. No total foram obtidas 14 linhagens transformadas. Para confirmar que as plantas mutantes possuíam a construção, foi realizado o teste com a folha bandeira em solução de higromicina. Seis linhagens apresentaram boa produção de sementes e houve uma linhagem com crescimento anormal. Após a multiplicação das linhagens em casa de vegetação, foram selecionadas as linhagens L1, L2 e L6 para os experimentos de análise dos efeitos do silenciamento do gene *OsAMT1.3*. Primeiramente, as linhagens selecionadas foram avaliadas quanto ao nível de silenciamento do gene *OsAMT1.3*. As linhagens de arroz transformadas apresentaram maior nível de silenciamento do gene *OsAMT1.3* quando comparadas às plantas controle, no entanto, diferentes níveis de silenciamento foram observados. A linhagem L1 apresentou menor nível de silenciamento do gene *OsAMT1.3*, enquanto L2 e L6 apresentaram maior silenciamento. As linhagens L1, L2 e L6 e a planta controle IRS (transformada com o vetor vazio) foram cultivadas em câmara de crescimento até os 30 dias após a germinação, com a aplicação dos seguintes tratamentos: sem N por três dias, ressuprimento com 0,15 mM de N-NH_4^+ após três dias de privação de N (baixa dose) e 2,0 mM de N-NH_4^+ constante (alta dose). As linhagens L1, L2 e L6 apresentaram menor absorção de NH_4^+ com 0,15 mM de N-NH_4^+ quando comparadas com as plantas controle (IRS), enquanto as plantas cultivadas com 2,0 mM de N-NH_4^+ não apresentaram diferenças na absorção de NH_4^+ . A expressão dos genes dos transportadores de NH_4^+ *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* foi induzido pelo tratamento com 0,15 mM de N-NH_4^+ nas plantas controle (IRS), enquanto as linhagens transformadas apresentaram repressão dos genes *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*. A menor absorção de NH_4^+ com 0,15 mM de N-NH_4^+ causou menor nível de N-NH_4^+ e N-amino nas raízes das linhagens transformadas, enquanto nas plantas com 2,0 mM de N-NH_4^+ houve pouca alteração nos conteúdos de N-NH_4^+ e N-amino. Os resultados indicam que o silenciamento do gene *OsAMT1.3* provoca regulação negativa dos transportadores *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2*, alterando a absorção de NH_4^+ . Apesar do gene *OsAMT1.3* ser menos expresso que os genes *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2*, o transportador *OsAMT1.3* pode estar envolvido na eficiência de absorção em baixas doses de NH_4^+ .

Palavras-chave: Transportador de amônio. Expressão gênica. MicroRNA artificial.

ABSTRACT

JACQUES, Marcela de Lemos Neves. **Transporter *OsAMT1.3* gene silencing by miRNA and its effects in the ammonium efficiency uptake (*Oryza sativa* L.)** 2014. 34p. Dissertation (Master Science in Agronomy - Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2014.

The main goal of this study was evaluate the effect of downregulation of the ammonium transporter *OsAMT1.3* in the ammonium uptake through the high affinity system, as well as the effects on nitrogen metabolism. To perform the *OsAMT1.3* gene silencing, it was used the artificial micro RNA (amiRNA) technology. In this system, the *OsAMT1.3* coding region sequence (cgs) is inserted in W marcelaMD3 website and putatives amiRNAs to silencing *OsAMT1.3* were made. The amiRNA was inserted by PCR using the pNW55 vector as template. The amiRNA was inserted in the IRS154 vector using the T4 DNA ligase. The IRS154 plus amiRNA was cloned in the *E. coli* by electroporation. After rice transformation of Nipponbare variety through *Agrobacterium* and Hygromycin selection, 14 lineages were obtained. Six lineages showed high seed production and only one lineage with abnormal growth. After seed production in a greenhouse, the lineages L1, L2 and L6 were selected to further experiments evaluating the effects of *OsAMT1.3* downregulation. First, the lineages selected were evaluated about the levels of *OsAMT1.3* downregulation. The rice lineages transformed with amiRNA showed lower level of *OsAMT1.3* expression compared to control plants, however, different levels of *OsAMT1.3* downregulation was observed. The lineage L1 showed lower levels of *OsAMT1.3* downregulation, L2 and L6 showed higher levels of *OsAMT1.3* downregulation. The lineages L1, L2 and L6 as well as IRS control plant (transformed with empty vector) were grown in growth chamber at 30 days after germination, and the treatments used were: N starvation for three days, resupply with 0.15 mM of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (low level) and 2.0 mM of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (high level). The lineages L1, L2 and L6 showed lower NH_4^+ uptake with 0.15 mM of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ compared to control plants (IRS), on the other hand, the plants grown with 2.0 mM of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ did not show NH_4^+ uptake differences, except L1. The expression of *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* and *OsAMT1.3* ammonium transporters were upregulated with 0.15 mM of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ in the control plants (IRS); in the lineages L1, L2 and L6 showed downregulation of the *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* and *OsAMT1.3* genes. The lower NH_4^+ uptake with 0.15 mM of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ resulted in lower levels of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and Amino-N in the roots in the lineages, while the $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and Amino-N in the plants grown with 2.0 mM of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ was minimally changed. The results indicate that *OsAMT1.3* downregulation leads to *OsAMT1.1* and *OsAMT1.2* downregulation as well, decreasing the NH_4^+ uptake. Despite the *OsAMT1.3* lower expression compared to *OsAMT1.1* and *OsAMT1.2*, the *OsAMT1.3* transporter may be involved in the nitrogen uptake efficiency in low levels of NH_4^+ .

Keywords: Ammonium transporter. Gene expression. Artificial microRNA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 O Nitrogênio no Cultivo de Arroz	3
2.2. Absorção e Transportadores de Amônio (AMT).....	4
2.3. Silenciamento Gênico via MicroRNA.....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. Construção do Cassete de Expressão para o Silenciamento do Gene <i>OsAMT1.3</i>	9
3.2. Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10
3.3. Transformação de Arroz Mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10
3.4. Avaliação do Nível de Expressão do Transportador <i>OsAMT1.3</i>	11
3.5. Avaliação dos Efeitos do Silenciamento do Transportador <i>OsAMT1.3</i> na Absorção de NH_4^+	11
3.5.1. Análises das frações nitrogenadas solúveis e açúcares solúveis	12
3.6. Análise Estatística.....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.2. Avaliação do Nível de Expressão do Transportador <i>OsAMT1.3</i>	14
4.3. Avaliação dos Efeitos do Silenciamento do gene <i>OsAMT1.3</i> na Absorção de NH_4^+ , Expressão Gênica e Frações Solúveis.....	16
5. CONCLUSÕES.....	27
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um cereal consumido principalmente pelo homem em todo o mundo. Destacando-se tanto na produção como na área de cultivo, desempenhando papel fundamental no aspecto social e econômico. Com grande importância nos países em desenvolvimento. A Ásia e Oceania representam 70% da população mundial e aproximadamente dois terços da população subnutrida. No Brasil o arroz também é uma importante fonte de alimentação, principalmente para a população de baixa renda. Fornece 20% da energia e 15% da proteína necessária ao homem, sendo considerada a espécie com grande potencial para combate à fome mundial. É alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas e, há estimativas de que até 2050, ocorrerá uma demanda para atender o dobro desta população (EMBRAPA, 2005).

Na produção de arroz destacam-se no Brasil os estados do RS, MT e MA. O RS representa mais de 70% da produção nacional de arroz (CONAB, 2013), predominando o cultivo de arroz alagado com maior emprego de insumos, técnicas agronômicas para alta produção e variedades de arroz responsivas à adubação. Por outro lado, no Maranhão predomina o cultivo de arroz por agricultores familiares, praticamente sem uso de insumos, ocorrendo a dependência dos nutrientes presentes no solo.

No cultivo de plantas, principalmente quando o interesse é o aumento do teor de proteína e rendimento de grãos, faz-se o uso de grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados. Entretanto, o uso destas grandes quantidades de adubos nitrogenados é ineficiente, uma vez que apenas um terço do fertilizante aplicado é realmente absorvido pelas plantas, e de 50 a 70% é perdido a partir do sistema planta-solo. O fato dos adubos nitrogenados serem associados ao alto custo de produção e o seu uso em grandes quantidades estar associado a danos ambientais, cada vez mais se busca novas técnicas, a fim de melhorar a eficiência do uso de nitrogênio (EUN) (SHRAWAT AND GOOD,2008).

O nitrogênio (N) é dos elementos essenciais mais requeridos pelas plantas, por estar envolvido na produção de proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, entre outros, sendo um fator limitante ao crescimento. A deficiência de N apresenta fortes implicações no crescimento e produção do arroz, interferindo no número de perfilhos, na produção de parte aérea, no número e no enchimento de grãos (FAGERIA et al.,2007).

Os íons amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) são as formas de N predominantemente disponíveis para as plantas. Em cultivo de arroz alagado a principal forma de N disponível é o amônio, pois o nitrato em condições anaeróbicas é perdido por desnitrificação. Segundo, LEA e AZEVEDO (2006) as plantas geralmente não acumulam altos níveis de NH_4^+ devido a sua toxicidade quando em altas concentrações dentro da planta.

A absorção de NH_4^+ ocorre através de um sistema bifásico. Quando as concentrações de NH_4^+ no meio externo (solução do solo ou solução nutritiva) são maiores ou iguais a 1 mM opera um sistema de absorção de baixa afinidade (LATS), e em concentrações abaixo desta opera um sistema de alta afinidade (HATS), que são representados, respectivamente, pelas famílias AMT2 e AMT1 (transportadores de amônio, AMT: *Amonium transporter*). As proteínas de membranas que são responsáveis pelo transporte de NH_4^+ são codificadas por famílias multigênicas que apresentam grande variação dos parâmetros cinéticos de absorção, fato que demonstra que as plantas possuem uma plasticidade para absorção de pequenas quantidades de N, que foram adquiridas durante um longo período da evolução das plantas superiores.

O entendimento dos componentes da absorção de NH_4^+ é vital para a nutrição de plantas. Entre os transportadores de NH_4^+ , os membros da família OsAMT1 são de particular

importância por atuarem na absorção de NH_4^+ em baixas doses. OsAMT1.1 é o membro da família de alta afinidade melhor caracterizado por ser mais expresso nas raízes de arroz, sendo considerado o principal transportador de NH_4^+ de alta afinidade. OsAMT1.2 está presente na região do cilindro central e está envolvido no fluxo interno de NH_4^+ na raiz (SONODA et al., 2003b). OsAMT1.3 está presente na camada de células da epiderme, raízes laterais e cilindro central (FERREIRA, 2013) e possui alta variação de expressão dependendo do status de N na planta e da concentração de NH_4^+ no solo. A alta expressão do gene *OsAMT1.3* em variedades de arroz adaptadas a baixos níveis de NH_4^+ mostra que esse transportador pode desempenhar papel fundamental na absorção de NH_4^+ (SOUZA, 2010).

Entre as estratégias para o estudo da função de um determinado gene destaca-se a superexpressão e o silenciamento gênico. A superexpressão apresenta limitações como controle pós-transcricional e pós-traducional, sendo o silenciamento gênico uma alternativa para o estudo da função de um gene por diminuir a quantidade da proteína/enzima alvo. Desse modo, no presente trabalho foi realizado o silenciamento do gene *OsAMT1.3* usando a tecnologia do microRNA artificial (amiRNA) para caracterizar a importância do transportador OsAMT1.3 na absorção de NH_4^+ .

FERREIRA (2013) utilizando as proteínas repórteres GUS/GFP verificou que a expressão do *OsAMT1.3* está localizada na epiderme da raiz e no cilindro central. Esse autor também observou que o *OsAMT1.3* é expresso quando da emissão de raízes laterais e na pontas das raízes, indicando o seu envolvimento na absorção de amônio.

LIMA et al (2010) avaliando a influência do transportador de NH_4^+ em arábida na emissão de raízes laterais observaram que somente as plantas transformadas onde o transportador AMT1.3 foi silenciado ocorreu uma redução na emissão de raízes laterais, esse resultado indica que o transportador AMT1.3 pode estar envolvido na mudança da arquitetura radicular das plantas.

Dessa maneira, a hipótese deste trabalho é que o transportador OsAMT1.3 está envolvido na absorção de NH_4^+ em baixas concentrações e tem influência sobre o metabolismo e essa característica pode contribuir para a eficiência de absorção de nitrogênio em arroz. Assim, esta dissertação teve por objetivo avaliar o efeito do silenciamento do transportador *OsAMT1.3* sobre a habilidade de plantas de arroz absorverem o N- NH_4^+ pelo sistema de alta afinidade, bem como seus reflexos no metabolismo do nitrogênio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Nitrogênio no Cultivo de Arroz

O nitrogênio inorgânico, como NO_3^- e NH_4^+ , são as principais formas disponíveis para as plantas, sendo a primeira predominante em solos aerados e a segunda em solos alagados. As duas formas podem ser usadas pelas plantas em diferentes proporções dependendo do genótipo ou espécie (EPSTEIN & BLOON, 2006).

Um dos elementos que mais influencia na produção do arroz é o N, por ser requerido pela cultura em grandes quantidades principalmente quando o objetivo é produção de grãos. O N é componente da clorofila, responsável pelo incremento da área foliar da planta, aumentando a eficiência de interceptação da radiação solar, da taxa fotossintética, e consequentemente, exerce grande influência na produtividade (FAGERIA et al., 2003). Esta cultura exige o N durante todo o período vegetativo, porém em duas fases fisiológicas deve-se ter uma atenção redobrada quanto à disponibilidade de N, no início do perfilhamento e no início da diferenciação do primórdio floral (ARAÚJO et al., 2012). O suprimento adequado de N nestas duas fases fisiológicas do arroz implica em maior número de perfilhos férteis, consequentemente, maior produção de grãos.

Segundo ALI et al (2007) o fornecimento de N usando somente como fonte o NO_3^- pode ocasionar numa redução da produção de matéria seca e grãos em plantas que possuem baixa capacidade de reduzir o NO_3^- , uma vez que para ser incorporado a compostos orgânicos se faz necessário a sua redução. Já quando a disponibilidade é o NH_4^+ , a sua alta concentração nos tecidos vegetais, pode provocar efeitos negativos sobre o crescimento radicular e da parte aérea devido ao seu efeito tóxico (ARAÚJO et al., 2012). Diversos estudos em arroz sugerem que o suprimento combinado de NH_4^+ e NO_3^- melhora o aproveitamento do N fornecido favorecendo o desenvolvimento de parte aérea e raízes quando comparado com o suprimento isolado das duas fontes de N (DUAN et al., 2006, DUAN et al., 2007).

