UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

Marielle Vitti

Caracterização funcional de genes codificadores de transportadores de amônio em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

Piracicaba 2015

MARIELLE VITTI

Caracterização funcional de genes codificadores de transportadores de amônio em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira

Piracicaba 2015 AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Vitti, Marielle

Caracterização funcional de genes codificadores de transportadores de amônio em cana-de-açúcar / Marielle Vitti; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - Piracicaba, 2015.

106 p. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

 Bioinformática 2. Biomassa 3. Cultura de tecidos 4. Espectrometria de massas
Expressão gênica 6. Fertilizantes nitrogenados 7. Genótipos 8. Sequenciamento genético 9. Transgenes I. Título

CDU 577.21:631.84

Dedico esse trabalho à minha família, principalmente aos meus pais, Irene e Roberto, que sempre se esforçaram para que eu estudasse e me deram o apoio necessário para essa jornada.

Meu amor por vocês é infinito

Agradeço também ao meu marido, Cássio, que com muito amor e paciência me acompanhou em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela dádiva da vida.

Ao Professor Dr. Antonio Figueira por ter me oferecido todo o suporte para a realização desse trabalho e pelos ensinamentos sempre valiosos.

Ao Professor Dr. Joni Esrom Lima pela confiança que depositou em mim e por ter me ajudado a crescer como profissional nesses mais de quatro anos de convivência.

A Professora Dra. Marie-Anne Van Sluys por ter disponibilizado seu laboratório para que parte desse projeto pudesse ser realizado, e a Professora Dra. Nathalia de Setta que acompanhou o desenvolvimento do trabalho em São Paulo e depois por videoconferências, e teve a paciência de me ensinar a anotar genes.

Aos Professores Dr. José Albertino Bendassolli e Paulo Cesar Ocheuze Trivellin por estar sempre à disposição e por todo o suporte na realização de análises de ¹⁵N em seu laboratório.

Ao Professor Dr. Fabio Tebaldi, por ter disponibilizado a lupa de seu laboratório para as análises de GUS/GFP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos técnicos do Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP: Raquel Orsi, Felippe Campana, Wlamir Godoy, José Alves, Paulo Cassieri e Inês Possignolo, pela atenção e ajuda dada. Agradeço imensamente todo o suporte que vocês me deram.

Aos amigos do Laboratório de Melhoramento de Plantas: Daniela Bardella, Eduardo Bressan, Fernando Ferreira, Flávia Bento, Gabriela Juliano, Jamile Silva, Juliana Leles, Karina Brandão, Lucas Anjos, Renato Ferreira, Roberto Camargo e Thaísa Pinheiro, pela ótima convivência. De maneira especial queria agradecer: André Tagliaferro, Alessandra Koltun, Danielle Scotton, Layanne Souza, Luís Damasceno Serezino e Melissa Alves, muito obrigada por serem amigos de coração e me apoiarem me ajudando nos experimentos ou somente me incentivando a continuar em frente.

As Brunas da minha vida, Bruna Factor e Bruna Brogio, que apesar do pouco tempo que estiveram no laboratório contribuíram imensamente para que eu terminasse esse trabalho.

Às minhas amigas, Sarina Tsui, Elaine Cardoso, Maíra Gonzáles, Fernanda Gaudio, Gabrielle Valadão e Bianca Minink Villa por todas as risadas e por me fazerem acreditar que "no final dá tudo certo".

Aos meus familiares que suportaram minhas ausências e me deram amor e apoio incondicional nesse período. Obrigada pela confiança, sem vocês nada disso seria possível.

A todos que participaram direta ou indiretamente desse projeto, deixo aqui meus sinceros agradecimentos.

"É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota."

Theodore Roosevelt

RESUMO

VITTI, M. Caracterização funcional de genes codificadores de transportadores de amônio em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). 2015. 106 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

A demanda crescente por alimentos e biocombustíveis tem levado ao aumento indiscriminado do uso de fertilizantes nitrogenados na agricultura, o que tem ocasionado impactos negativos em ecossistemas aquáticos e terrestres. Para manutenção dos altos níveis de produtividade, o uso de fertilizantes a base de nitrogênio (N) na cultura de cana-de-açúcar é inevitável, sendo amônio a fonte inorgânica de N preferencial para essa espécie. Em plantas, os transportadores responsáveis pelo transporte de amônio pertencem à família AMT (AMMONIUM TRANSPORTERS), no entanto, pouco se conhece sobre a funcionalidade desses transportadores. Para isso, esse trabalho teve como objetivo a caracterização funcional e molecular de transportadores de amônio membros da subfamília AMT1 de cana-de-açúcar em Arabidopsis thaliana. As sequências gênicas e promotoras dos membros da subfamília AMT1 de cana-de-açúcar foram identificadas por seleção em biblioteca de BACs (Bacterial artificial chromosome). Análises de expressão gênica realizadas em raízes de cana-de-açúcar demonstraram que os genes ScAMT1.1 e ScAMT1.3 são regulados pelo status de N e atuam na aquisição de amônio quando a disponibilidade exógena de N é limitante. Experimentos de localização da expressão tecido/órgão específico em A. thaliana utilizando os promotores de ScAMT1.1 e ScAMT1.3 fusionados aos genes repórters GUS e GFP demonstraram que os genes de cana-de-açúcar são preferencialmente expressos na região da endoderme/periciclo e vascular das células das raízes, sendo regulados espacialmente pela disponibilidade e fonte de N. A caracterização funcional dos transportadores de amônio identificados no genoma de cana-de-açúcar superexpressos no quádruplo mutante qko de arabidopsis demonstraram que essas plantas apresentaram alta sensibilidade ao metilamônio (análogo tóxico ao amônio), além de produzirem biomassa a níveis comparáveis ao genótipo selvagem ('Col-0') quando cultivadas exclusivamente em amônio como fonte única de N, indicando a funcionalidade de ScAMT1.1 e ScAMT1.3 no transporte de metilamônio e amônio. Análises de influxo de ¹⁵Namônio em raízes de plantas transgênicas de qko superexpressando os genes ScAMT1.1 e ScAMT1.3 demonstraram a existência de um sistema de transporte de alta afinidade a amônio (High Affinity Transporter System - HATS) ativo, o qual é modulado em resposta ao status de N das plantas. Esses resultados indicam que os transportadores ScAMT1.1 e ScAMT1.3 de cana-de-acúcar são funcionais em raízes, atuando com propriedade distintas no transporte de amônio nessa gramínea regulando a aquisição de amônio de acordo com a disponibilidade de N no solo.

Palavras-chave: BACs. Cana-de-açúcar. Transportadores de amônio. Expressão heteróloga. *Arabidopsis thaliana*.

ABSTRACT

VITTI, M. Functional characterization of genes encoding ammonium transporters in sugarcane (*Saccharum* spp.). 2015. 106 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

The growing demand for food and biofuels has led to the indiscriminate growth in use of nitrogen (N) fertilizers in agriculture, which has caused negative impacts in water and land ecosystems. To maintain high yields, the use of N fertilizer in sugarcane cultivation is inevitable, and ammonium is the preferred N source of this species. In plants, transporters from the AMT (AMMONIUM TRANSPORTERS) family are responsible for ammonium acquisition, but little is known about the functionality of these transporters in sugarcane. This work aimed to functionally characterize members of the AMT1 gene subfamily of sugarcane in Arabidopsis thaliana. Gene and promoter region sequences of members of the sugarcane AMT1 subfamily were identified in a Bacterial Artificial Chromosome (BAC) library. Expression analysis in sugarcane roots demonstrated that ScAMT1.1 and ScAMT1.3 are regulated by N status and participate in ammonium uptake when exogenous N availability is limiting. The expression of the promoter region of ScAMT1.1 and ScAMT1.3 directing the expression of the reporter genes GUS and GFP demonstrated preferential expression in the endodermis/pericycle regions of arabidopsis roots, spatially regulated by availability and source of N. The functional characterization of ammonium transporters identified in the sugarcane genome over-expressed in the quadruple arabidopsis mutant *qko* demonstrated that the complemented plants exhibited high sensitivity to methyl-ammonium (a toxic ammonium analog), while producing biomass at comparable levels to the wild 'Col-0' genotype when cultivated exclusively in ammonium as the only N source, indicating the functionality of ScAMT1.1 and ScAMT1.3 in the transport of methyl-ammonium and ammonium. Analysis of ¹⁵N-ammonium influx in roots of complemented *qko* plants demonstrated the existence of an active ammonium High Affinity Transporter System (High Affinity Transporter System -HATS), which is modulated in response to the plant N status. These results indicated that the sugarcane ScAMT1.1 and ScAMT1.3 transporters are functional in roots, acting with distinct properties in the ammonium transport in this grass, regulating the ammonium acquisition according to the availability of soil N level.

Keywords: BACs. Sugarcane. Ammonium Transporters. Heterologous Expression. *Arabidopsis thaliana*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Fertilizantes nitrogenados	16
2.2 Cana-de-açúcar	17
2.3 Eficiência no uso de nitrogênio (NUE)	
2.4 Genes relacionados ao transporte de amônio	
2.5 Regulação dos transportadores de amônio	
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 Identificação dos genes <i>ScAMT1.1</i> e <i>ScAMT1.3</i> em biblioteca de BACs (<i>Bacterial artificial chromosome</i>) de cana-de-açúcar	24
3.2 Amplificação e clonagem das sequências gênicas e promotoras dos AMTs de cana- açúcar	-de- 25
3.3 Construção dos vetores de transformação	
3.4 Transformação de plantas de arabidopsis	
3.5 Seleção de transgênicos	30
3.6 Expressão de ScAMT1.1 e ScAMT1.3 nos eventos de transgenia	
3.6.1 Extração de RNA total	
3.6.2 Quantificação e Síntese de RNA	
3.6.3 Análise quantitativa de transcritos reversos	
3.7 Análise fenotípica dos transgênicos de arabidopsis	
3.7.1 In vitro	
3.7.2 In vivo	
3.8 Localização subcelular dos AMTs de cana-de-açúcar em arabidopsis	
3.9 Regulação da expressão gênica de ScAMT1.1 e ScAMT1.3 pelo status de N em can açúcar	a-de- 35
3.9.1 Extração de RNA total de cana-de-açúcar	
3.9.2 Quantificação e Síntese de cDNA	
3.9.3 Análise quantitativa de transcritos reversos	
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 Identificação dos transportadores de amônio em biblioteca de BACs de cana-de-aç	úcar 38
4.2 Regulação da expressão gênica de <i>ScAMT1.1</i> e <i>ScAMT1.3</i> pelo status de N em can açúcar	na-de- 56

4.3 Localização dos AMT1s de cana-de-açúcar em Arabidopsis	. 62
4.4 Expressão heteróloga de <i>ScAMT1.1</i> e <i>ScAMT1.3</i> de cana-de-açúcar em mutante quádru para <i>AMMONIUM TRANSPORTERS</i> em <i>Arabidopsis thaliana</i>	plo . 74
4.5 Caracterização fenotípica das plantas transgênicas de arabidopsis complementadas com ScAMT1.1 e ScAMT1.3 de cana-de-açúcar	76
4.5.1 In vitro	.76
4.5.2 In vivo	. 90
5. CONCLUSÕES	. 97
REFERÊNCIAS	. 99

1. INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial e a crescente demanda por alimentos e biomassa têm levado ao aumento exponencial da quantidade de fertilizantes nitrogenados utilizados na agricultura, visando à obtenção de alta produtividade. A intensificação e a conversão de novas áreas para uso agrícola causou um aumento global de cerca de 900% no uso de fertilizantes nitrogenados (MULVANEY et al., 2009). Estima-se que em 2050 o uso desses fertilizantes aumentará para 240 milhões de ton (TILMAN et al., 1999). Dessa maneira, o uso excessivo de fertilizantes nitrogenados ultrapassou os limites aceitáveis de alterações ambientais (ROCKSTRÖM et al., 2009). O uso excessivo de fertilizantes à base de nitrogênio (N), aliado a uma perda de 50-70% do N adicionado (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010), tem introduzido cada vez mais N reativo ao ambiente (GALLOWAY et al., 2008; AUSTIN et al., 2013), o que aumenta a emissão de gases do efeito estufa, como N₂O, NO e NH₃, e a contaminação de corpos d'águas devido à lixiviação do nitrato, com importantes consequências ambientais (ALLEN et al., 2010; GALLOWAY et al., 2008; ERISMAN et al., 2010). O impacto ambiental tende a ser agravado com a demanda crescente por biocombustíveis, que devem privilegiar a incorporação de solos marginais, e, portanto com maior requerimento de fertilizantes a base de N (ERISMAN et al., 2010).

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) apresenta destaque devido ao seu potencial para a produção de bioetanol; no entanto as perdas advindas da fertilização nitrogenada nessa espécie podem chegar a 50% (TRIVELLIN et al., 2002). Quando comparada a outras espécies cultivadas, como sorgo e milho, a cana-de-açúcar possui baixa capacidade de absorver e estocar nitrato, sendo o amônio a fonte preferencial de N para cana-de-açucar, tanto em condições de alta disponibilidade de N (ROBINSON et al., 2011) quanto sob deficiência de N (comunicação pessoal, Dr. Joni Esrom Lima). Apesar dessa preferência por amônio, pouco se conhece sobre os genes que codificam esses transportadores em plantas cultivadas, como cana-de-açúcar. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi a caracterização funcional e molecular dos transportadores de amônio da subfamília AMT1 de cana-de-açúcar no sistema heterólogo *Arabidopsis thaliana*, objetivando comprovar a essencialidade desses transportadores de membrana no processo de absorção de amônio em raízes dessa gramínea.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fertilizantes nitrogenados

O nitrogênio (N) é um nutriente essencial para o desenvolvimento das plantas e, portanto, a deficiência ou excesso de N nos solos pode afetar a produtividade de plantas cultivadas (MARSCHNER, 1986; LEA; AZEVEDO, 2006). O desenvolvimento do processo "Haber-Bosch", que tornou possível a conversão de sua forma gasosa não utilizável (N₂ atmosférico) para amônia (NH₃), possibilitou a produção de fertilizantes nitrogenados em escala industrial, com impacto pronunciado no aumento da produtividade agrícola. Estima-se que o número de pessoas sustentadas por hectare (ha) de terra cultivada subiu de 1,9 para 4,3 pessoas entre 1908 e 2008, particularmente devido ao processo "Haber-Bosch" (ERISMAN et al., 2008). Atualmente, estima-se que 120 milhões de toneladas de N atmosférico são convertidos em suas formas reativas, ultrapassando os limites ambientais aceitáveis de alteração no ciclo biogeoquímico de N (ROCKSTRÖM et al., 2009). Para suprir a demanda crescente de alimentos, estima-se que o uso de fertilizantes nitrogenados passou de 11,6 milhões de ton em 1961 para 104 milhões de ton em 2006 (MULVANEY et al., 2009), com expectativa de aumento para 240 milhões de ton em 2050 (TILMAN et al., 1999). Como resultado, o excesso de N reativo introduzido no ambiente apresenta sérios impactos nos ecossistemas terrestres e aquáticos (ERISMAN et al., 2008; ROCKSTRÖM et al., 2009; GALLOWAY et al., 2008; ALLEN et al., 2010).

Um dos impactos mais severos do uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados é a emissão de gases do efeito estufa, como amônia (NH₃) e particularmente o óxido nitroso (N₂O). Por exemplo, na ausência de influência humana, a emissão de NH₃ e NO na atmosfera é de cerca de 0,5 Kg N ha⁻¹ anuais, mas em áreas altamente fertilizadas, essa emissão chega a 10 Kg N ha⁻¹ ano⁻¹ (GALLOWAY et al., 2004). Para o N₂O, estudos recentes tem demonstrado que a emissão desse gás, principalmente, em culturas utilizadas para produção de biocombustíveis, como cana-de-açúcar e milho, depende não somente da quantidade de N adicionado e do tipo de solo e clima, mas principalmente da forma como o fertilizante nitrogenado é aplicado (ALLEN et al., 2010; GAGNON et al., 2011; do CARMO et al., 2012). Em solos australianos cultivados com cana-de-açúcar, a taxa de emissão de N₂O é de 2,95% quando a quantidade de fertilizante a base de N é fracionada e aplicada por duas vezes ao longo do ciclo da cultura, mas a emissão desses gases passa a ser de 6,7% quando todo o

fertilizante é aplicado de uma só vez (ALLEN et al., 2010). Desse modo, o conhecimento sobre a resposta das espécies vegetais ao N adicionado poderia possibilitar um manejo eficiente da cultura, diminuindo a contaminação ambiental.

2.2 Cana-de-açúcar

Nas últimas décadas, o interesse para o desenvolvimento de fontes alternativas de energia renovável, que possam substituir os combustíveis fósseis, aumentou devido a preocupações relacionadas aos estoques mundiais de petróleo, os preços flutuantes e os impactos ambientais gerados por esses combustíveis (WACLAWOVSKY et al., 2010). Nesse cenário, a cultura de cana-de-açúcar tem sido alvo de desaque devido ao grande potencial para produção de álcool combustível, o que se reflete na expansão crescente da cultura. O Brasil responde atualmente por cerca de 35% da produção mundial de cana-de-açúcar e para a safra de 2015/2016, a área destinada à atividade sucroalcooleira está estimada em 9 milhões de ha e a produção nacional em 654,6 milhões de ton, sendo 56% para a produção de álcool anidro e hidratado (CONAB, 2015). Dentre os 14 países que são os maiores produtores de cana-deaçúcar, respondendo por 86% da produção mundial, o Brasil aparece na primeira posição, com a maior produção e o menor volume de fertilizantes nitrogenados aplicados anualmente, 60 a 100 Kg N ha⁻¹ (ROBINSON et al., 2011). Porém, esse panorama pode sofrer alterações com a expansão da cultura para áreas marginais, a qual pode acarretar um aumento significativo na quantidade de N utilizado e consequentemente um desbalanço na relação entre produção e sustentabilidade da cultura, como alternativa ao combustível fóssil.

Em 2014, cerca de 32 milhões de toneladas de fertilizantes foram utilizados em canaviais no Brasil (ANDA, 2014), mas, apesar da melhoria dos sistemas de cultivos em cana-de-açúcar com a otimização no processo de aplicação, disponibilidade de N, e o emprego da fixação biológica de N (OLIVEIRA et al., 1999; GAVA et al., 2001; TRIVELIN et al., 2002; SIMONETE et al., 2003; BALDANI et al., 2002; MENDES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007), as perdas de N que ocorrem no solo podem chegar a 50% (TRIVELIN et al., 2002), o que indica uma baixa eficiência no uso de N em cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2007; ROBINSON et al., 2011).

Experimentos de campo utilizando fertilizantes nitrogenados marcados (¹⁵N) demonstraram que em "cana-planta", apenas 40% do N total absorvido/metabolizado é derivado do fertilizante, enquanto que em "cana-soca" pode chegar a 70% (SILVEIRA; CROCOMO, 1990; FRANCO et al., 2011). Durante a fase de maturação da cana ocorre um decréscimo acentuado do N total, o que sugere que a aquisição/absorção e transporte de N na planta possui papel fundamental principalmente durante o início do desenvolvimento e ainda, a fertilização a base de N é importante para a manutenção do crescimento e consequentemente, produtividade em cana-de-açúcar (FRANCO et al., 2011). Dessa forma, há a necessidade da compreensão do processo de aquisição e de transporte de N em cana-de-açúcar objetivando obter cultivares com maior eficiência no uso de N (NUE) (HIREL et al., 2007).

2.3 Eficiência no uso de nitrogênio (NUE)

A eficiência no uso de N (NUE) depende tanto da eficiência na absorção de N, que se refere à habilidade da planta em adquirir N do solo e do transporte de N em nível de raiz, quanto do uso interno de N, que se refere à assimilação de N e sua remobilização para outros tecidos (ROBINSON et al., 2007; CHARDON et al., 2010). Em plantas utilizadas para produção de biomassa, como cana-de-açúcar, o NUE é expresso como peso fresco ou seco produzido por conteúdo de N (GOOD et al., 2004). Com o objetivo de buscar diversidade genética para a eficiência no uso interno de N (iNUE) em cana-de-açúcar, 61 genótipos crescidos em condições limitantes ou suficientes de N apresentaram uma variação substancial para produção de biomassa, sugerindo que há diversidade a ser aproveitada em programas de melhoramento para essa característica específica, que poderia contribuir para a sustentabilidade da cultura em relação ao uso de N (ROBINSON et al., 2007).

A absorção de N pode ocorrer na forma de N inorgânico, como amônio e nitrato, ou na forma de N orgânico, como aminoácidos e peptídeos (MARSCHNER, 1986; NÄSHOLM et al., 2009). Em geral, nitrato é a forma mais abundante de N inorgânico no solo, mas por ser bastante solúvel e, portanto móvel no solo, processos como a conversão microbiana e a lixiviação ocasionam variações expressivas na concentração desse nutriente em solos cultivados (MILLER et al., 2007). O amônio por ser menos solúvel, é facilmente adsorvido na matriz dos solos cultivados, apresentando assim uma prevalência maior no ambiente

(MARSCHNER, 1995; MILLER et al., 2007; ROBINSON et al., 2011). A absorção de N inorgânico pelas raízes das plantas ocorre através de um sistema de transporte de alta afinidade (*High Affinity Transporter System - HATS*) quando a concentração de N disponível é menor que 1 mM ou através de um sistema de baixa afinidade (*Low Affinity Transporter System - LATS*) quando a concentração de N é maior que 1 mM (GLASS et al., 2002). Ambos os sistemas são modulados e, juntamente com mudanças no padrão de crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo mudanças na arquitetura radicular, possibilitam que as plantas possam lidar com a disponibilidade heterogênea de N no ambiente (KRAISER et al., 2011).

Estudos realizados com fertilizantes nitrogenados marcados (¹⁵NH₄NO₃ e NH₄¹⁵NO₃) demonstraram que, quando comparada a outras gramíneas cultivadas, como sorgo e milho, a cana-de-açúcar e espécies parentais de Saccharum apresentam uma menor capacidade para adquirir e estocar nitrato quando há alta disponibilidade de N (ROBINSON et al., 2011). Entre essas espécies, a contribuição do nitrato em relação ao N total das plantas foi bem menor em cana-de-açúcar, sendo somente 2 a 5%, enquanto que em milho o nitrato representou 22% do N total da planta (ROBINSON et al., 2011). Resultados similares foram obtidos em estudos de campo com plantas de cana que receberam dose comercial de fertilizante nitrogenado; nesse caso, a absorção de ¹⁵N-nitrato pelas raízes representou somente 15% da absorção de ¹⁵N-amônio (ROBINSON et al., 2011). Esses resultados indicam, portanto, que quando existe alta disponibilidade de N, amônio é a fonte preferencial de N para cana-de-açúcar (ROBINSON et al., 2011). Portanto, é possível que em condições de cultivo, a nutrição de N pela cana-de-açúcar seja dependente principalmente da aquisição de amônio. Apesar dessa preferência, comparações com arroz (Oryza sativa), uma espécie que preferencialmente utiliza amônio como fonte N (LOQUÉ; VON WIRÉN, 2004), demonstraram que a recuperação de fertilizantes nitrogenados aplicados ao solo é baixa em cana-de-açúcar, variando entre 20-30% (CHAPMAN et al., 1994; FRANCO et al., 2011), enquanto que em arroz essa recuperação pode chegar a 50-60% (GHALEY et al., 2010), o que indica uma reduzida capacidade de absorção de N em raízes de cana-de-açúcar. Com isso, fica evidente a necessidade de realizar a caracterização fisiológica e molecular do processo de absorção/aquisição de N do solo, objetivando o melhoramento do NUE em cana-de-açúcar.

