## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

### ALESSANDRA KOLTUN

Identificação e caracterização funcional de genes da subfamília Ammonium Transporter 2 (AMT2) de cana-de-açúcar (Saccharum spp.)

> Piracicaba 2016

### ALESSANDRA KOLTUN

Identificação e caracterização funcional de genes da subfamília Ammonium Transporter 2 (AMT2) de 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 2016 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

Koltun, Alessandra

Identificação e caracterização funcional de genes da subfamília *Ammonium Transporter 2* (*AMT2*) de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) / Alessandra Koltun; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Piracicaba, 2016.

146 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. Biologia molecular 3. Expressão gênica 4. Fertilizantes nitrogenados
Genética molecular 6. Impactos ambientais 7. Nitrogênio 8. Sequenciamento genético 9. Translocação vegetal I. Título

CDU 579.258 : 631.84

Aos meus pais Soleni e Jorge, dedico este trabalho, por amor e gratidão.

#### AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Soleni e Jorge, por não medirem esforços para que eu chegasse até aqui, pela confiança e pelo amor que me dedicam. Aos meus irmãos, Fernando e Rafael, por todo o apoio e amizade. Espero um dia ser capaz de retribuir tudo o que vocês me proporcionaram.

Ao Professor Dr. Antonio Figueira pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa, por ter me oferecido todo o suporte para a realização desse trabalho e pelos valiosos ensinamentos.

Ao Professor Dr. Joni Esrom Lima pela orientação durante todo o processo de criação e desenvolvimento dessa pesquisa e pelos ensinamentos inestimáveis, que tanto contribuíram para a minha formação profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

À 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, auxiliando na anotação dos genes.

Aos Professores Dr. José Albertino Bendassolli e Paulo Cesar Ocheuze Trivelin por estarem sempre à disposição e por todo o suporte na realização de análises de <sup>15</sup>N.

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

Aos técnicos do Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP: Felippe Campana, Inês Possignolo, Paulo Cassieri, Raquel Orsi e Wlamir Godoy pela atenção e ajuda dada. Sem o trabalho, organização e dedicação de vocês, não seria possível a realização dos experimentos. Ressalvo o carinho especial pelo "Professor Wlamir" que tanto perturbou quanto alegrou meus dias.

Aos companheiros do Laboratório de Melhoramento de Plantas: Aline Pedroso, Aline Peruchi, Bruna Brogio, Bruna Factor, Eduardo Bressan, Flávia Bento, Gabriela Juliano, Karina Brandão, Lucas Anjos, Mônica Marchesin, Natalia Coutouné, Roberto Camargo, Sean Valente e Thaísa Pinheiro por toda ajuda e ótima convivência. De maneira especial queria agradecer: Andrezinho, Bard, Ferfer, Lú, Jamilinda, Jú Leles, Lay, Mari Temer, Mel e Rodolfo Pós-doc por todo a apoio, ajuda, ensinamentos e amizade. Eu tenho muito orgulho de ter trabalhado com esse grupo tão qualificado e competente. Vocês todos têm meu respeito, minha admiração, meu carinho e minha gratidão. À Danielle Scotton por todo carinho e suporte que me proporcionou. Sempre tão solícita e tão amável. Seu bom humor, sua bondade e sua amizade foram cruciais durante toda essa caminhada. O fato é que não tenho palavras para te agradecer o suficiente.

À Gabriela Machineski que me aconselha, me ajuda e me apoia desde os tempos de graduação. Obrigada minha amiga!

À Ives Koltun, por ter sido minha companheira fiel durante toda a minha jornada.

A todos os meus amigos que de uma forma ou de outra me apoiaram e incentivaram, além de fazerem meus dias mais felizes.

Ao meu namorado, Felipe Spagnuolo, por todo amor, companheirismo, carinho, atenção, compreensão, paciência e suporte. Eu te amo!

A todos que participaram direta ou indiretamente dessa conquista, expresso aqui meus sinceros agradecimentos.

"Eu não quero acreditar, eu quero conhecer".

Carl Sagan

#### **RESUMO**

KOLTUN, A. Identificação e caracterização funcional de genes da subfamília *Ammonium Transporter* 2 (*AMT2*) de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) 2016. 146 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

A cana-de-açúcar (Saccharum spp.) desempenha um papel de grande importância no cenário socioeconômico brasileiro, e representa 42% da matriz energética renovável do país. A expansão da área de cultivo da cana-de-açúcar para solos marginais e a necessidade de manutenção da alta produtividade dessa cultura tem levado à maior aplicação de fertilizantes a base de nitrogênio (N). Tal fato aliado à baixa responsividade da cana-de-açúcar a fertilizantes nitrogenados acarreta altos custos econômicos e ambientais. O amônio é a fonte preferencial de N para essa gramínea, sendo que pouco se conhece sobre a funcionalidade dos transportadores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pertencentes à família gênica AMT (AMMONIUM TRANSPORTER). Neste contexto, é relevante esclarecer os mecanismos que influenciam na eficiência do uso de N (NUE), visando reduzir o impacto econômico e ambiental da aplicação dos fertilizantes nitrogenados nos sistemas agrícolas. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo a caracterização molecular e funcional de membros da subfamília AMT2 de cana-de-açúcar através de expressão heteróloga em mutantes de Saccharomyces cerevisiae (cepa 31019b) e Arabidopsis thaliana (qko), defectivos no transporte de amônio. As sequências gênicas e promotoras de ScAMT2;1 e ScAMT3;3A foram identificadas em biblioteca de BAC (bacterial artificial chromosome) de cana-de-açúcar (cultivar 'R570'). Análises de expressão gênica de ScAMT2;1 e ScAMT3;3A em cana-de-açúcar demonstraram uma expressão preferencial em raízes e em folhas maduras, respectivamente, e que estes genes são regulados de maneira distinta entre si e entre os órgãos, de acordo com o desenvolvimento e com o status de N da planta. A complementação de levedura com os AMT2 de cana-de-açúcar demonstrou que estes genes restauram o crescimento do mutante, sendo que ScAMT2;1 permite maior absorção de amônio; porém o experimento não indicou sensibilidade dessas proteínas ao metilamônio (análogo tóxico ao amônio). Experimentos de localização da expressão órgão/tecido específico em arabidopsis selvagem 'Col-0', utilizando os promotores de ScAMT2;1 ou ScAMT3;3A fusionados a GUS ou GFP, demonstraram que esses AMTs são preferencialmente expressos na região da endoderme/periciclo e vascular das células das raízes e região vascular da parte aérea, sendo regulados pela disponibilidade e fonte de N. Plantas de arabidopsis *qko* superexpressando ScAMT2;1, ScAMT3;3A ou transformadas com ScAMT2;1 dirigido por seu promotor endógeno, crescidas in vitro com amônio como fonte exclusiva de N, apresentaram um aumento significativo na produção de biomassa em relação a qko não transformada, principalmente para ScAMT2;1, indicando que essas proteínas são capazes de transportar amônio e complementar o mutante. Dados de influxo e acúmulo de <sup>15</sup>N-amônio *in vivo* em raízes e parte aérea de plantas qko superexpressando ScAMT2;1 ou ScAMT3;3A demonstraram que ScAMT2;1 atua na absorção de amônio pelas raízes e provavelmente do carregamento do xilema, enquanto ScAMT3;3A está possivelmente envolvida na remobilização de amônio na parte aérea, podendo atuar aditivamente na absorção de NH4<sup>+</sup> em raízes sob alto amônio. Esses resultados indicam que os transportadores ScAMT2;1 e ScAMT3;3A de cana-de-açúcar são funcionais, atuando com propriedades e funções distintas no transporte de amônio nessa gramínea e de acordo com a disponibilidade de N.

**Palavras-chave:** BAC. Expressão heteróloga. *Saccharomyces cerevisiae*. *Arabidopsis thaliana*. Translocação e remobilização de nitrogênio.