O cultivo de arroz no Brasil é feito em áreas de várzeas e terras altas em vários tipos de sistemas de produção. A cultura de arroz alagado contribui com cerca de 68% da produção brasileira, ocupando aproximadamente 31% da área cultivada no país (FAGERIA et al., 2007). O arroz é considerado uma planta tolerante ao NH_4^+ uma vez que este íon é predominante em solos alagados. No cultivo alagado pode ocorrer perda do N aplicado em cobertura com ureia através da volatilização de amônia, ou seja, ocorre a passagem da amônia para a atmosfera, de acordo com a seguinte reação: $\text{N-NH}_4^+ + \text{OH}^-$ (aquoso) $\rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{N-NH}_3$. Outros fatores também devem ser considerados para a volatilização da amônia, como a taxa de evaporação, o poder tampão, entre outros (DUARTE et al., 2006). Já NO_3^- por sua vez não tem recebido tanta importância como fonte de N no cultivo de arroz por inundação, devido a sua disponibilidade ser reduzida em solo alagado, uma vez que é convertido em suas formas voláteis (NO , N_2O e N_2) nos locais anaeróbios do solo e por ser perdido para a atmosfera (KRONZUCKER et al., 2000; KIRK & KRONZUCKER, 2005 citado por HOLZSCHUH et al., 2011).

FAGERIA & BALIGAR, (2001) afirmam que a eficiência de recuperação de N no cultivo alagado está por volta de 40%. Portanto, cada vez mais se faz necessário o uso adequado da adubação nitrogenada com o objetivo não só de aumentar a eficiência de recuperação pela cultura como também aumentar a produtividade, diminuindo assim o custo de produção e reduzindo os problemas de poluição ambiental que está associada à adubação nitrogenada em excesso (FAGERIA et al., 2007).

Além de adotar essas práticas, o uso de cultivares que são eficientes na absorção e utilização de N pode ser uma estratégia de grande importância para aumentar a eficiência do

uso de N (EUN). Por exemplo, variedades de arroz adaptadas a baixos teores de NH_4^+ possuem maior expressão dos transportadores de NH_4^+ de alta afinidade. SOUZA (2010) e RANGEL (2014) mostraram que variedades mais eficientes na absorção de NH_4^+ apresentam maior expressão dos genes *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*.

2.2. Absorção e Transportadores de Amônio (AMT)

O NO_3^- e o NH_4^+ são as principais formas de nitrogênio absorvidas pelo sistema radicular das plantas e sua disponibilidade varia de acordo com as variáveis do ecossistema. Portanto, em solos aerados, a forma de N disponível em maior quantidade é o NO_3^- enquanto que em ecossistemas alagados o NH_4^+ é dominante (ZHU et al, 2011).

A absorção de NH_4^+ e NO_3^- ocorre por intermédio de proteínas transportadoras que estão presentes na membrana plasmática. A absorção do nitrato se dá por um mecanismo simporte 2H^+ contra um gradiente de potencial eletroquímico, já o NH_4^+ é absorvido por um mecanismo uniporte a favor de uma gradiente de potencial eletroquímico (MARSCHNER, 1995).

Por ter efeito tóxico em altas concentrações no interior das plantas, o NH_4^+ absorvido ou proveniente da redução do NO_3^- é imediatamente incorporado a esqueletos de carbono por meio das enzimas da via glutamina sintetase - glutamato sintase (GS-GOGAT). Tanto a redução do NO_3^- quanto a assimilação do NH_4^+ requerem energia na forma de ATP e poder redutor como o NADH, o NAD(P)H e a Ferredoxina reduzida, bem como esqueletos de carbono provindos do ciclo de Krebs, como o α -cetogluturato.

De acordo com LEA e AZEVEDO (2006) os transportadores de amônio são codificados por uma família multigênica com ampla variação na cinética de absorção, o que mostra uma flexibilidade em absorver pequenas quantidades nitrogênio. Assim como a absorção do NO_3^- , a absorção do NH_4^+ é feita por um sistema bifásico. Quando os níveis de NH_4^+ presentes na solução do solo ou solução nutritiva encontram-se em concentrações inferiores a 1mM opera um sistema de absorção de alta afinidade (HATS), enquanto em concentrações iguais ou maiores que 1 mM opera um sistema de absorção de baixa afinidade (LATS).

Estudos moleculares revelaram uma família de genes que codificam para os transportadores de NH_4^+ AMT (*Ammonium Transporter*), que estão presentes na membrana plasmática. O fato de existir um grande número de transportadores de uma mesma família indica que as plantas são capazes de se adequar as várias concentrações de NH_4^+ presentes no meio externo. Os integrantes da família de transportadores AMT1 são os responsáveis pelo transporte de alta afinidade em plantas e os AMT2 pelo transporte de baixa afinidade. Uma árvore de similaridade contendo os membros da família AMT de arroz e Arabidopsis é apresentada na Figura 1.

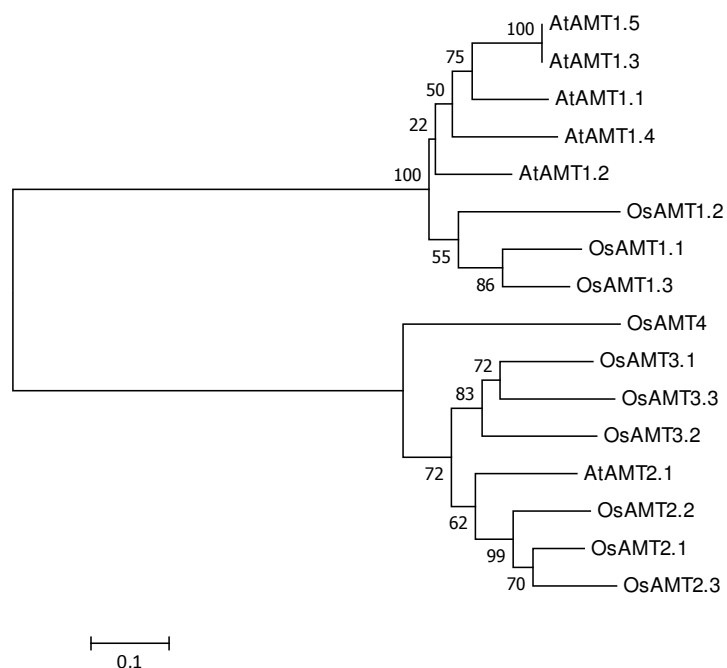


Figura 1. Árvore de similaridade obtida pelo método de agrupamento Neighbor-Joining com o programa MEGA (Multi Evolutionary Genomic Analysis). Comparação entre as seqüências das proteínas dos transportadores de amônio (AMTs) de arroz (*OsAMT*) e *Arabidopsis* (*AtAMT*).

De acordo com SONODA et al (2003) a expressão dos genes que codificam os transportadores de NH_4^+ em arroz (*OsAMT*) apresentam perfis diferentes. O *OsAMT1.1* é um gene constitutivo, ou seja é expresso tanto na raiz quanto na parte aérea, enquanto os genes *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* são expressos especificamente nas raízes, sendo que o primeiro responde positivamente ao ressuprimento de NH_4^+ enquanto que o segundo tem a sua expressão reduzida em resposta ao alto suprimento de NH_4^+ . Esses mesmos autores, sugerem que a regulação dos transportadores de NH_4^+ é controlada pelos teores de glutamina existentes no interior das raízes e não pelos teores de NH_4^+ presentes na solução. Fato que demonstra que há um controle interno da absorção de NH_4^+ , indicando uma adaptação de algumas variedades de arroz de acordo com os níveis de NH_4^+ presentes na solução do solo.

O transportador *OsAMT1.2* teve sua expressão detectada principalmente no cilindro central das raízes, o que propõe um importante papel desse transportador como o principal transportador de NH_4^+ no interior da planta. Portanto, parece que este transportador possui duas funções que é auxiliar o transportador *AMT1.1* na absorção do NH_4^+ quando disponível na solução do solo e também na absorção e recuperação do amônio no sistema radicular.

Foi demonstrado por LIMA et al (2010), em *Arabidopsis* que o gene *AtAMT1.3* está envolvido na emissão e crescimento de raízes laterais. Já o *AtAMT1.1* possui função na absorção de NH_4^+ , mas não está associado com a emissão e crescimento de raízes laterais. Os transportadores *AtAMT1.1*, *AtAMT1.3* e *AtAMT1.5* apresentam expressão relativamente alta nas células das raízes com deficiência em N e chegam a contribuir com aproximadamente 70-80% da absorção no sistema de alta afinidade (YUAN et al.,2007). O *AtAMT1.2* é responsável pela absorção do NH_4^+ que entrou nos tecidos radiculares pela rota apoplástica e *AtAMT1.4* tem a função de mediar a passagem do NH_4^+ na membrana plasmática do pólen (LI et al.,2009).

Os transportadores de amônio em arroz apresentam comportamento diferente de acordo com a concentração de amônio no meio externo. O *OsAMT1.2* responde rapidamente e positivamente ao ressuprimento de NH_4^+ , sugerindo que seu papel é auxiliar ao *OsAMT1.1* na

absorção de NH_4^+ em solos com altas concentrações do íon, já o *OsAMT1.3* é induzido pela redução drástica dos níveis de NH_4^+ , indicando que este transportador está envolvido com a absorção de NH_4^+ quando sua concentração é muito baixa na solução do solo (TABUCHI et al. 2007).

HOQUE et al (2006) observaram que quando superexpressaram o gene *OsAMT1.1* (sistema de alta afinidade) houve o aumento da absorção de NH_4^+ na concentração de 2 mM, porém, o crescimento das plantas foi reduzido. Esse efeito inibitório no crescimento das plantas mutantes sob altas concentrações de NH_4^+ pode estar envolvido com o consumo de esqueletos de carbono até o ciclo fútil de NH_4^+ que gera consumo de ATP, sendo estes possíveis efeitos da sua toxidez quando em altas concentrações (ZHU et al, 2011).

Em arroz LI et al.(2012) caracterizaram o padrão de expressão de nove transportadores de NH_4^+ em plantas sob diferentes condições de suprimento de N e compararam sua expressão no estágio de plântula e no perfilhamento. Esses autores concluíram que o *OsAMT1.2* e o *OsAMT1.3* são mais expressos na raízes, enquanto o *OsAMT1.2* é mais expresso na fase de perfilhamento e o *OsAMT1.3* é mais expresso na fase de plântula. Por outro lado, *OsAMT1.1* tem alta expressão em todas as partes da planta independente de qualquer estágio de vida que a planta se encontre. SONODA et al (2003) verificaram que os *OsAMT2.1*, *OsAMT2.2*, *OsAMT2.3*, *OsAMT3.1*, *OsAMT3.2* e *OsAMT3.3* não são muito expressos e encontram-se principalmente na parte aérea, indicando que a absorção de NH_4^+ pelas raízes das plantas é feita principalmente pela família *AMT1* em arroz.

No que diz respeito à disponibilidade de NH_4^+ no meio externo, os transportadores *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2* são induzidos após 48 horas de deficiência de NH_4^+ , entretanto o *OsAMT1.3* é induzido pelo ressuprimento com baixas doses de NH_4^+ e pela deficiência de N. Os genes *OsAMT2.1*, *OsAMT2.2*, *OsAMT2.3* apresentam uma expressão constante, enquanto *OsAMT3.1*, *OsAMT3.2* e *OsAMT3.3* são induzidos pela deficiência de N (LI et al., 2012). Os resultados indicam que há uma complexidade na expressão dos diferentes membros da família *AMT*, indicando que existem várias rotas que regulam a expressão desta família gênica.

Além da regulação transcricional exercida pela assimilação do NH_4^+ sobre os membros da família *AMT*, a regulação pós-traducional por meio da fosforilação do resíduo de treonina 460 (T460) na região C terminal, é um importante mecanismo de regulação da absorção de NH_4^+ . Com o ressuprimento de NH_4^+ em plantas de *Arabidopsis*, os níveis de fosforilação no resíduo T460 no transportador *AMT1.1* são proporcionais à dose de NH_4^+ aplicado e o tempo de exposição, ou seja, quanto maior a dose de NH_4^+ aplicado maior será a fosforilação no *AMT1.1* inativando a absorção de NH_4^+ por esse transportador (LANQUAR et al., 2009). A extremidade N-terminal das proteínas da família *AMT1* é fundamental para a estabilização do oligômero (três proteínas), sendo que a absorção de NH_4^+ é fortemente reduzida quando o oligômero é desfeito (GRAFF et al., 2011).

2.3. Silenciamento Gênico via MicroRNA

O silenciamento gênico está relacionado com diversos mecanismos nos quais a regulação da expressão de um ou mais genes está envolvida. Este mecanismo provavelmente surgiu como um sistema de defesa que atua na identificação e degradação de moléculas de RNA que são estranhas ao transcriptoma de uma célula sadia (LINDBO e DOUGHERTY, 1992).

A interferência por RNA (RNAi) é um mecanismo celular responsável pelo silenciamento gênico pós-transcricional (*post transcription gene silencing* - PTGS) que atua sobre o RNA mensageiro (mRNA). No foco deste mecanismo está uma molécula de fita dupla de RNA (dsRNA - *double stranded RNA*) que, ao ser incorporada ativamente um complexo intracitoplasmático, se ligando a uma sequência de nucleotídeos complementar localizada no

mRNA-alvo, ocasionando assim o silenciamento, por inibição da tradução e/ou pela degradação do mRNA.

Os miRNAs foram relatados pela primeira vez no início da década de 90 (LEE et al. 1993) que constataram que o gene *Lin-4*, conhecido por controlar o tempo de desenvolvimento larval de *C. elegans*, não codificava nenhuma proteína e sim um par de pequenos RNAs, um com 22 nt e outro com 16 nt. Esses pequenos miRNAs eram complementares a várias regiões da região 3' não-traduzida (3' UTR) do gene *Lin-14*, e mediavam sua repressão quando pareados na região UTR, inibindo assim a sua tradução. Posteriormente, REINHART et al, 2000 descobriram o *Let-7*, que codificava um miRNA de 22 nt, que também estava envolvido no desenvolvimento de *C. elegans*. Esses pequenos miRNA de 21-24 nt são originados a partir de um precursor transcrito endógeno com capacidade de adquirir uma estrutura secundária em forma de grampo e que pode ser processado por uma série de proteínas intranucleares e citoplasmáticas (HUTVAGNER et al, 2001).