2.4 Genes relacionados ao transporte de amônio

As proteínas transportadoras de amônio pertencem à superfamília MEP/AMT/Rh – METHYLAMMONIUM PERMEASES/ AMMONIUM TRANSPORTERS/ RHESUS (LOQUÉ; VON WIRÉN, 2004). O primeiro transportador dessa superfamília foi identificado em um mutante de levedura por meio de testes de resistência à metilamônio, um análogo tóxico do amônio (DUBOIS et al., 1979). Posteriormente, estudos de complementação de mutantes defectivos permitiram identificar genes transportadores de amônio e suas respectivas proteínas em leveduras (*MEP - METHYLAMMONIUM PERMEASES*) e plantas (*AMT - AMMONIUM TRANSPORTERS*) (MARINI et al., 1994; NINNEMANN et al., 1994). Proteínas homólogas à MEP/AMT também foram descritas em animais, incluindo o polipeptídeo Rhesus (Rh) em humanos (MARINI et al., 2000).

Em plantas, os transportadores responsáveis pela absorção de amônio pertencentes à família AMT (AMMONIUM TRANSPORTERS) já foram descritos para diversas espécies, incluindo Arabidopsis thaliana (GAZZARRINI et al., 1999; RAWAT et al., 1999; SOHLENKAMP et al., 2002), Solanum lycopersicum (VON WIRÉN et al., 2000), Lotus japonicus (SALVEMINI et al., 2001; SIMON-ROSIN et al., 2003; D'APUZZO et al., 2004) e Oryza sativa (SUENAGA et al., 2003; SONODA et al., 2003). No entanto, o número de genes AMTs presentes nas diversas espécies varia consideravelmente. Enquanto A. thaliana possui seis genes e L. japonicus e S. Lycopersicum possuem quatro genes cada, no genoma de Oryza sativa foram identificados dez ortólogos a AMTs (VON WIRÉN et al. 1997, SAIKI et al. 2002, SONODA et al., 2003, LOQUÉ; VON WIRÉN , 2004), os quais são divididos nas subfamílias AMT1 e AMT2 nas diversas espécies (LOQUE; VON WIRÉN , 2004). A subfamília AMT2 possui membros cujas sequências gênicas são mais proximamente relacionadas aos transportadores de amônio da família MEP (LUDEWIG et al., 2002). Em cana-de-açúcar, nenhum gene codificador de transportadores de amônio já foi descrito o que demonstra a importância do presente trabalho.

2.5 Regulação dos transportadores de amônio

Estudos funcionais identificaram os principais transportadores de membrana da família *AMT* que são responsáveis pela aquisição de amônio em plantas, demonstrando a essencialidade da nutrição dessa forma inorgânica de N. Na planta modelo *A. thaliana*, os

transportadores *AtAMT1;1* e *AtAMT1;3* são expressos principalmente em células da epiderme e cortex radicular, incluindo os pelos radiculares (LOQUÉ et al., 2006). A análise de absorção por influxo rápido (*short term uptake*) utilizando ¹⁵N-amônio em raízes de mutantes defectivos para esses transportadores demonstraram que *AtAMT1;1* e *AtAMT1;3* são responsáveis por 70% da absorção total de amônio (LOQUÉ et al., 2006). Nas raízes do mutante defectivo para o transportador *AtAMT1.1* foi observado um decréscimo de 30% na absorção de amônio na faixa de concentração de alta afinidade (LOQUÉ et al., 2006). A expressão ectópica de *AMT1.3* nas raízes do mutante *amt1.1* restaura a capacidade de absorção de amônio, indicando uma ação aditiva e sugerindo que possa haver uma função redundante desses membros da família AMT1 de arabidopsis no processo de aquisição de amônio (KAISER et al., 2002; LOQUÉ et al., 2006).

Além desses transportadores, a organização espacial e a atividade conjunta de outros membros da subfamília *AMT1* são responsáveis pela homeostasia de amônio em raízes. O mutante defectivo no transportador AMT1.2 de *A. thaliana* apresenta 26% menos influxo de ¹⁵N-amônio em suas raízes (YUAN et al., 2007). A análise do promotor do gene *AtAMT1.2* indicou sua expressão na endoderme e cortex das raízes, apontando a função desse carreador no transporte apoplástico de amônio (YUAN et al., 2007). O mutante quádruplo (*qko*) para transportadores de amônio de arabidopsis, defectivo nos genes *AMT1.1, AMT1.2, AMT1.3* e *AMT2;1*, ainda apresenta 10% de absorção de amônio em suas raízes quando comparado ao tipo selvagem. Essa capacidade de aquisição de N é devido a atividade da proteína transmembrana AMT1.5, a qual está localizada nas células da rizoderme e nos pelos radiculares (YUAN et al., 2007).

Em outras espécies, membros da subfamília AMT1 atuam no transporte de amônio nos diversos órgãos e tecidos. Em tomateiro, a expressão de *SlAMT1.1* também está localizada em pelos radiculares e apresenta forte indução sob restrição de N, indicando sua importante função no processo de aquisição de amônio (LUDEWIG et al., 2002). No entanto, *SlAMT1.3* não apresenta expressão localizada em raízes, somente na parte aérea da planta (VON WIRÉN et al., 2000). Contrariamente, em *L. japonicus, LjAMT1.1* apresenta maior expressão na parte aérea (D'APUZZO et al., 2004). Outro membro da família *AMT1, AtAMT1.4* identificado em arabidopsis apresenta expressão definida em grãos de pólen e tubo polínico, e sua função fisiológica foi atribuída à nutrição por amônio durante o desenvolvimento do pólen (YUAN et al., 2009). Esses resultados indicam que membros ortólogos da família *AMT1*

assim, na homeostase de amônio em distintos processos fisiológicos (LOQUÉ; VON WIRÉN, 2004). Portanto, a caracterização da localização espacial dos genes da família *AMT* nas diversas espécies vegetais é fundamental para compreensão do processo de absorção/aquisição de N do solo.

A regulação de expressão dos genes AMTs pelo status de N da planta também apresenta uma variação considerável entre as espécies. Sob condição de restrição de N, os genes que codificam os transportadores AtAMT1.1 e AtAMT1.3 são induzidos em raízes de arabidopsis (LOQUÉ et al., 2006). Similarmente, em arroz, OsAMT1.3 apresenta um aumento de transcritos detectados em raízes sob limitação de N (SONODA et al., 2003). No entanto, para OsAMT1.1, evidências sugerem uma complexa regulação, a qual varia de acordo com o genótipo estudado, incluindo expressão constitutiva entre tecidos e tratamentos e/ou indução em resposta ao aumento crescente da concentração de amônio no meio (SONODA et al., 2003, GAUR et al., 2012). Em arroz, outros genes estudados apresentam padrões distintos de expressão, como OsAMT2.1, sendo constitutiva nos diversos tecidos, independente do status de N da planta (SUENAGA et al., 2003). Para OsAMT3.1, um alto nível de transcritos foi detectado sob condição específica de deficiência de N na parte aérea da planta, enquanto para OsAMT3.2 foi identificada uma maior expressão em raízes submetidas tanto à deficiência quanto à suficiência de N (BAO-ZHEN et al., 2009). Em tomateiro, os três membros da subfamília AMT1 apresentam uma regulação diferenciada, enquanto SlAMT1.1 apresenta a expressão aumentada em raízes em resposta à deficiência de N, SlAMT1.2 responde principalmente à presença de amônio ou nitrato em raízes, e SlAMT1.3, que possui expressão restrita à parte aérea, apresenta um padrão de regulação diurna, sugerindo uma correlação direta com o metabolismo de carboidratos (GAZZARINI et al., 1999; VON WIRÉN et al., 2000). Esses dados revelam que a regulação espacial e pelo status de N dos AMTs entre as espécies refletem diferenças adaptativas de modo a coordenar a oscilação na concentração de N no ambiente.

Além da regulação em nível transcricional dos *AMTs*, uma regulação alostérica da proteína transportadora de amônio, AtAMT1.1 de arabidopsis, possibilita que esse transportador atue como um sensor da concentração externa de amônio (LANQUAR et al., 2009). Através de mudanças conformacionais no complexo proteico, desencadeadas pela fosforilação da Treonina-460 (T460) do C-terminal, o transportador AtAMT1.1 regula o influxo de amônio nas raízes, impedindo a entrada excessiva desse nutriente, que poderia causar toxidez (LOQUE et al., 2007; LANQUAR et al., 2009). Portanto, os

transportadores de amônio atuam não somente na aquisição desse nutriente, mas também podem participar de vias de sinalização na regulação da homeostase de amônio e alteração do desenvolvimento da planta (LOQUÉ; VON WIRÉN, 2004).

Considerando a importância fundamental dos transportadores de amônio para a compreensão do processo de NUE e com o propósito de melhorar a eficiência no uso de N em cana-de-açúcar, o objetivo desse trabalho consistiu na caracterização funcional e molecular dos genes codificadores de transportadores de amônio da subfamília AMT1 de cana-de-açúcar em sistema heterólogo (*Arabidopsis thaliana*), visando comprovar a essencialidade desses transportadores de membrana no processo de absorção de amônio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Identificação dos genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* em biblioteca de BACs (*Bacterial artificial chromosome*) de cana-de-açúcar

Os iniciadores utilizados para a busca dos genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* (Tabela 1) foram previamente desenvolvidos em colaboração com o Prof[®] Renato Vicentini (Laboratório de Bioinformática e Biologia de Sistemas, UNICAMP), com base em sequência de genes ortólogos de *A. thaliana* e *O. sativa* no banco de dados do SUCEST (*Sugarcane Expressed Sequence* Tag). A identificação dos genes *AMTs* foi realizada utilizando a biblioteca genômica de BACs de cana-de-açúcar (cultivar R750) disponível no laboratório GaTE (*Genomes and Transposable Elements*) da Prof^a. Marie Anne Van Sluys do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB/USP), em colaboração com a Prof^a. Nathalia de Setta da Universidade Federal do ABC (UFABC). O processo de seleção de BACs (*Bacterial artificial chromosome*) foi realizado através de *pools* 3D por meio de três reações de amplificação dos *superpools* (3D) para a identificação dos blocos positivos; (ii) amplificação dos condenadas dos poços que contêm os clones positivos, e; (iii) amplificação dos clones positivos isolados para validação.

As reações de PCR em tempo real continham 1x SYBR Green Master Mix® (Roche), 0,4 μ M de cada iniciador (Tabela 1), 100 ng do pool de DNA e água Milli-Q estéril para um volume final de reação de 15 μ L. O perfil da reação consistiu de uma desnaturação inicial de 95° C por 5 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95° C por 20 s, anelamento a 60° C por 20 s e extensão a 72° C por 40 s. Para todas as reações foram incluídos em duplicata um controle negativo (sem DNA) e um controle positivo (100 ng de DNA genômico de folhas de cana-de-açúcar).

Após a identificação das coordenadas, os clones positivos foram validados por meio do crescimento das bactérias em meio LB (Luria-Bertani) líquido (10 g L⁻¹ de triptona, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 10 g L⁻¹ de NaCl, pH 7,0) contendo 12,5 μ g mL⁻¹ de cloranfenicol a 37° C por 12 h sob agitação. Após esse período, 1 μ L da cultura foi utilizada como *template* para uma nova reação de PCR em tempo real (conforme descrito acima), utilizando os iniciadores específicos para os genes *AMTs* (Tabela 1). As culturas contendo bactérias positivas para a presença dos genes foram então riscadas em placas contendo LB sólido (15 g L⁻¹ de ágar) e 12,5 μ g mL⁻¹ de cloranfenicol e crescidas a 37° C por 12-16 h. Para cada placa, 3 colônias isoladas foram selecionadas e crescidas em meio LB líquido contendo 12,5 μ g mL⁻¹ de cloranfenicol a 37° C por 12 h. Uma nova reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando as culturas como *template*. Culturas de bactérias positivas para os genes de interesse foram estocadas em glicerol (50%) a -80° C. A extração de DNA para sequenciamento foi realizada utilizando o kit *Large-Construct*® (Qiagen, Hilden, Düsseldorf, Alemanha) conforme instruções do fabricante. Os BACs positivos para a presença dos genes *AMTs* foram sequênciados utilizando a plataforma de sequenciamento *high-throughput* 454/Roche, no CATG (*Center for Advanced Technologies in Genomics*) do Instituto de Química da USP. A anotação dos genes *AMTs* foi realizada em colaboração com a Prof^a. Nathalia de Setta (UFABC) utilizando o programa Artemis: Genome Browser and Annotation Tool (versão 16.0.11) (RUTHERFORD et al., 2000) e como referência os genes *SbAMT1.1* (gb|JX294859.1) e *SbAMT1.3* (gb|JX294852.1) de sorgo.

Tabela 1 - Sequências de iniciadores (*primers*) relativos aos genes que codificam proteínas transportadoras de amônio (*AMTs-AMMONIUM TRANSPORTERS*) e os respectivos tamanhos esperados dos amplicons, utilizados para a busca desses genes em biblioteca de BACs (*Bacterial artificial chromosome*) de cana-de-açúcar e para análises quantitativas de transcritos reversos

Nome	Sequência dos primers	Amplicon
ScAMT1.1 For	GCACCTTCCTGCTGTGGTT	201 ph
ScAMT1.1 Rev	CGTTCCAGTGACCCGTTTG	201 pb
ScAMT1.3 For	GAACGTGGTGATGATCCTGGT	172 ph
ScAMT1.3 Rev	CATGTCCTCGTCGTGGTAAGC	172 pb

3.2 Amplificação e clonagem das sequências gênicas e promotoras dos *AMTs* de cana-deaçúcar

A partir da identificação e confirmação das sequências dos genes codificadores dos transportadores de amônio *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* em BACs, *primers* específicos foram desenhados para amplificação das sequências gênicas completas e regiões regulatórias dos *AMTs* (Tabela 2). As reações de PCR foram realizadas utilizando tampão PCR Kapa, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 μ M de cada primer, 0,2 mM de dNTP, 1 U de *HiFi Hot Start High Fidelity Taq* polimerase (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EUA), 50 ng de DNA dos BACs 105_J02 e 239_A11 correspondentes, respectivamente à *ScAMT1;1* e *ScAMT1;3* e água Milli-Q estéril para um volume final de 25 μ l. A ciclagem utilizada foi uma desnaturação inicial de 5 min a 95°C seguido de 40 ciclos de desnaturação a 98°C por 20 s, amplificação a 65°C por 30 s e

extensão a 72°C por 60 s para as sequências gênicas e 90 s min para as sequências regulatórias; a extensão final foi de 10 min a 72° C. A identificação dos produtos das reações de PCR foi feita por eletroforese em gel TAE (40 mM de Tris-Base, 20 mM de ácido acético glacial, 1 mM de EDTA pH 8,0, pH ajustado pra 8,3) de 1% agarose corado com SYBR® Gold (Life Technologies, Carlsbad, EUA) e visualizado em luz ultravioleta. Os produtos foram purificados com o uso do kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification*® (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a clonagem dos fragmentos, 100 ng dos produtos purificados foram utilizados para ligação no vetor PCR8/GW/TOPO® (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) segundo orientação do fabricante. Bactérias eletrocompetentes cepa DH5A α foram transformadas com 1 µL de cada construção e crescidas em meio SOC (20 g L⁻¹ de triptona, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 0,5g L⁻¹ de NaCl, 180 µL de 20% glicose, pH 7,0) sob agitação a 150 rpm por 1 h a 37° C. O meio contendo as bactérias foi plaqueado em meio LB sólido contendo 100 mg L⁻¹ de espectinomicina para seleção das bactérias transformadas e crescidas a 37°C por 12 h. Para cada construção foram selecionadas 12 colônias, que foram inoculadas separadamente em 5 mL de meio LB líquido com 100 mg L⁻¹ de espectinomicina e crescidas a 37° C overnight para extração de DNA plasmidial por lise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979).O DNA obtido foi digerido com a enzima *EcoR*I à 37° C *overnight* e visualizado em gel TAE de 1% agarose corado com SYBR® Gold sob luz ultravioleta. Clones positivos para a presença do fragmento de interesse foram sequênciados utilizando o sequênciador 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA) do Laboratório de Melhoramento de Plantas (CENA/USP).

Nome	Sequência dos primers	Amplicon
ScAMT1.1 For	ATGTCGACGTGCGCGGC	1499 mb
ScAMT1.1 Rev	TTACACCTGGTTGCTGGTCGCC	1400 pb
ScAMT1.3 For	ATGGCGACGTGCGCCACGA	1461 pb
ScAMT1.3 Rev	CTAGAACTCGCCGCTGGACGCG	1401 pb
Pro ScAMT1.1 For	GCCGACTTGGCACCTAAATAAACAC	2032 ph
Pro ScAMT1.1 Rev	CGTTCCAGTGACCCGTTTG	2032 po
Pro ScAMT1.3 For	CAATTTTCAATACCCGAATTTCCAAC	2007 ph
Pro ScAMT1.3 Rev	CTCGACTGGCTTTGCTCCCTC	2007 pb

Tabela 2 - Sequências de iniciadores (*primers*) relativos aos genes que codificam proteínas transportadoras de amônio (*AMTs-AMMONIUM TRANSPORTERS*) e suas regiões regulatórias em cana-de-acúcar utilizados para a clonagem dessas sequências

3.3 Construção dos vetores de transformação

Após a confirmação da fidelidade das sequências clonadas, reações de recombinação para os vetores de destino, pMDC (CURTIS; GROSSNIKLAUS, 2003) (Tabela 3) foram realizadas utilizando 0 kit Gateway LR Clonase Π Enzyme mix® (Life EUA) Technologies, Carlsbad, conforme instruções do fabricante. **Bactérias** eletrocompetentes cepa DH5Aa foram transformadas com 1 µL de cada recombinação, crescidas em meio SOC sob agitação a 150 rpm por 1 h a 37°C e plaqueadas em meio LB sólido contendo 100 mg L⁻¹ de kanamicina para seleção das bactérias transformadas. Para cada recombinação foram selecionadas três colônias que foram inoculadas posteriormente em 5 mL de meio LB líquido, contendo 100 mg L⁻¹ de kanamicina e crescidas a 37°C overnight para a extração de DNA plasmidial por lise alcalina. O DNA obtido foi digerido com as enzimas PacI e AcsI à 37° C overnight e visualizado em gel TAE de 1% agarose corado com SYBR® Gold (Life Technologies) sob luz ultravioleta. Clones positivos para a presença das sequências recombinadas foram sequênciados utilizando o sequênciador 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fischer Scientific) do Laboratório de Melhoramento de Plantas (CENA/USP) para confirmação da direção correta de inserção do fragmento de interesse, utilizando primers específicos para cada vetor de destino (Tabela 4).

Confirmada a clonagem direcional, os vetores de destino contendo as sequências de interesse foram transformados em *Agrobacterium* eletrocompetentes cepa GV3101 com 50 ng de cada construção, crescidas em meio SOC sob agitação a 150 rpm por 1 h a 28°C e plaqueadas em meio LB sólido contendo 100 mg L⁻¹ de rifampicina e 100 mg L⁻¹ de kanamicina. As placas foram incubadas à 28°C por 48 h e após esse período três colônias isoladas para cada construção foram inoculadas em 3 mL de meio LB líquido contendo 100 mg L⁻¹ de rifampicina e 100 mg L⁻¹ de rifampicina e 100 mg L⁻¹ de kanamicina e crescidas à 28° C por 12 h sob agitação. Para cada colônia inoculada, 1 µL da cultura foi utilizada como *template* para uma reação de PCR com *primers* específicos para os genes e regiões regulatórias dos *AMTs* (Tabela 2). As reações de PCR continham tampão PCR Kapa, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTP, 1 U de HiFi Hot Start High Fidelity *Taq* polimerase (Kapa Biosystems) e água Milli-Q estéril para um volume final de 25 µL. A ciclagem utilizada foi uma desnaturação inicial de 10 min a 95° C seguido de 35 ciclos de desnaturação a 98° C por 20 s, anelamento a 65° C por 30 s e extensão a 72° C por 60 s, a extensão final foi de 10 min a 72° C. A identificação dos produtos das reações de PCR foi feita por eletroforese em gel TAE

de 1% agarose corado com SYBR® Gold (Life Technologies) e visualizado em luz ultravioleta. *Agrobacterium* positivas para a presença dos genes *AMTs* foram estocadas em glicerol à -80°C.

Tabela 3 – Sequências de cana-de-açúcar recombinadas em seus respectivos vetores de destino (CURTIS; GROSSNIKLAUS, 2003)

Sequência	Vetor de destino	Construção
Gene ScAMT1.1	pMDC32	35S:ScAMT1.1
Gene ScAMT1.3	pMDC32	35S:ScAMT1.3
Promotor ScAMT1.1	pMDC110	ProScAMT1.1:GFP
	pMDC164	ProScAMT1.1:GUS
Promotor ScAMT1.3	pMDC110	ProScAMT1.3:GFP
	pMDC164	ProScAMT1.3:GUS
Promotor ScAMT1.1 + Gene ScAMT1.1	pMDC99	ProScAMT1.1: ScAMT1.1
Promotor ScAMT1.3 + Gene ScAMT1.3	pMDC99	ProScAMT1.3: ScAMT1.3

Nome	Sequência dos primers
pMDC32 For	AAGGGATGACGCACAATCCCA
pMDC110 e pMDC164 For	ATTCAGGCTGCGCAACTGTTGG
pMDC99 For	GCGATTAAGTTGGGTAACGCCAG

Tabela 4 - Sequências de iniciadores (*primers*) relativos aos vetores de destino da família pMDC (CURTIS; GROSSNIKLAUS, 2003), utilizados para sequenciamento objetivando a confirmação da direção correta de inserção dos fragmentos de interesse

3.4 Transformação de plantas de arabidopsis

Sementes de arabidopsis dos genótipos selvagem 'Col-0' e do mutante quádruplo no transporte de alta-afinidade a amônio em A. thaliana, qko (YUAN et al., 2007), foram fornecidas pelo Prof. Dr. Nicolaus von Wirén do IPK-Gatersleben, (Department of Physiology and Cell Biology - Alemanha) e foram germinadas e crescidas por 30 d em substrato e vermiculita (1:1) contendo 8 g L⁻¹ de NPK (04:14:08) e 4 g. L⁻¹ de calcário em câmara de à 22°C com 80% de umidade e fotofase crescimento 16 h de luz a 200 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa. Após esse período, as plantas foram transformadas utilizando o método floral dip modificado (NARUSAKA et al., 2010). Para isso, placas de meio LB sólido contendo 100 mg L^{-1} de rifampicina e 100 mg L^{-1} de kanamicina foram riscadas com as culturas de Agrobacterium cepa GV3101 positivas para cada construção de interesse e crescidas à 28°C por 48 h. Em seguida, uma colônia isolada de cada construção foi inoculada em 2 mL de meio LB líquido contendo os antibióticos de seleção e crescida sob agitação (100 rpm) por 22 h à 28°C. As culturas de bactérias foram então transferidas para microtubos de 2 mL e centrifugadas à 2000 g por 10 min. O pellet formado foi ressuspendido delicadamente em uma solução contendo 5% de sacarose e 0,02% do surfactante Silweet-L77 (Momentive, NY, EUA). Para cada construção foram transformados dois vasos contendo três plantas de arabidopsis, sendo 10 µL da solução de Agrobacterium colocada em cada botão floral disponível no vaso. Após a transformação, as plantas foram mantidas em caixas fechadas e no escuro na câmara de crescimento por 24 h. A transformação foi realizada duas vezes com intervalo de uma semana.