#### ABSTRACT

KOLTUN, A. Identification and functional characterization of genes from the *Ammonium Transporter* subfamily 2 (*AMT2*) in sugarcane (*Saccharum* spp.). 2016. 146 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

Sugarcane (Saccharum spp.) plays a major role in the Brazilian socio-economic scenario, and represents 42% of renewable energy sources in the country. The expansion of sugarcane cultivation to marginal lands and the requirement to maintain high yields have led to increased application of nitrogen (N) fertilizer. This fact, coupled with the low response of sugarcane to N fertilization, entails high economic and environmental costs. Ammonium is the preferred source of N by this grass; however, little is known about the functionality of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporters belonging to the AMT gene family (AMMONIUM TRANSPORTER). In this context, it is important to clarify the mechanisms that affect the nitrogen use efficiency (NUE) in order to reduce the economic and environmental impact of the application of N fertilizers in agricultural systems. Therefore, this study aimed to conduct the molecular and functional characterization of members of the AMT2 subfamily from sugarcane by heterologous expression in mutants of Saccharomyces cerevisiae (strain 31019b) and Arabidopsis thaliana (qko), both defective in ammonium transport. Gene and regulatory region sequences of ScAMT2;1 and ScAMT3;3A were identified in a bacterial artificial chromosome (BAC) library of sugarcane (cultivar 'R570'). Expression analysis of ScAMT2;1 and ScAMT3;3A in sugarcane showed a preferential expression in roots and mature leaves, respectively, and indicated a distinct expression pattern between genes and organs according to the ontogeny and the N status of the plant. The yeast complementation with AMT2 of sugarcane demonstrated that these genes restore the mutant growth, with ScAMT2;1 enabling higher ammonium absorption; however, the experiment did not indicate sensitivity to methylammonium (toxic ammonium analog). Arabidopsis wild type 'Col-0' transformed with the promoter region of ScAMT2;1 or ScAMT3;3A directing the expression of GUS or GFP, demonstrated preferential expression in the endodermis/pericycle regions of roots and vascular region in shoots, being regulated by the availability and source of N. Arabidopsis *ako* overexpressing *ScAMT2*; *1*, *ScAMT3*; *3A* or transformed with *ScAMT2*; *1* driven by its endogenous promoter, grown in vitro with ammonium as the sole source of nitrogen, showed a significant increase in biomass production compared to untransformed *ako*, especially for *ScAMT2;1*, indicating that these proteins are capable of transporting ammonium and complementing the mutant. Data of <sup>15</sup>N-ammonium influx and accumulation *in vivo* in roots and shoots of *qko* plants overexpressing *ScAMT2*; 1 or *ScAMT3*; 3A showed that ScAMT2;1 acts in ammonium uptake by roots and probably in the xylem loading, while ScAMT3;3A is possibly involved in ammonium remobilization in shoots, and may act additively in the absorption of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in roots under high ammonium. These results indicate that ScAMT2;1 and ScAMT3;3A from sugarcane are functional, working with distinct properties and functions in ammonium transport according to the availability of N.

**Keywords**: BAC. Heterologous expression. *Saccharomyces cerevisiae*. *Arabidopsis thaliana*. Nitrogen translocation and remobilization.

## SUMÁRIO

| <b>1. INTRODUÇÃO</b> 15  |
|--|
| 2. REVISÃO DE LITERATURA17   |
| 2.1 Fertilizantes nitrogenados17   |
| 2.2 Cenário atual da produção de cana-de-açúcar no Brasil18  |
| 2.3 Dinâmica do nitrogênio no sistema solo-planta-atmosfera21  |
| 2.3.1 Eficiência no uso de nitrogênio em plantas23   |
| 2.3.2 Transportadores de amônio25  |
| 3.MATERIAL E MÉTODOS   |
| 3.1 Identificação dos genes <i>AMT2</i> em biblioteca de BAC ( <i>bacterial artificial chromosome</i> ) de cana-de-açúcar                              |
| 3.2 Análises de localização da expressão tecido-preferencial e perfil transcricional dos genes<br><i>ScAMT2;1</i> e <i>ScAMT3;3A</i> em cana-de-açúcar |
| 3.3 Análises <i>in silico</i> das diversas regiões promotoras e gênicas de <i>ScAMT2;1</i> e <i>ScAMT3;3A</i> encontradas nos BACs de cana-de-acúcar   |
| 3.4 Construção de vetores com as sequências gênicas dos <i>AMTs</i> para expressão heteróloga em levedura, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>             |
| 3.4.1 Amplificação das sequências gênicas dos <i>AMTs</i> com bordas de sítios de restrição para expressão heteróloga em levedura                      |
| 3.4.2 Clonagem das sequências gênicas dos <i>AMTs</i> para posterior recombinação em vetor de destino para expressão em levedura                       |
| 3.4.3 Recombinação das sequências gênicas dos <i>AMTs</i> em vetor de destino para expressão em levedura   |
| 3.4.4 Produção de células quimiocompetentes de Saccharomyces cerevisiae  |
| 3.5 Transformação de Saccharomyces cerevisiae pelo método de acetato de lítio  |
| 3.6 Análise de complementação para capacidade de transporte de amônio da levedura mutante complementada com <i>ScAMT2;1</i> e <i>ScAMT3;3A</i> 40      |
| 3.7 Construção de vetores com as sequências promotoras e gênicas dos AMTs para expressão heteróloga em planta, Arabidopsis thaliana                    |
| 3.7.1 Amplificação das regiões regulatórias e gênicas dos AMTs para expressão heteróloga em planta   |
| 3.7.2 Clonagem das regiões regulatórias e gênicas dos <i>AMTs</i> em vetor de entrada para expressão heteróloga em planta                              |

| 3.7.3 Recombinação das regiões regulatórias e gênicas dos <i>AMTs</i> em vetores de destino par expressão heteróloga em planta  |
|---|
| 3.8 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 4   |
| 3.9 Transformação de plantas de arabidopsis com Agrobacterium tumefaciens4  |
| 3.10 Seleção de eventos transgênicos homozigotos4   |
| 3.11 Expressão dos AMTs nos eventos de transgenia de Arabidopsis thaliana5  |
| 3.11.1 Extração de RNA total de arabidopsis5  |
| 3.11.2 Síntese de cDNA de arabidopsis e análise de transcritos reversos5  |
| 3.12 Localização tecido/célula dos AMTs de cana-de-açúcar em arabidopsis5   |
| 3.13 Análise fenotípica dos transgênicos de arabidopsis5  |
| 3.13.1 In vitro   |
| 3.13.2 In vivo  |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO   |
| 4.1 Identificação dos transportadores de amônio da subfamília AMT2 em biblioteca de BAC regulação transcricional em cana-de-açúcar                                    |
| 4.2 Caracterização <i>in silico</i> de <i>ScAMT2;1</i> e <i>ScAMT3;3A</i> identificados em biblioteca de BA<br>de cana-de-açúcar                                      |
| 4.3 Expressão heteróloga de <i>ScAMT2;1</i> e <i>ScAMT3;3A</i> de cana-de-açúcar em levedur defectiva para o transporte de amônio90                                   |
| 4.4 Localização dos AMTs de cana-de-açúcar em arabidopsis90   |
| 4.5 Expressão heteróloga de <i>ScAMT2;1</i> e <i>ScAMT3;3A</i> de cana-de-açúcar em mutant quádruplo para transportadores de amônio em <i>Arabidopsis thaliana</i> 10 |
| 4.6 Caracterização fenotípica das plantas transgênicas de arabidopsis complementadas con<br>ScAMT2;1 ou ScAMT3;3A de cana-de-açúcar10                                 |
| 4.6.1 In vitro  |
| 4.6.2 In vivo12   |
| <b>5. CONCLUSÕES</b>  |
| REFERÊNCIAS   |

### 1. INTRODUÇÃO

Estima-se que a população mundial seja de sete bilhões de pessoas e que atingirá, em 2050, mais de nove bilhões (DESA, 2010; TESTER; LANGRIDGER, 2010). Esse crescimento pressiona a demanda por alimentos e energia, a qual vem sendo atendida, principalmente, pela expansão de novas áreas de cultivo e pelo aprimoramento da agricultura (MARTINELLI; FILOSO, 2008; ERISMAN et al., 2010). As projeções são de que, nos próximos anos, haverá um incremento substancial no uso de fertilizantes químicos no Brasil, principalmente dos nitrogenados, para atender à essa intensificação da agricultura e à recuperação de áreas degradadas. O uso excessivo de fertilizantes a base de nitrogênio (N), aliado a uma perda de 50 a 70% do N adicionado (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010), tem introduzido cada vez mais N reativo no ambiente (GALLOWAY et al., 2008; AUSTIN et al., 2013), o que aumenta a emissão de gases do efeito estufa e a contaminação de corpos de água com importantes consequências ambientais (GALLOWAY et al., 2008; ERISMAN et al., 2010). Assim, a liberação de compostos nitrogenados em excesso para o ambiente ameaça a qualidade do ar, da água e do solo.

A crescente preocupação com a alteração climática global e a segurança energética gerou a necessidade da substituição do consumo de combustíveis fósseis por biocombustíveis renováveis (TILMAN et al., 2009; MILLER, 2010; FLAVELL et al., 2011). Neste contexto, o Brasil possui destaque mundial na produção de bioetanol combustível utilizando a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) como matéria-prima (BALDANI et al., 2002). A cana-de-açúcar possui um papel de grande importância no cenário agrícola e econômico brasileiro. Quanto à nutrição mineral desta cultura, o nitrogênio apresenta grande importância em seu crescimento, desenvolvimento e produtividade, sendo o amônio sua fonte preferencial (ROBINSON et al., 2011). Com a finalidade de potencializar a produção de cana-de-açúcar, a utilização de fertilizantes nitrogenados tem se tornado uma prática cada vez mais intensiva. Deve-se destacar, porém, que a cana-de-açúcar apresenta baixa resposta à adubação nitrogenada, principalmente em 'cana planta', e que as perdas advindas da fertilização de N nessa espécie podem chegar a 50% (TRIVELIN et al., 2002; FRANCO et al., 2008). As causas desta baixa responsividade ainda não estão totalmente esclarecidas.