O miRNA é originado de longos RNAs de fita-simples com auto-pareamento (imperfeito), o que leva ao acúmulo de RNAs pequenos (miRNA), e estão envolvidos principalmente no controle pós-transcricional de transcritos endógenos (OSSOWSKI et al., 2008).

Os miRNAs são sintetizados pela RNA polimerase II (LEE et al., 2004), originalmente de fragmentos de 80-250 nucleotídeos em plantas, que apresentam auto-anelamento imperfeito e posteriormente o splicing produzirá o miRNA. Ainda não é conhecida a importância do tamanho completo da sequência precursora do miRNA, sendo que somente a expressão da região de auto-anelamento é capaz de produzir o miRNA.

O principal componente da maquinaria do processamento do miRNA em *Arabidopsis* é a DICER-like1 (DCL1), que é uma RNase do tipo III, que produz cortes em todos os precursores de miRNA (KURIHARA et al, 2004). DCL1 é auxiliada pelas proteínas HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) e pela proteína dedo de zinco C2H2 SERRATE (SE), que se ligam no dsRNA (YANG et al, 2006). Tanto a HYL1 quanto a SE, tem como função melhorar a eficiência e a precisão de clivagem pela DCL1. O processamento do precursor do miRNA feito pelos complexos da RNase III provoca a liberação do miRNA/miRNA*. Para que o miRNA/miRNA* gerado não seja degradado, a enzima metil-transferase HUA ENHANCER1 (HEN1) modifica a ribose 3' terminal, prevenindo a uridilização e estabilizando do miRNA (YU et al., 2005). O miRNA produzido é incorporado em um complexo RISC, neste complexo existe uma proteína chama argonauta (AGO). Esta proteína se liga ao miRNA, e como ela apresenta atividade de endonuclease, o complexo é dirigido contra a fita de mRNA complementar ao miRNA. Já o miRNA* é degradado (BOLOGNA et al, 2012).

Os pequenos RNAs gerados agem como componentes específicos da maquinaria protéica denominada “complexo de silenciamento induzido por RNA” (RISC), que contém a enzima Argonauta (AGO1) como subunidade catalítica. Uma importante característica da fita guia de siRNA e miRNA é a instabilidade da extremidade 5' por causa do alto conteúdo de AU ou não-anelamento, comparados com a extremidade 3' (KHVOROVA et al., 2003; SCHWARZ et al., 2003). O siRNA e miRNA efetivos apresentam características em comum, como a base A na posição 10, precedendo o sítio de clivagem. Como um dsRNA gera vários siRNAs, a clivagem mediada pela enzima AGO1 ocorrerá em vários sítios do mRNA alvo, enquanto o miRNA é o único produto do splicing do miRNA imaturo, a clivagem do alvo ocorrerá em um sítio específico. O anelamento do miRNA com o mRNA alvo é perfeito, enquanto os miRNAs são efetivos com até 5 nucleotídeos não pareados. As bases não pareadas entre o miRNA e o mRNA alvo ocorrem mais frequentemente na extremidade 3', enquanto o pareamento na extremidade 5' e central é mais importante (MALLORY et al.,

2004). As bases 2-12 no miRNA são as sensíveis aos não-anelamentos (SCHWAB et al., 2005), sendo que o pareamento na extremidade 3' não é completamente dispensável (PALATNIK et al., 2007).

O uso de pequenos RNA (sRNA) com base em miRNA artificial (amiRNA) tem crescido nos últimos anos a partir do desenvolvimento de vetores para uso em *Arabidopsis* e em arroz, sendo chamado de segunda geração de RNAi. A tecnologia de amiRNA é baseada na manipulação de precursores de miRNA endógenos para silenciamento de mRNA específico (SCHWAB et al., 2006). Análises de expressão mostram que amiRNA possuem similaridade e alta especificidade como miRNA endógenos (SCHWAB et al., 2006), sendo que suas sequências podem ser facilmente otimizadas para silenciamento de um ou de diversos genes sem afetar a expressão de outros genes.

A tecnologia envolvendo amiRNA pode ser facilmente manipulada usando miRNAs endógenos. Sabendo a região que é processada na sequência do miRNA imaturo, essa pode ser manipulada por PCR para inserir um miRNA específico no mRNA alvo. No entanto, é necessário encontrar as melhores regiões dentro do mRNA alvo para um silenciamento eficiente.

Segundo WARTHMAN et al. (2008), o conhecimento das características do miRNA torna possível o desenvolvimento de miRNAs específicos para genes de interesse. As características do miRNA são uracila na extremidade 5' baixa estabilidade termodinâmica na porção 5' (maior conteúdo de A e U), na extremidade 3' maior teor de citosina e guanina e sítio de clivagem no nucleotídeo 10 sendo adenina (OSSOWSKI et al., 2008). A plataforma WMD (Web MicroRNA Design) produz amiRNAs a partir da sequência do gene de interesse e das características do miRNA citadas anteriormente. Com isso, foram obtidos diversos amiRNAs para silenciar *OsAMT1.3* que serão inseridos na estrutura do pri-miRNA de *osa-MIR528* usando primers contendo o miRNA por PCR.

O sistema de amiRNA consegue silenciar especificamente até genes que fazem parte de uma família gênica conservada. A construção do amiRNA se baseia em quatro reações de PCR contendo primers que irão formar a região amiRNA/amiRNA*, usando um pri-miRNA endógeno como amostra.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Construção do Cassete de Expressão para o Silenciamento do Gene *OsAMT1.3*

Com o objetivo de avaliar o efeito do silenciamento do *OsAMT1.3* sobre o sistema de alta afinidade para absorção de $N-NH_4^+$, bem como o possível envolvimento desse transportador em eventos de sinalização, foram obtidas plantas de arroz silenciando um microRNA artificial específico para o gene *OsAMT1.3* sobre o controle do promotor da ubiquitina de milho (UBIL).

Foi construído um microRNA artificial (amiRNA) específico para o *OsAMT1.3*. Para tal, foi utilizada a plataforma WMD3 - Web MicroRNA Designer projetada pelo Dr. Weigel (Max Planck Institute for Developmental Plant Biology: <http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>). Como resultado a plataforma forneceu *primers* contendo os amiRNAs. Esses *primers* foram utilizados em reações de PCR com o vetor pNW55 para substituição do osa-MIR528 presente nesse vetor pelo amiRNA desejado, mantendo a estrutura do anterior (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos iniciadores (primers) usados nas reações de PCR para montagem do microRNA artificial (amiRNA), com o objetivo de silenciar o gene *OsAMT1.3*. O amiRNA final após o processamento possuía a seguinte sequência TGTTAAACCCGTACCACGCAA.

Primer	Sequencia
I miRNA	agTGTTAAACCCGTACCACGCAAcaggagattcagtttga
II miRNA	tgTTGCGTGGTACGGGTTTAACActgctgctgctacagcc
III miRNA	ctTTGCGAGGTTTCGGGTTTAACAttctgctgctaggctg
IV miRNA	aaTGTTAAACCCGAACCTCGCAAagagaggcaaaagtgaa
G-4368*	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC
G-4369*	GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAG

* Primers gerais usados que anelam fora da região do amiRNA

Letras maiúsculas representam o amiRNA e letras minúsculas indicam a região de anelamento no vetor pNW55

A programação da PCR foi feita de acordo com WARTHMAN et al. (2008). Primeiramente, foram gerados três produtos de PCR que posteriormente foram fusionados para formar o amiRNA. O protocolo das reações de PCR pode ser constatado na tabela 2.

O produto de PCR foi digerido com as enzimas de restrição BanHI e KpNI e transferido para o vetor binário IRS154 no qual o amiRNA ficou sob o controle do promotor da ubiquitina de milho (UBIL:amiRNA-*OsAMT1.3*) e leva o gene da higromicina fosfotransferase (*hpt*) para resistência a higromicina.

Tabela 2. Protocolo das reações de PCR usado para a construção do amiRNA no vetor pNW55.

Primer	Tamanho	Protocolo da PCR
G-4368 + primer II	256 bp	95°C 2 min;
Primer I + primer IV	87 bp	34 ciclos de 95°C 30s, 55°C 30s, 72°C 30s;
Primer III + G-4369	259 bp	72°C 7 min

Reação de PCR para fusão dos fragmentos do amiRNA:

Primer	Tamanho	Protocolo da PCR
		95°C 2 min;
G-4368 + G-4369	554 bp	34 ciclos de 95°C 30s, 55°C 30s, 72°C 1min; 72°C 7 min

3.2. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

A construção foi inserida em *Agrobacterium tumefaciens* estirpe LBA4404 como descrita a seguir: foi adicionado 1µg de plasmídio a 100µL de *Agrobacterium* competente, a mistura foi homogeneizada suavemente e incubada no gelo por 30 minutos. As células com o plasmídio foram congeladas em nitrogênio líquido por cinco minutos e em seguida incubadas a 37°C em banho-Maria por mais cinco minutos. Após este tempo, foi adicionado 1mL de meio YEB, e as células mantidas a 28°C, com agitação constante a 150 rpm durante duas horas. A transformação (1mL) foi plaqueada em meio YEB sólido com o antibiótico correspondente a construção (Kanamicina) mais Rf-Rifamicina (100µg/mL) e Gm-Gentamicina (40µg/mL). Estes dois últimos antibióticos são referentes à resistência genômica e plasmidial da *Agrobacterium* LBA4404 armada. As placas foram incubadas a 28°C até o aparecimento de colônias (dois a três dias). A transformação foi confirmada por PCR de colônia.

3.3. Transformação de Arroz Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Para transformação de plantas de arroz foi utilizado o método de transformação de TOKI et al. (2006) com adaptações. O método se baseia na produção de calos embriogênicos provenientes da região do escutelo de sementes de arroz germinadas em meio contendo 2,4-D por apenas cinco dias, evitando possíveis variações somaclonais. Os calos foram então infectados por *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor com a construção gênica desejada e então, após duas semanas de cultivo em meio de seleção contendo o antibiótico higromicina a 50mg L⁻¹, novas plantas de arroz foram regeneradas a partir dos calos resistentes em meio contendo 2mg L⁻¹ de cinetina e 0.05mg L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA). A composição dos meios é detalhada por TOKI et al (2006).

Todas as linhagens transgênicas de arroz obtidas passaram por avaliação visando identificar aquelas com apenas uma cópia do gene. Uma análise de segregação foi feita para estimar o número de inserções (espera-se que linhagens com apenas uma cópia do gene apresente segregação 3:1 na geração T2). Para confirmação, uma análise de PCR em tempo real foi realizada também.

As plantas que sofrem o procedimento de transformação são chamadas de T0, as sementes destas plantas dão origem as diferentes linhagens chamadas de T1, e as sementes das linhagens T1 dão origem à geração T2 onde já é possível observar a segregação. Com o cultivo das sementes das plantas da geração T2 separadamente já é possível identificar quem é heterozigota ou homozigota na geração T3.

3.4. Avaliação do Nível de Expressão do Transportador *OsAMT1.3*

Com objetivo de avaliar o nível de expressão do transportador *OsAMT1.3* foram selecionadas seis linhagens que foram transformadas com a construção (L1, L2, L5, L6, L8 e IRS 154) as sementes dessas linhagens foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (2%) durante 10 minutos e depois lavadas repetidas vezes em água destilada. Essas sementes foram então acondicionadas sobre gaze em potes de 0,7 L e colocadas para germinar em água destilada na câmara de crescimento. Aos quatro dias após o período de germinação (4 DAG) as plantas foram transferidas para potes de 0,7 L contendo solução nutritiva de HOAGLAND & ARNON (1950) modificada a ¼ força iônica com concentração de 2,0 mM de N (1,5 mM N-NO₃⁻ e 0,5 mM N-NH₄⁺). Aos 11 DAG as plantas foram postas em uma solução nutritiva a ½ força iônica. Aos 18 DAG as plantas foram transferidas para uma solução nutritiva desprovida de N (deficiência) e após três dias foi feita a coleta das plantas (Figura 2).

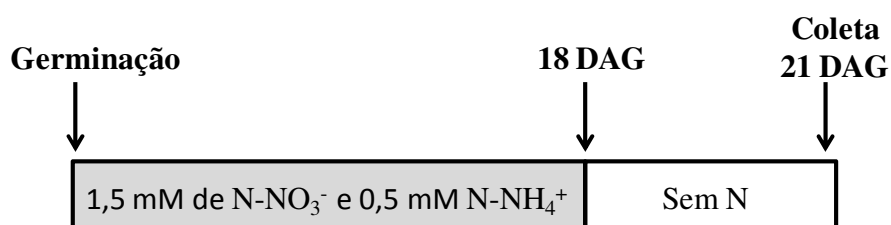


Figura 2. Ilustração do sistema de condução do experimento na câmara de crescimento utilizando plantas de arroz das linhagens transformadas 1, 2, 5, 6, 8 (com o amiRNA) e IRS 154 (vetor vazio). Aos 18 DAG as plantas foram colocadas em solução nutritiva desprovida de N e aos 21 DAG as plantas foram coletadas.

As plantas foram separadas em parte aérea e raiz que foram congeladas em nitrogênio líquido (N₂), para análise da expressão gênica do transportador *OsAMT1.3* feita por Real time PCR. Também foi avaliada a massa fresca de raiz e de parte aérea. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento no departamento de solos da UFRRJ. As plantas foram submetidas a um fotoperíodo de 12h/12h (luz/escuro) com aproximadamente 500 μmol m⁻² s⁻¹ de fótons fotossinteticamente ativo, umidade relativa do ar de 70% e temperatura de 28°C/26°C (dia/noite). O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizado com quatro repetições.

3.5. Avaliação dos Efeitos do Silenciamento do Transportador *OsAMT1.3* na Absorção de NH₄⁺

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento no departamento de solos da UFRRJ. As plantas foram submetidas a um fotoperíodo de 12h/12h (luz/escuro) com aproximadamente 500 μmol m⁻² s⁻¹ de fótons fotossinteticamente ativo, umidade relativa do ar de 70% e temperatura de 28°C/26°C (dia/noite). O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizado com três repetições.