3.5 Seleção de transgênicos

Sementes das plantas transformadas foram coletadas e esterilizadas em 70% etanol (v/v) contendo 0.05% (v/v) Triton X-100 por 8 min e em seguidas lavadas 2 vezes em etanol absoluto por 1 min cada. Após secarem, as sementes foram espalhadas em placas com meio MS ½ força (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificado (sem vitaminas e contendo 1% de ágar e sacarose) e 25 mg L⁻¹ de higromicina. As placas foram mantidas no escuro a 4°C por 4 d, e em seguida foram transferidas para sala de luz à 25°C sob fotofase 16 h luz a 100 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa. Após 14 d, plantas que apresentaram resistência ao antibiótico de seleção (geração T₀) foram aclimatadas em câmara de crescimento a 22°C com 80% de umidade e fotofase 14 h de luz a 200 μ mol m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa. Após 30 d, sementes das plantas T_0 foram coletadas, esterilizadas e germinadas em meio de seleção. Para cada evento de transformação obtido, cinco plantas (geração T₁) foram aclimatadas. Novamente, após 30 d, sementes dessas plantas foram coletadas, esterilizadas e germinadas em meio de seleção. Nessa geração foi possível avaliar as plantas quanto à segregação e aclimatar plantas consideradas homozigotas (geração T₂) (Figura 1). Sementes de plantas previamente consideradas homozigotas que não segregaram em meio de seleção foram então utilizadas para os experimentos (geração T₃).



Figura 1 – Plantas de Arabidopsis transgênicas crescidas em meio MS ½ força (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificado com antibiótico de seleção (25 mg L⁻¹ de higromicina). Geração T₂. As setas vermelhas indicam plantas recessivas; as setas em azul indicam plantas presumivelmente heterozigotas para a sequência de cana-de-açúcar inserida e as setas pretas indicam as plantas homozigotas.

3.6 Expressão de ScAMT1.1 e ScAMT1.3 nos eventos de transgenia

A caracterização dos eventos de transgenia das construções 35S:ScAMT1.1, 35S:ScAMT1.3, Promotor ScAMT1.1:ScAMT1.1 e Promotor ScAMT1.3:ScAMT1.3transformadas em 'Col-0' e *qko* foi realizada por meio de análise quantitativa de transcritos reversos (RT-q-PCR). Para isso, sementes homozigotas para essas construções e sementes de plantas selvagens ('Col-0') controle foram esterilizadas e espalhadas em ½ MS modificado, contendo 1 mM NH₄NO₃, sendo as placas mantidas no escuro a 4° C por 4 d. Após esse período, as placas foram transferidas para sala de luz à 25° C com fotofase de 16 h luz e intensidade luminosa de 100 µmol m⁻² s⁻¹ para germinação das sementes. Após 7 d, 30 plantas de cada evento de transformação foram coletadas em duplicatas e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido para posterior maceração.

3.6.1 Extração de RNA total

Plantas de arabidopsis foram maceradas em nitrogênio líquido e adicionou-se 1 mL de Trizol® (Invitrogen) nos tubos de 1,5 mL, que foram vortexados e incubados em temperatura ambiente por 5 min e em seguida centrifugados a 4º C por 15 min a 9000 g. O sobrenadante e transferido foi retirado para um novo tubo onde se adicionou 200 µL de CIA (Clorofórmio:Álcool Isoamílico, 24:1 vol/vol). Os tubos foram agitados e incubados a temperatura ambiente por 5 mim sendo em seguida centrifugados a 4º C por 15 min a 9000 g. Coletou-se a fase aquosa em um novo tubo onde foi adicionado 500 µL de isopropanol. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 10 min sendo posteriormente centrifugadas a 4° C por 10 min a 9000 g. O sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado foi lavado duas vezes com 75% etanol e centrifugado a 4° C por 6 min a 9000 g. Depois de seco, o RNA foi eluído em 15 µL de água DEPC (dietilpirocarbonato) autoclavada e armazenado à -80°C.

3.6.2 Quantificação e Síntese de RNA

O RNA total foi quantificado em NanoDrop (Thermo Scientific) e sua integridade visualizada em gel TAE de 1% agarose corado com SYBR® Gold sob luz ultravioleta. Após a quantificação, cerca de 2 μ g do RNA de cada amostra foi tratado empregando 1 U de DNAse I (Invitrogen) em tampão apropriado, 2 U de RNAseout (Invitrogen) e água ultrapura DEPC inativa, em reação incubada a 37° C por 30 min. A reação foi parada com a adição de EDTA, e incubada a 65° C por 10 min. Amostras de 1 μ g de RNA total tratado com DNase (Invitrogen, Waltham, MA, EUA) e o oligodT (0,5 μ g μ L⁻¹) foram desnaturadas a 65° C por 5 min e incubadas a 4° C por 2 min, seguido da adição de 4 μ L de tampão 5X Reaction, 1 mM dNTP, 40 U de RNAseOUT (Invitrogen) e 200 U da enzima RevertAid RT (Fermentas). A reação foi então incubada a 42° C por 1 h, seguida de incubação a 70° C por 10 min e 4° C por 2 min.

3.6.3 Análise quantitativa de transcritos reversos

Para a análise quantitativa de transcritos reversos foi utilizado 5 µL KAPA SYBR FAST®, 0,2 µM de cada iniciador (Tabela 1), 1 µL do cDNA 1:10 (v/v) e água Milli-Q estéril para um volume final de reação de 10 µL. Todas as reações de RT-q-PCR continham um controle negativo (sem cDNA) e foram realizadas no RotorGene-6000 (Qiagen; Hilden, Alemanha). O perfil da reação foi designado com duas temperaturas iniciais: 50° C por 10 min e 95° C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de três passos: 95° C por 20 s, 60° C por 25 s e 72° C por 25 s. Após a amplificação, determinou-se a curva de dissociação entre 72 e 95° C. Em todos os experimentos os valores dos C_Q (*quantification cycle*) foram utilizados para determinar a diferença da expressão gênica, de acordo com método "Delta Delta" (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001): razão =2 $-\Delta(\Delta C_q)$ sendo $\Delta C_Q = C_Q$ (gene alvo) – C_Q (gene referência) e o $\Delta = \Delta C_Q$ (tratamento) - ΔC_Q (controle). Para todos os experimentos o gene *AtUbiq2* de arabidopsis foi utilizado como gene de referência (Tabela 6) e os genes *AtAMT1.1* e *AtAMT1.3* (Tabela 6) para padronizar a expressão gênica.

Nome	Sequência dos primers	Amplicon
AtAMT1.1 For	GCTCAGCTGATTCAGATCATTG	236 ph
AtAMT1.1 Rev	TTAGCACCAGAAGGAGAAGGAG	230 pb
AtAMT1.3 For	GTTGGTGGCATAGCAGGTTT	196 mh
AtAMT1.3 Rev	CGGAACGAGTATCTTAGTGAAGG	180 pb
AtUbiq2 For	CCAAGATCCAGGACAAAGAAGGA	222 mh
AtUbiq2 For	TGGAGACGAGCATAACACTTGC	222 po

Tabela 6 - Sequências de iniciadores (*primers*) relativos aos genes que codificam proteínas transportadoras de amônio (*AMTs-AMMONIUM TRANSPORTERS*) em arabidopsis e o gene de referência *Ubiquitina*, utilizados para análise quantitativa de transcritos reversos

3.7 Análise fenotípica dos transgênicos de arabidopsis

3.7.1 In vitro

Para os experimentos in vitro, sementes de plantas selvagens ('Col-0'), mutantes (qko) e plantas homozigotas contendo as construções 35S:ScAMT1.1, 35S:ScAMT1.3, Promotor ScAMT1.1:ScAMT1.1 e Promotor ScAMT1.3:ScAMT1.3 transformadas em 'Col-0' e qko foram esterilizadas e submetidas a período de vernalização a 4º C por 4 d em placas de *petri* com meio MS ¹/₂ força modificado, contendo como fonte de N apenas 5 mM KNO₃. As placas foram colocadas na posição vertical em sala de luz a 25° C e com fotofase de 16 h luz sob intensidade luminosa de 100 µmol m⁻²s⁻¹ para germinação das sementes. Após 4 d de germinação, as plântulas foram transferidas para placas com meio MS ¹/₂ força modificado, contendo N nas concentrações de 0,2 e 0,5 mM de (NH₄)₂SO₄ ou 0,5 mM de KNO₃ como controle de suplemento de N. Após 14 d, a biomassa seca foi avaliada para as diferentes linhas transgênicas e controles não transgênicos. Para os experimentos com o análogo tóxico a amônio, metilamônio (MeA), as plântulas dos diversos genótipos foram transferidas para placas com 2 mM KNO₃ e concentrações de 0, 20 e 50 mM de MeA. Após 14 d, a biomassa fresca da parte aérea dos genótipos foi avaliada. Para cada tratamento 3 a 4 plântulas por genótipos foram crescidas em cada placa de petri. Cada tratamento continha dez réplicas (*n*=10) em todos os experimentos.

3.7.2 In vivo

Para os experimentos in vivo, inicialmente as sementes de 'Col-0' e qko e as sementes de qko complementadas com AMTs de cana-de-açúcar foram germinadas em solução nutritiva em potes de 2 L contendo 1 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 250 µM K₂SO₄, 250 µM CaCl₂, 100 μM Na-Fe-EDTA, 50 μM KCl, 50 μM H₃BO₃, 5 μM MnSO₄, 1 μM ZnSO₄, 1 μM CuSO₄ e 1 µM NaMoO₄, com pH ajustado para 5,8 utilizando solução de 2 mM KOH (LOQUÉ et al., 2006). As plantas foram cultivadas por 45 d em câmara de crescimento a 22°C com 80% de umidade e fotofase 10 h de luz a 200 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa em concentração de 1 mM de NH₄NO₃ Em seguida, foi realizado o tratamento de deficiência de N (sem adição de N, -N) por 3 d ou de suficiência de N (+N, 1 mM de NH₄NO₃). Após a imposição dos tratamentos, as raízes das plantas foram lavadas em solução de 1 mM CaSO₄ para eliminar o excesso de amônio apoplástico (LOQUÉ et al., 2006) e em seguida, foram transferidas para soluções nutritivas contendo 0,2 mM ¹⁵N-amônio (60%) por 10 min (LOQUÉ et al., 2006), e após esse período foram novamente lavadas em 1 mM CaSO₄. Após esse procedimento, as raízes foram cortadas e secas em estufa (60° C) para posterior análise de 15N. Foram realizadas 6 réplicas por tratamento (n=6) para cada genótipo. As determinações de ¹⁵N nas amostras foram realizadas em espectrômetro de massas ATLAS MAT CH4 (Alemanha) de fluxo molecular no laboratório de Isótopos Estáveis no CENA pelo Prof. Dr. José Albertino Bendassolli.

3.8 Localização subcelular dos AMTs de cana-de-açúcar em arabidopsis

Sementes das plantas homozigotas para as construções Pro*ScAMT1.1:GUS*, Pro*ScAMT1.1:GFP*, Pro*ScAMT1.3:GUS* e Pro*ScAMT1.3:GFP* foram esterilizadas e germinadas *in vitro* em meio MS $\frac{1}{2}$ força modificado, contendo 1 mM de NH₄NO₃. Após 4 d de vernalização à 4° C, as placas foram colocadas na posição vertical em sala de luz à 25°C e fotofase de 16 h luz com intensidade luminosa de 100 µmol m⁻² s⁻¹ para germinação das sementes. Após 4 d da germinação, as plântulas foram transferidas para os tratamentos: +N (MS $\frac{1}{2}$ força modificado contendo 2 mM NH₄NO₃), -N (MS $\frac{1}{2}$ força modificado sem nitrogênio) e NH₄⁺ (MS $\frac{1}{2}$ força modificado contendo 2 mM NH₄Cl). Após 1, 3 e 5 dias de tratamento, as plantas contendo os promotores fusionados à GFP (*Green fluorescent protein*)
foram analisadas em lupa Nikon SMZ18 pertencente ao Laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento Vegetal da ESALQ/USP do Professor Dr. Fabio Tebaldi Silveira Nogueira. Já as plantas contendo os promotores fusionados ao gene *uidA* GUS (β -Glucuronidase) foram transferidas para o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolilglucuranídeo (X-Gluc; Jersey Lab and Glove Supply, Livingston, NJ, EUA). Um total de 5 mg de X-Gluc foi dissolvido em 0,02 ml de dimetilformamida e adicionado a seguinte solução: 2,5 ml de 0,2 M fosfato de sódio; 2,3 ml de água deionizada; 0,025 ml de 0,1 M ferricianeto de potássio; 0,025 ml de 0,1 M ferrocianeto de potássio; 0,10 ml de 0,5 M EDTA de sódio; e 0,10 ml de Triton 10%. As plantas de arabidopsis foram incubadas nessa solução a 37° C por 8 h, lavadas em etanol 70% e posteriormente analisadas em lupa Nikon SMZ18 pertencente ao Laboratório de Genética Molecular do Desenvolvimento Vegetal da ESALQ/USP do Professor Dr. Fabio Tebaldi Silveira Nogueira.

3.9 Regulação da expressão gênica de *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* pelo status de N em canade-açúcar

As amostras para as análises de regulação da expressão gênica dos genes da subfamília *AMT1* de cana-de-açúcar foram gentilmente cedidas pelo mestrando Luís Henrique Damasceno Serezino do Laboratório de Melhoramento de Plantas (CENA/USP). Plantas de cana-de-açúcar foram cultivadas por três meses em solução nutritiva contendo 1 mM de NH₄NO₃, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 250 μ M K₂SO₄, 250 μ M CaCl₂, 100 μ M Na-Fe-EDTA, 50 μ M KCl, 50 μ M H₃BO₃, 5 μ M MnSO₄, 1 μ M ZnSO₄, 1 μ M CuSO₄ e 1 μ M NaMoO₄, com pH ajustado para 5,8 utilizando solução de 2 mM KOH (LOQUÉ et al., 2006). Após esse período, as plantas foram transferidas para solução nutritiva contendo 2 mM NH₄NO₃ (+N) por 2 d e em seguida foram submetidas à deficiência de N (-N) e a alto N (5 mM de NH₄NO₃), sendo que para cada tratamento amostras de raízes, colmo, folhas madura (+3) e folhas recém expandidas (+1) foram coletadas em triplicata nos períodos de 0, 1, 5 e 10 d após o tratamento e congeladas em N líquido.

3.9.1 Extração de RNA total de cana-de-açúcar

Para as análises de expressão gênica, amostras de raízes, parte aérea e colmos de canade-açúcar tiveram o RNA total extraído. Tal extração foi feita utilizando o método descrito em LEAL et al. (2007). As amostras foram maceradas em N líquido e transferidas para um microtubo de 2 mL, ao qual foi adicionado 1 mL de tampão de extração pré-aquecido à 65° C (2 % CTAB; 2% PVP; 2 M NaCl; 100 mM Tris; 25 mM EDTA; 2% ß-mercaptoethanol). Após a homogeneização em banho-maria a 65° C por cerca de 30 min, as amostras foram colocadas no gelo por 1 min, seguida da adição de 1 mL de CIA (clorofórmio:álcoolisoamílico 24:1) e de uma centrifugação a 9.000 g por 10 min a 4º C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, adicionando um volume igual de CIA, que foi emulsionado seguido de uma centrifugação a 9.000 g por 10 min a 4°C. Novamente, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL para posterior precipitação do RNA total, com solução de 10 M de LiCl (0,1 vol) e incubação a 4º C por 12 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 9.000 g por 30 min a 4° C, seguido do descarte do sobrenadante. O pellet formado foi lavado duas vezes com 500 µL de 75% etanol e centrifugado a 9.000 g por 10 min a 4° C. Por fim, foi feita a ressuspensão do pellet em 30 µL de água 0,01% DEPC (dietilpirocarbonato) autoclavada e o RNA foi armazenado à -80°C.

3.9.2 Quantificação e Síntese de cDNA

O RNA total foi quantificado em NanoDrop (Thermo Scientific) e sua integridade visualizada em gel TAE de 1% agarose corado com SYBRGold sob luz ultravioleta. Após a quantificação, cerca de 2 µg do RNA de cada amostra foi tratado empregando 1 U de DNAse I (Invitrogen) em tampão apropriado, 2 U de RNAseout (Invitrogen) e água ultrapura DEPC inativa, em reação incubada a 37° C por 30 min. A reação foi parada com a adição de EDTA, e incubada a 65° C por 10 min. Amostras de 1 µg de RNA total tratado e o oligodT (0,5 µg µL ⁻¹) foram desnaturadas a 70° C por 10 min e incubadas a 4° C por 2 min, seguido da adição de 4 µL de 5X *First-Strand Buffer*, 1 mM dNTP, 40 U de RNAseOUT (Invitrogen), 1 µL de DTT 0,1 M e 20 U da enzima SuperScript III RT (Invitrogen). A reação foi então incubada a 55° C por 1 h, seguida de incubação a 70° C por 10 min e 4° C por 2 min.

3.9.3 Análise quantitativa de transcritos reversos

Para a análise quantitativa de transcritos reversos foi utilizado 5 µL KAPA SYBR FAST®, 0,2 µM de cada iniciador (Tabela 7), 1 µL do cDNA 1:10 (v/v) e água Milli-Q estéril para um volume final de reação de 10 µL. Todas as reações de RT-q-PCR continham um controle negativo (sem cDNA) e foram realizadas no RotorGene-6000 (Qiagen; Hilden, Alemanha). O perfil da reação foi designado com duas temperaturas iniciais: 50° C por 10 min e 95° C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de três passos: 95° C por 20 s, 60° C por 25 s e 72° C por 25 s. Após a amplificação, determinou-se a curva de dissociação entre 72 e 95° C. Em todos os experimentos os valores dos C_Q (*quantification cycle*) foram utilizados para determinar a diferença da expressão gênica, de acordo com método "Delta Delta" (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001): razão =2 $-\Delta (\Delta C_q)$ sendo $\Delta C_Q = C_Q$ (gene alvo) – C_Q (gene referência) e o $\Delta = \Delta C_Q$ (tratamento) - ΔC_Q (controle). Para todos os experimentos o gene *ScUbiq2* (Tabela 7) foi utilizado como gene de referência.

Tabela 7 - Sequências de iniciadores (*primers*) relativos aos genes que codificam proteínas transportadoras de amônio (*AMTs-AMMONIUM TRANSPORTERS*) em cana-de-açúcar e o gene de referência (*Ubiquitina*), utilizados para análise quantitativa de transcritos reversos

Nome	Sequência dos primers	Amplicon
ScAMT1.1 For	GCACCTTCCTGCTGTGGTT	201 pb
ScAMT1.1 Rev	CGTTCCAGTGACCCGTTTG	
ScAMT1.3 For	GAACGTGGTGATGATCCTGGT	172 pb
ScAMT1.3 Rev	CATGTCCTCGTCGTGGTAAGC	
ScUbiq2 For	CTTCTTCTGTCCCTCCGATG	159 pb
ScUbiq2 Rev	TCCAACCAAACTGCTGCTC	

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação dos transportadores de amônio em biblioteca de *BACs* de cana-deaçúcar

A seleção na biblioteca de *BACs* de cana-de-açúcar (cultivar 'R570') no laboratório Genomes and Transposable Elements do IB/USP da Prof^a. Marie Anne van Sluys do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB/USP), em colaboração com a Prof^a. Nathalia de Setta da Universidade Federal do ABC (UFABC) permitiu identificar cinco *BACs* contendo sequências gênicas para o transportador de amônio *ScAMT1.1* (*BACs* 105_J02, 108_B06, 290_B15, 303_B24 e 315_A20) e dois *BACs* contendo sequências para *ScAMT1.3* (*BACs* 232_N03 e 290_A11). Os BACs foram então sequênciados integralmente pelo grupo da Prof^a. Marie Anne van Sluys e a presença dos genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* foram confirmadas.

A superfamília de transportadores MEP/AMT/Rh é caracterizada por possuírem um motivo assinatura conservado de 26 aminoácidos e 11 domínios transmembranas (MARINI et al., 1997; LOQUÉ; VON WIRÉN, 2004). Com o objetivo de verificar a presença nesses polipeptídeos dos sinais conservados, as sequências gênicas codificando os transportadores ScAMT1.1 e ScAMT1.3 de cana-de-açúcar foram traduzidas pelo programa ORF Finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html) e analisadas no banco de dados do UniProt (http://www.uniprot.org/) e do *Prosite* (http://us.expasy.org/prosite). Os domínios transmembranas proteínas foram preditos para essas pelo programa ТМНММ (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/).

Ambas as proteínas de cana-de-açúcar apresentaram o motivo assinatura conservado para a superfamília MEP/AMT/Rh (Figura 2A). A proteína ScAMT1.1 apresenta o motivo assinatura localizado entre os aminoácidos 191-216; para a proteína ScAMT1.3, o motivo se encontra entre os aminoácidos 190-215 (dados não mostrados). A análise das proteínas AMTs de cana-de-açúcar no programa *TMHMM*, resultou em 11 domínios com alta probabilidade de ocorrência para ScAMT1.1 (Figura 2B) e 10 domínios para ScAMT1.3 (Figura 2C). Para o transportador ScAMT1.3, o que seria o 10° domínio apresentou 50% de probabilidade de ocorrência (Figura 2C). Considerando que são preditos 11 domínios transmembranas para a superfamília MEP/AMT/Rh (MARINI et al., 1997; LOQUÉ; VON WIRÉN, 2004), não é possível afirmar se o domínio com menor probabilidade de ocorrência para o transportador ScAMT1.3 de cana-de-açúcar existe o que estaria de acordo com o predito para outras

espécies (MARINI et al., 2010, THOMAS et al., 2000) ou mesmo se ScAMT1.3 de cana-deaçúcar difere de outros membros dessa superfamília em relação ao número de domínios transmembranas, possuindo apenas 10 domínios.



Figura 2 – Motivo assinatura da superfamília MEP/AMT/Rh e domínios transmembranas preditos para as proteínas ScAMT11 e ScAMT1.3 por meio do programa TMHMM. A. Representação WebLogo para o motivo assinatura de 26 aminoácidos conservado entre 41 membros da superfamília MEP/AMT/Rh, que estão depositados no banco de dados do Prosite (número de acesso PS01219). B. Domínios transmembranas preditos para ScAMT1.1. C. Domínios transmembranas preditos para ScAMT1.3. A seta em C, indica o domínio que tem 50% de probabilidade de ocorrência.

Evidências bioquímicas demonstraram que as proteínas MEP/AMT formam trímeros com uma orientação extra-citosólica do N terminal (LUDEWIG et al., 2003). As análises de indução de mutações pontuais no transportador de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) *SIAMT1.1* demonstraram que a deleção ou substituição de duas Cisteínas (C3 e C27) localizadas no N-terminal dessa proteína causa uma redução na estabilidade do complexo proteico na membrana plasmática e como consequência, uma menor capacidade de transporte de metilamônio (análogo tóxico ao amônio) sugerindo que a estabilidade dos trímeros é viabilizada pela formação de pontes de dissulfeto entre esses aminoácidos (GRAFF et al., 2010). A importância dessas cisteínas para a formação dos oligômeros é confirmada quando o N-terminal do transportador SIAMT1.3 de tomateiro foi analisado. Esse transportador possui um N-terminal pequeno em comparação com outros AMTs e não apresenta as cisteínas C3 e C27 e, portanto não possui a habilidade de formar trímeros na membrana plasmática (GRAFF et al., 2010).