Diante deste cenário, fica evidente a importância de criar estratégias para manter a competitividade do biocombustível com um balanço energético positivo na produção de canade-açúcar, objetivando reduzir a aplicação de fertilizantes nitrogenados e obter plantas com maior eficiência no uso de N e assim diminuir o impacto econômico nos sistemas agrícolas e os danos ambientais. Apesar da preferência de cana-de-açúcar por amônio, pouco se conhece sobre os genes que codificam esses transportadores em plantas cultivadas. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi a caracterização molecular e funcional de transportadores de amônio da subfamília AMT2 de cana-de-açúcar nos sistemas heterólogos *Saccharomyces cerevisiae* e *Arabidopsis thaliana*, visando elucidar a função desses transportadores no processo de absorção e redistribuição de amônio nesta gramínea.

### 2. REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1. Fertilizantes nitrogenados

A participação do nitrogênio em estruturas de blocos fundamentais da vida, como aminoácidos, ácidos nucléicos, enzimas, hormônios e pigmentos, faz dele um elemento crucial para o crescimento, desenvolvimento e produtividade de plantas (DECHORGNAT et al., 2011). Devido às inúmeras funções com as quais está relacionado no metabolismo dos vegetais, é considerado um dos mais importantes fatores, após a deficiência de água, que limita a produção de biomassa em ecossistemas naturais e na maioria dos sistemas agrícolas (ROBERTSON; VITOUSEK, 2009). Apesar de constituir 78% da atmosfera terrestre, o N atmosférico é biologicamente inerte, sendo que apenas uma pequena parcela de espécies de procariotos é capaz de reduzir o dinitrogênio, portanto, o  $N_2$  precisa ser convertido para uma forma mineral para que esteja disponível para as plantas (VITOUSEK et al., 1997; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As principais formas de entrada de N no solo agrícola são a deposição de matéria orgânica, fixação biológica de N<sub>2</sub> e, em maior proporção a utilização de fertilizantes nitrogenados produzidos por processos industriais (CORDEIRO, 2008). O advento da produção sintética de fertilizantes a base de N pelo processo 'Haber-Boch' no início do século XX permitiu o notável crescimento da produtividade na agricultura moderna (GALLOWAY; COWLING, 2002; TILMAN et al., 2002), e consequentemente o número de pessoas sustentadas por hectare (ha) de terra cultivada subiu de 1,9 para 4,3 entre 1908 e 2008 (ERISMAN et al., 2008). Apesar dos benefícios, esse processo de fixação industrial de N emprega altas temperaturas (> 400°C) e pressões (150-300 atm) (OLIVEIRA et al., 2013), alcançadas por meio de energia proveniente de combustíveis fósseis não renováveis, sendo, portanto, um processo altamente dispendioso energética e ambientalmente.

Para suprir a demanda crescente de alimentos e energia, estima-se que o uso de fertilizantes nitrogenados tenha passado de 11,6 milhões de toneladas (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). Os fertilizantes nitrogenados aplicados no solo passam por uma série de transformações químicas e microbianas, além disso, estima-se que as perdas de N no sistema solo-planta sejam em torno de 50% e 70% (PEOPLES et al., 1995), podendo resultar na contaminação de solos e de corpos de água devido,

principalmente, à lixiviação de nitrato (TILMAN, 1999; SCHRÖDER et al., 2004; VITOUSEK et al., 2009; FOLEY et al., 2011); na perda da biodiversidade (DIRZO; RAVEN, 2003); na contaminação da atmosfera pela emissão de gases causadores do efeito estufa, como o óxido nítrico e a amônia (TILMAN, 1999; SCHRÖDER et al., 2004; VITOUSEK et al., 2009; FOLEY et al., 2011), e no constante aumento do N reativo em ecossistemas terrestres (MARTINELLI; FILOSO, 2008).

A ureia (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O) é amplamente utilizada no Brasil, representando 66% do total de fertilizantes nitrogenados aplicados (ANDA, 2015), apesar do alto potencial para perdas através da volatilização (CANTARELLA et al., 2008). No entanto, maior preocupação está voltada para perdas por emissão de N<sub>2</sub>O resultante da produção de biocombustível. Estudos tem demonstrado que, sob uma perspectiva ambiental, a transformação de fertilizantes a base de N em gases N<sub>2</sub>O podem descompensar as vantagens provenientes da substituição do uso de combustíveis fósseis por biocombustíveis (OTTO et al., 2016). Apesar da produção de bioenergia ter o potencial de reduzir as emissões de CO<sub>2</sub> da queima dos combustíveis fósseis, essas culturas também trazem à tona problemas com o ambiente relacionados à alta e contínua demanda de N para alcançar altos níveis de produtividade (OTTO et al., 2016).

Considerando esses aspectos, fica evidente a necessidade de melhorar a eficiência dos sistemas agrícolas no que diz respeito ao uso de fertilizantes a base de N, sendo este um grande desafio para a agricultura moderna (TILMAN et al., 2001; SIMMONS et al., 2008; MUELLER et al., 2012). Desse modo, o conhecimento sobre a resposta das espécies vegetais ao N adicionado poderia possibilitar um manejo eficiente da cultura, diminuindo o custo de produção e a contaminação ambiental.

#### 2.2 Cenário atual da produção de cana-de-açúcar no Brasil

O governo brasileiro desenvolveu o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) em 1975 para incentivar a substituição em larga escala dos combustíveis a base de petróleo por etanol, o qual consequentemente promoveu o rápido crescimento da indústria da cana-deaçúcar brasileira (GOLDEMBERG, 2007). Atualmente, o Brasil é o país que mais produz cana-de-açúcar no mundo, seguido da índia e da China (FAOSTAT, 2015), e ocupa a 1ª e 2ª posições de maior produtor mundial de açúcar e etanol (UNICA, 2016). A cana-de-açúcar pode ser considerada uma das principais culturas do país em termos socioeconômicos, sendo que o setor sucroalcooleiro é responsável por mais de um milhão de empregos diretos e 3,6 milhões de empregos indiretos, com uma movimentação financeira anual de mais de 100 bilhões de reais (NEVES et al., 2014).

A produção de biocombustível é imprescindível para diminuir a dependência de formas externas e não renováveis de energia, como o petróleo, e com isso diminuir a susceptibilidade a flutuações de preços, e os impactos ambientais gerados por esses combustíveis (SIMMONS et al., 2008; WACLAWOVSKY et al., 2010). Aproximadamente 45% da matriz energética do Brasil é composta por energia renovável (CGEE, 2009; UNICA, 2016), e desse total 42% é proveniente da biomassa de cana-de-açúcar, utilizada para produção de etanol ou eletricidade (OECD, 2015). Segundo dados do MME (Ministério das Minas de Energia), de 1970 até 2005, a produção de energia primária de cana-de-açúcar registrou um aumento de cerca de 745%, passando de 3,6 milhões de toneladas equivalentes de petróleo (TEP) para 30,4 milhões (PACHECO, 2006).

Atualmente, quase 38% da área cultivada com cana-de-açúcar no mundo é encontrada no Brasil (FAOSTAT, 2015). Para a safra de 2015/16 a área destinada à atividade sucroalcooleira foi de 8.645,2 milhões de ha e a produção nacional foi de 665,5 milhões de ton (CONAB, 2016). A produção brasileira de etanol consolidou-se em 30,5 bilhões de litros, desse total, 11,2 bilhões de litros são de etanol anidro, utilizado na mistura com gasolina, e 19,3 bilhões de litros são de etanol hidratado, utilizado nos veículos *flex fuel*, com um aumento expressivo de 13,7%, quando comparado com a produção da safra anterior (CONAB, 2016). Algumas projeções indicam que a área de solo com cultivo de cana-deaçúcar chegará a 11,5 milhões de ha em 2024, com produção de cana-de-açúcar aumentando para 884 milhões de ton (OECD, 2015). De 2015 a 2024, a produção de açúcar também poderá aumentar de 39 para 48 milhões de ton e estima-se um aumento de 30 para 42,5 bilhões de litros na produção de etanol (OECD, 2015).

A produção de biocombustível proveniente da cana-de-açúcar tem inúmeras vantagens sobre outras culturas como milho, trigo e beterraba, incluindo baixa demanda de energia durante o processo de produção e balanço energético altamente positivo. (GOLDEMBERG, 2007; PIMENTEL; PATZEK, 2007; RENOUF et al., 2008; SMEETS et al., 2008). Essa matéria-prima apresenta alta eficiência fotossintética nas regiões tropicais, resultando em alta produção de biomassa, a qual, em associação com a reutilização dos seus subprodutos, apresenta vantagens econômicas e ambientais sobre combustíveis fósseis (GOLDEMBERG, 2007; NASS et al., 2007; LEAL et al., 2013). Outra vantagem que a indústria de cana-de-açúcar proporciona ao Brasil em comparação com outros países é a

flexibilidade que a maioria das refinarias de cana-de-açúcar tem de produzir açúcar e etanol com a mesma cultura, permitindo assim uma rápida transição de um produto para outro em resposta a mudanças econômicas e demanda do mercado (OTTO et al., 2016).