A partir do resultado do experimento para avaliação do nível de silenciamento do *OsAMT1.3* foram selecionadas três linhagens que apresentaram o maior nível de silenciamento do *OsAMT1.3*. As linhagens selecionadas foram a 1, 2, 6 e IRS 154. As sementes destas linhagens foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (2%) durante 10 minutos e depois lavadas repetidas vezes em água destilada. Essas sementes foram então acondicionadas sobre gaze em potes de 0,7 L e colocadas para germinar em água destilada na câmara de crescimento. Após 10 dias a germinação (10 DAG) as plantas foram transferidas para potes de 0,7 L contendo solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950) modificada a ½ força iônica com concentração de 2,0 mM de N-NH₄⁺. Aos 29 DAG

algumas plantas foram colocadas em solução nutritiva com concentração de 2,0 mM de NH_4^+ e outras em solução nutritiva desprovida de N. Aos 31 DAG parte das plantas que estavam em solução desprovida de N foram ressupridas com solução nutritiva com concentração de 0,15 mM de NH_4^+ , outra parte continuou com o tratamento sem N e as plantas com solução nutritiva com 2,0 mM de NH_4^+ permaneceram com a mesma concentração (Figura 3).

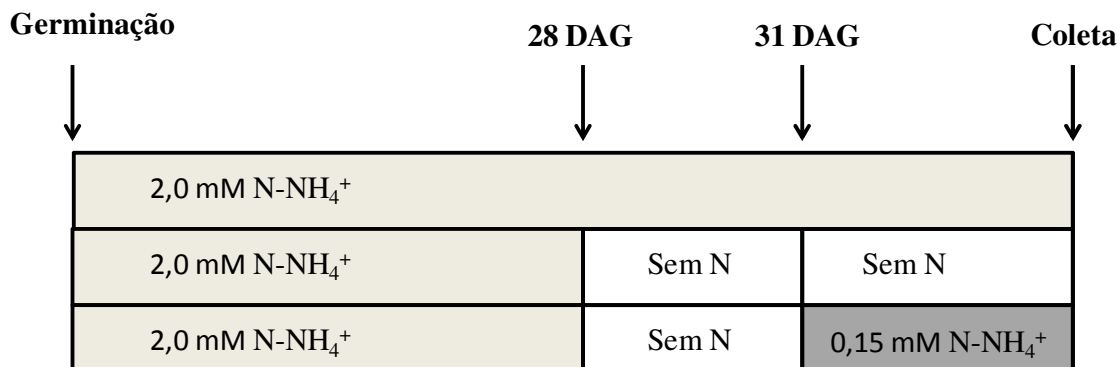


Figura 3. Ilustração do sistema de condução do experimento na câmara de crescimento utilizando plantas de arroz das linhagens 1, 2, 6 e IRS 154. Aos 31 DAG foi aplicado os tratamentos de 0,15mM de N-NH₄⁺, 2,0 mM de N-NH₄⁺ e sem fonte de N. Após 3 horas da aplicação dos tratamentos as plantas foram coletadas.

Após 3 horas de aplicação dos tratamentos as plantas foram coletadas e separadas em raiz, caule e folha acondicionadas em etanol 80% para posterior análise das frações solúveis. Também foram coletadas alíquotas das soluções nutritivas no momento da aplicação dos tratamentos e ao final da coleta para avaliar o influxo de NH_4^+ .

O RNA total e DNA foram extraídos de acordo com GAO et al. (2001). Para identificar as linhagens transformadas foram usados os primers para amplificar o gene da Higromicina (FERREIRA, 2013) e a reação de PCR em tempo real de acordo com as instruções do equipamento usando o kit SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems).

3.5.1. Análises das frações nitrogenadas solúveis e açúcares solúveis

a) Preparo das amostras para análise das frações solúveis

O procedimento para preparo do extrato foi executado a partir da maceração do material vegetal em etanol 80%, filtração do extrato obtido, partição com clorofórmio e elevação do volume da fração polar (menos densa) para 25 mL com etanol 80%. Com o extrato obtido foram feitas as análises das seguintes frações solúveis: N-amino livre (YEMM e COCKING, 1955), N-NH₄⁺ (FELKER, 1977) e açúcares solúveis (YEMM e WILLIS, 1954).

b) Dosagem de N-amino livre

Para a determinação de N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955), foram utilizadas alíquotas de 0,5 mL das amostras de extrato alcoólico visando à reação colorimétrica em meio reacional específico. O meio reacional foi preparado a partir de tampão citrato (1 mL) e uma mistura de Metil Celossolve, KCN e Ninhidrina (Hidrato de triceto-hidrindeno) (1,2 mL). Para o preparo da mistura, foi inicialmente preparada uma solução de Ninhidrina em Metil Celossolve (5 % P/V). Em seguida, uma solução de KCN em Metil Celossolve foi preparada a partir de KCN 0,01 M (5 mL) dissolvido em Metil Celossolve até completar 250 mL. Finalmente, a solução contendo a Ninhidrina foi misturada à solução contendo o KCN na proporção 1:5.

Para a reação colorimétrica, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio contendo o meio reacional e submetidas a agitação. Posteriormente, os tubos de ensaio foram fechados com papel alumínio e submetidos a aquecimento em banho-maria a 100 °C por 15 minutos. Após o aquecimento, os tubos de ensaio contendo as amostras em meio reacional foram resfriados em água corrente por 5 minutos e adicionou-se etanol 60% (3 mL) ao seu conteúdo. Após nova agitação, a absorvância a 570 nanômetros foi determinada em espectrofotômetro (Thermo Scientific).

Para a determinação da concentração de N-amino nas amostras, foi utilizado como parâmetro a curva padrão de Leucina. As amostras das soluções que constituem a curva padrão foram submetidas à reação colorimétrica e determinou-se sua absorvância, conforme descrito anteriormente.

c) Dosagem de N-NH₄⁺

Para a dosagem de N-amônio (FELKER, 1977), alíquotas de 0,5 mL das amostras de extrato alcoólico foram submetidas a reação colorimétrica em meio reacional específico. Para o meio reacional, foi preparada previamente uma solução contendo Fenol (5g) e Nitroprussiato de Sódio (25 mg) diluída até o volume de 500 mL em água destilada. Além disso, preparou-se uma solução contendo Dicloroisocianurato de Sódio (0,31 g) e Hidróxido de Sódio (15 g) também elevados até 500 mL com água destilada. De cada solução preparada foram utilizados 2,5 mL para o meio reacional.

Para a reação colorimétrica, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio contendo o meio reacional e submetidas a agitação. Após 30 minutos em temperatura ambiente, realizou-se uma nova agitação e foi determinada a absorvância a 630 nanômetros.

Para a determinação da concentração de N-amônio nas amostras foi utilizada como parâmetro a curva padrão de cloreto de amônio e avaliou-se sua absorvância, conforme o descrito anteriormente.

d) Dosagem de açúcares solúveis

Para determinação de açúcares solúveis (YEMM & WILLIS, 1954), foram utilizadas alíquotas de 0,2 mL das amostras de extrato alcoólico visando a reação colorimétrica em meio reacional específico. O meio reacional foi preparado com Antrona (0,4 g) diluída em uma mistura de ácido sulfúrico e água destilada (5:2). Após o preparo, a mistura foi deixada em repouso por aproximadamente 45 minutos e, posteriormente, utilizada para o meio reacional.

Para a reação colorimétrica, a solução de Antrona em ácido sulfúrico e água (5 mL) foi depositada em tubos de ensaio de 50 mL em banho de gelo. Após 5 minutos, foi adicionada lentamente a amostra e, posteriormente, etanol 80% (0,8 mL). A mistura foi deixada em repouso por mais 5 minutos em banho de gelo e, em seguida, agitada. Para o desenvolvimento da cor verde, os tubos foram devidamente vedados com papel alumínio e levados ao banho-Maria a temperatura de 100°C por 10 minutos. Posteriormente, os tubos foram esfriados e de seu conteúdo foi determinada a absorvância a 620 nm que, posteriormente, foi comparada ao padrão de glicose.

3.6. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade (Teste de Lilliefors) e de homogeneidade das variâncias (Cochran e Bartlett). Posteriormente, os resultados foram submetidos à análise de variância e o nível de significância analisado através do teste de F ($P < 0,05$). As médias serão comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação do Nível de Expressão do Transportador *OsAMT1.3*

Em todos os experimentos, a planta usada como controle passou pelo processo de transformação, porém carrega o vetor IRS154 sem a construção do microRNA "vetor vazio". Observou-se que as linhagens 1, 2, 6, 8 apresentaram crescimento semelhante às plantas com vetor vazio. A linhagem 5 apresentou maior crescimento e não será usada nos futuros experimentos (Figura 4). Fez-se análise de PCR para identificar as plantas transformadas usando os iniciadores (primers) para o gene da higromicina fosfotransferase que confere resistência a higromicina.

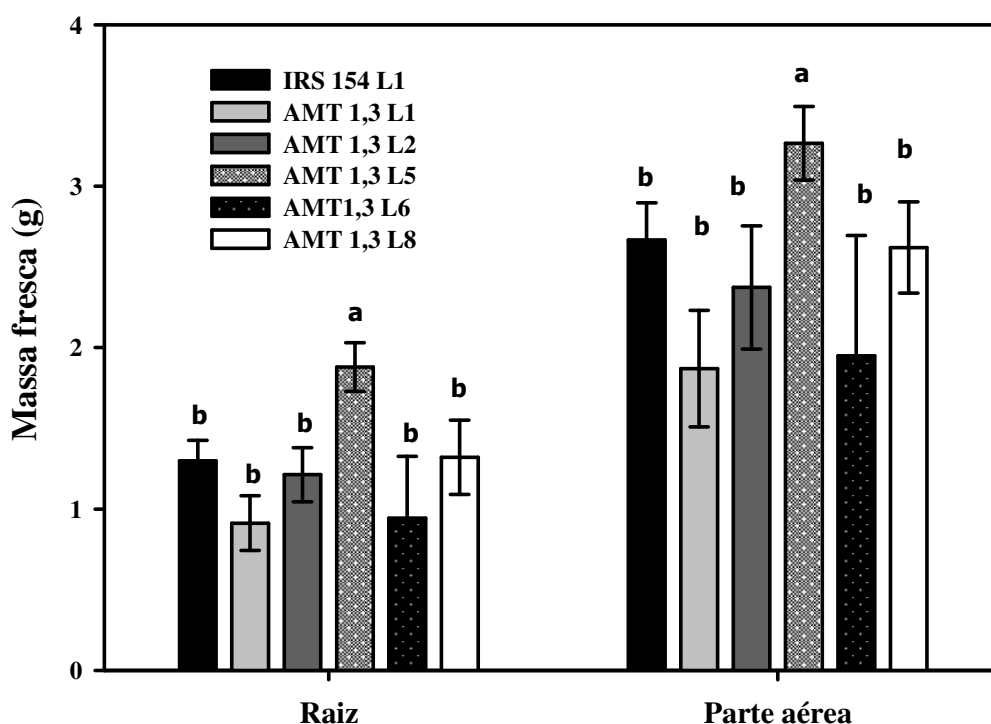


Figura 4. Valores de massa fresca de raiz e de parte aérea das linhagem transformadas L1, L2, L5, L6 e L8 (UBIL:amiRNA-*OsAMT1.3*) e planta controle IRS154 (planta transformada com o vetor vazio) para avaliar diferenças de crescimento e selecionar as linhagens para análise do nível de expressão do transportador *OsAMT1.3*.

A reação de PCR amplificando o gene da resistência à higromicina com as amostras do experimento para avaliar o silenciamento do gene *OsAMT1.3* mostra que ocorreu segregação nas linhagens analisadas, portanto, foi necessário selecionar as plantas transformadas pelo ensaio de resistência à higromicina na folha (Figura 5).

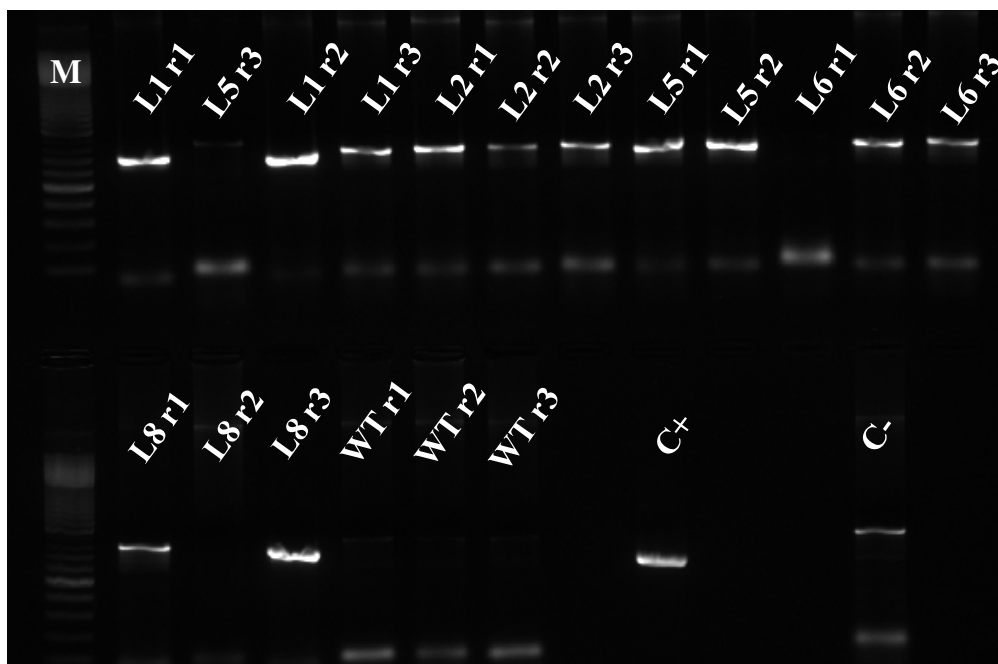


Figura 5. Análise de PCR para detecção do gene da higromicina fosfotransferase usando DNA extraído das plantas transformadas e não transformadas (WT), permitindo identificar as plantas que possuem o vetor silenciando o transportador *OsAMT1.3*. Onde as linhagens são representadas pela letra L e suas repetições pela letra r. C+: controle positivo usando o vetor IRS154 vazio. C-: controle negativo usando plantas tipo selvagem.

A análise de silenciamento do gene *OsAMT1.3* nas linhagens escolhidas (L1, L2 e L6) mostrou que ocorreu de fato a redução do nível dos transcritos do gene *OsAMT1.3* (Figura 6). É possível notar que ocorreram diferentes níveis de silenciamento do gene *OsAMT1.3* entre as linhagens, em que a linhagem L1 apresentou redução de aproximadamente 60% da expressão, enquanto a L2 e L6 apresentaram redução de expressão de aproximadamente 90% do nível de expressão do gene *OsAMT1.3*.