Uma vez que esses dois aminoácidos já foram descritos como fundamentais para a estabilidade dos oligômeros dos AMTs em tomateiro, a sequência do N-terminal dos transportadores de amônio identificados no genoma de cana-de-açúcar foi alinhada com o N-terminal de membros da subfamília AMT1 de arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e tomateiro (*Solanum lycopersicum*), além das sequências para *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* (comp110189_c0_seq1 e comp110189_c0_seq3) obtidas através de sequenciamento de RNA de alta performance (RNA-seq) realizado pelo Dr. Joni Esrom Lima do Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP (Figura 3). Com exceção da proteína de tomateiro SIAMT1.3, os demais membros da subfamília AMT1 apresentaram as duas cisteínas conservadas, incluindo os transportadores de amônio de cana-de-açúcar (Figuras 3A e B), o que indica a provável formação de trímeros de proteínas AMTs na membrana plasmática de células dessa gramínea.



Figura 3 – Alinhamento em aminoácidos do N-terminal de membros da subfamília AMT1 de arabidopsis (AtAMTs), arroz (OsAMTs), cana-de-açúcar (ScAMTs) milho (ZmAMTs), sorgo (SbAMTs) e tomateiro (SlAMTs). Comp110189_c0_seq1 e Comp110189_c0_seq3 se referem às sequências de transcritos obtidas por meio de RNA-seq de tecidos de cana-de-açúcar ('SP80-3280') realizado no Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP.
A: Alinhamento realizado no ClustalW. B: Representação WebLogo para os resíduos conservados entre as proteínas AMT1.1 e AMT1.3 de arroz, cana-de-açúcar, milho e sorgo. As setas vermelhas indicam as cisteínas conservadas entre os membros dessa subfamília. Os números de acesso para os distintos AMTs estão indicados juntamente com o nome das sequências em A.

A região C-terminal das proteínas AMTs também possui função regulatória nesses transportadores de membrana. Um processo de regulação alostérica foi descrita para AtAMT1.1 de arabidopsis (LOQUÉ et al., 2007; LANQUAR et al., 2009). A ativação ou inativação do complexo proteico depende de modificações conformacionais ocasionadas pela fosforilação da Treonina-460 (T460), localizada no C-terminal que regula o influxo de amônio nas raízes impedindo que esse nutriente possa causar toxidez nas células (LOQUÉ et

al., 2007; LANQUAR et al., 2009). O alinhamento da sequência do C-terminal dos transportadores de amônio identificados em BACs e RNA-seq de cana-de-açúcar com o C-terminal de membros da subfamília AMT1 de várias espécies, permitiu identificar que a Treonina 460 é conservada nas proteínas AMT1.1 e AMT1.3 de cana-de-açúcar, quando comparado a outras espécies (Figura 4), indicando que mecanismo similar de regulação pós-transcricional por meio da fosforilação treonina 460 pode existir também em raízes de cana-de-açúcar.

Experimentos prévios realizados pelo nosso grupo com plantas de cana-de-açúcar já haviam fornecido o primeiro indício para uma regulação pós-transcricional dessas proteínas transportadoras (VITTI, 2012). Plantas de cana-de-açúcar foram cultivadas por dois meses em solução nutritiva, e subsequentemente submetidas à deficiência de N por 3 d, com posterior ressuplementação com amônio (2 mM NH4Cl) (VITTI, 2012). A correlação da análise temporal de influxo rápido usando 0,2 mM de ¹⁵N-amônio e análise quantitativa de transcritos reversos demonstraram que ocorre uma rápida indução no acúmulo de transcritos para os genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3*, a partir de 4 h até 24 h após a adição de amônio, mas no entanto, o influxo de ¹⁵N-amônio diminuiu cerca de 30% até 24 h após a exposição ao amônio (VITTI, 2012). Desse modo, os dados de expressão gênica e os de influxo de ¹⁵N-amônio apresentaram um padrão oposto, ou seja, enquanto os níveis de expressão de *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* a umentam após a provisão de amônio, o influxo de ¹⁵N-amônio é reduzido significativamente, o que indica a ocorrência de uma regulação pós transcricional em raízes de cana-de-açúcar sob provisão de amônio (VITTI, 2012).

Com base nos resultados das análises de expressão gênica e influxo de ¹⁵N obtidos para cana-de-açúcar e a análise das sequências codificadores de transportadores de amônio identificados no genoma de cana-de-açúcar, reforçam a existência de um mecanismo similar de regulação conservado entre monocotiledôneas e dicotiledônias, devido a presença de um aminoácido chave para a ocorrência dessa regulação alostérica (T460) (Figuras 4A e B). No entanto, recentes estudos em arabidopsis demonstram que apesar das proteínas AtAMT1.1 e AtAMT1.3 possuírem T460 conservada na região C-terminal, apenas AtAMT1.1 é fosforilado *in vivo* sob condições de provisão de amônio (YUAN et al., 2013). Considerando que proteínas AMTs formam oligômeros na membrana plasmática, a formação de heterotrímeros de AtAMT1.1 e AtAMT1.3 ou homotrímeros de AtAMT1.1 fornece uma maior flexibilidade de regular a capacidade de transporte nas raízes mediante a presença de amônio (YUAN et al., 2013). Esses estudos em arabidopsis aliado aos resultados de caracterização fisiológica do

transporte de amônio e caracterização molecular de AMTs em cana-de-açúcar (Figura 4) indicam, portanto, que o processo de regulação alostérica nas proteínas ScAMT1.1 e ScAMT1.3 é existente em raízes de cana-de-açúcar, porém, se apenas ScAMT1.1 ou ScAMT1.3 é fosforilado *in vivo* em raízes de cana-de-açúcar ainda requer validação experimental.



Figura 4 – Alinhamento em aminoácidos do C-terminal de membros da subfamília AMT1 de arabidopsis (AtAMTs), arroz (OsAMTs), cana-de-açúcar (ScAMTs) milho (ZmAMTs), sorgo (SbAMTs) e tomateiro (SlAMTs). Comp110189_c0_seq1 e Comp110189_c0_seq3 se referem às sequências de transcritos obtidas por meio de RNA-seq de tecidos de cana-de-açúcar ('SP80-3280') realizado no Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP.
A: Alinhamento realizado no ClustalW. B: Representação WebLogo para os resíduos conservados entre as proteínas AMT1.1 e AMT1.3 de arroz, cana-de-açúcar, milho e sorgo. A seta vermelha indica a Treonina 460 (T460) conservada entre os membros dessa subfamília. Os números de acesso para os distintos AMTs estão indicados juntamente com o nome das sequências em A.

Após a análise das sequências gênicas identificadas no genoma de cana-de-açúcar, por meio de sequenciamento de clones BACs, essas foram traduzidas pelo programa *ORF Finder* e as sequências proteicas geradas de ScAMT1.1 e ScAMT1.3 foram então utilizadas em análises filogenéticas com alinhamento para a função de máxima parcimônia no programa PAUP 4.0b10 agrupando com sequências de aminoácidos de diversos transportadores de amônio pertencentes à subfamília AMT1 de arabidopsis, arroz, milho, sorgo e tomateiro, além de sequências para *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* (comp110189_c0_seq1 e comp110189_c0_seq3) obtidas por meio de sequenciamento de RNA de alta performance (RNA-seq) realizado pelo Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP (Dr. Joni Esrom Lima).

O agrupamento das proteínas AMTs identificadas nessas espécies por máxima parcimônia possibilitou a formação de três grupos (Figura 5). No primeiro, encontram-se os transportadores AMT1.1 das monocotiledôneas: arroz, cana-de-açúcar, milho e sorgo (Figura 5A). No segundo grupo, estão agrupados os transportadores AMT1.3 dessas espécies bem como OsAMT1.2 de arroz (Figura 5B). No terceiro grupo encontram-se os transportadores da subfamília AMT1 das dicotiledôneas arabidopsis e tomateiro (Figura 5C).

Quando as sequências para o transportador ScAMT1.1 identificadas no genoma de cana-de-açúcar são comparadas com seus ortólogos nas demais espécies analisadas, obtêm-se cerca de 99% de similaridade entre ScAMT1.1 e SbAMT1.1 de sorgo (Figura 5). Para milho, a similaridade entre essas sequências é 97% e 93% para ZmAMT1.1.a e ZmAMT1.1b respectivamente, enquanto para arroz, a similaridade é de 93% (Figura 5). Em espécies mais distante como as dicotiledôneas arabidopsis e tomateiro, ScAMT1.1 compartilha 75% de similaridade com ambas as proteínas AtAMT1.1 e SIAMT1.1 (Figura 5). No caso do transportador ScAMT1.3, a similaridade entre as proteínas de monocotiledôneas é de 98% com SbAMT1.3 e ZmAMT1.3 e 78% com OsAMT1.3, enquanto para as proteínas de dicotiledôneas AtAMT1.3 e SIAMT1.3 é de 72% e 66% respectivamente (Figura 5). Essas comparações demonstram que essas proteínas são altamente conservadas em plantas, no entanto, existe uma evidente separação entre os AMTs de mono e dicotiledônias (MCDONALD et al., 2011, WITTGENSTEIN et al., 2014). Desse modo, a análise filogenética demonstrou que as sequências dos AMTs de cana-de-açúcar apresentam alto grau de similaridade às sequências de monocotiledôneas arroz, milho e sorgo e são mais distantes dos transportadores de amônio das dicotiledôneas arabidopsis e tomateiro, o que sugere uma pressão de seleção diferencial em relação a essas proteínas de membrana entre mono e dicotiledôneas.

Estudos filogenéticos demonstram que os AMMONIUM TRANSPORTERS são separados em duas subfamílias, AMT1 e AMT2 (LOQUÉ; VON WIRÉN, 2004, MCDONALD et al., 2011, WITTGENSTEIN et al., 2014). Essa duplicação ocorreu durante o processo de evolução antes da divergência entre monocotiledôneas e dicotiledôneas, formando grupos evolucionariamente e funcionalmente distintos (MCDONALD et al., 2011, WITTGENSTEIN et al., 2014). Em cana-de-açúcar, ambas as subfamília AMT1 e AMT2 estão presentes no genoma (dados não mostrados), assim como em outras monocotiledôneas (MCDONALD et al., 2011, WITTGENSTEIN et al., 2014). Em particular para a subfamília AMT1, a análise de reconstrução filogenética sugere a existência de dois supergrupos distintos para membros AMT1 de angiospermas, sendo um composto por sequências de Licófitas e outro, por sequências de Briófitas (WITTGENSTEIN et al., 2014). A separação desses supergrupos de AMT1 possivelmente ocorreu anteriormente à separação de Embriófitas e Briófitas, mas após a separação de plantas terrestres (Embriófitas) e algas verdes (Clorófitas) (WITTGENSTEIN et al., 2014). No entanto, não é possível dividir esses supergrupos para AMT1 entre monocotiledôneas e dicotiledôneas o que sugere que os AMT1s presentes em plantas possuem origem vertical a partir de um ancestral comum (MCDONALD et al., 2011).

Portanto, o número distinto de genes AMT1 encontrados entre as monocotiledôneas, sendo dois genes para cana-de-açúcar (ScAMT1.1 e ScAMT1.3), dois genes em sorgo (SbAMT1.1 e SbAMT1.3), três em milho (ZmAMT1.1a, ZmAMT1.1b e ZmAMT1.3) e três em arroz (OsAMT1.1, OsAMT1.2 e OsAMT1.3) (SUENAGA et al., 2003; SONODA et al., 2003; GU et al., 2013; KOEGEL et al., 2013) (Figura 5) sugere uma recente diversificação funcional dessas proteínas em monocotiledôneas. Isso fica evidente pela regulação distinta dos genes da subfamília AMT1.1 entre monocotiledôneas e dicotiledôneas. Por exemplo, em arabidopsis AtAMT1.1, AtAMT1.3 e AtAMT1.5 apresentam expressão localizada principalmente em células da epiderme e córtex, incluindo os pelos radiculares e são induzidos sob deficiência de N, enquanto AtAMT1.2 é expresso principalmente na endoderme e córtex nas células das raízes (LOQUÉ et al., 2006; YUAN et al., 2007). O outro membro dessa subfamília em arabidopsis, AtAMT1.4 apresenta expressão definida em grãos de pólen e tubo polínico (YUAN et al., 2009). O gene SlAMT1.1 de tomateiro apresenta similar localização e regulação à AtAMT1.1 de arabidopsis (LUDEWIG et al., 2002), no entanto, SlAMT1.2 tem a expressão induzida na presença de amônio ou nitrato (VON WIRÉN et al., 2000), enquanto SlAMT1.3 possui expressão restrita a parte aérea (VON WIRÉN et al., 2000).

Entre as monocotiledôneas também existe uma variação considerável na regulação dos genes AMT1: em milho, *ZmAMT1.1a* e *ZmAMT1.3* são expressos na epiderme e zona apical das raízes, mas não são induzidos por deficiência de N (GU et al., 2013); *SbAMT1.1* e *SbAMT1.3* de sorgo apresentam uma expressão constitutiva em raízes e parte aérea (KOEGEL et al., 2013). Em arroz, *OsAMT1.3* é expresso preferencialmente em raízes sob deficiência de N (SONODA et al., 2003), no entanto, *OsAMT1.1* apresenta uma complexa regulação, a qual é dependente do genótipo estudado e varia de expressão constitutiva em raízes e parte aérea independente da fonte de N disponibilizada para as plantas até indução em raízes por concentrações crescentes de amônio (SONODA et al 2003; GAUR et al., 2012). Portanto, a ampla função de membros AMT1 em plantas é evidenciada pelo padrão distinto de expressão e função fisiológica no transporte de amônio, o que justifica a necessidade de realizar a caracterização funcional de cada membro AMT1 identificado em cana-de-açúcar.



Figura 5 – Análise filogenética dos AMTs (AMMONIUM TRANSPORTERS) de arabidopsis (AtAMTs), arroz (OsAMTs), cana-de-açúcar (ScAMTs), milho (ZmAMTs), sorgo (SbAMTs) e tomateiro (SIAMTs). Os alinhamentos das sequências de aminoácidos foram realizados no programa ClustalW e a árvore filogenética foi gerada no programa PAUP 4.0b10 empregando máxima parcimônia. Os números de acesso para os distintos AMTs estão indicados juntamente com o nome das proteínas na figura. A: agrupamento dos transportadores AMT1.1 de arroz, cana-de-açúcar, milho e sorgo; B: agrupamento dos transportadores AMT1.3 das monocotiledôneas e OsAMT1.2; C: agrupamento dos transportadores da subfamília AMT1 de arabidopsis e tomateiro.

Considerando o caráter poliplóide e redundante do genoma de cana-de-açúcar (WANG et al., 2010; GARSMEUR et al., 2010) foi realizada uma série de alinhamentos para definir quais genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* identificados nos distintos BACs seriam os alvos utilizados para a caracterização funcional através da expressão heteróloga em mutantes de *Arabidopsis thaliana* (Figuras 6-11).

Para as sequências gênicas codificando o transportador de cana-de-açúcar, ScAMT1.1, foram alinhadas as sequências obtidas dos BACs (105_J02, 108_B06, 290_B15, 303_B24 e 315_A20) com a sequência de transcritos para ScAMT1.1 (Comp110189_c0_seq1) obtida através de sequenciamento de RNA de alta performance (Dr. Joni Esrom Lima, comunicação pessoal), o que permitiu identificar polimorfismos de nucleotídeos entre as sequências gênicas alinhadas (Figura 6). Embora a maioria desses polimorfismos não tenha alterado a sequência de aminoácidos, três regiões sofreram modificações (Figura 7). Na primeira modificação, no aminoácido 31 há uma variação possível entre alanina (A) ou treonina (T); a segunda modificação, no aminoácido 110, a variação se dá entre uma histidina (H) ou glutamina (Q); a última modificação ocorre na posição 392 somente com a sequência obtida do RNA-seq contendo uma alanina (A) e as demais sequência obtidas dos BACs contendo uma treonina (T). Quando as regiões que sofreram modificações foram analisadas foi possível observar que nenhuma dessas modificações ocorreu nos domínios transmembranas preditos para esse transportador (aminoácidos 36-58, 79-101, 121-140, 147-169, 189-211, 232-254, 274-296, 303-325, 330-352, 365-382, 410-495) (Figura 3B). Portanto, pode-se supor que nenhuma dessas modificações tenha alterado a função da proteína transportadora ScAMT1.1.

Para os estudos funcionais relacionados às regiões regulatórias do transportador *ScAMT1.1*, uma sequência de 2030 pb *upstream* ao códon de iniciação da transcrição (ATG) foi definida como a sequência promotora. No entanto, devido ao posicionamento do gene *ScAMT1.1*, no início dos clones da maioria dos BACs identificados, somente dois BACs poderiam ser utilizados para a clonagem da região promotora: 105_J02 e 315_A20. O alinhamento da sequência 5' acima do códon de iniciação do gene *ScAMT1.1* presente nesses dois BACs permitiu identificar uma similaridade de 99% entre suas sequências promotoras (Figura 8). Além disso, as proteínas traduzidas pelos genes presentes nos BACs 105_J02 e 315_A20 são idênticas (Figura 7). Desse modo, o BAC105_J02 foi escolhido para a amplificação e clonagem do gene e região promotora presumível de *ScAMT1.1*.



Figura 6 – Alinhamento em nucleotídeos das sequências gênicas para ScAMT1.1. Comp110189_c0_seq1 se refere à sequência de transcrito obtida através de RNA-seq de tecidos de cana-de-açúcar ('SP80-3280') realizado no Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP. As demais sequências foram obtidas por sequenciamento de clones de biblioteca de BACs de cana-de-açúcar (cultivar 'R570').



Figura 7 – Alinhamento em aminoácidos das sequências gênicas traduzidas conceitualmente para ScAMT1.1. Comp110189_c0_seq1 se refere à sequência de transcrito obtida por meio de RNA-seq de tecidos de cana-de-açúcar ('SP80-3280') realizado no Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP. As demais sequências foram obtidas por sequenciamento de clones de biblioteca de BACs de cana-de-açúcar (cultivar 'R570'). Promotor BAC 105_J02 CTGGATO Promotor BAC 315_A20 CTGGATO BAC 105_J02 CTTCC BAC 315_A20 CTTCC C 105_J02 TGC C105_J02 GCT 540 520 530 550 570 580 AC 105_J02 CTTG 610 620 630 640 650 05_J02 TAAGTO 15_A20 TAAGTO TGTCA GTTA 720 730 740 750 760 ΑΤΤΟΤΑΑ 830 840 850 AC 105_J02 TAAATTTA AC 315 A20 TAAATTTA 940 930 AC 105_J02 TCTCATA AC 315_A20 TCTCATA GATC ATGTCC AC 105_J02 A TG TTA 112 1150 AC 105_J02 TTTATA AC 315_A20 TTTATA AC 105_J02 AGTCTT AC 315_A20 AGTCTT AC 105_J02 CAAATT AC 315_A20 CAAATT AC 105_J02 ACTTAAT AC 315 A20 ACTTAAT AC 105_J02 ACCA 105_J02 CGTT 173 172 AC 105_J02 GTTA GTTA 1830 AC 105_J02 CCAGO AC 315_A20 CCAGO GAATCT СТАААА СТАААА ГССТ. ГССТ. Promotor BAC 105_J02 ATCGAC Promotor BAC 315_A20 ATCGAC TTCGTC TCC Promotor BAC 105_02 Promotor BAC 105_02 GAGGGACAGAGAGAGCGAGCGAACCCAAGCTAAG Promotor BAC 315_A20 GAGGGACAGAGAGAGCGAGCGAACCCAAGCTAAG

Figura 8 – Alinhamento em nucleotídeos das regiões regulatórias para *ScAMT1.1* dos BACs 105_J02 e 315_A20, identificados por sequenciamento de clones de biblioteca de BACs de cana-de-açúcar (cultivar 'R570').

Para o outro membro da subfamília AMT1 de cana-de-açúcar, *ScAMT1.3*, os polimorfismos de nucleotídeos na sequência codificante (Figura 9) refletiram somente em uma alteração na sequência de aminoácidos (Figura 6), na posição 464, onde a sequência obtida do *BAC* 232_N03 apresenta lisina (K) e as sequências do *BAC* 239_A11 e do RNA-seq (Comp110189_c0_seq3) apresentam o ácido glutâmico (E). Novamente a modificação não ocorreu em nenhum dos domínios transmembranas (36-58, 79-100, 120-139, 146-168, 188-210, 231-253, 273-295, 302-324, 329-351, 406-428).

A região promotora do gene *ScAMT1.3* foi definida como uma sequência de 2007 pb *upstream* ao códon de iniciação da transcrição desse gene (ATG), no entanto, o alinhamento das sequências promotoras dos BACs 232_N03 e 239_A11 apresentou uma variação considerável tornado difícil escolher o clone de BAC que seria utilizado para as clonagens e experimentos de caracterização funcional. Uma vez que a proteína codificada pelo gene *ScAMT1.3* encontrado no BAC 239_A11 é idêntica a proteína codificada pelo transcrito do gene encontrado por RNA-seq, o que indica que esse gene é expresso, foi escolhido utilizar esse BAC para a clonagem do gene e da região promotora presumível de *ScAMT1.3*.



 Figura 9 – Alinhamento em nucleotídeos das sequências gênicas de ScAMT1.3. Comp110189_c0_seq3 se refere à sequência obtida por meio de RNA-seq de tecidos de cana-de-açúcar ('SP80-3280') realizado pelo Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP. As demais sequências foram obtidas por sequenciamento de clones de biblioteca de BACs de cana-de-açúcar (cultivar 'R570').



Figura 10 – Alinhamento em aminoácidos das sequências gênicas traduzidas conceitualmente para ScAMT1.3. Comp110189_c0_seq3 se refere à sequência de transcrito obtida por meio de RNA-seq de tecidos de cana-de-açúcar ('SP80-3280') realizado pelo Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP. As demais sequências foram obtidas por sequenciamento de clones de biblioteca de BACs de cana-de-açúcar (cultivar 'R570'). Promotor BAC232_N03 TCGGCTGTCGTGG --CAAATA --AAATATGGGAATCT Promotor BAC239_A11 -CAATTTTCAATACCGGAATTTCCAACTACCCGAATTA C232_N03 AAATGGCAGCAGAGGCCAATT C239 A11 ACGCGGTGCCGGTGCAGAGCAA AATCC ACATGA MGGCAGACAGGGCGTCAGGGCCGCCGAGAGCGACGCGCGGCGGTGCCGGTGGA MTTT - TATATGATTAGATTTGTAAAGAATTATAG - TATTCCATGATTA CAGGGCAG Prom AC232_N03 TCTGGACAC ACCATA A AATG A A 510 570 540 TTAACGA ACCCTTTCATCCATGG AC232_N03 TAAAT GTTAATTTAGTCTT(GTTAATTTAGTCTT) CTGG ATTTTTTA A AC232_N03 TTT AC239_A11 TTT Promo BAC232_N03 BAC239_A11 TTCC r BAC232_N03 r BAC239_A11 A T A A G T A T A A G T 930 Promoto Promoto r BAC232_N03 r BAC239_A11 T T T T T T 1010 - T A T BAC232_N03 BAC239_A11 GATACT GATACT GTCO ATA Promo 1130 1140 BAC232_N03 TATCTTTTTAAGTTGG BAC239_A11 TATCTTTTTAAGTTGG CAATTTA CAATTTA GCC TC AG AG T GCC TC AG AG T TGCGTAT TGCGTAT A T T G G A C A C A T T G G A C A C Promo AGACGT1 AGACGT1 TGA 1230 BAC232_N03 ATTGC BAC239_A11 тст Promo 00000 GGTTG TCT GCTGT 1330 Promotor BAC232_N03 CTGCATCCGTCCCAACATAAATCAACTTTTAGA(Promotor BAC239_A11 CTGCATCCGTCCCAACATAAATAAACTTTTAGA(G T T T T A T T A A A G T T T T A T T A A A АААСТА АААСТА T A A A A A Promotor BAC232_N03 CCAAATTTATATCACTAGATATATCATAAAATA Promotor BAC239_A11 CCAAATTTATATCACTAGATATATCATAAAATA TGTGTCATAGATGATGT TGTGTCATAGATGATGT TCTTTC TCTTTC G T C A A A C Promotor BAC232_N03 TTTTG Promotor BAC239_A11 TTTG TAAA CTTTAC TGATTTA TAGAA ŢŢĄŢ Promotor BAC232_N03 TGTAGATATGATTA Promotor BAC239_A11 TGTAGATATGATTA CGTGA AGTCO TGTACA 1710 1730 1750 1770 Promotor BAC232_N03 CACAACATCTG Promotor BAC239_A11 CACAACATCTG A T T A T (A T T A T (CCGGATT CCGGATT A T C A C ACAATTT TCTGGTA 1830 1810 1870 GAAG r BAC232_N03 - G G r BAC239_A11 G A G G 1910 1930 1950 1970 199 CGTC TCTCGCG TCTCGCG TGAT GGCCACCGT GGCCACCGT T T C A T T T T C A T T BAC232_N03 CTGA BAC239_A11 CTGA GGCCATT GGCCATT Promo Promo TCCATT 2010 2030 BAC232_N03 BAC239_A11

Figura 11 – Alinhamento em nucleotídeos das regiões regulatórias para *ScAMT1.3* dos BACs 232_N03 e 239_A11, identificados por sequenciamento de clones de biblioteca de BACs de cana-de-açúcar (cultivar 'R570').