Apesar de ser o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, o Brasil apresenta o menor volume de fertilizantes nitrogenados aplicados anualmente em comparação com os outros países produtores em larga escala, 60 a 100 Kg N ha<sup>-1</sup> (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. Além disso, com o objetivo de maximizar a produção desta fonte de energia renovável, a fertilização de cultivos com nitrogênio é uma prática que tem sido realizada de forma desenfreada, a despeito do potencial de contaminação do ambiente (VITOUSEK et al., 2009). Em 2014, cerca de 32 milhões de ton de fertilizantes foram utilizados em canaviais no Brasil (ANDA, 2014).

Para a maioria das cultivares de cana-de-açúcar, ocorre um acúmulo de N mais acentuado no início do desenvolvimento. Experimentos em campo utilizando fertilizantes nitrogenados marcados (<sup>15</sup>N) demonstraram que na 'cana-planta' apenas 40% do N total absorvido/metabolizado é derivado de fertilizante, enquanto que na 'cana-soca' pode chegar a 70% na fase vegetativa (SILVEIRA; CRÓCOMO, 1990; FRANCO et al., 2011). Durante a fase de maturação da cana ocorre um decréscimo acentuado do N total, o que demonstra a importância da aplicação do fertilizante nitrogenado nos estágios iniciais da cultura e da reserva de N no solo nos períodos subsequentes e sugere que a absorção e transporte de N na planta possui papel fundamental, principalmente durante o início do desenvolvimento (FRANCO et al., 2011).

Apesar da melhoria dos sistemas de cultivos em cana-de-açúcar com a otimização no processo de aplicação, disponibilidade de N, e o presumível benefício proveniente da fixação biológica de N (OLIVEIRA et al., 1999; GAVA et al., 2001; BALDANI et al., 2002; TRIVELIN et al., 2002; SIMONETE et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007), as perdas desse nutriente 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), sendo que as causas fisiológicas e genéticas dessa reduzida responsividade ainda permanecem desconhecidas (MENDES, 2006; RESENDE et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007).

Assim, a falta de cultivares de alto rendimento nas condições de solos marginais e a tentativa da manutenção da alta produtividade da cultura canavieira têm acarretado aumento do consumo de fertilizantes a base de N. Ou seja, apesar da cana-de-açúcar ser considerada a cultura tropical mais adequada para a produção de biocombustíveis, as grandes quantidades de N aplicadas no solo levantam dúvidas sobre a sustentabilidade da produção, e estão em desacordo com uma cultura baseada na redução da emissão de gases do efeito estufa (ROBINSON 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 Dinâmica do nitrogênio no sistema solo-planta-atmosfera

A absorção de N pode ocorrer na forma de N orgânico, como aminoácidos e peptídeos (SCHIMEL; BENNETT 2004; JONES et al., 2005; VINALL et al., 2012) e em maior proporção sob a forma inorgânica, como amônio e nitrato. No solo, o N encontra-se em maior proporção na forma orgânica (> 98%) e, portanto, apenas uma pequena fração está prontamente disponível para as plantas na forma inorgânica (MARSCHNER, 1986; NÄSHOLM et al., 2009; HOLST et al., 2012). As formas amoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e nítrica (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) representam cerca de 80% do total de cátions e ânions absorvidos pelas plantas (STARCK; HART, 1997; MILLER; CRAMER, 2004), e estes íons passam pela membrana plasmática das células da epiderme e do córtex da raiz por meio de transportadores específicos de absorção e transporte (MAYER; LUDEWIG, 2006).

O nitrato, geralmente, é a fonte de N mais abundante no solo (MILLER et al., 2007; ROBINSON et al., 2011), no entanto, sua forma aniônica o torna mais solúvel e móvel e, consequentemente, mais propenso a perdas por lixiviação ou conversão por atividade microbiana do solo (MILLER et al., 2007; ROBINSON et al., 2011). Já o amônio é um cátion facilmente adsorvido na matriz dos solos, apresentando assim uma prevalência maior no ambiente (MARSCHNER, 1995; MILLER et al., 2007; ROBINSON et al., 2011). A proporção de fertilizantes absorvidos pelas plantas e remanescente no solo (imobilizado, solúvel ou adsorvido) é de ~58%, com perdas de N por lixiviação, volatilização, desnitrificação, percolação, e emissões de  $N_2O$  e amônia através das folhas representando 42% (OTTO et al., 2016). Além disso, emissões de amônia foliar ocorrem em tecidos senescentes através do estômato devido ao ponto de compensação de amônia (FARQUHAR et al., 1980), e parece ser a principal via de perda de N durante estágios avançados de crescimento das plantas (MARIANO et al., 2015), na qual perdas de até 90 kg de N ha<sup>-1</sup> tem sido reportadas em campos de cana-de-açúcar (TRIVELIN et al., 2002).

Em solos cultivados, a magnitude do N inorgânico pode variar drasticamente na faixa de micromolar ( $\mu$ M) a millimolar (mM) (GLASS et al., 2001; MILLER et al., 2007). Para responder a esta magnitude das concentrações de nitrogênio inorgânico presente na solução dos solos, as plantas desenvolveram mecanismos para regular o influxo de nitrato e amônio (GLASS, 2002). Estudos fisiológicos da cinética de absorção de N em diversas espécies revelaram uma característica bifásica, classificando as proteínas da membrana em dois tipos: os de baixa afinidade (*Low affinity transport system*- LATS) e os de alta afinidade (*High affinity transport system*- HATS) (WANG et al., 1993; VALE et al., 1988). Os membros de LATS atuam quando a concentração externa de N é alta (N > 1 mM) e não exibem saturação cinética. As proteínas pertencentes ao HATS operam sob baixas concentrações externas de N (N < 1 mM) e são saturáveis (GLASS et al., 2002). Ambos os sistemas de absorção desses íons são modulados pela presença de transportadores específicos, pela afinidade desses por amônio ou nitrato, pela concentração de N presente no solo (LOQUÉ; VON WIRÉN, 2004) e de maneira coordenada com as mudanças no padrão de crescimento e desenvolvimento das plantas (KRAISER et al., 2011).

Apesar de nitrato ser a forma de N inorgânica presente em maior proporção em solos cultivados, o amônio é a fonte preferencial de N para algumas espécies, como é o caso da cana-de-açúcar (GAZZARRINI et al., 1999; ROBINSON et al., 2011). Estudos realizados com fertilizantes nitrogenados marcados (<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub><sup>15</sup>NO<sub>3</sub>) 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) e sob deficiência de N (SEREZINO, 2015). Entre essas espécies, a contribuição do nitrato em relação ao N total das plantas foi significativamente menor em cana-de-açúcar, sendo somente de 2 a 5%, comparada a 22% em milho (ROBINSON et al., 2011). Dados similares foram obtidos em estudos de campo com plantas de cana-de-açúcar que receberam dose comercial de fertilizante nitrogenado; nesse caso, a absorção de <sup>15</sup>N-nitrato pelas raízes representou somente 15% da absorção de <sup>15</sup>N-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; SEREZINO, 2015).

Dessa forma, é possível que em condições de cultivo, a nutrição de N pela cana-deaçúcar seja dependente principalmente da aquisição de amônio. Apesar dessa preferência, comparações com arroz (*Oryza sativa*), uma espécie que preferencialmente utiliza amônio como fonte de N (LOQUÉ; VON WIRÉN, 2004), demonstraram que a recuperação de fertilizantes nitrogenados aplicados ao solo é baixa em cana-de-açúcar, variando entre 20% e 30% (CHAPMAN et al., 1994; FRANCO et al., 2011), enquanto em arroz essa recuperação pode chegar a 60% (GHALEY et al., 2010), o que indica uma reduzida capacidade de absorção de N em raízes de cana-de-açúcar.

Assim, o ciclo do N apresenta uma dinâmica complexa, pelas múltiplas transformações e por sua mobilidade no sistema solo-planta-atmosfera. Levando-se em consideração os fatos expostos, fica clara a necessidade de buscar novas soluções visando o aumento e manutenção de produtividade e a maior eficiência na utilização de fertilizantes a base de N em cana-de-açúcar.

#### 2.3.1 Eficiência no uso de nitrogênio em plantas

O processo de eficiência no uso do nitrogênio envolve a eficácia da absorção de fontes de N do solo, assim como, da utilização de N na planta, a qual compreende os processos de assimilação e remobilização deste nutriente durante o desenvolvimento da cultura (GOOD et al., 2004; LEA; AZEVEDO, 2006; FAN et al., 2007; HIREL et al., 2007). 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). Diversidade genética para a eficiência no uso interno de N (iNUE) em cana-de-açúcar foi identificada, apesar de limitada, indicando a possibilidade de explorar essa característica em programas de melhoramento genético, o que poderia contribuir para a sustentabilidade da cultura em relação ao uso de N (ROBINSON et al., 2007).