O amiRNA foi desenhado com o auxílio da plataforma WMD3 que apesar de buscar por amiRNAs específicos para o gene alvo dentro do genoma da espécie estudada, não dá garantias de que o amiRNA de fato irá silenciar o gene alvo (WARTHMAN et al., 2008), necessitando de confirmações após a obtenção da plantas transformadas. A escolha do amiRNA baseado nas características ótimas para atividade do miRNA de acordo com SCHWAB et al. (2006) permitiu que obtivéssemos um amiRNA efetivo para o silenciamento do *OsAMT1.3*.

Após a confirmação da expressão do gene *OsAMT1.3* por PCR em tempo real e das características fenotípicas como portanto foi necessário selecionar as plantas transformadas pelo ensaio de resistência à higromicina na folha. Com crescimento semelhante a planta controle transformada com o vetor vazio, as linhagens L1, L2 e L6 foram usadas para avaliar o efeito do silenciamento do gene *OsAMT1.3* na absorção de NH_4^+ .

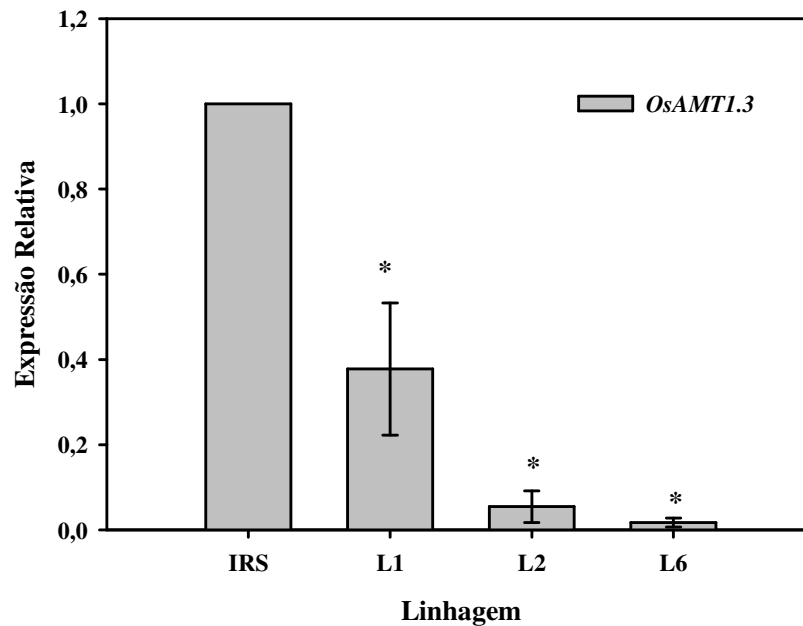


Figura 6. Expressão do gene *OsAMT1.3* nas linhagens de plantas transformadas com amiRNA (UBIL:amiRNA-*OsAMT1.3*) para silenciar o gene *OsAMT1.3* (L1, L2 e L6) e na planta controle IRS transformadas com vetor vazio.

* Indica diferença entre a linhagem e a planta controle (IRS) obtido pelo teste F ($P < 0,05$).

4.2. Avaliação dos Efeitos do Silenciamento do gene *OsAMT1.3* na Absorção de NH_4^+ , Expressão Gênica e Frações Solúveis

As linhagens L1, L2 e L6 e plantas controle IRS foram crescidas em solução de Hoagland e submetidas aos seguintes tratamentos: ressurgimento com 0,15 mM de N-NH_4^+ após três dias de deficiência de NH_4^+ , suprimento constante com 2,0 mM de N-NH_4^+ e deficiência de NH_4^+ por três dias.

O silenciamento do gene *OsAMT1.3* não alterou o crescimento das raízes e parte aérea quando comparados com as plantas controle (IRS) em nenhum dos tratamentos aplicados (Tabela 3). A relação Raiz/Parte aérea também não foi alterada nos mutantes. FERREIRA (2013) superexpressando o gene *OsAMT1.3* também não verificou aumento de massa fresca, mostrando que o gene *OsAMT1.3* pode não estar envolvido no crescimento de plantas de arroz. Usando mutantes silenciando os transportadores de NH_4^+ em *Arabidopsis*, LIMA et al. (2010) verificaram que *AMT1.3* está envolvido na formação de raízes secundárias. Dessa forma, apesar do silenciamento do gene *OsAMT1.3* não afetar a biomassa total de raiz, FERREIRA (2013) verificou que a superexpressão do gene *OsAMT1.3* afetou a morfologia radicular. SOUZA (2010) e RANGEL (2014) verificaram que a variedade de arroz Manteiga apresentou maior quantidade de raízes secundárias concomitante com maior expressão do gene *OsAMT1.3*.

Tabela 3. Massa fresca de raiz e parte aérea e relação raiz/parte aérea (R/PA) das linhagens mutantes L1, L2 e L6 silenciando o gene *OsAMT1.3* (UBIL:amiRNA-*OsAMT1.3* e controle IRS154 (vetor vazio).

Tratamento sem Nitrogênio					
	MF de raiz		MF de PA		R/PA
	(g/4 plantas)		(g/4 plantas)		(g/4 plantas)
IRS 154	2,17	ns	4,80	ns	0,45 ns
AMT 1.3 L1	2,05	ns	4,15	ns	0,49 ns
AMT 1.3 L2	2,15	ns	4,65	ns	0,46 ns
AMT 1.3 L6	2,20	ns	4,59	ns	0,47 ns
Tratamento com 0,15 mM de NH₄⁺					
	MF de raiz		MF de PA		R/PA
	(g/4 plantas)		(g/4 plantas)		(g/4 plantas)
IRS 154	2,31	ns	4,83	ns	0,47 ns
AMT 1.3 L1	2,26	ns	4,58	ns	0,49 ns
AMT 1.3 L2	2,31	ns	4,54	ns	0,50 ns
AMT 1.3 L6	2,24	ns	4,28	ns	0,52 ns
Tratamento com 2,0 mM de NH₄⁺					
	MF de raiz		MF de PA		R/PA
	(g/4 plantas)		(g/4 plantas)		(g/4 plantas)
IRS 154	1,85	ns	4,88	ns	0,38 ns
AMT 1.3 L1	1,95	ns	4,72	ns	0,41 ns
AMT 1.3 L2	1,89	ns	4,52	ns	0,41 ns
AMT 1.3 L6	2,16	ns	5,21	ns	0,41 ns

ns = não significativo no teste F (P<0,05).

O influxo de NH₄⁺ foi reduzido nos mutantes silenciando o *OsAMT1.3* submetidas ao ressurgimento de 0,15 mM de NH₄⁺ quando comparadas com a planta controle (IRS), não sendo afetada com 2,0 mM de N-NH₄⁺, com exceção da linhagem L1 que teve aumento do influxo com 2,0 mM de N-NH₄⁺ (Figura 7). A linhagem L6 apresentou menor influxo quando comparado com a linhagem L1, estando de acordo com o maior nível de silenciamento na linhagem L6 (Figura 6).

Entre os três membros da família *OsAMT1*, *OsAMT1.1* é o membro mais expresso enquanto *OsAMT1.3* é o membro menos expresso (SONODA et al., 2003).

A superexpressão do gene *OsAMT1.1* causou maior absorção de NH₄⁺ em baixas doses (RANATHUNGE et al., 2014). Por outro lado, a superexpressão do gene *OsAMT1.3* não causou alteração do influxo de NH₄⁺ (FERREIRA, 2013). O gene *OsAMT1.3* é fortemente expresso após a submissão das plantas à deficiência de N ou após ressurgimento com baixas doses de NH₄⁺, o que pode causar maior absorção no ressurgimento com baixas doses de NH₄⁺ (SOUZA, 2010). A falta de correlação entre a superexpressão do gene *OsAMT1.3* e o influxo de NH₄⁺ observado por FERREIRA (2013) pode ter sido causado pela regulação pós-transcricional ou pós-traducional provocado pela superexpressão do gene *OsAMT1.3*.

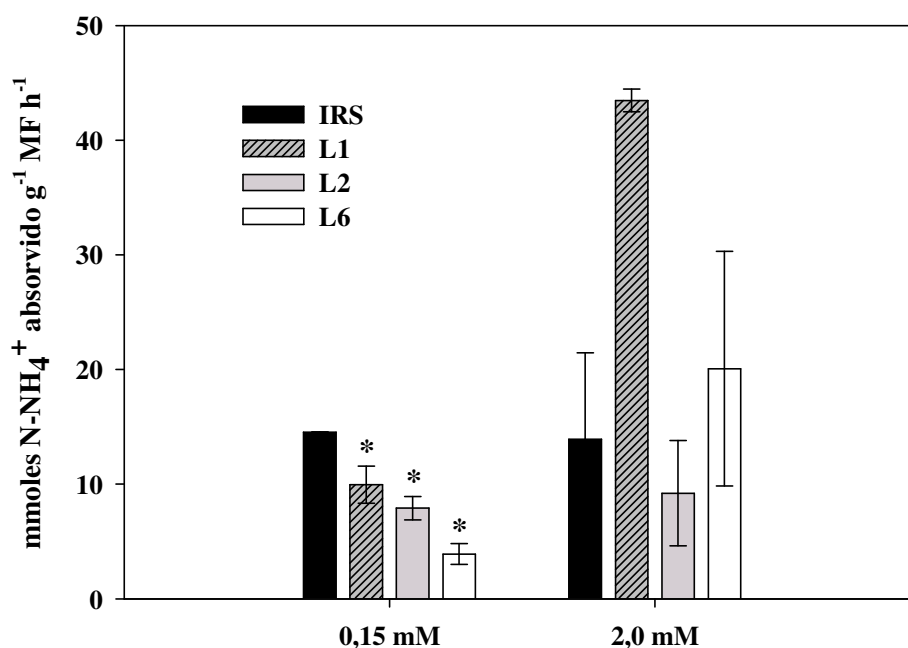


Figura 7. Influxo de NH_4^+ nas linhagens mutantes L1, L2 e L6 silenciando o gene *OsAMT1.3* (UBIL:amiRNA-*OsAMT1.3*) e plantas controle IRS154 (vetor vazio) ressupridas com 0,15 mM de N-NH_4^+ e supridas com 2,0 mM de N-NH_4^+ .

* Indica diferença entre a linhagem e a planta controle (IRS) obtido pelo teste F ($P < 0,05$).

A falta de relação entre o influxo de NH_4^+ e silenciamento do gene *OsAMT1.3* em alta dose de N-NH_4^+ (2,0 mM) pode ser explicada pelo efeito repressor que 2,0 mM de N-NH_4^+ exerce na expressão dos genes da família *OsAMT1*. SPERANDIO et al. (2011) observaram que o ressuprimento com 2,0 mM de N-NH_4^+ reprime a expressão dos genes da família *OsAMT1*, principalmente *OsAMT1.3*. Como ocorre repressão da expressão do gene *OsAMT1.3* pela alta dose de NH_4^+ , o silenciamento não teve efeito nesse tratamento.

A expressão do gene *OsAMT1.3* é apresentado na Figura 8. O ressuprimento com 0,15 mM de N-NH_4^+ causou aumento de expressão de aproximadamente 30 vezes nas plantas IRS (transformadas com o vetor IRS154 vazio), enquanto não houve variação da expressão do *OsAMT1.3* nas plantas sem N ou com 2,0 mM de N-NH_4^+ .

Apesar de diversos trabalhos observarem a indução do gene *OsAMT1.3* na deficiência de NH_4^+ (SONODA et al., 2003; SOUZA, 2010; SPERANDIO et al., 2011), NACRY et al. (2013) indicam que a expressão do gene *OsAMT1.3* ocorre pelo status de N na planta. SOUZA (2010) também encontrou uma indução transiente após um ressuprimento com 0,15mM de NH_4^+ , indicando que esse gene pode também responder rapidamente a baixas doses de NH_4^+ .

Desse modo, a indução de *OsAMT1.3* ocorre pela deficiência interna de N na planta, não pela ausência de N na solução, podendo levar alguns dias para ocorrer a indução do *OsAMT1.3* após o esgotamento do N na solução.

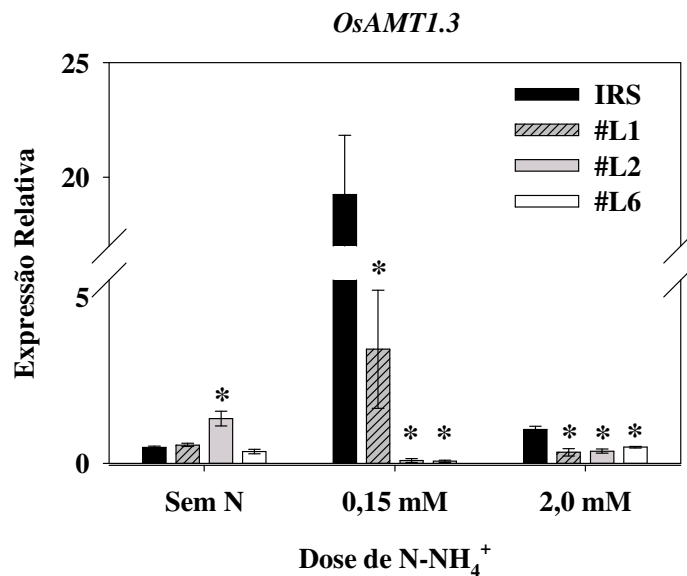


Figura 8. Expressão do gene *OsAMT1.3* nas linhagens de plantas transformadas com amiRNA para silenciar o gene *OsAMT1.3* (L1, L2 e L6) (UBIL:amiRNA-*OsAMT1.3*) e na planta controle IRS transformadas com vetor vazio com os seguintes tratamentos: Sem N por três dias, ressuprimento com 0,15 mM de N-NH₄⁺ e 2,0 mM de N-NH₄⁺. * Indica diferença entre a linhagem e a planta controle (IRS) obtido pelo teste F no mesmo tratamento ($P < 0,05$).

No tratamento com ressuprimento de 0,15 mM de N-NH₄⁺ a expressão do gene *OsAMT1.3* foi menor nas linhagens L1, L2 e L6 com o amiRNA para silenciar *OsAMT1.3* comparado com a planta IRS controle, sendo L1 o menor nível de silenciamento enquanto L2 e L6 com maior intensidade de silenciamento (Figura 8). Nas plantas cultivadas com ressuprimento de 2,0 mM de N-NH₄⁺ também ocorreu redução da expressão do gene *OsAMT1.3* em comparação com as plantas IRS.