4.2 Regulação da expressão gênica de *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* pelo status de N em canade-açúcar

Como organismos sésseis plantas desenvolveram um complexo mecanismo que atua como sensor e desencadeia uma série de respostas mediante as variações de N no solo (REMANS et al., 2006; LIMA et al., 2010). Essas respostas adaptativas incluem a regulação de respostas fisiológicas e morfológicas para impedir a deficiência ou toxidez por amônio (YUAN et al., 2007; LIMA et al., 2010). A regulação em nível transcricional é uma importante resposta fisiológica adaptativa regulada pela disponibilidade de amônio no solo, como previamente demonstrada em outras espécies (VON WIRÉN et al., 2000; SONODA et al., 2003; YUAN et al., 2007). Além da função de absorção de amônio em raízes, os AMTs atuam na manutenção da homeostase de amônio em outros tecidos (VON WIRÉN et al., 2000, GAUR et al., 2012), portanto, a localização e distribuição espacial da expressão dos genes *AMT1s* é importante para compreensão da função fisiológica desses genes em cana-de-açúcar

Com o objetivo de caracterizar a regulação dos genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* pelo status de N em diversos órgãos/tecidos de cana-de-açúcar (cultivar 'SP80-3280'), análises quantitativas de transcritos reversos (RT-qPCR) foram realizadas em plantas de cana-de-açúcar submetidas a condições de suficiência de N (+N; 5 mM NH₄NO₃) ou deficiência de N (-N; sem adição de N) nos períodos 0, 1, 5 e 10 d após a imposição dos tratamentos.

Análises prévias haviam demonstrado que os genes da subfamília AMT1 (*ScAMT1.1* e *ScAMT1.3*), apresentam uma expressão basal maior em raízes de cana-de-açúcar, quando comparada à expressão em folhas e colmos, o que sugere a função principal desse genes no transporte de amônio em raízes (VITTI, 2012).

A análise do perfil de expressão de *ScAMT1.1* em raízes de cana-de-açúcar demonstrou uma indução progressiva no acúmulo de transcritos até 10 d após os tratamentos, ou seja, em ambos os tratamentos (+N e –N), há um aumento na expressão desse gene quando comparado ao controle (0 d) (Figura 12A). Além disso, com 10 d de deficiência, *ScAMT1.1* apresentou um acúmulo de transcritos 8,5 vezes maior quando comparado ao início do tratamento (0 d) (Figura 12A), o que demonstra que *ScAMT1.1* é induzido sob deficiência de N. Em espécies como arabidopsis e tomateiro a expressão de *AMT1.1* responde rapidamente ao status de N na planta, com aumento de número de transcritos para esse gene quando as raízes são cultivadas em condições limitantes de N (GAZZARRINI et al., 1999, VON)

WIRÉN et al., 2000; KUMAR et al., 2003; LOQUÉ et al., 2006; YUAN et al., 2007). No entanto, quando plantas de milho foram cultivadas sob deficiência de N por até 4 d, nenhuma alteração na expressão de *ZmAMT1.1a* foi observada (GU et al., 2013). Considerando a existência de uma similaridade de 97% entre as sequências dos transportadores AMT1.1 de milho e cana-de-açúcar (Figura 5), é possível que a expressão de *ZmAMT1.1a* seja induzida após um período maior de deficiência de N, como aqui observado para cana-de-açúcar (Figura 12A), ou mesmo que essas duas espécies apresentem uma regulação diferencial pelo status de N da planta. Para cana-de-açúcar, os resultados obtidos sugerem que *ScAMT1.1* é regulado pela status de N em raízes e que possivelmente esse gene atua na aquisição de amônio quando a disponibilidade exógena de N é limitante.

Para *ScAMT1.3*, um padrão diferencial de expressão foi encontrado em raízes de canade-açúcar (Figura 12B). Nesse caso, a expressão basal desse gene se mantém até 5 d independentemente do tratamento, no entanto, com 10 d de deficiência de N, o nível de transcritos desse gene aumenta cerca de 3 vezes em relação ao controle, demonstrando que esse transportador apresenta uma resposta tardia ao status de N da planta. Logo, similar a *ScAMT1.1*, o gene *ScAMT1.3* também é induzido sob condições de deficiência de N (Figura 12 A e B). Em arabidopsis e arroz, os genes *AMT1.3* são induzidos sob deficiência de N (SONODA et al., 2003; LOQUÉ et al., 2006), enquanto o gene *ZmAMT1.3* de milho não apresentou expressão alterada mesmo após 4 d de deficiência de N (GU et al., 2013). Dessa forma, assim como encontrado para *ScAMT1.1*, a indução na expressão do gene *ScAMT1.3* em raízes de cana-de-açúcar sob restrição de N sugere um papel relevante para esse transportador na aquisição de amônio quando as plantas se encontram em deficiência de N.

A proteína de membrana AMT1;3 parece ser um componente essencial na sinalização para desencadear a morfologia de raiz dependente de amônio, o que não acontece com outros membros dessa família gênica (LIMA et al., 2010). O transportador AMT1;3 desencadeia uma resposta morfológica modulando o desenvolvimento radicular de acordo com a concentração de N no ambiente (LIMA et al., 2010). Os altos níveis de expressão basal dos ortólogos da subfamília AMT1 de cana-de-açúcar e sua regulação pelo status de N sugerem que esses transportadores são essenciais para a aquisição de amônio em raízes de cana-deaçúcar e podem estar relacionados ao processo de desenvolvimento radicular.



Figura 12 – Regulação dos genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* pelo status de N em raízes de cana-deaçúcar. Análise quantitativa de transcritos reversos de *ScAMT1.1*(**A**) e *ScAMT1.3* (**B**) em raízes de cana-de-açúcar submetidas a condições contrastantes de disponibilidade de N. Plantas de cana-de-açúcar com três meses de cultivo em solução nutritiva suficiente de N (1 mM de NH₄NO₃) foram submetidas à deficiência de N (-N) ou a alto N (+N; 5 mM de NH₄NO₃). Amostras de raízes foram coletadas nos períodos de 0, 1, 5 e 10 d. Para as análises de expressão, as médias dos valores de expressão gênica obtidos foram normalizados para *ScAMT1.1* no tratamento N suficiente (+N; 2 mM NH₄NO₃, tempo 0 d). Barras indicam ±SE, n= 4-5 plantas por tempo amostrado.

A análise da regulação dos genes *AMTs* em resposta ao status de N na parte aérea e colmos de cana-de-açúcar pode fornecer importantes evidências para um possível papel desses transportadores no transporte de amônio entre os tecidos ou durante a remobilização de N de acordo com desenvolvimento da planta (MASCLAUX-DAUBRESSE; CHARDON, 2011).

Em arroz (*O. sativa* L. cv Nipponbare) foi relatado que a expressão de *OsAMT1.1* é constitutiva em folhas e raízes independente da restrição, fonte de N utilizada (amônio ou nitrato) ou sua concentração (SONODA et al., 2003), recentemente, entretanto, estudos com dois outros genótipos de arroz ('Pusa Basmati' e 'Kalanamak 3119') demonstraram que

OsAMT1.1 apresentou expressão induzida em raízes e folhas em resposta ao aumento crescente da concentração de amônio no meio (GAUR et al., 2012). Em cana-de-açúcar, a expressão de *ScAMT1.1* foi constitutiva em folhas maduras (Figura 13C), assim como descrito para seu ortólogo em arroz (SONODA et al., 2003), no entanto, em folhas jovens, a expressão desse gene foi reprimida em todos os períodos e condições avaliadas quando comparada a sua expressão basal (+N, 0d) (Figura 13A). Uma vez que nenhuma alteração na expressão gênica de *ScAMT1.1* foi encontrado em folhas maduras, somente em folhas jovens, é possível inferir que esse transportador está atuando no transporte de amônio exclusivamente em folhas neste estágio de desenvolvimento.

O gene ScAMT1.3 também apresentou uma regulação em nível transcricional em folhas. Em folhas jovens, houve um aumento no acúmulo de transcritos com 5 d após as plantas serem submetidas a suficiência de N (+N) (Figura 13B). Já sob deficiência de N, um pico de expressão foi identificado, 10 d após o tratamento; em todos os demais períodos a expressão desse gene se manteve próximo aos níveis basais (Figura 13B). Em folhas maduras foi possível observar uma tendência de aumento do número de transcritos para ScAMT1.3 em condição de deficiência de N (Figura 13D). Esse acúmulo de transcritos também foi verificado em plantas submetidas à suficiência de N, entretanto, a máxima expressão desse gene foi encontrada 5 d após o tratamento, sendo que após 10 d já é possível observar uma diminuição no acúmulo de transcritos (Figura 13D). Portanto, uma regulação diferencial na expressão de ScAMT1.3 foi encontrada em folhas maduras e jovens de cana-de-açúcar, a qual varia de acordo com os status de N e período avaliado, indicando uma função importante para esse transportador na homeostasia de amônio nesse órgão. Em tomateiro, a expressão de SlAMT1.3 foi detectada somente na parte aérea, sendo que o maior acúmulo de transcritos desse gene ocorre logo após o fim do dia quando há maior transporte de N para processos de síntese de asparagina ou no catabolismo do glutamato em células do mesófilo (VON WIRÉN et al., 2000). A indução da expressão de ScAMT1.3 em folhas jovens e maduras pode indicar um papel para esse transportador na distribuição/realocação e remobilização de amônio entre os tecidos.



Figura 13 – Análise quantitativa de transcritos reversos de ScAMT1.1(A e C) e ScAMT1.3 (B e D) em folhas novas (+1) e maduras (+3) de cana-de-açúcar submetidas a condições contrastantes de disponibilidade de N. Plantas de cana-de-açúcar com três meses de cultivo em solução nutritiva suficiente de N (1 mM de NH₄NO₃) foram submetidas à deficiência de N (-N) ou a alto N (+N; 5 mM de NH₄NO₃). Amostras de raízes foram coletadas nos períodos de 0, 1, 5 e 10 d. Para as análises de expressão, as médias dos valores de expressão gênica obtidos foram normalizadas para ScAMT1.1 no tratamento N suficiente (+N; 2 mM NH₄NO₃, tempo 0 d). Barras indicam ±SE, n= 4-5 plantas por tempo amostrado.

Em cana-de-açúcar, os colmos têm a capacidade de acumular grandes quantidades de sacarose, cerca de 20% do peso fresco desse órgão em variedades comerciais (WANG et al., 2013). Por ser uma cultura robusta e eficiente na produção de biomassa, contribui significativamente para a produção de açúcar e de bioetanol (NASS et al., 2007). No entanto, esse acúmulo de biomassa é dependente da regulação de vários processos fisiológicos, como por exemplo, a absorção de N, assimilação de C via fotossíntese e a alocação de C e N entre os órgãos (GASTAL; LEMAIRE, 2002). Em cana-de-açúcar, a deficiência de N durante o desenvolvimento é um fator limitante na produtividade, porque conduz a menores níveis de N nas folhas, consequentemente diminuindo o acúmulo de fotoassimilados que exercem *feedback* negativo na fotossíntese (VAN DER MERWE et al., 2010). Por outro lado, o

excesso de fertilização nitrogenada pode desviar esqueletos de C para a via de assimilação de N, diminuindo o acúmulo de sacarose nos colmos (STITT et al., 2002).

Devido a importância da interação entre o metabolismo de C e N nessa gramínea, análises quantitativas de transcritos reversos para os genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* foram realizadas em colmos de cana-de-açúcar (Figura 14). Um padrão de expressão oposto foi encontrado para esses dois genes (Figura 14A e B). Enquanto a expressão de *ScAMT1.1* é reprimida em todos os períodos amostrados em relação ao controle (+N, 0 d) (Figura 14A), *ScAMT1.3* apresentou um aumento no acúmulo de transcritos detectados a partir de 5 d de tratamento (Figura 14B). Esses resultados demonstram que existe uma regulação diferencial dos genes *AMT1* de cana-de-açúcar pelo status de N nos colmos de cana-de-açúcar, o que indicam funções distintas para esses genes nesse órgão.



Figura 14 – Análise quantitativa de transcritos reversos de ScAMT1.1(A) e ScAMT1.3 (B) em colmos de cana-de-açúcar submetidas a condições contrastantes de disponibilidade de N. Plantas de cana-de-açúcar com três meses de cultivo em solução nutritiva suficiente de N (+N; 1 mM de NH₄NO₃) foram submetidas à deficiência de N (-N) e a alto N (5 mM de NH₄NO₃). Amostras de raízes foram coletadas nos períodos de 0, 1, 5 e 10 d. Para as análises de expressão, as médias dos valores de expressão gênica obtidos foram normalizadas para ScAMT1.1 no tratamento N suficiente (+N; 2 mM NH₄NO₃, tempo 0 d). Barras indicam ±SE, n= 4-5 plantas por tempo amostrado.

Portanto, a análise do perfil transcricional de *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* em diferentes órgãos de cana-de-açúcar demonstrou que esses genes são regulados pelo status de N da plantas e que, o maior acúmulo relativo de transcritos de *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* em raízes, quando comparado a folhas e colmo, sugere uma função relevante desses genes no transporte de amônio principalmente nesse órgão. No entanto, considerando a variação existente na regulação dos genes AMT1 pelo status de N em raízes entre as espécies como arabidopsis (LOQUÉ et al., 2006; YUAN et al., 2007), tomateiro (LUDEWIG et al., 2002; VON WIRÉN et al., 2000), arroz (SONODA et al., 2003), sorgo (KOEGEL et al., 2013) e milho (GU et al., 2013), uma série de experimentos de expressão heteróloga em arabidopsis foram realizados para melhor compreensão das funções fisiológicas de *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* em cana-de-açúcar.

4.3 Localização dos AMT1s de cana-de-açúcar em Arabidopsis

Com o objetivo de caracterizar a possível função fisiológica dos transportadores de amônio AMT1 de cana-de-açúcar, experimentos de localização da expressão tecido/órgão específica desses genes foram realizados em plantas do tipo selvagem de *A. thaliana* ('Col-0') transformadas com construções contendo o promotor de cada membro da subfamília AMT1 fusionado aos genes repórteres GUS (β -Glucuronidase) e GFP (green fluorescent protein).

Para verificar a regulação por status de N das regiões cis-regulatórias dos genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* em arabidopsis, as plantas transgênicas contendo ProScAMT1.1:GUS ou Pro*ScAMT1.3*:GUS foram cultivadas em condição suficiente de N (1 mM NH₄NO₃) por 4 d e em seguida foram transferidas para meios de cultivo contendo NH₄⁺ (2 mM NH₄Cl), - N (sem adição de N) ou + N (1 mM NH₄NO₃) como controle, por 3 d.

Plantas transgênicas Pro*ScAMT1.1*:GUS, quando cultivadas em condição suficiente de N, apresentaram maior acúmulo de expressão de GUS dirigida pelo promotor *ScAMT1.1* em regiões mais internas nas raízes primárias, que compreende a região da endoderme/ periciclo e a vascular (Figura 15). Essa atividade do promotor *ScAMT1.1* se estende até a região apical da raiz primária, porém nenhuma atividade foi encontrada na região meristemática (Figura 15). Por outro lado, em raízes laterais, *ScAMT1.1* foi expresso na região meristemática (Figura 15). Em arabidopsis, a atividade do promotor de *AtAMT1.1* em condição de suficiência de N está restrito à região mais apical das raízes (LOQUÉ et al., 2006), assim como o encontrado para o promotor de *ScAMT1.1* (Figura 15). Sob condições de suficiência de N, a atividade do

promotor de *ScAMT1.1* foi expresso somente em cotilédones, mas não em folhas jovens em desenvolvimento (Figura 15).

Por outro lado, quando as plantas transgênicas ProScAMT1.1:GUS foram cultivadas somente em amônio como fonte de N, a atividade do promotor de ScAMT1.1 foi fortemente induzida nas raízes e parte aérea das plantas (Figura 15). Nesse caso, a localização da expressão do gene ScAMT1.1 em raízes, não foi alterada pelo tratamento, em relação à condição de suficiência de N (1 mM NH₄NO₃), porém, visualmente, a coloração pelo ensaio com GUS é mais forte, o que pode indicar um maior nível de expressão sob aplicação de amônio (Figura 15). A atividade do promotor de ScAMT1.1 foi detectada em cotilédones e folhas novas sob nutrição exclusiva por amônio (Figura 15). Esse resultado indica que o nitrato pode estar regulando a atividade do promotor de ScAMT1.1, uma vez que quando as plantas transgênicas ProScAMT1.1:GUS foram cultivadas em +N (1 mM NH4NO3), a atividade desse promotor não foi encontrada em folhas novas (Figura 15). Evidências para uma regulação no influxo de amônio por nitrato já foram descritas em raízes de arabidopsis (GAZZARINI et al., 1999). Nessa espécie, plantas pré-cultivadas em hidroponia sob condição suficiente de N (1 mM NH₄NO₃), foram transferidas para solução contendo somente nitrato (1 mM KNO₃) e o influxo de ¹⁵N-amônio foi medido até 3 d após o tratamento. Embora o influxo de ¹⁵N-amônio em raízes tenha aumentado até 3 vezes após 3 d, os níveis de expressão de AtAMT1.1, AtAMT1.2 e AtAMT1.3 em raízes não foram induzidos, sugerindo que possa haver uma regulação pós-transcricional da absorção de amônio por nitrato (GAZZARINI et al., 1999). No caso do promotor de cana-de-açúcar, os resultados obtidos sugerem que a regulação por nitrato pode ocorrer em nível transcricional e ser mais relevante para a expressão de ScAMT1.1 em folhas.

A deficiência de N (-N, sem adição de N) também demonstrou ser efetiva na regulação de *ScAMT1.1*, visto que, uma atividade menor do promotor de *ScAMT1.1* foi detectada em raízes primárias, zona de diferenciação e parte aérea (Figura 15). No entanto, a expressão de *ScAMT1.1* se manteve alta em raízes laterais (Figura 15). Considerando que as análises de expressão desse gene em raízes de cana-de-açúcar demonstraram que uma acúmulo mais acentuado no número de transcritos ocorre após 5 d e 10 d de deficiência de N (Figura 12A), é possível que os 3 d de tratamento não tenham sido suficientes para induzir a atividade do promotor de *ScAMT1.1*. Em arabidopsis, a deficiência de N, aumenta a expressão e altera a localização subcelular de *AtAMT1.1*, que passa a ser expresso em células da rizoderme,

incluindo os pelos radiculares (LOQUÉ et al., 2006), no entanto, para o promotor de cana-deaçúcar, não foi encontrada atividade em pelos radiculares (Figura 15).

Em resumo, esses resultados de expressão heteróloga do promotor de *ScAMT1.1* em arabidopsis demonstram que esse gene é possivelmente expresso em células da endoderme, periciclo e região vascular nas raízes, e também em folhas jovens realizando o transporte de amônio. De acordo com o status de N da planta e/ou fonte N, *ScAMT1.1* apresenta alteração no nível de expressão, sendo fortemente induzido em raízes na presença de amônio após 3 d. A repressão na expressão de *ScAMT1.1* em folhas jovens de plantas cultivadas em suficiência de N (1 mM NH₄NO₃), sugere que o nitrato possui um papel importante na regulação desse gene nesse órgão.



Figura 15 – Localização da atividade do promotor de ScAMT1.1 fusionado à GUS. Plantas transgênicas foram cultivadas em suficiência de N (1 mM NH₄NO₃) por 4 d e em seguida foram transferidas para meio de cultivo contendo NH₄⁺ (2 mM NH₄Cl), - N (sem adição de N) ou + N (1 mM NH₄NO₃) como controle por 3 d.

Plantas transgênicas expressando Pro*ScAMT1.3*:GUS apresentaram padrão distinto de regulação. A atividade do promotor de *ScAMT1.3* fusionado ao gene GUS não foi detectada em raízes após 3 d de tratamentos de suficiência de N (+N), presença de amônio ou deficiência de N (Figura 16). As análises de expressão gênica em cana-de-açúcar demonstraram que o nível de expressão basal do gene *ScAMT1.3* em raízes é em média 5 vezes menor quando comparado à *ScAMT1.1* (Figura 12B). Além disso, uma indução tardia em raízes de plantas deficientes em N foi detectada para esse gene (10 d) (Figura 12B), e, portanto, a atividade desse promotor em raízes de arabidopsis talvez possa ser detectada com um maior tempo de exposição aos tratamentos.

Por outro lado, quando as plantas transgênicas foram cultivadas em $+N e NH_4^+$ a atividade do promotor de *ScAMT1.3* na parte aérea foi alta, apresentando maior expressão em folhas jovens do que em folhas cotiledonares (Figura 16). Já em deficiência de N (-N) foi detectada uma reduzida expressão na parte aérea, em folhas novas e cotilédones (Figura 16). Com base nos dados de expressão gênica para *ScAMT1.3* em cana-de-açúcar, que demonstram que em folhas a expressão desse gene é induzida após 10 d de deficiência de N (Figura 13), uma indução maior na atividade desse promotor poderia ser detectada em um período maior de extensão da restrição de N.

Em resumo, a atividade do promotor de *ScAMT1.3* em plantas de arabidopsis sugerem a expressão desse gene principalmente na parte aérea, o que difere dos resultados de expressão gênica obtidos em cana-de-açúcar. Ainda, *ScAMT1.3* apresenta regulação por N em folhas (Figura 15).



Figura 16 – Localização da atividade do promotor de ScAMT1.3 fusionado à GUS. Plantas transgênicas foram cultivadas em suficiência de N (1 mM NH₄NO₃) por 4 d e em seguida foram transferidas para meio de cultivo contendo NH₄⁺ (2 mM NH₄Cl), - N (sem adição de N) e + N (1 mM NH₄NO₃) como controle por 3 d.