O processo de assimilação de N parece ter uma função essencial para aumentar o NUE em cereais. Grande parte do nitrato absorvido é transportada para a parte aérea, onde é reduzido a nitrito pela nitrato redutase (NR) no citoplasma, sendo depois reduzido a amônio pela nitrito redutase (NiR), nos plastídeos, e pela glutamina sintetase (GS) (LAM et al., 1996). O amônio derivado da redução do nitrato, ou absorvido diretamente do solo, é assimilado em aminoácidos via ciclo GS/GOGAT (glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase) (LAM et al., 1996; DONATO et al., 2004). A superexpressão da glutamina sintetase (GS1) citosólica em milho levou à maior produção de grãos quando as plantas foram submetidas à alta fertilização de N (MARTIN et al., 2006), e plantas transgênicas de tabaco superexpressando GS também apresentaram maior acúmulo de biomassa (OLIVEIRA et al., 2002).

Diferentemente dos demais cereais citados, em um estudo para acúmulo de biomassa e eficiência do uso de N em população segregante resultante do cruzamento entre *Saccharum officinarum* e a cultivar comercial Q165<sup>A</sup> foi constatado que a cultivar comercial apresenta melhor performance para NUE quando cultivada em altas concentrações de N (ROBINSON et al., 2007). Esse alto desempenho, no entanto, não estava relacionado à atividade da GS, sugerindo que essa enzima tem pouco impacto na eficiência para uso de N no caso de cana-de-açúcar (ROBINSON et al., 2007). Além disso, foi constatada atividade constitutiva das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase em variedades de cana-de-açúcar uma baixa relação destas enzimas com o processo de assimilação e consequentemente com o NUE (LEA; AZEVEDO, 2006; ROBINSON et al., 2007).

Os valores de NUE para cana-de-açúcar no Brasil variam de 7% a 40% (com média de 26%) (TRIVELIN et al., 1995; TRIVELIN et al., 2002; GAVA et al., 2003; VITTI, 2003; FARONI, 2008; FRANCO et al., 2008), enquanto a porcentagem de N total na planta derivado de fertilizantes varia entre 23% e 37% (com média de 32%) (BASANTA et al., 2003; VITTI, 2003; FARONI, 2008). Dentre as estratégias para aumentar o NUE de cana-de-açúcar estão o manejo correto de fertilizantes na cultura (taxa, período, frequência de aplicação) e a utilização de genótipos mais eficientes no uso de N (OTTO et al., 2016). Estudos tem demonstrado que existe variabilidade genética para esta característica (ROBINSON et al., 2007; WHAN et al., 2010), com alguns genótipos sendo altamente eficientes no uso de N para produção de biomassa, enquanto outros são capazes de armazenar N durante os estágios iniciais da cultura (ROBINSON et al., 2007; ROBINSON et al., 2008; WHAN et al., 2010).

A magnitude de perdas de N e baixo NUE da cana-de-açúcar reflete em significativos custos financeiros e ambientais (THORBURN et al., 2011; SKOCAJ et al., 2013), e há uma preocupação crescente em relação a sustentabilidade econômica e ambiental do aumento da dependência por fertilizantes de N para a produção de culturas para bioenergia (ERISMAN et al., 2010). O N proveniente da mineralização da matéria orgânica é a principal fonte de N durante a maior parte do período de cultivo da cana-de-açúcar, e nesse sentido, fica evidente a necessidade de realizar a caracterização fisiológica, genética e molecular do

processo de absorção/aquisição de N do solo e transporte de N na planta, objetivando o melhoramento do NUE em cana-de-açúcar.

#### 2.3.2 Transportadores de amônio

As proteínas transportadoras de amônio pertencem à superfamília MEP/AMT/Rh -METHYLAMMONIUM PERMEASES/AMMONIUM TRANSPORTERS/RHESUS (GAZZARRINI et al., 1999; LOQUÉ; VON WIRÉN, 2004), e são identificadas em todos os domínios da vida (BAO-ZHEN et al., 2009). O primeiro transportador dessa superfamília foi identificado em um mutante de levedura por meio de testes de resistência a metilamônio (MA), 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 e plantas (MARINI et al., 1994; NINNEMANN et al., 1994). Proteínas homólogas a MEP/AMT também foram descritas em animais, incluindo o polipeptídeo Rhesus (Rh) em humanos (MARINI et al., 2000).

A família AMT codifica diversas proteínas responsáveis pelo transporte de amônio em diversos órgãos (GAZZARINI et al., 1999). Sequências de *AMTs* foram identificadas em *Arabidopsis thaliana* (6 *AMTs*; SOHLENKAMP et al., 2000), *Solanum Lycopersicum* (4 *AMTs*; VON WIRÉN et al., 2000a), *Lotus japonicus* (4 *AMTs*; SIMON-ROSIN et al., 2003; D'APUZZO et al., 2004), *Oryza sativa* (12 *AMTs*; SUENAGA et al., 2003; SONODA et al., 2003), *Populus trichocarpa* (14 *AMTs*; COUTURIER et al., 2007), *Glycine max* (16 *AMTs*; KOBAE et al., 2010), *Sorghum bicolor* (8 AMTs; KOEGEL et al., 2013), *Zea mays* (7 AMTs; GU et al., 2013), *Pyrus betulaefolia* (3 AMTs; LI et al., 2014 e 2015), dentre outras espécies.

Nota-se que o número de genes *AMTs* presentes nas diversas espécies varia consideravelmente e assim, pode-se concluir que cada espécie possui um sistema de transporte de amônio resultante da seleção a que foi submetida durante o processo evolutivo e/ou domesticação. Essa família é subdividida em AMT1 e AMT2 (SOHLENKAMP et al., 2000; LOQUÉ; VON WIRÉN, 2004), sendo que, as sequências gênicas de AMT2 são mais semelhantes aos transportadores isolados de *Saccharomyces cerevisiae* (MEP) e *Escherichia coli* do que aos transportadores de plantas da família *AMT1* (SOHLENKAMP et al., 2000; LOQUÉ; VON WIRÉN, 2004).

Estudos fisiológicos, genéticos e de influxo de amônio sugerem que uma organização espacial desses transportadores parece ser fundamental para homeostase de N em plantas (LOQUÉ; VON WIRÉN, 2004). Os membros da subfamília AMT1 são preferencialmente expressos em raízes, com exceção de LeAMT1;3 de tomate e LjAMT1;1 e LjAMT1;2 de *Lotus japonicus* (VON WIRÉN et al., 2000a; D'APUZZO et al., 2004), enquanto AMT2;1 de *Arabidopsis thaliana* (SOHLENKAMP et al., 2002), *Oryza sativa* (SUENAGA et al., 2003), *Lotus japonicus* (SIMON-ROSIN et al., 2003) e *Sorghum bicolor* (KOEGEL et al., 2013), apresentaram expressão em todos os órgãos da planta e outros membros da subfamília AMT2 (*OsAMT3;1, OsAMT3;2 e OsAMT3;3*; GAUR et al., 2012) apresentaram maior acúmulo de transcritos ou foram encontrados exclusivamente na parte aérea (*PbAMT3;* LI et al., 2015). Além da localização diferenciada, o padrão de regulação dos AMT2 em relação à deficiência de N ou suprimento com diferentes fontes nitrogenadas é altamente variável entre as espécies (COUTURIER et al., 2007; BAO-ZHEN et al., 2009; GAUR et al., 2012; LI et al., 2015).

Estes padrões de expressão distintos indicam que os membros da família dos AMTs atuam não só na captação de amônio nas raízes, mas também no transporte de amônio entre células adjacentes em raízes (SUENAGA et al., 2003) e na parte aérea durante a reciclagem de amônio em processos como senescência foliar e fotorrespiração (HOWITT; UDVARDI, 2000; SOHLEMKANP et al., 2000; VON WIRÉN et al., 2000b; SOUZA; FERNANDES, 2006) visando à manutenção do status de N na planta. Sendo assim, a presença de várias formas de transportadores de amônio nas plantas superiores permite uma maior flexibilidade na regulação em organelas, células, tecidos ou ainda, na especialização de órgãos, além de permitir que as células absorvam amônio sob um amplo espectro de concentrações e impedir a deficiência ou toxidez por amônio (D´APUZZO et al., 2004).

As diversas proteínas transportadoras da família AMT apresentam afinidades distintas pelo amônio e atuam de forma aditiva no processo de aquisição de amônio pelas raízes (YUAN et al., 2007). Todas as proteínas *AMT1* estudadas até este momento são saturáveis, apresentam alta afinidade pelo  $NH_4^+$  e também podem transportar metilamônio (CEREZO et al., 2001). Porém a caracterização de genes *AMT2* tem demonstrado que as proteínas dessa subfamília não são capazes de transportar metilamônio (MA) (ROON et al., 1975; SOHLENKAMP et al., 2000; SIMON-ROSIN et al., 2003; COUTURIER et al., 2007; PÉREZ-TIENDA et al., 2011; LI et al., 2015).