Apesar de estudos sugerirem a indução do gene *OsAMT1.3* pela deficiência de N (SONODA et al., 2003; TABUCHI et al., 2007), outros estudos demonstram que pequenas doses de NH₄⁺ (<0,2 mM) em plantas que sofreram privação de N promovem alta indução do gene *OsAMT1.3* (SOUZA, 2010; FERREIRA, 2013; RANGEL, 2014). Desse modo, a indução do gene *OsAMT1.3* pode contribuir com a absorção de NH₄⁺ em baixas doses. Esses autores ainda verificaram que *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2* também são induzidos por baixas doses de NH₄⁺.

Apesar da redução da absorção de NH₄⁺ com 0,15 mM de N-NH₄⁺ ser menor nas linhagens silenciando *OsAMT1.3*, não podemos afirmar que esse fato ocorre exclusivamente devido à menor expressão de *OsAMT1.3*. As linhagens L1, L2 e L6 também apresentaram menor expressão dos genes *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2* (Figura 9). Foi observado que o padrão de expressão dos genes *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2* foi similar ao gene *OsAMT1.3*, sobretudo no ressuprimento com 0,15mM.

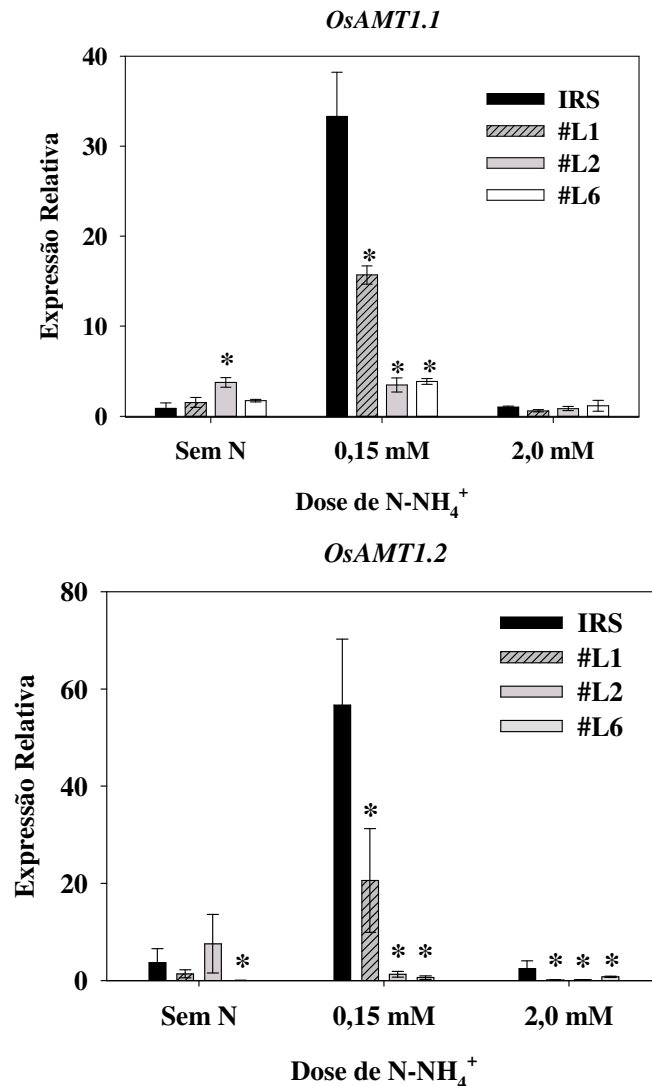


Figura 9. Expressão dos genes *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2* nas linhagens de plantas transformadas com amiRNA para silenciar o gene *OsAMT1.3* (L1, L2 e L6) e na planta controle IRS transformadas com vetor vazio com os seguintes tratamentos: Sem N por três dias, ressuprimento com 0,15 mM de N-NH₄⁺ e 2,0 mM de N-NH₄⁺. * Indica diferença entre a linhagem e a planta controle (IRS) obtido pelo teste F no mesmo tratamento ($P \leq 0,05$).

A superexpressão do gene *OsAMT1.3* em arroz não aumentou a absorção de NH₄⁺ da solução nutritiva, apesar do aumento de mais de 20 vezes na expressão gênica nas linhagens mutantes comparadas com plantas tipo-selvagem (FERREIRA, 2013). Esse autor ainda verificou que ocorreu aumento da expressão do transportador *OsAMT1.2* nas linhagens transformadas e não ocorreu alteração de expressão do gene *OsAMT1.1*. Como *OsAMT1.2* é expresso predominantemente no cilindro central e *OsAMT1.1* nas camadas mais externas da raiz (TABUCHI et al., 2007), a absorção de NH₄⁺ pode estar mais relacionada com a expressão do gene *OsAMT1.1*. A super-expressão do gene *OsAMT1.1* em arroz aumentou a absorção de NH₄⁺ em baixas concentrações, levantando a hipótese de que esse gene possa ser o principal membro da família *OsAMT1* para a absorção do NH₄⁺ da solução do solo (RANATHUNGE et al., 2014).

A redução da expressão do gene *OsAMT1.1* nas linhagens silenciando o *OsAMT1.3* pode ser a causa principal da menor absorção de NH₄⁺ com baixa dose de NH₄⁺ (0,15 mM), visto que a superexpressão do gene *OsAMT1.3* não causa aumento da absorção de NH₄⁺

(FERREIRA, 2013). Desse modo, dois questionamentos surgem: (i) o amiRNA feito para silenciar *OsAMT1.3* pode estar silenciando os outros membros da família *OsAMT1* ou (ii) *OsAMT1.3* regula a expressão de outros membros da família *OsAMT1*.