A fim de validar os resultados obtidos para as plantas transgênicas Pro*ScAMT1.1*:GUS e Pro*ScAMT1.3*:GUS, as mesmas regiões regulatórias de cada gene foram fusionados ao gene repórter GFP e transformadas em plantas de arabidopsis do tipo selvagem ('Col-0'). Plantas transgênicas expressando Pro*ScAMT1.1*:GFP ou Pro*ScAMT1.3*:GFP foram submetidas as mesmas condições que os promotores fusionados ao gene GUS: + N (1 mM NH₄NO₃), NH₄⁺ (2 mM NH₄Cl) e - N (sem adição de N).

As plantas transgênicas expressando Pro*ScAMT1.1*:GFP submetidas aos tratamentos + N, NH₄⁺ e - N por 3 d, apresentaram o mesmo padrão de localização obtido para esse promotor fusionado à GUS, ou seja, com fluorescência na região mais interna das raízes, correspondente provavelmente ao periciclo/endoderme e região vascular (Figura 17). Além disso, uma fluorescência mais intensa referente à atividade de *ScAMT1.1* foi detectada em raízes de plantas crescidas em amônio, confirmando a indução desse promotor por essa fonte inorgânica de N (Figura 17).

Um padrão diferencial de localização foi encontrado quando as plantas transgênicas foram submetidas ao tratamento + N por um período maior de tempo (5 d). Nesse caso, a atividade do promotor de *ScAMT1.1* não ficou restrita à parte mais interna das raízes primárias, e a fluorescência de GFP apresentou uma distribuição em maior número de células perto da região basal da raiz primária (Figura 18). Além disso, consistente com os dados de expressão gênica realizados em raízes de cana-de-açúcar, uma indução maior na atividade do promotor de *ScAMT1.1* foi encontrada em raízes de plantas submetidas a deficiência de N por 5 d, quando comparadas as plantas que estiveram sob deficiência por um período menor (3 d) (Figura 18). Portanto, as análises de expressão gênica em raízes de cana-de-açúcar correlacionaram positivamente com a localização de *ScAMT1.1* em plantas transgênicas Pro*ScAMT1.1*:GFP, ou seja, um acúmulo de transcritos para esse gene foi encontrado em raízes de plantas de cana-de-açúcar sob deficiência de N por 5 d (Figura 12) assim como um aumento da atividade do promotor de *ScAMT1.1* nas plantas transgênicas (Figura 18).



Figura 17 – Localização da atividade do promotor de ScAMT1.1 fusionado à GFP. Plantas transgênicas foram cultivadas em suficiência de N (1 mM NH₄NO₃) por 4 d e em seguida foram transferidas para meio de cultivo contendo NH₄⁺ (2 mM NH₄Cl), - N (sem adição de N) e + N (1 mM NH₄NO₃) como controle por 3 d.



Figura 18 – Localização da atividade do promotor de ScAMT1.1 fusionado à GFP. Plantas transgênicas foram cultivadas em suficiência de N (1 mM NH₄NO₃) por 4 d e em seguida foram transferidas para meio de cultivo contendo NH₄⁺ (2 mM NH₄Cl), - N (sem adição de N) e + N (1 mM NH₄NO₃) como controle por 5 d.

Para as plantas de arabidopsis transformadas com o promotor de *ScAMT1.3* fusionado a GFP, nenhuma fluorescência foi detectada na zona de diferenciação das raízes em todos as condições de N avaliadas. No entanto, a atividade desse promotor foi detectada no periciclo e endoderme durante a iniciação de raízes laterais após 3 d e 5 d de cultivo das plantas em + N, NH_4^+ e - N (Figuras 19 e 20), indicando a função do gene *ScAMT1.3* no transporte de amônio durante o desenvolvimento de raízes laterais.

Em raízes primárias, a atividade de *ScAMT1.3* foi detectada em plantas submetidas aos tratamentos de + N, NH₄⁺ e - N por 3 d (Figura 19), o que difere de plantas expressando *ScAMT1.3* fusionado a GUS (Figura 16). Além disso, a atividade desse promotor foi confinada à região mais interna das raízes assim como observado para o promotor de *ScAMT1.1* (Figuras 15 e 17). No entanto, quando as plantas transgênicas foram cultivadas em suficiência de N por 5 d (+N), a fluorescência de GFP referente a atividade de *ScAMT1.3* em raízes primárias apresentou uma distribuição mais abrangente próxima a região basal e meristemática da raiz primária, do mesmo modo que o observado para o promotor de *ScAMT1.1* (Figura 18). Esses resultados indicam que existe uma sobreposição na localização de *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* e que a presença de nitrato, leva a uma distribuição espacial diferenciada na expressão desses genes em células da raiz.

Os resultados das análises de localização realizadas nas plantas de arabidopsis transformadas com os promotores de ScAMT1.1 e ScAMT1.3 fusionados aos genes repórteres GUS e GFP, demonstraram a existência de uma organização espacial dos transportadores de amônio de cana-de-açúcar, a qual é regulada pelo status de N da planta e também de acordo com a fonte inorgânica de N. Em plantas de arabidopsis cultivadas sob suficiência de N, AtAMT1.1 e AtAMT1.3 estão localizados em células da epiderme e córtex na zona apical das raízes, mas somente AtAMT1.1 apresenta localização no periciclo (LOQUÉ et al., 2006). Em deficiência de N, esses genes são induzidos e passam a ser expressos também em pelos radiculares e na zona basal das raízes (LOQUÉ et al., 2006). Experimentos de hibridização in situ realizados em milho demonstraram que os genes ZmAMT1.1a e ZmAMT1.3 são expressos em células da epiderme na zona apical das raízes de plantas cultivadas sob ressuplementação de amônio, no entanto, ZmAMT1.3 também teve transcritos encontrados em células do periciclo e na zona basal das raízes (GU et al., 2013). Porém, em milho, os genes ZmAMT1.1a e ZmAMT1.3 não são induzidos sob deficiência de N (GU et al., 2013). Em canade-açúcar, os resultados obtidos sugerem que os genes ScAMT1.1 e ScAMT1.3 são expressos mais internamente em células das raízes, o que provavelmente corresponde as células da
endoderme/periciclo e vascular, assim como descrito para *AtAMT1.1* e *ZmAMT1.3* (LOQUÉ et al., 2006; GU et al., 2013). No entanto, novas análises devem ser realizadas empregando microscópio confocal para estabelecer a localização célula-específica dos *AMTs* de cana-de-açúcar em resposta ao status de N em plantas de arabidopsis expressando Pro*ScAMT1.1*:GFP ou Pro*ScAMT1.3*:GFP, assim como, experimentos de hibridização *in situ* em raízes de cana-de-açúcar. Apesar disso, os resultados apresentados aqui demonstram uma sinalização conservada entre dicotiledôneas e monocotiledôneas, visto que, a região promotora dos genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* apresentaram regulação de acordo com a disponibilidade de N ou amônio (Figuras 15-20) em plantas de arabidopsis, o que sugere que, os mecanismos de regulação transcricional desses transportadores de amônio são preservados.



Figura 19 – Localização da atividade do promotor de *ScAMT1.3* fusionado à GFP. Plantas transgênicas foram cultivadas em suficiência de N (1 mM NH_4NO_3) por 4 d e em seguida foram transferidas para meio de cultivo contendo NH_4^+ (2 mM NH_4Cl), - N (sem adição de N) e + N (1 mM NH_4NO_3) como controle por 3 d.



Figura 20 – Localização da atividade do promotor de ScAMT1.3 fusionado à GFP. Plantas transgênicas foram cultivadas em suficiência de N (1 mM NH₄NO₃) por 4 d e em seguida foram transferidas para meio de cultivo contendo NH₄⁺ (2 mM NH₄Cl), - N (sem adição de N) e + N (1 mM NH₄NO₃) como controle por 5 d.

4.4 Expressão heteróloga de *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* de cana-de-açúcar em mutante quádruplo para *AMMONIUM TRANSPORTERS* em *Arabidopsis thaliana*

Considerando que os resultados de expressão heteróloga de promotores e expressão de *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* em plantas de cana-de-açúcar indicam a função essencial desses genes em raízes, foram realizados experimentos de complementação funcional de mutante quádruplo em *AMMONIUM TRANSPORTERS (qko)* de arabidopsis (YUAN et al., 2007) para inferir quanto as propriedades bioquímicas de transporte de ScAMT1.1 e ScAMT1.3 de cana-de-açúcar. O mutante *qko* de arabidopsis é defectivo nos transportadores AtAMT1.1, AtAMT1.2, AtAMT1.3 e AtAMT2.1 e possui apenas 10% de capacidade de absorção de amônio, devido à presença do transportador AtAMT1.5 (YUAN et al., 2007), o que torna esse genótipo uma ferramenta valiosa para estudos de funcionalidade de transportadores de amônio individuais ou co-expressão de transportadores funcionais ou defectivos (YUAN et al., 2009)

Após a clonagem e transformação das plantas de arabidopsis do tipo selvagem ('Col-0') e do mutante quádruplo (*qko*) com as construções 35S:*ScAMT1.1*, 35S:*ScAMT1.3*, Pro*ScAMT1.1*:*ScAMT1.1* e Pro*ScAMT1.3*:*ScAMT1.3* análises de expressão dos transgenes nos diferentes eventos de transformação (geração T3) foram realizados para definir quais desses eventos seriam utilizados para a análise funcional dos transportadores de amônio de cana-de-açúcar (Figura 21).

Plantas de arabidopsis superexpressando os genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* acumularam mais transcritos quando comparadas à expressão de *AtAMT1.1* em plantas de 'Col-0' (Figura 21). Para *ScAMT1.1*, a expressão foi até 25 vezes maior quando esse gene foi superexpresso no genótipo mutante e 28 vezes maior no genótipo selvagem (Figura 21). Já para *ScAMT1.3*, o acúmulo de transcritos foi 150 vezes maior nas plantas de *qko* superexpressando esse gene e 200 vezes maior nas plantas de 'Col-0' (Figura 21). Para essas construções, os eventos de transformação escolhidos para as análises funcionais dos transportadores de amônio de canade-açúcar foram os eventos F2 e f1 da construção 35S:*ScAMT1.1* e o evento E3 e e1 da construção 35S:*ScAMT1.3*.

Para as construções Pro*ScAMT1.1:ScAMT1.1* e Pro*ScAMT1.3:ScAMT1.3*, o nível de expressão dos genes *AMTs* foi menor do que seus ortólogos em arabidopsis, sugerindo que cana-de-açúcar apresenta uma expressão basal menor desses genes ou mesmo que essas espécies podem diferir em relação à regulação desses genes na condição estudada (+ N, 1 mM NH₄NO₃) (Figura 21). Nesse caso, os eventos G4 e g4 da construção Pro*ScAMT1.1:ScAMT1.1*

foram escolhidos para os experimentos, enquanto para a construção Pro*ScAMT1.3:ScAMT1.3,* os eventos H4 e h5 foram utilizados para as análises funcionais.



Figura 21 – Análise quantitativa de transcritos reversos para ScAMT1.1 e ScAMT1.3 nos distintos eventos de transformação de arabidopsis. As barras em cinza escuro correspondem às construções transformadas no mutante qko; as barras em cinza claro correspondem às construções transformadas em 'Col-0'. O controle utilizado para normalização da expressão gênica (barras em preto) foram a expressão de AtAMT1.1 em 'Col-0' para os eventos 35S:ScAMT1.1 e ProScAMT1.1:ScAMT1.1 e a expressão de AtAMT1.3 em 'Col-0' para as construções 35S:ScAMT1.3 e ProScAMT1.3:ScAMT1.3. O gene UBQ2 foi utilizado como gene de referência. Barras indicam ±SE, n= 2 pools de plantas por tempo amostrado.

4.5 Caracterização fenotípica das plantas transgênicas de arabidopsis complementadas com *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* de cana-de-açúcar

4.5.1 In vitro

As análises fenotípicas *in vitro* das plantas transgênicas de arabidopsis foram realizadas com uma linha de cada construção previamente selecionada por análises de expressão gênica (Figura 21). Para a caracterização inicial, foi realizado um experimento de toxidez ao metilamônio (MeA), uma vez que os AMT1s são capazes de transportar esse análogo tóxico ao amônio (LUDEWIG et al., 2002, 2003).

Inicialmente plantas do genótipo selvagem ('Col-0'), do mutante (*qko*) e as transgênicas foram cultivadas em meio MS modificado contendo como fonte de N apenas 5 mM KNO₃ objetivando a homogeneização do crescimento das plantas, e em seguida, foram transferidas para meios de cultivo contendo 2 mM KNO₃ e concentrações crescentes de 0, 20 e 50 mM de MeA. Após 14 d de cultivo, a biomassa fresca da parte aérea das plantas foi avaliada.

Quando as plantas de 'Col-0', *qko* e as linhas transgênicas foram cultivadas em meio MS modificado sem adição de MeA, não houve diferenças significativas na produção de biomassa entre os genótipos superexpressando *ScAMT1.1* ou *ScAMT1.3* e plantas controles (Figuras 22A e B). No entanto, em concentrações crescentes de MeA, 'Col-0' apresentou reduzido acúmulo de biomassa quando comparado ao genótipo mutante *qko*, sendo a produção de biomassa da parte aérea 25% e 27% menor nas concentrações de 20 e 50 mM de MeA, respectivamente, em relação a *qko* (Figuras 22A, C e D). Isso ocorreu porque plantas de 'Col-0' apresentam maior aquisição de MeA, que é tóxico, levando a inibição no crescimento quando comparado ao mutante *qko* que apresenta apenas 10% da capacidade de absorver amônio.

Para as plantas de *qko* superexpressando o gene *ScAMT1.1*, ocorreu uma inibição significativa no crescimento em relação a plantas de *qko*. Nesse caso, a biomassa foi 16% menor em 20 mM MeA e 35% menor em 50mM MeA, evidenciando um elevado nível de toxidez decorrente da restauração da capacidade de transporte de amônio/metilamônio nessas plantas devido a superexpressão de *ScAMT1.1* (Figuras 22A, C e D). Esses resultados demonstram que ScAMT1.1 é funcional no transporte de MeA.

Resultados similares foram encontrados em plantas de *qko* superexpressando *ScAMT1.3*, visto que, plantas 35S:*ScAMT1.3* apresentaram alta sensibilidade ao MeA, com redução no acúmulo de biomassa em 25% na concentração de 20mM MeA e 29% em 50 mM MeA em relação a plantas de *qko* (Figuras 22A, C e D). Portanto, ScAMT1.3 também é funcional em raízes de arabidopsis.





Figura 22 – Acúmulo de biomassa de plantas selvagens ('Col-0'), mutantes (*qko*) e linhas transgênicas para as construções 35:ScAMT1.1 e 35S:ScAMT1.3 em concentrações crescentes de MeA. A: Crescimento de plantas de 'Col-0', *qko* e linhas transgênicas em meio MS modificado contendo 0, 20 ou 50 mM de MeA na presença de 2 mM de NO₃⁻ (2 mM KNO₃) por 14 d. **B, C e D**: Biomassa fresca (MF) da parte aérea (g) de plantas de genótipos selvagem ('Col-0'), mutante (*qko*) e linhas transgênicas em concentrações crescentes de MeA, **B**: 0 mM MeA; **C**: 20 mM MeA; **D**: 50 mM MeA. (n=10). Para as análises estatísticas, construções inseridas no background 'Col-0' foram comparadas com o controle 'Col-0' e construções inseridas no background *qko* foram comparadas com o controle *qko*. Diferenças significativas são indicadas por asteriscos (*P < 0,05 e **P < 0,001, teste-t de Student).

Para melhor compreensão quanto a capacidade de transporte de amônio de proteínas ScAMT1.1 e ScAMT1.3, foram realizadas construções gênicas contendo o promotor endógenos dos respectivos AMT1s de cana-de-açúcar. Plantas controle de 'Col-0' transformadas com *ProScAMT1.1:ScAMT1.1* ou *ProScAMT1.3:ScAMT1.3* apresentaram redução significativa de acúmulo de biomassa, a níveis similares a planta 'Col-0' em comparação ao mutante *qko* (Figura 23), o que indica que a absorção de MeA a níveis tóxicos está ocorrendo nas raízes desses genótipos. Quando plantas de *qko* foram transformadas com *ProScAMT1.1:ScAMT1.3:ScAMT1.3* e foram submetidas as distintas concentrações de MeA, nenhuma diferença significativa foi encontrada em relação à produção de biomassa da parte aérea em ambas as concentrações de MeA testadas, quando comparadas as plantas de *qko*, demonstrando que o transporte de MeA através dos transportadores de cana-de-açúcar foi baixo ou mesmo não ocorreu (Figuras 23A, C e D).

Com base nos resultados obtidos através da localização da expressão desses promotores fusionados a GUS/GFP, no qual demonstrou que existe uma regulação pelo status de N da planta (Figuras 15-20), e principalmente, que os promotores endógenos de *ScAMT1.1 e ScAMT1.3* são regulados negativamente na presença nitrato (Figuras 15-20), os dados obtidos para as plantas de *qko* complementadas com *ProScAMT1.1:ScAMT1.1* ou *ProScAMT1.3:ScAMT1.3* sugerem que o nitrato utilizado como fonte de N nos experimentos de MeA pode ter reprimido a expressão de *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* no background de *qko*, levando a menor absorção de MeA (Figuras 23A, C e D). Há de se considerar ainda que os níveis de expressão de *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* em plantas *qko* complementadas são extremamente baixos quando comparados aos seus ortólogos em arabidopsis (Figura 21), o que pode também ter contribuído para não complementação de plantas mutante de *qko* com os genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* e seus respectivos promotores endógenos.

Em arabidopsis, a complementação de genes *AMT1* endógenos no background *qko* possibilita a restauração da capacidade de transporte de amônio/metilamônio (YUAN et al., 2007), assim como em milho, onde a superexpressão dos genes *ZmAMT1.1* e *ZmAMT1.3* no background *qko*, leva à restauração da capacidade de transporte de amônio (GU et al., 2013), no entanto, até o momento não existe nenhum trabalho publicado utilizando genes e seus respectivos promotores endógenos para expressão heteróloga no mutante *qko*.

Portanto, os resultados obtidos para as plantas de arabidopsis transgênicas superexpressando os genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3*, demonstraram que ocorreu uma restauração do transporte de amônio/metilamônio nessas plantas, evidenciada pela alta

sensibilidade ao MeA (figura 22), o que indica que os genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* identificados no genoma de cana-de-açúcar, codificam para proteínas transportadoras de amônio funcionais. A baixa sensibilidade ao MeA demonstrada pelas plantas de arabidopsis transformadas com *ProScAMT1.1:ScAMT1.1* ou *ProScAMT1.3:ScAMT1.3* pode ter ocorrido pela repressão desses promotores por nitrato ou ainda devido à baixa expressão desses genes em plantas *qko* transgênicas para os genes endógenos de cana-de-açúcar.



80



Figura 23 - Acúmulo de biomassa de plantas selvagens ('Col-0'), mutantes (qko) e linhas transgênicas para as construções ProScAMT1.1:ScAMT1.1 e ProScAMT1.3:ScAMT1.3 em concentrações crescentes de MeA. A: Crescimento de plantas de 'Col-0', qko e linhas transgênicas em meio MS modificado contendo 0, 20 ou 50 mM de MeA na presença de 2 mM de NO₃ (2 mM KNO₃) por 14 d. B, C e D: Biomassa fresca (MF) da parte aérea (g) de plantas de genótipos selvagem ('Col-0'), mutante (qko) e linhas transgênicas em concentrações crescentes de MeA, B: 0 mM MeA; C: 20 mM MeA; D: 50 mM MeA. (n=10). Para as análises estatísticas, construções inseridas no background 'Col-0' foram comparadas com o controle 'Col-0' e construções inseridas no background qko foram comparadas com o controle qko. Diferenças significativas são indicadas por asteriscos (*P < 0,05 e **P < 0,001, teste-t de Student).

Com o objetivo de confirmar a funcionalidade dos genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* de cana-de-açúcar, experimentos para a caracterização fenotípica das plantas transgênicas de arabidopsis foram realizados sob nutrição de fontes inorgânicas de N. Para isso, plantas de 'Col-0', *qko* e *qko* complementadas com superexpressão ou promotor endógeno dos genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* foram cultivadas em meio MS modificado contendo como fonte de N apenas 5 mM KNO₃, e em seguida foram transferidas para meios de cultivo contendo 0,2 e 0,5 mM de NH₄Cl ou 0,5 mM de KNO₃ como controle da fonte de N. Após 14 d de cultivo, a biomassa seca das plantas foi avaliada.

Quando as plantas foram cultivadas em meio contendo apenas nitrato como fonte única de N (0,5 mM KNO₃), como era esperado, não houve diferenças para acúmulo de biomassa entre as plantas dos genótipos selvagem ('Col-0'), mutante (qko) e qko+35S:ScAMT1.1 e qko+35S:ScAMT1.3 (Figuras 24A e B), indicando que a absorção de nitrato é comparável a plantas controle ('Col-0'). Já quando os distintos genótipos foram submetidos ao crescimento em duas concentrações de N-amônio (0,2 e 0,5 mM de NH₄Cl), o quádruplo mutante (qko) teve um crescimento significativamente menor do que o genótipo selvagem ('Col-0'); 20% menor em 0,2 mM amônio e 30% menor em 0,5 mM amônio, devido a reduzida capacidade de influxo de amônio (YUAN et al., 2007) (Figura 24 e 25). Em 0,2 mM N-amônio, plantas de qko superexpressando os genes ScAMT1.1 e ScAMT1.3 tiveram uma produção de biomassa significativamente maior do que o qko, sendo que qko+35S:ScAMT1.1 apresentou um aumento de 50% no acúmulo de biomassa e para qko+35S:ScAMT1.3 o aumento na produção de biomassa foi 100% maior quando comparado a qko controle (Figura 24A e C).

Resultados similares foram obtidos na concentração de 0,5 mM de amônio para as construções 35S:*ScAMT1.1* e 35S:*ScAMT1.3* no background de *qko*, com significante aumento de cerca de 50% e 100% no acúmulo de biomassa para plantas *qko*+35S:*ScAMT1.1* e *qko*+35S:*ScAMT1.3*, respectivamente, em relação a plantas de *qko* (Figuras 24A e D). Esses resultados demonstram que a expressão ectópica de *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* no background de *qko* foi capaz de restaurar o crescimento das plantas em relação as plantas controles utilizadas, o que comprova que ScAMT1.1 e ScAMT1.3 de cana-de-açúcar são capazes de transportar amônio em raízes.

Resultados surpreendentes foram obtidos com a superexpressão de *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* no background genético de 'Col-0' sob nutrição por amônio. Quando as plantas 'Col-0'+35S:*ScAMT1.1* foram cultivadas em 0,2 mM de amônio, o acúmulo de biomassa total

excedeu em 40% a biomassa do genótipo selvagem 'Col-0' (Figuras 24A e C). No entanto, quando essas foram submetidas ao aumento exógeno da concentração de amônio no meio de cultivo (0,5 mM) foi observado um acúmulo de biomassa de 17% em relação à 'Col-0', o que sugere que o maior acúmulo de amônio em plantas expressando de forma ectópica *ScAMT1.1* no background 'Col-0' causa toxidez, inibindo o desenvolvimento/crescimento da planta (Figuras 24A e D). Esses resultados demonstram que a superexpressão de *ScAMT1.1* de canade-açúcar leva a maior aquisição de amônio mesmo na presença de *AMTs* endógenos de arabidopsis em 'Col-0'.