A existência de um sistema de sinalização e regulação para os transportadores de N dificultam a obtenção de plantas mais eficientes na absorção deste nutriente, pois há diversos escapes para manter a homeostasia na planta (LEA; AZEVEDO, 2006). Considerando que a

maior eficiência na absorção e transporte de N está relacionada à maior produção de biomassa (LEA; AZEVEDO, 2006), estudos moleculares estão voltados para o entendimento e identificação dos transportadores de N presentes na membrana plasmática das células, os quais são fundamentais para melhoria do uso eficiente em plantas.

Não há registros sobre a identificação e caracterização de genes *AMT2* para a cana-deaçúcar, o que indica a relevância deste trabalho. Considerando a importância socioeconômica e ambiental da cultura da cana-de-açúcar no Brasil, o papel fundamental dos transportadores de amônio para a compreensão e possível aumento da eficiência no uso do nitrogênio em cana-de-açúcar, o objetivo desse trabalho consistiu na identificação e caracterização funcional e molecular dos genes codificadores de transportadores de amônio da subfamília AMT2 de cana-de-açúcar em sistemas heterólogos (*Saccharomyces cerevisiae* e *Arabidopsis thaliana*).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

# 3.1 Identificação dos genes AMT2 em biblioteca de BAC (*bacterial artificial chromosome*) de cana-de-açúcar

A primeira etapa do trabalho consistiu na identificação dos genes AMTs (ammonium transporters) em biblioteca genômica de BAC de cana-de-açúcar (cultivar `R570') disponível no Laboratório GaTE (Genomes and Transposable Elements) da Prof<sup>a</sup>. Marie Anne van Sluys do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB/USP). Essa biblioteca é constituída de 269 placas com 384 clones cada, representando um total de 103.296 clones com cobertura de 4,5 vezes o genoma de cana-de-açúcar, e probabilidade de 98% de identificar sequências de interesse no genoma da espécie (TOMKINS et al., 1999). Os primers (iniciadores) utilizados para essa busca foram previamente desenvolvidos em colaboração com o Profº Renato Vicentini (Laboratório de Bioinformática e Biologia de Sistemas, UNICAMP), com base em sequências de genes ortólogos de Arabidopsis thaliana e Oryza sativa no banco de dados do SUCEST (Sugarcane Expressed Sequence Tags) (Tabela 1). O processo de seleção de BACs foi realizado através de pools 3D por meio de três reações de amplificação em tempo real com a seguinte estratégia: (i) amplificação dos superpools (3D) para a identificação dos blocos positivos; (ii) amplificação dos blocos para a seleção das coordenadas dos poços que contêm os clones positivos, e (iii) amplificação dos clones positivos isolados para validação.

**Tabela 1** - Sequências de *primers* relativos aos genes que codificam proteínas transportadoras de amônio e os respectivos tamanhos esperados dos amplicons, utilizados para a busca de genes da subfamília AMT2 em biblioteca de BAC de cana-de-açúcar

| Nome          | Sequência dos primers | Amplicon |
|---------------|-----------------------|----------|
| ScAMT2;1 For  | GGCAGCATCGTGAAGAAGAA  |          |
| ScAMT2;1 Rev  | CACCAGCACCCACACCAG    | 90 pb    |
| ScAMT3;1C For | GGCAGCATCGTGAAGAAGAA  |          |
| ScAMT3;1C Rev | CCACACCACCAGCAGA      | 141 pb   |
| ScAMT3;2C For | TCGCCAACGGGAACATC     |          |
| ScAMT3;2C Rev | GGCACGAACAGCATCCAC    | 250 pb   |

As reações de PCR em tempo real continham 100 ng do *pool* de DNA, 0,4  $\mu$ M de cada iniciador (Tabela 1), 1X SYBR *Green* PCR *Master Mix* (Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, MA, EUA) e água ultra pura Milli-Q estéril para um volume final de reação de 15  $\mu$ L. Os passos da reação foram constituídos 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 foi incluído um controle negativo (sem DNA) e um controle positivo (100 ng de DNA genômico de cana-de-açúcar) em duplicatas.

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<sup>-1</sup> de triptona, 5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 10 g L<sup>-1</sup> de NaCl, pH 7,0) contendo 12,5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol a 37 °C por 12 h sob agitação. Após esse período, 1  $\mu$ L da cultura foi utilizado como *template* para uma nova reação de PCR em tempo real (conforme descrito acima). As culturas contendo bactérias positivas para a presença dos genes foram então riscadas em placas contendo LB sólido (15 g L<sup>-1</sup> de ágar) e 12,5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de cloranfenicol e crescidas a 37 °C por 12 h. Para cada placa, 3 colônias isoladas foram selecionadas e crescidas em meio LB líquido contendo 12,5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> 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 sequenciados 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<sup>a</sup>. Nathalia de Setta da Universidade Federal do ABC (UFABC) utilizando o programa Artemis: *Genome Browser and Annotation Tool* (versão 16.0.11) (RUTHERFORD et al., 2000) e como referência os genes de sorgo *SbAMT2;1* (gb|sb09g02030) e *SbAMT3;3A* (gb|Sb04g022390). As sequências utilizadas na identificação foram alinhadas pelo programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994) e através deste resultado foi gerada uma árvore filogenética pelo programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013) empregando máxima parcimônia.

# 3.2 Análises de localização da expressão tecido-preferencial e perfil transcricional dos genes *ScAMT2*;*1* e *ScAMT3*;*3A* em cana-de-açúcar

Após a identificação de sequências de *AMTs* de cana-de-açúcar em biblioteca de BAC, foi realizada uma análise de localização tecido-preferencial e perfil transcricional dos genes detectados e para isso RNA total de cana-de-açúcar foi extraído e síntese de cDNA foi realizada para as análises de expressão gênica. As amostras de material vegetal foram gentilmente cedidas pelo mestre Luís Henrique Damasceno Serezino do Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura pertencente à Universidade de São Paulo (CENA/USP). Plantas de cana-de-açúcar foram cultivadas por três meses em solução nutritiva contendo 1 mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, posteriormente transferidas para solução contendo 2 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (+N) por 2 d, e então submetidas a dois tratamentos: deficiência de N (-N) e alto N (5 mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>). Amostras de raízes, colmo, folhas recém expandidas (+1) e maduras (+3) foram coletadas em triplicata nos períodos de 0, 1, 5 e 10 d em cada tratamento, e congeladas em N líquido.

As amostras coletadas tiveram o RNA total extraído seguindo o método descrito em Leal et al. (2007) com algumas modificações. As amostras foram maceradas manualmente em cadinhos de porcelana tratados com água 0,01% DEPC (dietilpirocarbonato) ativa e posteriormente autoclavados, em N líquido e transferidas para microtubos de polipropileno de 1,5 mL. Aos microtubos adicionou-se 1 mL de tampão de extração (2% CTAB, 2 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA, 2% PVP, e 2% ß-mercaptoetanol em água 0,01% DEPC inativa) pré-aquecido a 65 °C. Após a homogeneização em banho-maria a 65 °C por cerca de 40 min, as amostras foram colocadas no gelo por 1 min, e então, foi adicionado aos tubos 1 mL de CIA (clorofórmio:álcool-isoamílico 24:1) e estes foram centrifugados a 9000 rcf por 10 min a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, no qual adicionou-se um volume igual de CIA, e as amostras foram emulsionadas por inversão e em seguida centrifugadas a 9000 rcf por 10 min a 4 °C. Novamente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e um volume de 1/4 referente ao sobrenadante recuperado foi adicionado de 10 M LiCl, e as amostras foram então incubadas a 4 °C por 12 h. Após esse período, uma nova centrifugação foi feita a 9000 rcf por 30 min a 4 °C, e o sobrenadante foi descartado. O pellet formado foi lavado duas vezes com 500 µL de 75% etanol e centrifugado a 9000 rcf por 10 min a 4 °C. Por fim, foi feita a ressuspensão do precipitado em 20 µL de água 0,01% DEPC inativa e o RNA foi armazenado a -80 °C.

O RNA total foi quantificado em NanoDrop (Thermo Fischer Scientific) e sua integridade foi verificada em gel TAE (40 mM de Tris-Base, 20 mM de ácido acético glacial, 1 mM de EDTA pH 8,0, pH 8,3) de 1% agarose corado com SYBR Gold (Thermo Fischer Scientific) sob luz ultravioleta. Após a quantificação, cerca de 2 µg do RNA de cada amostra foi tratado com 1 U de DNase I (Thermo Scientific) e tampão apropriado, 2 U de Ribolock *RNase Inhibitor* (Thermo Fischer Scientific) e água ultrapura Milli-Q 0,01% DEPC inativa, e incubado a 25 °C por 15 min. A reação foi interrompida com a adição de EDTA, e incubada a 65 °C por 10 min. Para o próximo passo, 1 µg de RNA total tratado foi transferido para novos tubos com 1 µL de oligodT (50 mM) e 1 µL de dNTP (1 mM) e estas amostras foram desnaturadas a 65 °C por 5 min, e então adicionou-se 4 µL de 5X *First-Strand Buffer*, 1 µL de DTT 0,1 M e 20 U da enzima SuperScript III *Reverse Transcriptase* (Thermo Fischer Scientific). A reação permaneceu a 25 °C por 5 min, 50 °C por 1 h seguida de 70 °C por 15 min. O cDNA foi diluído 1:10 em água ultrapura Milli-Q estéril para as reações de amplificação dos genes.