A tecnologia do amiRNA para arroz foi desenvolvida por WARTHMAN et al. (2008) que usa a plataforma WMD3 para criar amiRNAs altamente específicos para o gene alvo, além de garantir as características do amiRNA para ter atividade de processamento e clivagem no gene alvo. A Figura 10 mostra o alinhamento dos genes membros da família *OsAMT1* com detalhes para a homologia destes com o amiRNA desenhado para silenciar o *OsAMT1.3*. As marcações em preto mostram as bases não pareadas entre o amiRNA com o mRNA dos *OsAMT1.1~1.3* e indicam que ocorrem falhas no pareamento "mismachs" na região da semente (marcada em verde no gene *OsAMT1.3*) para genes *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2*. Falhas de pareamento entre a região somente do amiRNA com o gene alvo dificulta o reconhecimento da enzima DCL (*Dicer-Like*) e a clivagem é fortemente prejudicada (SCHWAB et al., 2006). Principalmente, a adenina (A) na região central do amiRNA (marcada de vermelho) é essencial para a clivagem do mRNA, sendo o local onde a enzima DCL faz o corte no mRNA (WARTHMAN et al., 2008). Desse modo, a clivagem dos genes *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2* é pouco provável. Além disso, há muitos relatos de alta especificidade dos amiRNAs desenhados pela plataforma WMD3 WARTHMAN et al. (2008), sobretudo em plantas de arroz.

```

amiRNA                               TTGCGTGGTACGGGTTTAAACA
OsAMT1.2   GCTCGGCACCTTCCTGCTGTGGTTCCGGTGGTTCGGCTTCAACC CGGGGTCCTTCACCA 778
OsAMT1.3   GCTCGGCAGCTTCCTTCTGTGGTTCGGTGGTACGGGTTTAAACC CGGGCTCGTTCCTCA 843
OsAMT1.1   G-TGGACGAC-----GCCGGAGCCGGCGAAGT-TCGA---TCACACCGGAGCCGAACAGC 830
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 10. Alinhamento dos genes da família *OsAMT1* com o reverso complementar do amiRNA para silenciar o gene *OsAMT1.3*. Bases marcadas de preto no gene não pareiam com o amiRNA. Bases marcadas em vermelho indicam o sítio de clivagem da enzima *Dicer-like 1* (DCL1). Em verde indica a região de anelamento do amiRNA no mRNA. Alinhamento feito no programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>).

A hipótese de que o transportador *OsAMT1.3* possa regular a expressão dos outros transportadores da família *OsAMT1* é plausível pelos resultados encontrados, além da observação feita por outros autores. A superexpressão do gene *OsAMT1.3* resultou em aumento da expressão do gene *OsAMT1.2*, sem contudo afetar a expressão do gene *OsAMT1.1* (FERREIRA, 2013). A diferença nos resultados obtidos no presente trabalho e por FERREIRA (2013) podem ter sido provocados pela regulação pós-transcricional que o gene pode sofrer após a superexpressão.

Com o ressuprimento de alta dose de $N-NH_4^+$ (2,0 mM) não foram observadas diferenças na absorção de NH_4^+ entre as linhagens, com exceção da L1 (Figura 7). As linhagens também apresentaram menor expressão dos genes *OsAMT1* com 2,0 mM de $N-NH_4^+$ (Figuras 8 e 9). Em concentrações de $N-NH_4^+$ maiores que 1 mM os transportadores de NH_4^+ de alta afinidade (*OsAMT1*) possuem importância reduzida por serem reprimidos, se destacando os transportadores de baixa afinidade. O gene *OsAMT2.1* aparece como provável gene responsável pela absorção de NH_4^+ na faixa de baixa afinidade (LI et al., 2012). Desse modo, não ocorreu alteração da absorção de NH_4^+ com 2,0 mM de $N-NH_4^+$ por causa da forte repressão que o sistema de alta afinidade sofre com alta dose de NH_4^+ , sendo o silenciamento do gene *OsAMT1.3* com pouco/nenhum efeito na absorção de NH_4^+ em altas concentrações.

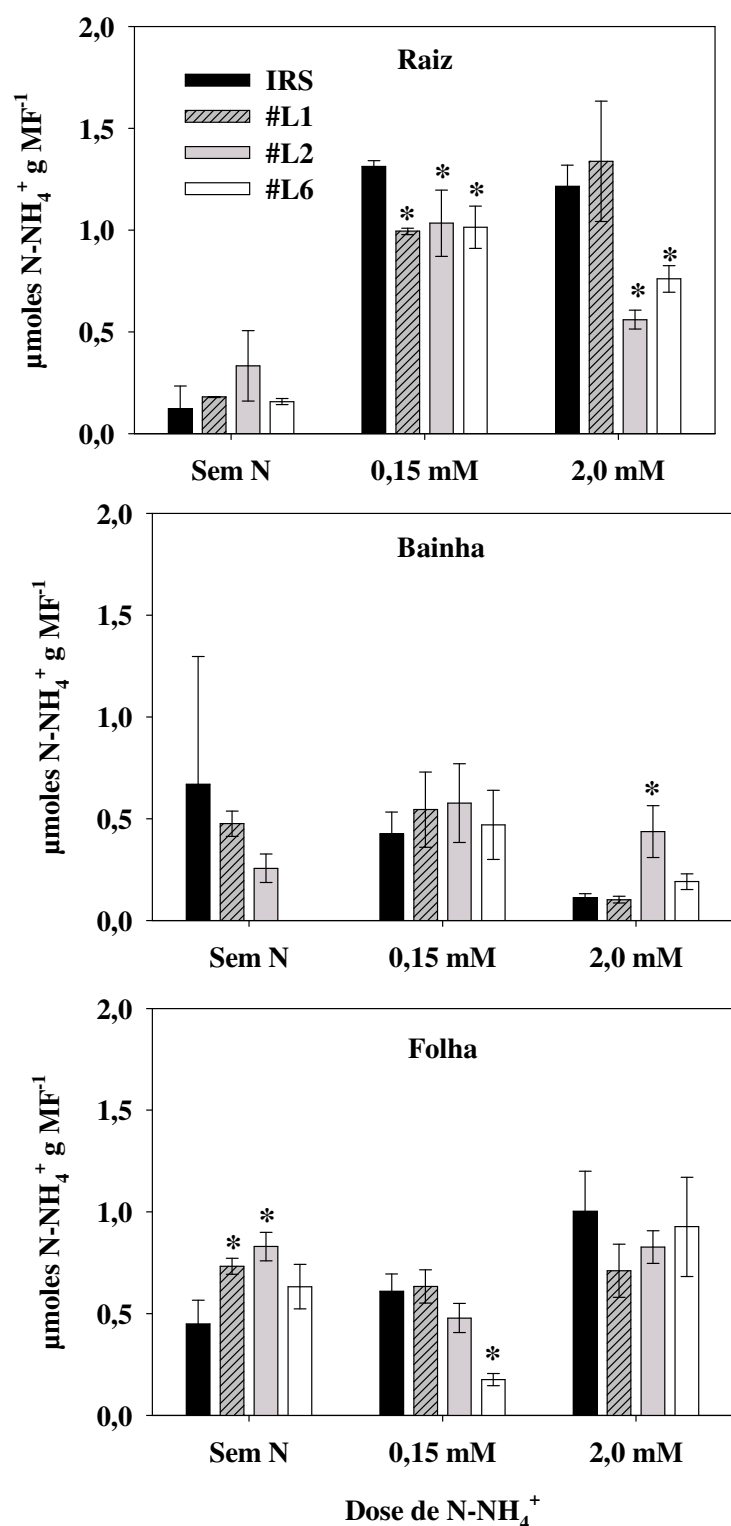


Figura 11. Teores de N-NH₄⁺ nas linhagens de plantas transformadas com amiRNA para silenciar o gene *OsAMT1.3* (L1, L2 e L6) e na planta controle IRS transformadas com vetor vazio com os seguintes tratamentos: Sem N por três dias, ressurgimento com 0,15 mM de N-NH₄⁺ e 2,0 mM de N-NH₄⁺.

* Indica diferença entre a linhagem e a planta controle (IRS) obtido pelo teste F no mesmo tratamento ($P < 0,05$).

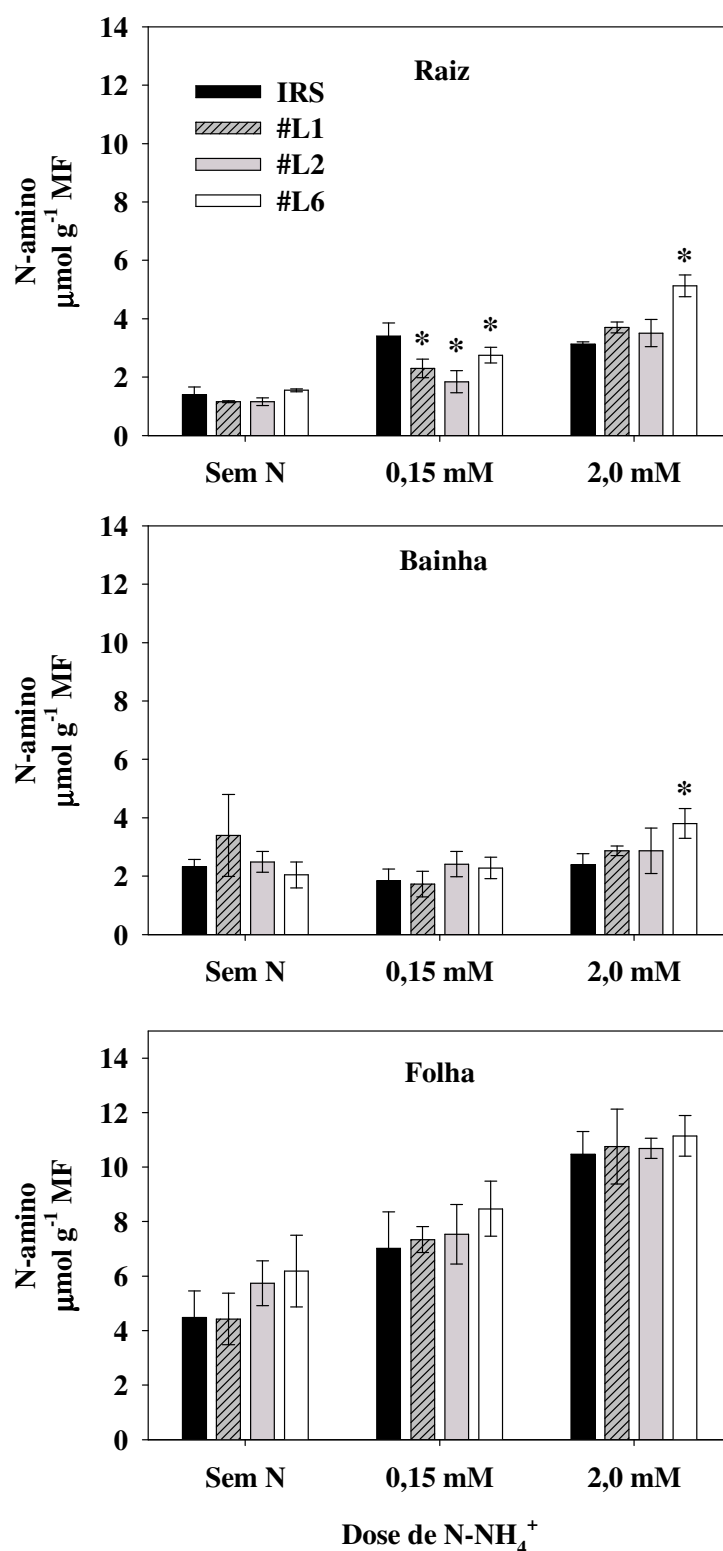


Figura 12. Teores de N-amino livre nas linhagens de plantas transformadas com amiRNA para silenciar o gene *OsAMT1.3* (L1, L2 e L6) e na planta controle IRS transformadas com vetor vazio com os seguintes tratamentos: Sem N por três dias, ressuprimento com 0,15 mM de N-NH₄⁺ e 2,0 mM de N-NH₄⁺. * Indica diferença entre a linhagem e a planta controle (IRS) obtido pelo teste F no mesmo tratamento ($P < 0,05$).

O silenciamento do gene *OsAMT1.3* e a alteração da expressão da família *OsAMT1* gerou alteração nos teores de N-NH₄⁺ (Figura 11) e N-amino (Figura 12) nas linhagens de arroz transformadas em comparação com as plantas controle IRS. Nas plantas com deficiência de N por três dias não houve alteração do teor de NH₄⁺ nas raízes e na bainha nas linhagens comparadas com as plantas IRS, enquanto na parte aérea houve aumento do teor de NH₄⁺ nas linhagens L1 e L2 (Figura 11). Após ressuprimento com 0,15mM de N-NH₄⁺ as linhagens silenciando o *OsAMT1.3* apresentaram menores teores de N-NH₄⁺ nas raízes comparado as plantas controle.

Com 2,0 mM de N-NH₄⁺ houve redução dos teores de N-NH₄⁺ nas raízes das linhagens L2 e L6 quando comparadas com IRS154, enquanto na bainha ocorreu aumento de N-NH₄⁺ na L2 e nas folhas não ocorreram mudanças. A linhagem L1 não apresentou diferença no teor de N-NH₄⁺ comparado com as plantas controle. Não houve alteração dos teores de N-amino livre nas linhagens com deficiência de N por três dias quando comparadas com a planta controle IRS154 (Figura 12). Com 0,15 mM de N-NH₄⁺ ocorreu redução dos teores de N-amino livre nas raízes das linhagens comparadas com a planta controle, enquanto na bainha e folhas não houve alterações no teor de N-amino. Com 2,0 mM de N-NH₄⁺ somente L6 apresentou aumento dos teores de N-amino na raiz e bainha de arroz comparada com a planta controle, enquanto nas folhas não houve alteração dos teores de N-amino livre.

Os teores de N-NH₄⁺ e N-amino livre nas linhagens transformadas e na planta controle estão de acordo com a alteração de influxo de NH₄⁺ provocada pelo silenciamento do gene *OsAMT1.3* (Figura 7) e a alteração de expressão dos genes *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2* (Figura 9). SPERANDIO et al. (2011) observaram forte aumento dos teores de N-NH₄⁺ em raízes de arroz após ressuprimento com 2,0 mM de N-NH₄⁺, provocado pela maior absorção de NH₄⁺. A menor absorção de NH₄⁺ nas três linhagens silenciando o gene *OsAMT1.3* com 0,15 mM de N-NH₄⁺ possivelmente resultou em menor teor de N-NH₄⁺ na raiz comparado com o controle IRS.

A redução nos teores de N-amino se relaciona com a menor absorção de NH₄⁺ com consequente menor disponibilidade desse íon para assimilação pela Glutamina Sintetase (GS) na raiz, mostrando que o silenciamento do gene *OsAMT1.3* e consequente redução da absorção de NH₄⁺ tem implicações na fisiologia da planta de arroz cultivada com baixa dose de NH₄⁺. SPERANDIO et al. (2011) também verificaram forte interação entre a maior absorção de NH₄⁺ com o maior teor de NH₄⁺ e N-amino nas raízes de arroz. Por outro lado, não houve alteração dos teores de N-NH₄⁺ e N-amino na bainha e folha de arroz nas linhagens com 0,15 mM de N-NH₄⁺ comparado com as plantas controle.

O NH₄⁺ em altas concentrações é um íon tóxico para as plantas, sendo preferencialmente assimilado nas raízes pelas enzimas GS-GOGAT e enviados para a parte aérea na forma de aminoácidos (SOUZA e FERNANDES, 2006). A super-expressão do gene *OsAMT1.1* em arroz causou maior absorção de NH₄⁺ concomitante com maiores teores de N-NH₄⁺ e N-amino na raiz (RANATHUNGE et al., 2014), corroborando com os resultados encontrados silenciando a expressão do gene *OsAMT1.3*. A super-expressão do gene *OsAMT1.3* realizada por FERREIRA (2013) não afetou o acúmulo de N-NH₄⁺ e N-amino nas plantas transformadas, possivelmente porque não houve alteração da absorção de NH₄⁺ nas plantas transformadas. Não foi observado alteração dos teores de N-amino livre nas bainhas e folhas das plantas com 0,15 mM de N-NH₄⁺, possivelmente por causa do pequeno tempo de exposição ao NH₄⁺ (três horas).

Com 2,0 mM de N-NH₄⁺ duas linhagem apresentaram menores teores de NH₄⁺ na raiz (Figura 11), no entanto, não foi verificado decréscimo dos teores de N-amino nas raízes (Figura 12). A falta de relação entre absorção de NH₄⁺, teor de N-NH₄⁺ e N-amino livre pode ser causada pelo fato de que o silenciamento do gene *OsAMT1.3* possui pouca influência na absorção com alta concentração de NH₄⁺, onde os transportadores de baixa afinidade atuam

na absorção de NH_4^+ com mais intensidade com valores de V_{max} superiores aos de alta afinidade (LI et al., 2012), enquanto os genes da família *OsAMT1* apresenta baixa expressão (Figura 8 e 9).

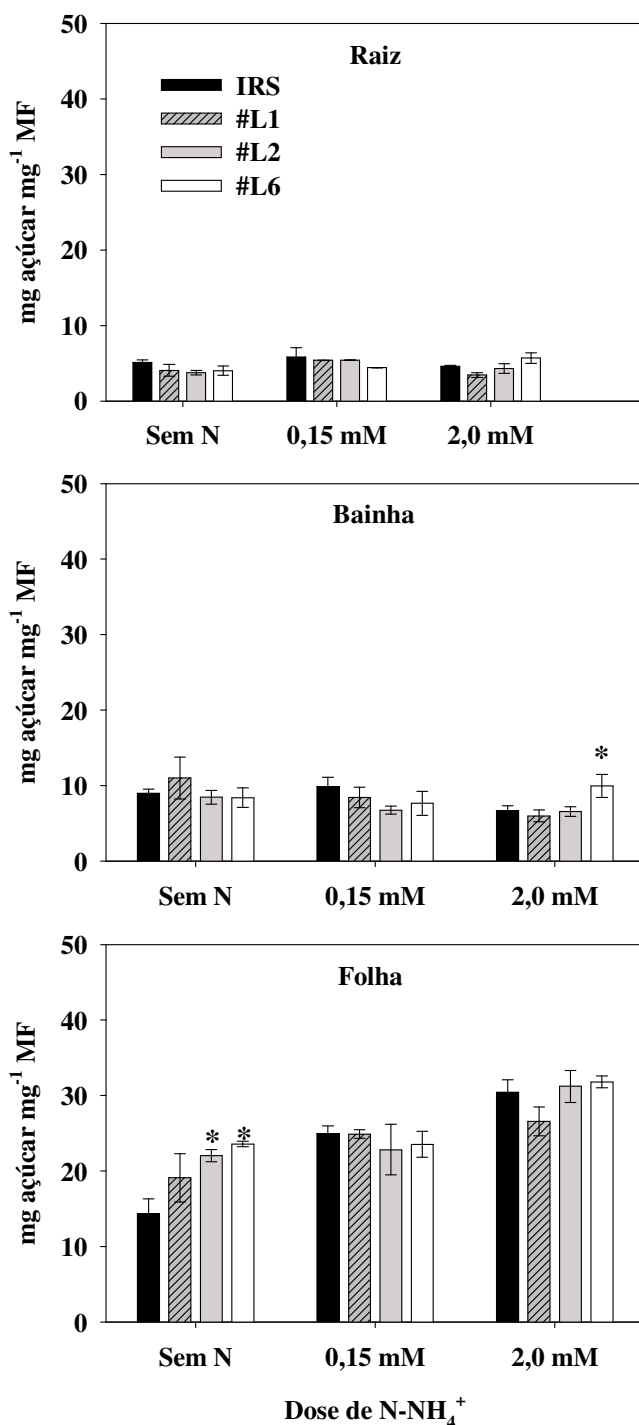


Figura 13. Teores de açúcares livres nas linhagens de plantas transformadas com amiRNA para silenciar o gene *OsAMT1.3* (L1, L2 e L6) e na planta controle IRS transformadas com vetor vazio com os seguintes tratamentos: Sem N por três dias, ressuprimento com 0,15 mM de N-NH_4^+ e 2,0 mM de N-NH_4^+ . * indica diferença entre a linhagem e a planta controle (IRS) obtido pelo teste F no mesmo tratamento ($P < 0,05$).

O silenciamento do gene *OsAMT1.3* causou a pouca alteração no conteúdo de açúcares solúveis, com maior teor na L6 nas bainhas das plantas com 2,0 mM de N-NH₄⁺ e nas folhas nas linhagens L2 e L6 do tratamento sem N por três dias quando comparado com as plantas controle IRS (Figura 13). Nas plantas submetidas ao ressuprimento com 0,15 mM de N-NH₄⁺ não houve alteração dos teores de açúcares solúveis em nenhuma das partes analisadas e nas linhagens comparadas com as plantas controle IRS. Apesar de trabalhos sugerirem alteração dos teores de açúcares com a maior absorção de N (SOUZA et al., 1998; SANTOS et al., 2009), pode também não ocorrer alteração como observado por SPERANDIO (2011). Os teores de açúcares solúveis são fortemente influenciados pela condição de crescimento das plantas, como fotoperíodo e intensidade luminosa. Dessa forma, a comparação da alteração dos teores de açúcares solúveis entre diferentes experimentos é prejudicada.

O menor influxo de NH₄⁺ com 0,15 mM de N-NH₄⁺ não foi suficiente para alterar o teor de açúcares nas raízes. Possivelmente a alteração da absorção de NH₄⁺ com altas doses de NH₄⁺ pode levar também a reduções dos teores de açúcares solúveis por causa do consumo de esqueletos de carbono durante a assimilação de NH₄⁺ pelo ciclo GS-GOGAT (SOUZA e FERNANDES, 2006).

A estratégia para estudar a absorção de NH₄⁺ usando o silenciamento do gene *OsAMT1.3* via amiRNA foi satisfatória, gerando resultados inéditos para a nutrição de plantas no que se refere a regulação da absorção de NH₄⁺ em baixas concentrações. Pela possível característica de regulador de outros membros da família OsAMT1, o transportador OsAMT1.3 ainda necessita de detalhada análise para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nos resultados encontrados no presente trabalho. Um exemplo a ser seguido é o trabalho feito com o transportador de NO₃⁻ NRT1.1 (CHL1) em *Arabidopsis* (HO et al., 2009) que por meio de análises de bioinformática e mutação específica foram encontrados resíduos de aminoácidos essenciais para a ação regulatória da absorção de NO₃⁻, além de proteínas regulatórias envolvidas na percepção e sinalização da concentração externa de nitrato.

5. CONCLUSÕES

O silenciamento via amiRNA do gene *OsAMT1.3* levou à redução de expressão dos genes dos transportadores *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2*, com reflexos na absorção de NH_4^+ nas linhagens mutantes ressupridas com baixa dose de NH_4^+ , conseqüentemente houve menores teores de N- NH_4^+ e N-amino livre nas plantas.

Esses resultados indicam que o silenciamento do gene *OsAMT1.3* altera a eficiência de uso de N no sistema de alta afinidade, entretanto, o transportador *OsAMT1.3* surge como um candidato a ser explorado, por afetar de maneira marcante a expressão dos genes *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise de silenciamento do gene *OsAMT1.3* nas linhagens escolhidas mostrou que ocorreu a redução do nível dos transcritos do gene *OsAMT1.3*. A linhagem L1 apresentou redução de aproximadamente 60% da expressão enquanto L2 e L6 apresentaram redução de expressão de aproximadamente 90% do nível de expressão do gene *OsAMT1.3*.

Os valores de massa fresca de raiz e de parte aérea das linhagens obtidas não diferiram daqueles obtidos na planta controle (IRS154). Na relação Raiz/Parte Aérea também não houve diferença entre as plantas.

A regulação da expressão dos genes da família *OsAMT1* precisa ser melhor explorada para identificar proteínas chaves na regulação da absorção de NH_4^+ pelo sistema de alta afinidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, A., SIVAKAMI, S. & RAGHURAM, N. Effect of nitrate, nitrite, glutamate, glutamine and 2-oxoglutarate on RNA, levels and enzyme activities of nitrate reductase and nitrite reductase in rice. *Physiol. Molec. Biol. Plants*, 13:17-25, 2007.