Entretanto, quando plantas de 'Col-0' 35S:*ScAMT1.3* foram cultivadas em 0,2 mM de amônio, o incremento na produção de biomassa das plantas foi de 15% em relação a plantas de 'Col-0', enquanto que plantas crescidas em 0,5 mM de amônio, tiveram um incremento no acúmulo de biomassa de 20%, demonstrando que para esse gene, o aumento na concentração de amônio no meio de cultivo possibilitou que as plantas transgênicas 'Col-0' 35S:*ScAMT1.3* tivessem um aumento significativo na produção de biomassa (Figuras 24A, C e D). Esses resultados indicam que a expressão ectópica de *ScAMT1.3* no background de 'Col-0' não leva a absorção de amônio nas raízes a níveis tóxicos, como foi demonstrado para 'Col-0'+35S:*ScAMT1.1* cultivadas sob 0.5 mM de amônio, o que sugere propriedade bioquímicas distintas de transporte de amônio entre ScAMT1.1 e ScAMT1.3 de cana-de-açúcar.

Em resumo, os resultados de superexpressão dos genes de cana-de-açúcar *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* no background de 'Col-0' e *qko* demonstram: i) a capacidade de restaurar o transporte de amônio em raízes e ii) a existência de diferenças na capacidade de transporte entre *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3*.

Em espécies como arabidopsis e milho, os membros da subfamília AMT1 apresentam diferentes capacidades de transporte (YUAN et al., 2007, GU et al., 2013). Por exemplo, *AtAMT1.1* de arabidopsis possui uma afinidade estimada ao substrato (K_m) de 50 µM e capacidade de transporte (V_{max}) de 345 µmol h⁻¹ g⁻¹ enquanto *AtAMT1.3* apresenta K_m de 60 µM e V_{max} de 287 µmol h⁻¹ g⁻¹ (YUAN et al., 2007). Em milho, *ZmAMT1.1a* e *ZmAMT1.3* apresentam K_m de 48 µM e 33 µM e V_{max} de 351 µmol h⁻¹ g⁻¹ e 172 µmol h⁻¹ g⁻¹, respectivamente (GU et al., 2013). No entanto, para a caracterização da capacidade de transporte dos AMT1 de cana-de-açúcar, experimentos com as plantas *qko*, *qko*+35S:*ScAMT1.1 e qko*+35S:*ScAMT1.3* ainda precisam ser realizados em diferentes

concentrações de amônio para estabelecer os valores de $K_m e V_{max}$ para cada transportador individual.





Figura 24 – Acúmulo de biomassa de plantas selvagens ('Col-0'), mutantes (*qko*) e linhas transgênicas para as construções 35:ScAMT1.1 e 35S:ScAMT1.3 em nitrato e amônio. **A**: Crescimento de plantas de 'Col-0', *qko* e linhas transgênicas em meio MS modificado contendo 0,5 mM de NO₃⁻ (0,5 mM KNO₃), 0,2 mM NH₄⁺ (0,2 mM NH₄Cl) ou 0,5 mM NH₄⁺ (0,5 mM NH₄Cl) por 14 d. **B**, **C e D**: Biomassa seca (MS) (g) de plantas de genótipos selvagem ('Col-0'), mutante (*qko*) e linhas transgênicas em diferentes fontes de N, **B**: 0,5 mM de NO₃⁻ (0,5 mM KNO₃); **C**: 0,2 mM NH₄⁺ (0,2 mM NH₄Cl); **D**: 0,5 mM NH₄⁺ (0,5 mM NH₄Cl). (n=10). Para as análises estatísticas, construções inseridas no background 'Col-0' foram comparadas com o controle 'Col-0' e construções inseridas no background *qko* foram comparadas com o controle *qko*. Diferenças significativas são indicadas por asteriscos (*P < 0,05 e **P < 0,001, teste-t de Student).

Para verificar a regulação de genes AMT1s de cana-de-açúcar por fontes inorgânicas de N, plantas de 'Col-0' e do mutante qko foram transformadas com ScAMT1.1 ou ScAMT1.3 e seus respectivos promotores endógenos. Sob nutrição por nitrato (0,5 mM KNO₃), todos os genótipos e plantas transgênicas avaliadas apresentaram similar produção de biomassa (Figuras 25A e B), sugerindo que a expressão de AMT1s de cana-de-acúcar não altera a capacidade de aquisição de nitrato. Já em nutrição por amônio, a expressão de ScAMT1.1 ou ScAMT1.3 e seus respectivos promotores endógenos no background de 'Col-0' não levou ao maior acúmulo de biomassa em relação a 'Col-0', indicando que, genes AMT1s de cana-deaçúcar não atuam de forma aditiva aos genes endógenos AMT1s de arabidopsis durante a aquisição de amônio. Em tomateiro, análise dos transportadores SIAMT1.1 e SIAMT1.2 expressos em oócitos demonstraram a formação de homo e heteroligômeros entre esses transportadores (LUDEWIG et al., 2003). Essa capacidade de formação de heteroligômeros também foi demonstrada para os transportadores AtAMT1.1 e AtAMT1.3 em plantas de arabidopsis (YUAN et al., 2013). No entanto, em cana-de-açúcar, se existe a formação de heteroligômeros entre os transportadores ScAMT1.1 e ScAMT1.3 com os AMTs endógenos de 'Col-0', as alterações nas propriedades bioquímicas de transporte de amônio não levaram a maior aquisição de amônio, uma vez que plantas 'Col-0'+ProScAMT1.1:ScAMT1.1 ou 'Col-0'+ProScAMT1.3:ScAMT1.3 não acumulam mais biomassa que plantas de 'Col-0'.

Quando plantas de qko complementadas com ScAMT1.1 ou ScAMT1.3 e seus respectivos promotores endógenos foram cultivados sob concentrações crescentes de amônio exógeno, diferenças fenotípicas foram observadas (Figura 25). Plantas ProScAMT1.1:ScAMT1.1 e ProScAMT1.3:ScAMT1.3 no background de qko não apresentaram diferenças no acúmulo de biomassa quando comparado a qko em 0.2 mM de amônio (Figura 25A e C). Porém, com o aumento da concentração exógena para 0.5 mM de amônio, plantas de qko complementadas com ProScAMT1.3:ScAMT1.3 tiveram cerca de 54% mais produção de biomassa em relação a qko (Figura 25A e D), o que indica a capacidade de ScAMT1.3 de restaurar o transporte de amônio nas raízes dessas plantas. Já plantas de qko complementadas com ProScAMT1.1:ScAMT1.1 não apresentaram maior acúmulo de biomassa quando cultivas sob 0,5 mM de amônio, o que pode sugerir que: i) a expressão de ScAMT1.1 sob regulação do promotor endógeno não é capaz de restaurar a capacidade de absorção de amônio no background de qko, ou ii) amônio per se exerce um efeito regulatório em ScAMT1.1, diminuindo a atividade dessa proteína de membrana na presença de amônio.

Em arabidopsis, a presença de amônio desencadeia uma fosforilação na Treonina-460 presente no C-terminal da proteína AtAMT1.1, o que acarreta o fechamento do complexo proteico e inibe a entrada excessiva desse nutriente prevenindo a toxidez (YUAN et al., 2007), no entanto, os níveis de transcritos para esse gene ainda permanecem altos sob essas condições (YUAN et al., 2007). Apesar da presença de T-460 no C-terminal da proteína AtAMT1.3, essa regulação pós-transcricional não ocorre para essa proteína, sugerindo que ou esse transportador não é fosforilado in vivo ou as condições que desencadeiam a fosforilação não foram identificadas ainda (YUAN et al., 2013). Em raízes de cana-de-açúcar, uma regulação pós-transcricional dos AMTs similar ao descrito em arabidopsis foi encontrada pelo nosso grupo (VITTI, 2012), após a ressuplementação de amônio o influxo de ¹⁵N-amônio diminuiu 30% até 24 h após a adição de amônio, enquanto os níveis de transcritos para ScAMT1.1 e ScAMT1.3 permaneceram altos (VITTI, 2012). Baseados nos fenótipos encontrados nos experimentos in vitro realizados em plantas de qko complementadas com ProScAMT1.1:ScAMT1.1 e ProScAMT1.3:ScAMT1.3 é possível inferir que essa regulação pós-transcricional em cana-de-açúcar é exclusiva de ScAMT1.1 e não ocorre em ScAMT1.3. Portanto, uma inibição na absorção de amônio em plantas de qko complementadas com ProScAMT1.1:ScAMT1.1 pode estar ocorrendo devido a fosforilação de T-460 e a restauração da capacidade de transporte em plantas qko+ProScAMT1.3:ScAMT1.3 sugere que essa regulação não ocorre para essa proteína.





Figura 25 – Acúmulo de biomassa de plantas selvagens ('Col-0'), mutantes (*qko*) e linhas transgênicas para as construções *ProScAMT1.1:ScAMT1.1* e *ProScAMT1.3:ScAMT1.3* em nitrato e amônio. **A**: Crescimento de plantas de 'Col-0', *qko* e linhas transgênicas em meio MS modificado contendo 0,5 mM de NO₃⁻ (0,5 mM KNO₃), 0,2 mM NH₄⁺ (0,2 mM NH₄Cl) ou 0,5 mM NH₄⁺ (0,5 mM NH₄Cl) por 14 d. **B**, **C e D**: Biomassa seca (MS) (g) de plantas de genótipos selvagem ('Col-0'), mutante (*qko*) e linhas transgênicas em diferentes fontes de N, **B**: 0,5 mM de NO₃⁻ (0,5 mM KNO₃); **C**: 0,2 mM NH₄⁺ (0,2 mM NH₄⁺ (0,2 mM NH₄Cl)) mutante (*qko*) e linhas transgênicas em diferentes fontes de N, **B**: 0,5 mM de NO₃⁻ (0,5 mM KNO₃); **C**: 0,2 mM NH₄⁺ (0,2 mM NH₄Cl); **D**: 0,5 mM NH₄⁺ (0,5 mM NH₄Cl). (n=10). Para as análises estatísticas, construções inseridas no background 'Col-0' foram comparadas com o controle 'Col-0' e construções inseridas no background *qko* foram comparadas com o controle 'Col-0' e as as esteriscos (*P < 0,05 e **P < 0,001, teste-t de Student).

4.5.2 In vivo

Para a caracterização fenotípica *in vivo* das plantas transgênicas de arabidopsis, foram realizados experimentos de influxo rápido de ¹⁵N-amônio (LOQUÉ et al., 2006). Plantas de arabidopsis dos genótipos selvagem ('Col-0'), mutante (*qko*) e as distintas linhas transgênicas *qko*+35S:*ScAMT1.1*, *qko*+35S:*ScAMT1.3*, *qko*+Pro*ScAMT1.1*:*ScAMT1.1* e *qko*+Pro*ScAMT1.3*:*ScAMT1.3* foram cultivadas por 45 d em solução nutritiva contendo 1 mM NH₄NO₃ e em seguida foram transferidas para soluções contrastantes de disponibilidade de N, +N (1 mM NH₄NO₃) ou –N (sem adição de N) por 3 d. Após esse período, foram realizadas as análises de influxo rápido de amônio na faixa de alta afinidade (HATS) com 0,2 mM ¹⁵N-amônio.

Em condição de suficiência de N, plantas mutantes (*qko*) apresentaram um influxo de 15 N-amônio em raízes 10% menor do que plantas de 'Col-0' (Figura 26A), já em deficiência de N, o influxo em raízes de *qko* foi 30% menor em relação à 'Col-0', indicando a menor capacidade de transporte de amônio em raízes do quádruplo mutante na faixa de concentração de alta afinidade desse nutriente (0,2 mM) em relação ao genótipo selvagem (Figura 26B). Apesar disso, plantas de *qko* cultivadas em deficiência de N tiveram um influxo de amônio 56% maior do que plantas de *qko* em suficiência de N (Figura 26A e B), o que indica que ainda existe uma indução no sistema de absorção dependente de N em *qko*, a qual é conferida pelo transportador AtAMT1.5 (YUAN et al., 2007).

Plantas de *qko* superexpressando o gene *ScAMT1.1* de cana-de-açúcar quando cultivadas em suficiência de N, apresentaram um influxo de ¹⁵N-amônio 30% maior do que o genótipo mutante *qko* (Figura 26A). Sob condição de restrição de N, a capacidade de absorção de ¹⁵N em raízes de plantas *qko*+35S:*ScAMT1.1* aumenta consideravelmente em relação à *qko*, e representa 65% da absorção encontrada no mutante (Figura 26B). Em raízes de plantas de *qko* superexpressando *ScAMT1.3*, o influxo de ¹⁵N foi menor do que o encontrado nas plantas *qko*+35S:*ScAMT1.1* em ambas as condições de N avaliadas (Figura 26), ou seja, em suficiência de N, a absorção de ¹⁵N-amônio em plantas *qko*+35S:*ScAMT1.3* foi apenas 7% maior em relação a *qko* (Figura 26A), enquanto em raízes de plantas transgênicas deficientes de N, o influxo foi 30% maior (Figura 26B). Esses resultados indicam que plantas de arabidopsis *qko*+35S:*ScAMT1.1* e *qko*+35S:*ScAMT1.3* submetidas a deficiência de N são capazes de induzir o sistema de transporte de alta afinidade a amônio e portanto, os genes

ScAMT1.1 e ScAMT1.3 restauram a capacidade de transporte/absorção de amônio no background do mutante *qko* de arabidopsis.

O menor influxo de ¹⁵N-amônio encontrado em plantas superexpressando ScAMT1.3 em relação às plantas superexpressando ScAMT1.1, pode indicar uma menor capacidade de transporte de amônio para o transportador ScAMT1.3 em relação à ScAMT1.1, demonstrando novamente diferenças nas propriedades bioquímicas dessas proteínas de membrana. Outra alternativa a maior absorção de ¹⁵N-amônio nas raízes de plantas qko+35S:ScAMT1.1 e qko+35S:ScAMT1.3 poderia ser devido a maior expressão e consequente acúmulo de transcritos dos respectivos genes em linhas distintas de plantas transgênicas. Evidências suportando essa hipótese são indicadas pelos experimentos de análise quantitativa de transcritos reversos realizados nas plantas transgênicas *qko*+35S:*ScAMT1.1* e qko+35S:ScAMT1.3 (Figura 21). Nesse caso, o acúmulo de transcritos de ScAMT1.1 em plantas *qko*+35S:*ScAMT1.1* do evento F2 foi 12 x maior do que seu ortólogo em arabidopsis (Figura 21A), enquanto ScAMT1.3 foi 55 x mais expresso nas plantas qko+35S:ScAMT1.3 do evento E3 do que AtAMT1.3 de arabidopsis (Figura 21C). Além disso, quando a expressão de ScAMT1.3 no evento E3 foi comparado ao nível de expressão de AtAMT1.1, o acúmulo de transcritos foi similar ao encontrado para ScAMT1.1 (dados não mostrados). Considerando que o nível de expressão pode indicar uma maior quantidade de proteínas transportadoras de amônio, o acúmulo similar de transcritos entre os AMT1s de cana-de-açúcar nas linhas transgênicas não reflete no influxo similar de amônio entre essas proteínas, pelo contrário, em condição de suficiência de N, plantas qko+35S:ScAMT1.1 possuem influxo de ¹⁵N-amônio 25% maior que plantas qko+35S:ScAMT1.3 enquanto em deficiência de N, o influxo é 50% maior (Figura 26). Isso demonstra, portanto, que as diferenças no influxo de ¹⁵N-amônio entre *qko*+35S:ScAMT1.1 e *qko*+35S:ScAMT1.3 não ocorrem devido a expressão por transgenia, mas refletem diferenças na propriedade de transporte de amônio entre ScAMT1.1 e ScAMT1.3

Portanto, as análises de influxo de ¹⁵N-amônio em raízes de plantas de arabidopsis transgênicas superexpressando os genes AMT1s de cana-de-açúcar demonstraram que: i) os transportadores de amônio de cana-de-açúcar, ScAMT1.1 e ScAMT1.3 são funcionais em raízes de arabidopsis, ii) um sistema de transporte de alta afinidade (HATS) à amônio está ativo nas raízes das plantas transgênicas de arabidopsis o qual é modulado em resposta ao status de N da planta e ii) os transportadores ScAMT1.1 e ScAMT1.3 de cana-de-açúcar possuem distintas capacidades de transporte.



Figura 26 - Influxo de ¹⁵N-amônio em raízes de plantas de arabidopsis selvagens ('Col-0'), mutantes (*qko*) e linhas transgênicas para as construções 35:*ScAMT1.1* e 35S:*ScAMT1.3*. O influxo de ¹⁵N foi realizado com 0,2 mM de ¹⁵(NH₄)₂SO₄ em raízes de plantas submetidas a condições contrastantes de disponibilidade de N por 3 d. A: suficiência de N (+N); B: deficiência de N (-N). Barras indicam ±SE (n= 6). Diferenças significativas em relação ao controle *qko* são indicadas por asteriscos (*P < 0,05 e **P < 0,001, teste-t de Student).</p>

Para melhor caracterização da capacidade de transporte de amônio das proteínas ScAMT1.1 e ScAMT1.3, o influxo de ¹⁵N-amônio foi analisado em raízes de plantas transformadas com os AMT1s de cana-de-açúcar e seus respectivos promotores endógenos. Para cada gene AMT1 de cana-de-açúcar dois eventos independentes de transformação no background *qko* foram avaliados (Figura 27).

Quando o gene ScAMT1.1 e seu promotor endógeno foi expresso no background qko, diferenças foram encontradas entre os dois eventos de transformação (G3 e G4) avaliados (Figura 27). Em ambas as condições de disponibilidade de N, plantas transgênicas *qko*+ProScAMT1.1:ScAMT1.1# G3 apresentaram influxo de ¹⁵N-amônio menor do que *qko*: 10% menor em suficiência de N e 34% menor em deficiência de N (Figura 27A e B). Por outro lado, o influxo de ¹⁵N-amônio em plantas da linha G4 não diferiu significativamente do mutante em ambas as condições de disponibilidade de N avaliadas (Figura 27). Apesar disso, a restrição de N foi capaz de induzir em 26% a absorção de amônio nas raízes das plantas *qko*+Pro*ScAMT1.1:ScAMT1.1#* G3 em relação as plantas cultivadas na presença de N (+N) (Figura 27). O fato de que as linhas qko+ProScAMT1.1:ScAMT1.1 apresentaram níveis similares ou menores de aquisição de amônio a plantas do mutante qko podem indicar que nitrato está exercendo uma regulação negativa na expressão de ScAMT1.1 ou que a construção ProScAMT1.1:ScAMT1.1 não foi capaz de restaurar a aquisição de amônio na presença de N. Considerando que após 3 d de deficiência de N também não houve maior influxo de ¹⁵Namônio em plantas qko+ProScAMT1.1:ScAMT1.1 quando comparado a qko, é possível inferir que não houve complementação da absorção de amônio em plantas de qko expressando ScAMT1.1 sob controle do promotor endógeno.

Resultados similares foram encontrados para o gene ScAMT1.3 e seu promotor endógeno, as duas linhas transgênicas avaliadas, H4 e H5, apresentaram uma diminuição no influxo de ¹⁵N em relação as plantas de *qko* (Figura 27). Em suficiência de N, plantas qko+ProScAMT1.3:ScAMT1.3# H4 e qko+ProScAMT1.3:ScAMT1.3# H5 tiveram o influxo reprimido em 10%, e sob deficiência de N, a repressão foi de 36% e 33% respectivamente quando comparado a qko (Figura 27). Assim como observado para ScAMT1.1 sob controle do seu promotor endógeno, a restrição de N por 3 d também foi capaz de induzir o influxo de amônio em raízes de plantas expressando o gene ScAMT1.3 e seu promotor endógeno (Figura 27B), o influxo de amônio nessa condição foi cerca de 20% maior em ambas as linhas transgênicas (H4 e H5) quando comparadas as plantas cultivadas em suficiência de N (Figura ¹⁵N-amônio 27B), no entanto. aumento no influxo de nas plantas esse

qko+Pro*ScAMT1.3:ScAMT1.3* não foi suficiente para restaurar a capacidade de absorção a níveis superiores ao observado em plantas de *qko* (Figura 27B).

Portanto, é possível inferir que o aumento de influxo de ¹⁵N-amônio em plantas transgênicas qko+ProScAMT1.1:ScAMT1.1 e qko+ProScAMT1.3:ScAMT1.3 em condição de deficiência de N ocorreu devido a presença do transportador AtAMT1.5 endógeno de arabidopsis e não devido a inserção dos genes ScAMT1.1 e ScAMT1.3 sob controle de seus respectivos promotores endógenos. No entanto, a indução no sistema de transporte de alta afinidade a amônio em raízes de plantas transgênicas sob condição de deficiência de N quando comparado a plantas sob suficiência de N, foi menor do que o encontrado em plantas de qko, ou seja, plantas de qko apresentaram indução de 56% no influxo de ¹⁵N-amônio, enquanto plantas transgênicas *qko*+Pro*ScAMT1.1:ScAMT1.1* as *qko*+Pro*ScAMT1.3*:*ScAMT1.3* apresentaram indução de cerca de 26% e 20%, respectivamente (Figura 27), esses resultados sugerem que a presença dos genes ScAMT1.1 e ScAMT1.3 e seus respectivos promotores endógenos no background qko resultam em uma menor absorção de amônio. A ocorrência de homo e heteroligômeros entre transportadores de amônio já foi descrita para os AMT1 de tomateiro e arabidopsis (LUDEWIG et al., 2003; YUAN et al., 2013), portanto é possível que a formação de oligômeros entre os transportadores AtAMT1.5 de arabidopsis e ScAMT1.1 e ScAMT1.3 de cana-de-açúcar poderiam ser responsáveis pela menor capacidade de transporte de amônio observada nas plantas transgênicas *qko*+ProScAMT1.1:ScAMT1.1 e *qko*+ProScAMT1.3:ScAMT1.3, uma vez que possivelmente os transportadores AMT1 de cana-de-açúcar possuem propriedades bioquímicas distintas do transportador AtAMT1.5, o que poderia modificar a afinidade ao substrato e/ou a capacidade de transporte de amônio nas raízes dessas plantas.

Além disso, análises de expressão gênica de *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* indicam que a expressão desses genes aumenta após 5 ou 10 d de deficiência de N (Figura 21). Portanto, é possível que análises de influxo de ¹⁵N em raízes de plantas submetidas à deficiência de N por um período maior de tempo sejam necessárias para que ocorra a indução dos genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* de cana-de-açúcar no mutante *qko* de arabidopsis. Isso demonstra que apesar de genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* serem induzidos em raízes de arabidopsis, essa regulação é menor comparado aos genes nativos *AtAMT1*, o que sugere a existência de regulação temporal e quantitativa diferenciada da sinalização de de-repressão de AMT1 entre dicotiledôneas e monocotiledôneas sob deficiência de N. Ainda permanece desconhecida a sinalização que controla a de-repressão de genes *AMT1* durante a restrição de N em plantas, porém a análise

específica de comparação da região promotora de genes *AMT1* em arabidopsis e cana-deaçúcar pode ajudar a identificar possíveis domínios-cis regulatórios envolvidos nessa resposta.

Em resumo, a expressão de *ScAMT1.1* ou ScAMT1.3 sob controle de seus respectivos promotores endógenos no background do mutante *qko* não restauram a absorção de amônio a níveis similares aos observados em raízes de plantas superexpressando *ScAMT1.1* ou *ScAMT1.3*, o que demonstra que a regulação do promotor endógeno dos *AMT1s* de cana-de-açúcar difere dos genes nativos de arabidopsis. Apesar disso, a expressão ectópica de *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* em *qko* demonstra a funcionalidade dos transportadores de amônio da família AMT1 realizando a absorção de amônio em raízes, indicando uma função conservada dessas proteínas quando comparada a outras espécies.