Para a análise quantitativa de transcritos reversos foi utilizado 5 μL KAPA SYBR FAST (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EUA), 0,2 μM de cada iniciador (Tabela 2), 1 μL do cDNA 1:10 e água ultrapura 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). 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, 62 °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 *quantification cycle* (C<sub>Q</sub>) foram utilizados para determinar a diferença da expressão gênica, de acordo com método "Delta" (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) razão =2 -<sup>Δ</sup> ( $\Delta$ Cq) sendo  $\Delta$ C<sub>Q</sub> = C<sub>Q</sub> (gene alvo) – C<sub>Q</sub> (gene referência) e o  $\Delta$  =  $\Delta$ C<sub>Q</sub> (tratamento) -  $\Delta$ C<sub>Q</sub> (controle). Para todos os experimentos foram utilizados *primers* específicos para os genes *ScAMT2;1, ScAMT3;3A* e para *ScUbiq2* de cana-de-açúcar, o qual foi utilizado como gene de referência (Tabela 2).

| Nome                              | Sequência dos primers                | Amplicon |
|-----------------------------------|--------------------------------------|----------|
| RTScAMT2;1 For                    | GGCAGCATCGTGAAGAAGAA                 |          |
| RTScAMT2;1 Rev CACCAGCACCCACACCAG |                                      | 90 pb    |
| RTScAMT3;3A For                   | AACGCCGCTATGTCTGCTCT                 |          |
| RTScAMT3;3A Rev                   | RTScAMT3;3A Rev ATGAAGGTGGACGACACGCT |          |
| ScUbiq2 For                       | CTTCTTCTGTCCCTCCGATG                 |          |
| ScUbiq2 Rev                       | TCCAACCAAACTGCTGCTC                  | 159 bp   |

**Tabela 2** - Sequências de iniciadores relativos ao gene de referência *Ubiquitina* em cana-de-, utilizados para análise quantitativa de transcritos reversos

Para as análises de localização da expressão tecido-preferencial dos transportadores de amônio em cana-de-açúcar, as médias dos valores de expressão gênica obtidos foram normalizadas utilizando os dados de *ScAMT2;1* em raiz no tratamento de suficiência de N (+ N; 2 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) no tempo 0 d para *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A*. Já para as análises do perfil transcricional dos *AMTs* em raízes, colmos, folhas recém-expandidas (+1) e folhas maduras (+3) de cana-de-açúcar, cada gene teve seus valores relativos de expressão normalizados pelos  $C_Q$  obtidos em raízes no tratamento +N e 0 d, ou seja, os valores de expressão encontrados em raízes para *ScATM2;1* foram utilizados para normalizar os resultados referentes a este gene, e o nível de expressão detectado em raízes para *ScATM3;3A* foi a referência de normalização dos resultados dos demais órgãos vegetais avaliados para este gene.

# 3.3 Análises *in silico* das diversas regiões promotoras e gênicas de *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* encontradas nos BACs de cana-de-acúcar

Foi realizada uma série de análises *in silico* com as diversas sequências promotoras e gênicas de *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* identificados nos BACs para cada um dos genes, com o propósito de selecionar os alvos para a caracterização funcional. O primeiro passo para a comparação dos BACs foi o mapeamento dos genes e elementos móveis (TEs) circundantes aos AMT2 alvos, pelo programa Artemis, com a perspectiva de verificar se as sequências gênicas encontradas eram alelos e de identificar a presença de TEs na região regulatória dos mesmos. Para auxiliar nessa escolha, os promotores também foram analisados e comparados através do programa PlantPAN 2.0 (CHOW et al., 2015).

A identificação de possíveis variações de nucleotídeos e aminoácidos entre as sequências encontradas foi feita através de alinhamentos múltiplos progressivos com o algoritmo ClustalW no programa BioEdit (HALL, 1999; TIPPMANN, 2004), incluindo sequências provenientes da análise de sequenciamento de RNA de alta performance (RNA-seq) de tecidos de cana-de-açúcar ('SP80-3280') realizado no Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP, para comparação.

Ainda para verificar a identidade dessas sequências como AMTs, a presença de elementos característicos da superfamília de transportadores MEP/AMT/Rh foi confirmada. As sequências gênicas codificando os transportadores ScAMT2;1 e ScAMT3;3A de cana-de-açúcar foram traduzidas ORF Finder pelo programa (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html) e analisadas no banco de dados do UniProt (http://www.uniprot.org/) e do Prosite (<u>http://us.expasy.org/prosite</u>). Os domínios transmembranas para essas proteínas foram preditos pelo programa TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) e o motivo assinatura conservado "D-[FYWS]-[AS]-G-[GSC]-x(2)-[IV]-x(3)-[SAG](2)-x(2)-[SAG]-[LIVMF]-x(3)-[LIVMFYWA](2)-x-[G K]-x-R" foi verificado pelo programa WebLogo [http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi/ (CROOKS et al., 2004)]. E, finalmente, a presença de alguns aminoácidos teoricamente essenciais para as funções dos transportadores de amônio foram verificados através do alinhamento múltiplo das proteínas pelo ClustalW no programa BioEdit.

# 3.4 Construção de vetores com as sequências gênicas dos *AMTs* para expressão heteróloga em levedura, *Saccharomyces cerevisiae*

Com o intuito de investigar a função dos genes *AMTs* de cana-de-açúcar *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A*, foram propostas duas construções para expressão heteróloga de forma a complementar uma cepa mutante de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) defectiva para o transporte de amônio (GAZZARRINI et al., 1999). As sequências gênicas foram amplificadas e clonadas em pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, EUA) e transferidas para o vetor de destino pDR196 (RENTSCH et al., 1995) por ligação de extremidades coesivas. Os procedimentos e experimentos foram realizados no Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP, Piracicaba, São Paulo.

# 3.4.1 Amplificação das sequências gênicas dos *AMTs* com bordas de sítios de restrição para expressão heteróloga em levedura

Iniciadores foram desenhados para amplificação das sequências codificadoras completas de *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A*, contendo bordas com sítios de restrição enzimática específicos para cada gene, para posterior formação de bordas coesivas e ligação em vetor de destino (Tabela 3). Os iniciadores foram desenhados utilizando o programa NetPrimer (<u>www.premierbiosoft.com/netprimer</u>). O gene *AtAMT1;1* de *Arabidopsis thaliana*, já descrito como codificador de proteína transportadora de amônio (MAYER; LUDEWIG, 2006; LOQUÉ et al., 2007), foi inserido no processo de amplificação e clonagem para representar o controle positivo dos experimentos de expressão heteróloga em levedura.

**Tabela 3** - Sequências de iniciadores relativos aos genes que codificam as proteínas transportadoras de amônio AtAMT1;1, ScAMT2;1, e ScAMT3;3A utilizados para a clonagem dos genes para complementação de levedura. Em negrito estão as sequências referentes aos sítios de restrição adicionados

|                  |                                 | Sítio de      |          |
|------------------|---------------------------------|---------------|----------|
| Nome             | Sequência dos primers           | Restrição     | Amplicon |
| LevAtAMT1;1 For  | <b>GAATTC</b> ATGTCTTGCTCGGCCAC | <i>Eco</i> RI |          |
| LevAtAMT1;1 Ver  | CTCGAGTCAAACCGGAGTAGGTG         | XhoI          | 1518 pb  |
| LevScAMT2;1 For  | GAATTCATGGCGGCGTCGG             | <i>Eco</i> RI |          |
| LevScAMT2;1 Ver  | CTCGAGCTACAGCTGAATGGTGAC        | XhoI          | 1485 pb  |
| LevScAMT3;3A For | ACTAGTATGGCAGCAGGTGCGGTA        | SpeI          |          |
| LevScAMT3;3A Rev | CTCGAGTCAAACATTCTGTGTGACTC      | XhoI          | 1464 pb  |

As reações de PCR foram realizadas utilizando 1X tampão PCR Kapa, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 1 U de HiFi *Hot Start High Fidelity Taq* polimerase de alta fidelidade que possui atividade exonuclease (Kapa Biosystems), 0,4  $\mu$ M de cada *primer*, 10 ng de DNA plasmidial contendo os respectivos genes de cana-de-açúcar (*ScAMT2;1* em pBSK, *ScAMT3;3A* em PCR8) previamente sequenciados, ou 15 ng de cDNA de arabidopsis para o gene *AtAMT1;1* e água ultra pura Milli-Q estéril para um volume final de 25  $\mu$ L. A ciclagem utilizada foi uma desnaturação inicial de 4 min a 95 °C seguida de 35 ciclos de desnaturação a 98 °C por 20 s, amplificação a 66 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 60 s, e a extensão final foi de 5 min a 72 °C.
A identificação dos produtos das reações de PCR foi feita por eletroforese em gel 0,8% agarose corrido em tampão TAE, corado com SYBR Gold e visualizado sob luz ultravioleta. Os produtos foram purificados com o uso do kit GFX PCR DNA *and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) de acordo com as instruções do fabricante, e posteriormente quantificados em fluorômetro Hoefer DyNA Quant 200 (Hoefer Inc.; Holliston, MA, EUA). Esta etapa de purificação foi realizada em todas as clonagens, sendo recomendada para a remoção do excesso de *primers* e dímeros de *primers* que podem se recombinar eficientemente com o vetor de entrada na reação de ligação e aumentar o número de falsos positivos na etapa de transformação de *Escherichia coli*.