- ARAÚJO, J. L.; FAQUIN, V.; VIEIRA, N. M. B.; OLIVEIRA, M. V. C.; SORAES, A. A.; RORIGUES, C. R.; MESQUITA, A. C. Crescimento e produção do arroz sob diferentes proporções de nitrato e de amônio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.36, p.921-930, 2012.
- BOLOGNA, N. G.; SCHAPIRE A. L.; PALATNIK J. F. Processing of plant microRNA precursors. *Briefings in functional genomics*, v.12, p.37-45, 2012.
- CHENG, Z.-M.; SCHURR, J. A.; KAPAUN, J. A. Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. *Plant Cell Reports*, v. 17, p. 646-649, 1998.
- 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.
- CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, Sexto levantamento, março 2013. **Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab**, 25p. 2013.
- CORNEJO, M.-J.; LUTH, D.; BLANKENSHIP, K. M.; ANDERSON, O. D.; BLECHL, A. E. Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice, *Plant Molecular Biology*, v. 23, p. 567-581, 1993.
- CORUZZI, G. M.; ZHOU, L. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effects'. *Current Opinion in Plant Biology*, v.4, p.247-253, 2001.
- DUAN, Y.H.; ZHANG, Y.L.; SHEN, Q.R. & WANG, S.W. Nitrate effect on rice growth and nitrogen absorption and assimilation at different growth stages. *Pedosphere*, 16:707-717, 2006.
- 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. *Ann.Bot.*, 99:1153-1160, 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.
- EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. **Cultivo de arroz irrigado**. Em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap01.htm>>. Acesso em: 20 de abril de 2014.
- EPSTEIN, E., BLOOM, A., EPSTEIN. Nutrição e crescimento. Nutrição mineral de plantas. Londrina: Planta, 251-286, 2006.
- FAGERIA, N. K., SANTOS, A. D., CUTRIM, V. A. Produtividade de arroz irrigado e eficiência de uso do nitrogênio influenciadas pela fertilização nitrogenada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(7), 1029-1034, 2007.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Lowland rice response to nitrogen fertilization. **Communication Soil Science Plant Analysis**, v. 32, p. 1405-1428, 2001.

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

FERREIRA, L. M. **Caracterização funcional do transportador de amônio osamt1.3 e seu efeito sobre a nutrição nitrogenada em plantas de arroz**. 2013. 71f. Dissertação de Mestrado. (Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

FU, J.; SAMPALO, R.; GALLARDO, F.; CÁNOVAS, F. M.; KIRBY, E. G. Assembly of a cytosolic pine glutamine synthetase holoenzyme in leaves of transgenic poplar leads to enhanced vegetative growth in young plants. **Plant Cell and Environment**, v.26, n.3, p.411–418, 2013.

GAO, J.; LIU, J.; LI, B.; LI, Z. Isolation and purification of functional total RNA from blue-grained wheat endosperm tissues containing high levels of starches and flavonoids, **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.185a-185i, 2001.

GLASS A. D. M. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, p.453–470, 2003.

GLASS A. D. M.; BRITTO, D. T.; KAISER, B. N.; KINGHORN, J. R.; KRONZUCKER, H. J.; KUMAR, A.; OKAMOTO, M.; RAWAT, S.; SIDDIQI, M. Y.; UNKLES, S. E.; VIDMAR, J. J. The regulation of nitrate and ammonium transport system in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.855-864, 2002.

GOOD, A. G.; SHRAWAT, A. K.; MUENCH, D. G. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? **TRENDS in Plant Science**, v.9, n.12, p.597-605, 2004.

GRAFF, L.; OBRDLIK, P.; YUAN, L.; LÓQUE, D.; FROMMER, W. B.; VON WIRÉN, N. N-terminal cysteines affect oligomer stability of the allosterically regulated ammonium transporter LeAMT1;1. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 4, p. 1361–1373, 2011.

HABASH, D. Z.; MASSIAH, A. J.; RONG, H. L.; WALLSGROVE, R. M.; LEIGH, R. A. The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. **Annals of Applied Biology**, v.138, n.1, p.83–89, 2001.

HIEI, Yukoh; KOMARI, Toshihiko. Agrobacterium-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. **Nature Protocols**, v. 3, n. 5, p. 824-834, 2008.

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.

HO, C. H.; LIN, S. H.; HU, H. C.; TSAY, Y. F. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. **Cell**, v.138, p. 1184–1194. 2009.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural of Experimental Station Bull**, v.347, p.1-32, 1950.

HOLZSCHUH, M. J., BOHNEN, H., ANGHINONI, I., PIZZOLATO, T. M., CARMONA, F. C., CARLOS, F. S. Absorção de nutrientes e crescimento do arroz com suprimento combinado de amônio e nitrato. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 35(4), 1357-1366, 2011.

- 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.
- HUTVAGNER, G.; MCLACHLAN, J.; PASQUINELLI, A. E.; BALINT, E.; TUSCHL, T.; ZAMORE, P. D. A cellular function for the RNA interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. **Science**, v.293, p. 837-838, 2001.
- 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 NH_4^+ . **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.643-647, 2003.
- KAISER, B. N.; RAWAT, S. R.; SIDDIQI, M. Y.; MASLE, J.; GLASS, A. D. M. Functional analysis of an Arabidopsis T-DNA ‘Knockout’ of the high-affinity NH_4^+ transporter AtAMT1;1. **Plant Physiology**, v.130, p.1263–1275, 2002.
- KHVOROVA, A.; REYNOLDS, A.; JAYASENA, S. D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. **Cell**, v. 115, p. 209–216, 2003.
- KURIHARA, Y.; WATANABE, Y. Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. **Proc Natl Acad Sci**, v.101, p. 12753–12758, 2004.
- LANQUAR, V., LOQUÉ, D., HÖRMANN, F., YUAN, L., Bohner, A., ENGELSBERGER, W. R., FROMMER, W. B. Feedback inhibition of ammonium uptake by a phospho-dependent allosteric mechanism in Arabidopsis. **The Plant Cell Online**, 21(11), 3610-3622, 2009.
- LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Nitrogen use efficiency. Uptake of nitrogen from the soil. **Annals of Applied Biology**, v.149, n.3, p.243-247, 2006.
- LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.555-564, 2003.
- LEE, R. C.; FEINBAUM, R.L.; AMBROS, V. The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, p.843-854, 1993.
- LEE, Y.; KIM, M.; HAN, J.; YEOM, K. H.; LEE, S.; BAEK, S. H.; KIM, V. N. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **Embo J.** v. 23, p. 4051–4060. 2004.
- LI BAO-ZHEN, MIKE MERRICK, LI SU-MEI, LI HONG-YING, ZHU SHU-WEN, SHI WEI-MING, SU YAN-HUA. Molecular Basis and Regulation of Ammonium Transporter in Rice. **Rice Science**, 16(4): 314–322. , 2009.
- LI, S. M., LI, B. Z., SHI, W. M. Expression patterns of nine ammonium transporters in rice in response to n status. **pedosphere**. **22(6)**: 860–869, 2012.
- LIMA, J.E.; KOJIMA, S.; TAKAHASHI, H. & VON WÍREN, N. Ammonium Triggers Lateral Root Branching in Arabidopsis in an AMMONIUM TRANSPORTER1 ; 3-Dependent Manner. **The plant cell. Society** 22, p.3621-3633, 2010.
- LIN, J.; ZHOU, B.; YANG, Y.; ZHAO, X.; GUO, X.; HUANG, X.; TANG, D.; LIU, X. Piercing and vacuum infiltration of the mature embryo: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of indica rice. **Plant Cell Reports**, v. 28, p. 1065-1074, 2009.
- LINDBO, J. A.; DOUGHERTY, W. G. untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplast. **Virology**, p.725-733, 1992.

- LOQUÉ, D.; von WIRÉN, N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.1293–1305, 2004.
- LOULAKAKIS, K. A.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A. Plant NAD(H)-glutamate dehydrogenase consists of two subunit polypeptides and their participation in the seven isoenzymes occurs in an ordered ratio. **Plant Physiology**, V.97, p.104–111, 1991.
- MALLORY, A. C.; REINHART, B. J.; JONES-RHOADES, M. W.; TANG, G.; ZAMORE, P. D.; BARTON, M. K.; BARTEL, D. P. MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. **Embo Journal**, v. 23, p. 3356–3364, 2004.
- MAMIDALA, P.; NANNA, R. S. Influence of antibiotics on regeneration efficiency in tomato, **Plant Omics Journal**, v. 2, p. 135-140, 2009.
- MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**, 2nd ed., Academic Press, Cambridge, 1995.
- OSSOWSKI S.; SCHWAB, R.; WEIGEL D. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. **The Plant Journal**, v. 53, p. 674–690, 2008.
- PALATNIK, J.F.; WOLLMANN, H.; SCHOMMER, C., SCHWAB R.; BOISBOUVIER, J.; RODRIGUEZ, R.; WARTHMAN, N.; ALLEN, E.; DEZULIAN, T.; HUSON, D.; CARRINGTON, J. C.; WEIGEL, D. Sequence and expression differences underlie functional specialization of Arabidopsis microRNAs miR159 and miR319. *Dev. Cell* v. 13, p.115–125, 2007.
- RANATHUNGE, K.; EL-KEREAMY, A.; GIDDA, S.; BI, Y.; 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.56, i.4, p.965 -979, 2014.
- RANGEL, R. P. **Morfologia, arquitetura radicular e metabolismo de nitrogênio em variedades de arroz sob baixa disponibilidade de amônio**. 2014. p.66 Dissertação de Mestrado.(Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.
- REINHART, B. J.; B.J.; SLACK, F. J.; BASSON, M.; PASQUINELLI, A. E.; BETTINGER, J.C.; ROUGVIE, A. E.; HORVITZ, H. R.; RUVKUN, G. The 21 nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 403, p. 901-906, 2000.
- RIBEIRO JÚNIOR, J. I. **Análises estatísticas no SAEG**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 301 p.
- SANTOS, L. A., BUCHER, C. A., SOUZA, S. R., FERNANDES, M. S. Effects of nitrogen stress on proton-pumping and nitrogen metabolism in rice. **Journal of Plant Nutrition**, v. 32, p. 549 – 564, 2009.
- SCHWAB, R.; OSSOWSKI, S.; RIESTER, M.; WARTHMAN, N.; WEIGEL, D. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 18, p. 1121–1133, 2006.
- SCHWAB, R.; PALATNIK, J. F.; RIESTER, M.; SCHOMMER, C.; SCHMID, M.; WEIGEL, D. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. **Dev. Cell**, v. 8, p. 517–527, 2005.
- SCHWARZ, D. S.; HUTVAGNER, G.; DU, T.; XU, Z.; ARONIN, N.; ZAMORE, P. D. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v. 115, p. 199–208, 2003.

- SHRAWAT, Ashok K.; GOOD, Allen G. Genetic engineering approaches to improving nitrogen use efficiency. **ISB News Report**, p. 1-5, 2008.
- SONODA, Y., IKEDA, A., SAIKI, S., YAMAYA, T. AND YAMAGUCHI, J. Feedback regulation of the ammonium transporter gene family AMT1 by glutamine in rice. **Plant Cell Physiol**, 44, 1396-1402, 2003b.
- SONODA, Y.; IKEDA, A.; SAIKI, S.; von WIRÉN, N.; YAMAYA, T.; YAMAGUCHI, J. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (OsAMT1;1-1;3) in rice. **Plant Cell Physiology**, v.44, p.726-734, 2003.
- SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In: Fernandes, M.S. (Org.). *Nutrição Mineral de Plantas*. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006a, v. 1, p. 215-252.
- SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L.; FERNANDES, M. S. Nitrogen remobilization during the reproductive period in two Brazilian rice varieties. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, n.10, p.2049-2063, 1998.
- SOUZA, V. M. **Parâmetros cinéticos da absorção de amônio e expressão gênica dos transportadores OsAMT1 em variedades de arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2010. 60f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.
- 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.
- TABUCHI, M.; ABIKO, T.; YAMAYA, T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.9, p.2319-2327, 2007.
- TABUCHI, M.; 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.
- 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.
- WARTHMAN, N.; CHEN, H.; OSSOWSKI, S.; WEIGEL, D.; HERVÉ, P. Highly Specific Gene Silencing by Artificial miRNAs in Rice. **Plos One**, v. 3, i. 3, e1829, 2008.
- YANG, L.; LIU, Z.; LU, F. DONG, A.; HUANG, H. SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. **Plant J**, p.47, p.841-850, 2006.
- YEMM, E. W. & COCKING, E. C. The determination of amino-acid with ninhydrin. **Analytical Biochemistry**, v.80, p.209-213, 1955.
- YEMM, E. W. e WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plants extracts by anthrone. **Biochemistry**, v.57, p.508-514, 1954.
- YU, B.; YANG, Z.; LI, J.; MINAKHINA, S.; YANG, M.; PADGETT, R. W.; STEWARD, R.; CHEN, X. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. **Science**, v. 307, p. 932-935, 2005.
- YUAN, L., LOQUE, D., YE, F., FROMMER, W. B., WIRÉN, N. V. Nitrogen-dependent posttranscriptional regulation of the ammonium transporter AtAMT1;1. **Plant Physiology**, v. 143, p. 732-744, 2007.

ZHU, Y.Y.; LIAN, J.; ZENG, H.Q.; GAN, L.; DI, T.J.; SHEN, Q.R.; XU, G.H. Involvement of Plasma Membrane H⁺ATPase in Adaption of Rice to Ammonium Nutrient Original. **Rice Science**, V 18, Issue 4, Pag. 335-342, 2011.