Figura 27 - Influxo de ¹⁵N-amônio em raízes de plantas de arabidopsis selvagens ('Col-0'), mutantes (*qko*) e linhas transgênicas para as construções Pro*ScAMT1.1:ScAMT1.1* e Pro*ScAMT1.3:ScAMT1.3*. O influxo de ¹⁵N foi realizado com 0,2 mM de ¹⁵(NH₄)₂SO₄ em raízes de plantas submetidas a condições contrastantes de disponibilidade de N por 3 d. A: suficiência de N (+N); **B**: deficiência de N (-N). Barras indicam ±SE (n= 6). Diferenças significativas em relação ao controle *qko* são indicadas por asteriscos (*P < 0,05 e **P < 0,001, teste-t de Student).

5. CONCLUSÕES

✓ A seleção em biblioteca de BACs de cana-de-açúcar permitiu identificar
5 BACs contendo sequências gênicas para o transportador ScAMT1.1 e 3 BACs contendo sequências para ScAMT1.3.

✓ Análises de expressão gênica de *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* em raízes de cana-deaçúcar demonstraram que esses genes são regulados pelo status de N da planta sendo altamente expressos principalmente em raízes quando a disponibilidade exógena de N é limitante.

✓ A localização da expressão tecido/órgão específico de ScAMT1.1 e ScAMT1.3 de cana-de-açúcar utilizando os promotores desses genes fusionados aos genes repórteres GUS e GFP, permitiu identificar a expressão desses genes na região mais interna das raízes provavelmente correspondente à células da endoderme/periciclo e vascular, sendo esses genes regulados pela disponibilidade e fonte de N em diferentes órgãos/tecidos

✓ A caracterização funcional de plantas transgênicas de arabidopsis superexpressando ScAMT1.1 e ScAMT1.3 no background *qko* em ensaios bioquímicos utilizando concentrações crescentes de metilamônio (MeA) demonstram que ScAMT1.1 e ScAMT1.3 são funcionais no transporte de MeA.

 \checkmark A caracterização funcional de plantas de *qko* superexpressando *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* quando crescidas exclusivamente em amônio como fonte de N, demonstram que as plantas transgênicas tem um aumento significativo na produção de biomassa em relação a *qko*, indicando que esses transportadores são capazes de transportar amônio.

✓ Propriedades bioquímicas distintas de transporte entre ScAMT1.1 e ScAMT1.3 foram demonstradas devido a toxidez por amônio apresentada por plantas 'Col-0'+35S:ScAMT1.1, mas não por plantas 'Col-0'+35S:ScAMT1.3.

✓ Um mecanismo de regulação pós-transcricional pode estar atuando em ScAMT1.1 mas não em ScAMT1.3 considerando que a expressão de Pro*ScAMT1.1:ScAMT1.1* em plantas de *qko* crescidas exclusivamente em amônio não ocasiona o maior acúmulo de biomassa em relação a *qko*, enquanto a expressão de Pro*ScAMT1.3:ScAMT1.3* é capaz de restaurar a capacidade de absorção de amônio.

 \checkmark O influxo de ¹⁵N-amônio *in vivo* em raízes de plantas de arabidopsis mutantes (*qko*) superexpressando *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* demonstrou que um sistema de transporte de

alta afinidade (*HATS*) à amônio está ativo nas raízes das plantas transgênicas de arabidopsis o qual é modulado em resposta ao status de N da planta.

 \checkmark A regulação do promotor endógeno de *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* de cana-deaçúcar difere dos genes nativos de arabidopsis considerando que a expressão dos genes *AMT1s* de cana-de-açúcar sob controle de seus respectivos promotores endógenos não foi capaz de restaurar a capacidade de transporte de ¹⁵N-amônio em plantas de *qko* transgênicas na presença de N ou após 3 dias de deficiência de N.

REFERÊNCIAS

ALLEN, D. E.; KINGSTON, G.; RENNENBERG, H.; DALAL, R. C.; SCHMIDT, S. Effect of nitrogen fertilizer management and waterlogging on nitrous oxide emission from subtropical sugarcane soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 136, p. 209–217, 2010.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS - ANDA. Anuário Estatístico do Setor de Fertilizantes. São Paulo, 2014.

BALDANI, J.I., REIS, V. M., BALSANI, V. L. B., DÖBEREINER, J. Review: A brief story of nitrogen fixation in sugarcane — reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 29, p. 417-423, 2002.

BAO ZHEN, L., MERRICK, M., SU-MEI, L., HONG-YING, L., SHU-WEN, Z., WEI-MING, S., YAN-HUA, S. Molecular Basis and Regulation of Ammonium Transporter in Rice. **Rice Science**, Hangzhou, v. 16, n. 4, p. 314–322, 2009.

BIRNBOIM, H.C., DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research, Oxford, v. 24, p. 1513-1523, 1979.

CHAPMAN, L.S., HAYSOM, M., AND SAFFIGNA, P.G. The recovery of ¹⁵N from labelled urea fertilizer in crop components of sugarcane and in soil profiles. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 45, p. 1577-1585, 1994.

CHARDON, F., DANIEL-VEDELE, F., MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Natural variation of nitrate uptake and nitrogen use efficiency in *Arabidopsis thaliana* cultivated with limiting and ample nitrogen supply. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, p. 2293–2302, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Levantamento de safra. Disponível

http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_04_13_08_49_33_boletim_cana_p ortugues_-_10_lev_-_15-16.pdf. Acesso em: 2 abril 2015.

CURTIS, M. D., GROSSNIKLAUS, U. A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in plant. **Plant Physiology**, Rockville, v. 133, p. 462–469, 2003.

D'APUZZO, E., ROGATO, A., SIMON-ROSIN, U., EL ALAOURI, H., BARBULOVA, A., BETTI, M., DIMOU, M., KATINAKIS, P., MARQUEZ, A., MARINI, A., UDVARDI, M. K., CHIURAZZI, M. Characterization of three functional high-affinity ammonium transporters in *Lotus japonicus* with differential transcriptional regulation and spatial expression. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, p. 1763–1774, 2004.

DO CARMO, J.B., FILOSO, S., ZOTELLI, L.C., NETO, E. R. S., PITOMBO, L.M., DUARTE-NETO, P. J., VARGAS, V. P., ANDRADE, C. A., GAVA, G. J. C., ROSSETTO, R., CANTARELLA, H., NETO, A. E., MARTINELLE, L. A. Infield greenhouse gas emissions from sugarcane soils in Brazil: effects from synthetic and organic fertilizer application and crop trash accumulation. **GCB Bioenergy**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 267-280, 2012.

DUBOIS, E. GRENSON, E. Methylamine/ammonia uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae*: multiplicity and regulation. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 175, p. 67-76, 1979.

ERISMAN, J. W., SUTTON, M. A., GALLOWAY, J., KLIMONT, Z., WINIWARTER, W. How a century of ammonia synthesis changed the world. **Nature Geoscience**, London, v. 1, p. 636–639, 2008.

ERISMAN, J. W., VAN GRINSVEN, H., LEIP, A., MOSIER, A., BLEEKER, A. Nitrogen and biofuels; an overview of the current state of knowledge. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Netherlands, v. 86, p. 211–223, 2010.

FRANCO, H. C. J., OTTO, R., FARONI, C. E., VITTI, A. C., ALMEIDA DE OLIVEIRA, E. C., TRIVELIN, P. C. O. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 121, p. 29–41, 2011.

GAGNON, B., ZIADI, N., ROCHETTE, P., CHANTIGNY, M. H., ANGERS, D. A. Fertilizer source influenced nitrous oxide emissions from a clay soil under corn. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 75, p. 595–604, 2011.

GALLOWAY, J. N., DENTENER, F. J., CAPONE, D. G., BOYER, E. W., HOWARTH, R. W., SEITZINGER, S. P., ASNER, G. P., CLEVELAND, C. C., GREEN, P. A., HOLLAND, E. A., KARL, D. M., MICHAELS, A. F., PORTER, J. H., TOWNSEND, A. R., VÖOSMARTY, C. J. Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. **Biogeochemistry**, Amsterdam, v. 70, n. 2, p. 153-226, 2004.

GALLOWAY, J. N., TOWNSEND, A. R., ERISMAN, J. W., BEKUNDA, M., CAI, Z., FRENEY, J. R., MARTINELLI, L. A., SEITZINGER, S. P.; SUTTON, M. A. Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. **Science**, Washington, DC, v. 320, p. 889–892, 2008.

GARSMEUR, O., CHARRON, C., BOCS, S., JOUFFE, V., SAMAIN, S., COULOUX, A., DROC, G., ZINI, C., GLASZMANN, J. C., VAN SLUYS, M. A., HONT, A. High homologous gene conservation despite extreme autopolyploid redundancy in sugarcane. **New Phytologist**, London, v. 189, p. 629–642, 2010.

GASTAL, F., LEMAIRE, G. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 789-799, 2002.

GAUR, V. S., SINGH, U. S., GUPTA, A. K., KUMAR, A. Understanding the differential nitrogen sensing mechanism in Rice genotypes through expression analysis of high and low affinity ammonium transporter genes. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, p. 2233–2241, 2012.

GAVA, G. J. C. et al. Crescimento e acúmulo de nitrogênio em cana-de-açúcar cultivada em solo coberto com palha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 11, p. 1347-1354, 2001.

GAZZARRINI, S., LEJAY, L., GOJON, A., NINNEMANN, O., FROMMER, W. B., VON WIRÉN, N. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvationinduced uptake of ammonium into Arabidopsis roots. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 937-948, 1999.

GHALEY, B. B., HØGH-JENSEN, H., CHRISTIANSEN, J. L. Recovery of nitrogen fertilizer by traditional and improved rice cultivars in the Bhutan Highlands. **Plant Soil**, The Hague, v. 332, p. 233–246, 2010.

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 systems in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, 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**, Kidlington, v. 9, n. 12, p. 597–605, 2004.

GRAFF, L., OBRDLIK, P., YUAN, L., LOQUÉ, 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, Oxford, v. 62, n. 4, p. 1361-1373, 2010.

GU, R., DUAN, F., AN, X., ZHANG, F., VON WIRÉN, N., YUAN, L. Characterization of AMT-Mediated High-Affinity Ammonium Uptake in Roots of Maize (*Zea mays* L.). **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 54, n. 9, p.1515–1524, 2013.

HIREL, B. et al. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 9, p. 2369–2387, 2007.

HOAGLAND, D. R., ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley, CA: University of California. **Agriculture Experimental Station**, (Circular 347), 1950.

HOLST, J., BRACKIN, R., ROBINSON, N., LAKSHMANAN, P., SCHMIDT, S. Soluble inorganic and organic nitrogen in two Australian soils under sugarcane cultivation. Agriculture, Ecosystems and Environment, Amsterdam, v.155, p. 16–26, 2012.

JONES, D. L., HEALEY, J. R., WILLETT, V.B., FARRAR, J. F., HODGE, A. Dissolved organic nitrogen uptake by plants—an important N uptake pathway? **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37: p. 413–423, 2005.

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**, Rockville, v. 130, p. 1263-1275, 2002.

KOEGEL, S., LAHMIDI, N. A., ARNOULD, C., CHATAGNIER, O., WALDER, F., INEICHEN, K., BOLLER, T., WIPF, D., WIEMKEN, A., COURTY, P. E. The family of ammonium transporters (AMT) in Sorghum bicolor: two AMT members are induced locally, but not systemically in roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, London, v. 198, n. 3, p.853-865, 2013.

KRAISER, T. A, GRAS, D. E., GUTIERREZ, A. G., GONZALEZ, B., GUTIERREZ, R. A. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 1455–1466, 2011.

KUMAR, A., SILIM, S. N., OKAMOTO, M., SIDDIQI, M. Y., GLASS, A. D. M. Differential expression of three members of the *AMT1* gene family encoding putative high-affinity NH4+ transporters in roots of *Oryza sativa* subspecies *indica*. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 26, p. 907–914, 2003.

LANQUAR, V., LOQUÉ, D., HORMANN, F., YUAN, L., BOHNER, A., ENGELSBERGER, W. R., LALONDE, S., SCHULZE, W. X., VON WIRÉN, N., FROMMER, W. B. Feedback Inhibition of Ammonium Uptake by a Phospho-Dependent Allosteric Mechanism in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, p. 3610–3622, 2009.

LEA, P., AZEVEDO, R. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. Annals of Applied Biology, Cambridge, v. 149, p. 243-247, 2006.

LEAL, J. R. G. A, ALBUQUERQUE, P. S. B., FIGUEIRA, A. Genes differentially expressed in *Theobroma cacao* associated with resistance to witches' broom disease caused by *Crinipellis perniciosa*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 8, p. 279-292, 2007.

LIMA, J. E.; KOJIMA, S.; HIDEKI, T.; VON WIRÉN, N. Ammonium Triggers Lateral Root Branching in Arabidopsis in an ammonium transporter 1;3-dependent manner. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 3621-33, 2010.

LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta CT$ Method. **Methods**, San Diego, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOQUÉ, D., YUAN, L., KOJIMA, S., GOJON, A., WIRTH, J., GAZZARRINI, S., ISHIYAMA, K., TAKAHASHI, H., VON WIRÉN, N. Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogendeficient Arabidopsis roots. **Plant Journal**, Oxford, v. 48, p. 522-534, 2006.

LOQUÉ, D., VON WIRÉN, N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 1293-1305, 2004.

LOQUÉ, D., LALONDE, S., LOOGER, L. L., VON WIRÉN, N., FROMMER, W. B. A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. **Nature**, London, v. 446, p. 195-198, 2007.

LUDEWIG, U., VON WIRÉN, N., FROMMER, W. B. Uniport of NH4+ by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. **The Journal of Biological Chemistry**, San Francisco, v. 277, p. 13548-55, 2002.

MCDONALD, T. R., DIETRICH, F. S., LUTZONI, F. Multiple Horizontal Gene Transfers of Ammonium Transporters/Ammonia Permeases from Prokaryotes to Eukaryotes: Toward a New Functional and Evolutionary Classification. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 29, p. 51–60, 2011.

MARINI, A. M., SOUSSI-BOUDEKOU, S., VISSERS, S., ANDRE, B. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, D.C, v. 17, p. 4282-4293, 1997.

MARINI, A. M., VISSERS, S., URRESTARAZU, A., ANDRE, B. Cloning and expression of the *MEP1* gene encoding an ammonium transporter in Saccharomyces cerevisiae. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 13, p. 3456-3463, 2003.

MARINI, A. M., ANDRÉ, B. In vivo N-glycosylation of the mep2 high-affinity ammonium transporter of *Saccharomyces cerevisiae* reveals an extracytosolic N-terminus. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 38, p. 552–564, 2000.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. New York: Academic Press, 1986. 674p.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants, 2nd ed, Academic Press, 889p. New York, NY, USA, 1995.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C., DANIEL-VEDELE, F., DECHORGNAT, J. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany**, Oxford, v. 105, n. 7, p. 1141–1157, 2010.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C., CHARDON, F. Exploring nitrogen remobilization for seed filling using natural variation in Arabidopsis thaliana. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 2131–2142, 2011.

MENDES, L. C. Eficiência nutricional de cultivares de cana-de-açúcar. 2006. Dissertação (*Magister Scientiae*) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MILLER, A. J., FAN, X., ORSEL, M., SMITH, S. J., WELLS, D. M. Nitrate transport and signalling. Journal of Experimental Botany, Oxford, v. 58, p. 2297–2306, 2007.

MULVANEY, R. L., KHAN, S. A., ELLSWORTH, T. R. Synthetic nitrogen fertilizers deplete soil nitrogen: a global dilemma for sustainable cereal production. Journal of Environmental Quality, Madison, v. 38, p. 2295-2314, 2009.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NARUSAKA, M., SHIRAISHI, T., IWABUCHI, M., NARUSAKA, Y. The floral inoculating protocol: a simplified Arabidopsis thaliana transformation method modified from floral dipping. **Plant Biotechnology**, Oxford, v. 27, p. 349–351, 2010.

NASS, L. L., PEREIRA, P. A. A., ELLIS, D. Biofuels in Brazil: An Overview. Crop Science, Madison, v. 47, n. 6, p. 2228-2237, 2007.

NÄSHOLM, T., KIELLAND, K., GANETEG, U. Uptake of organic nitrogen by plants. **New Phytology**, London, v. 182, p. 31–48, 2009.

NINNEMANN, O., JAUNIAUX, J. C., FROMMER, W. B. Identification of a high affinity NH4+ transporter from plants. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 13, p. 3464-3471, 1994.

OLIVEIRA, F.A., BERNARDI, A. C. C., BITTENCOURT, V. V., CARMELLO, Q. A. C. Adubação de soqueira de cana-de-açúcar com soluções de carbonato/bicarbonato de amônio em mistura com sais de potássio e de fósforo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, p. 1027–1033, 1999.

OLIVEIRA, M. W. et al. Nutrição mineral e adubação da cana-de-açúcar. **Informe** Agropecuário, Belo Horizonte, v. 28, p. 30-43, 2007.

RAWAT, S. R., SILIM, S. N., KRONZUCKER, H. J., SIDDIQI, Y., GLASS, A. D. M. AtAMT1 gene expression and NH4+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. **The Plant Journal**, Oxford, v. 19, p.143-152, 1999.

REMANS, T., NACRY, P., PERVENT, M., FILLEUR, S., DIATLOFF, E., MOUNIER, E., TILLARD, P., FORD, B.G., GOJON, A. The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 103, p. 19206-1921, 2006.

ROCKSTRÖM, J. et al. A safe operating space for humanity. Nature, London, v. 461, p. 472-475, 2009.

ROBINSON, N., BRACKIN, R., VINALL, K., SOPER, F., HOLST, J., GAMAGE, H., PAUNGFOO-LONHIENNE, C., RENNENBERG, H., LAKSHMANAN, P., SCHMIDT, S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, e19045, 2011.

ROBINSON, N., FLETCHER., A., WHAN, A., CRITCHLEY, C., VON WIRÉN, N., LAKSHAMANAN, P., SCHMIDT, S. Sugarcane genotypes differ in internal nitrogen use efficiency. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 34: p. 1122-1129, 2007.

RUTHERFORD, K., PARKHILL, J., CROOK, J., HORSNELL, T., RICE, P., RAJANDREAM, M.A., BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, Oxford, v. 16, n. 10, p. 944-945, 2000.

SAIKI, S., SONODA, Y., IKEDA, A., YAMAYA, T. AND YAMAGUCHI, J. Functional analysis of rice ammonium transporter gene *OsAMT1;3*. **The Plant Cell Physiology**. Oxford, v.43 (suppl.) n. 127, p, 726-734, 2002.

SALVEMINI, F., MARINI, A. M., RICCIO, A., PATRIARCA, E. J., CHIURAZZI, M. Functional characterization of an ammonium transporter gene from *Lotus japonicus*. Gene, Amsterdam, v. 270, p. 237-243, 2001.

SILVEIRA, J. A. G.; CRÓCOMO, O. J. Assimilação de nitrogênio em cana-de açúcar cultivada em presença de elevado nível de n e de vinhaça no solo. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 2, n. 2, p. 7–15, 1990.

SIMONETE, M. A.; KIEHL, J. D. C.; ANDRADE, C. A. Efeito do lodo de esgoto em um Argissolo e no crescimento e nutrição de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n. 10, p. 1187–1195, 2003.

SIMON-ROSIN, U., WOOD, C., UDVARDI, M. K. Molecular and cellular characterisation of LjAMT2;1, an ammonium transporter from the model legume *Lotus japonicus*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 51: p. 99–108, 2003.

SOHLENKAMP, C., WOOD, C. C., ROEB, G. W., UDVARDI, M. K. Characterization of Arabidopsis AtAMT2, a high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane. **Plant Physiology**, Rockville, v.130, p.1788–1796, 2002.

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**, Oxford, v. 44, p. 726-734, 2003.

STITT, M., MÜLLER, C., MATT, P., GIBON, Y., CARILLO, P., MORCUENDE, R., SCHEIBLE, W. R., KRAPP, A. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 959-970, 2002.

SUENAGA, A., MORIYA, K., SONODA, Y., IKEDA, A., VON WIRÉN, N., HAYAKAWA, T., YAMAGUCHI, J., YAMAYA, T. Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter OsAMT2 in rice plants. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 44, p. 206-211, 2003.

THOMAS, G. H., MULLINS, J. G. L., MERRICK, M. Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 37, p. 331–344, 2000.

TILMAN, D. Global environmental impacts of agricultural expansion: the need for sustainable and efficient practices. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 96, p. 5995–6000, 1999

TOMKINS, J. P., YU, Y., MILLER-SMITH, H., FRISCH, D. A., WOO, S. S., WING, R. A. A bacterial artificial chromosome library for sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, p. 419–424, 1999.

TRIVELIN, P. C. O., OLIVEIRA, M. W. Perdas do nitrogênio da uréia no sistema solo-planta em dois ciclos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 2, p. 193–201, 2002.

VAN DER MERWE, M., GROENEWALD, J. H., STITT, M., KOSSMANN, J., BOTHA, F. Downregulation of pyrophosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase activity in sugarcane culms enhances sucrose accumulation due to elevated hexose-phosphate levels. **Planta**, Berlin, v. 231, p. 595–608, 2010.

VITTI, M. Caracterização dos transportadores de amônio em cana-de-açúcar (Saccharum spp.). 2012. 90 f. Monografia – Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

VON WIRÉN, N., BERGFELD, A., NINNEMANN, O. AND FROMMER, W. B. OsAMT1-1: a high-affinity ammonium transporter from rice (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare). **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 3, p. 681, 1997.

VON WIRÉN, N., LAUTER, F.R., NINNEMANN, O., GILLISSEN, B., WALCH-LIU, P., ENGELS, C., JOST, W., FROMMER, W. B. Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. **Plant Journal**, Oxford, v. 21, p.167-175, 2000.

YUAN, L., GRAFF, L., LOQUE, D., KOJIMA, S., TSUCHIYA, Y.N., TAKAHASHI, H., VON WIRÉN, N. AtAMT1;4, a pollen-specific high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane in arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 50, p. 13–25, 2009.

YUAN, L., LOQUÉ, D., KOJIMA, S., RAUCH, S., ISHIYAMA, K., INOUE, E., TAKAHASHI, H., VON WIRÉN, N. The organization of high-affinity ammonium uptake in Arabidopsis roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 2636-2652, 2007.

YUAN, L., GU, R., XUAN, Y., SMITH-VALLE, E., LOQUÉ, D., FROMMER, W. B., VON WIRÉN, N. Allosteric regulation of transport activity by heterotrimerization of arabidopsis ammonium transporter complexes in vivo. **The Plant Cell**, Rockville, v. 25, n. 3, p. 974-984, 2013.

WACLAWOVSKY, A. J., SATO, P. M., LEMBKE, C. G., MOORE, P. H., SOUZA, G. M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 263-276, 2010.

WANG, J., ROE, B., MACMIL, S., YU, Q., MURRAY, J.E., TANG, H., CHEN, C., NAJAR, F., WILEY, G., BOWERS, J., VAN SLUYS, M. A., ROKHSAR, D. S., HUDSON, M. E., MOOSE, S. P., PATERSON, A. H., MING, R. Microcollinearity between autopolyploid sugarcane and diploid sorghum genomes. **BMC Genomics**, London, v. 11, n. 261, 2010.

WANG, J., NAYAK, S., KOCH, K., MING, R. Carbon partitioning in sugarcane (*Saccharum* species). Frontiers in Plant Science, Lausanne, v. 4, p. 1-6, 2013.

WITTGENSTEIN, VON, N. J. J. B., Le, C. H., HAWKINS, B. J., EHLTING, J. Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 14, n.11, 2014.