### 3.4.2 Clonagem das sequências gênicas dos *AMTs* para posterior recombinação em vetor de destino para expressão em levedura

O sistema pGEM-T Easy é constituído por um plasmídeo linear que possui uma deoxitimina (T) em cada uma de suas extremidades 3' e que permite a inserção direta de produtos de PCR adenilados, pela enzima T4 DNA ligase ("TA" *cloning*). Assim, os genes previamente amplificados, purificados de gel de agarose e quantificados, passaram pelo procedimento *A-tailing*, já que a enzima utilizada para a amplificação dos genes possui atividade *proofreading*,

A partir do produto de PCR purificado e adenilado, foi realizada a reação de ligação dessas sequências no vetor pGEM-T Easy (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, 1  $\mu$ L da solução de ligação de cada vetor + inserto de interesse foi adicionado a 40  $\mu$ L de solução de células eletrocompetentes de de *E. coli* (cepa DH5 $\alpha$ ) em cubetas de 0,2 mm e transformadas com eletroporador MicroPulser (Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, CA, EUA).

Após a eletroporação, as bactérias foram rapidamente transferidas para um tubo (1,5 mL) com 1 mL de meio SOC (20 g L<sup>-1</sup> de triptona, 10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 0,5 g L<sup>-1</sup> de NaCl, 180  $\mu$ L de 20% glicose, pH 7,0) e mantido a 120 rpm por 1 h 30 min a 37 °C. O meio de cultura de bactérias foi centrifugado por 5 min a 2000 rcf, após essa etapa, 900  $\mu$ L de SOC foram retirados com uma pipeta e o restante foi cuidadosamente ressuspenso nos 100  $\mu$ L restantes. A solução celular concentrada foi plaqueada em meio LB sólido contendo 100 mg L<sup>-1</sup> de ampicilina, 0,4 mM de IPTG (indutor de *β-galactosidase*) e 100 mg L<sup>-1</sup> de X-Gal (substrato da enzima) para seleção das bactérias transformadas e as placas foram incubadas a 37 °C por 16 h. Para cada construção foram selecionadas 6 colônias

brancas, que foram inoculadas individualmente em 5 mL de meio LB líquido com 100 mg L<sup>-1</sup> de ampicilina e crescidas a 37 °C *overnight* para extração do DNA plasmidial por lise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979).

Para a minipreparação de DNA plasmidial, 1,5 mL de cada cultura líquida foram transferidos para novos microtubos e estes foram centrifugados a 16000 rcf por 1 min. Descartado o sobrenadante, o procedimento foi repetido para aumentar o rendimento da extração de DNA plasmidial. Em seguida, o precipitado de células foi ressuspenso em 200  $\mu$ L de solução I (50 mM glicose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM EDTA) com forte agitação, e os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 10 min. O próximo passo consistiu em adicionar 200  $\mu$ L da solução II (0,2 M NaOH e 1% dodecil sulfato de sódio) ao tubos, invertidos para mistura dos reagentes e incubados em gelo por 5 min. Posteriormente, foram acrescentados 150  $\mu$ L de solução III (3 M acetato de potássio pH 5,5), a homogeneização foi realizada por inversão e os tubos foram novamente incubados no gelo por 5 min. Passado esse período, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 16000 rcf, e o sobrenadante foi transferido para novos tubos com 500  $\mu$ L de fenol: CIA (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1) gelado, misturados por vórtex e centrifugados por 5 min a 16000 rcf.

Após a centrifugação, a fase superior aquosa foi transferida para novos tubos com a adição de 500  $\mu$ L de CIA (24:1), foi realizada a inversão dos tubos e estes foram novamente centrifugados por 5 min a 16 000 rcf. A fase líquida superior resultante foi coletada e transferida para outros tubos, os quais receberam 1 mL de etanol absoluto gelado, sendo misturados por inversão, e mantidos a -20 °C por 1 h. A precipitação em etanol foi seguida de centrifugação a 16 000 rcf por 10 min a 4 °C, sendo que a solução foi descartada e ao pellet formado foram adicionados 500  $\mu$ L de etanol 70%, os tubos foram agitados por vórtex, centrifugados por 10 min a 16 000 rcf e o sobrenadante foi novamente descartado.

As amostras foram então secas em termobloco a 37 °C (20 a 30 min) e ressuspensas em 30  $\mu$ L de TE com ribonuclease para eliminação de contaminação por RNA (RNAse A 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) seguidas de incubação por 15 min a 37 °C. O DNA plasmidial foi quantificado em fluorômetro Hoefer DyNA Quant 200 (Hoefer), e a presença do inserto de interesse foi confirmada por digestão com a enzima *Eco*RI a 37 °C *overnight*, visualizada em gel TAE de 0,8% agarose corado com SYBR Gold (Thermo Fischer Scientific) sob luz ultravioleta.

Clones positivos para a presença do fragmento de interesse foram sequenciados utilizando o sequênciador 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fischer Scientific) do Laboratório de Melhoramento de Plantas (CENA/USP) afim de confirmar a fidelidade das sequências de interesse no plasmídeo de entrada.

# 3.4.3 Recombinação das sequências gênicas dos *AMTs* em vetor de destino para expressão em levedura

Após a confirmação da fidelidade das sequências clonadas, uma segunda digestão foi realizada com as distintas enzimas correspondentes a cada gene (*Eco*RI e *Xho*I para *ScAMT2;1* e *AtAMT1;1* com tampão Tango 2X, e *Spe*I e *Xho*I para *ScAMT3;3A* com tampão G 2X) (Thermo Fischer Scientific) em termobloco a 37 °C *overnight*. O vetor de destino pDR196 foi digerido com as respectivas endonucleases, correspondentes a cada sequência de transferência para formar extremidades coesivas.

A identificação e confirmação dos produtos das reações de digestão foram feitas por eletroforese em gel de 0,8% agarose TAE corado com SYBR Gold (Thermo Fischer Scientific) e visualizado em luz ultravioleta. Os produtos das triplicatas foram purificados do gel de agarose e a reação de ligação foi feita utilizando a enzima T4 DNA ligase (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

A reação de ligação foi utilizada na transformação de *E. coli* por eletroporação, e os transformantes foram selecionados em meio SOC contendo 100 mg L<sup>-1</sup> de ampicilina, (processo descrito na seção 3.4.2). A confirmação da presença do inserto foi realizada por digestão do DNA plasmidial com as enzimas correspondentes ao vetor de destino com cada gene de interesse. As construções resultantes foram nomeados mep:*AtAMT1;1*, mep:*ScAMT2;1* e mep:*ScAMT3;3A* (Tabela 4).

**Tabela 4** – Sequências referentes a genes que codificam as proteínas transportadoras de amônio *AtAMT1;1, ScAMT2;1*, e *ScAMT3;3A* clonadas em pGEM-T Easy, recombinadas em vetor de destino pDR196, e as construções resultantes para expressão heteróloga em levedura

| Sequência | Construção    |  |
|-----------|---------------|--|
| AtAMT1;1  | mep:AtAMT1;1  |  |
| ScAMT2;1  | mep:ScAMT2;1  |  |
| ScAMT3;3A | mep:ScAMT3;3A |  |

#### 3.4.4 Produção de células quimiocompetentes de Saccharomyces cerevisiae

Foi empregada uma cepa mutante de *S. cerevisae* deficiente em transporte de amônio para investigar a capacidade de complementação dos genes de cana-de-açúcar. Para a produção de células de levedura quimiocompetentes, a cepa 31019b do mutante triplo defectivo para absorção de amônio (*MATa ura3 mep1* $\Delta$  *mep2* $\Delta$ ::*LEU2 mep3* $\Delta$ ::*KanMX2*) (MARINI et al., 1997), disponibilizada pelo Prof. Dr. Nicolaus von Wirén do IPK-Gatersleben (*Department of Physiology and Cell Biology*, Alemanha), foi estriada em placas de Petri contendo meio de cultura YPD (2% bacto peptona, 2% glicose, 1% bacto extrato de levedura, e 2% de ágar bacteriológico) e incubada a 30 °C, até colônias isoladas serem visíveis (1 a 3 d). Uma única colônia foi inoculada em tubo de ensaio contendo 5 ml de meio líquido YPAD (2% bacto peptona, 2% glicose, 1% extrato de levedura, e 80 mg L<sup>-1</sup> hemisulfato de adenina) e incubada por 16 h em agitador a 30 °C e 200 rpm.

O pré-inóculo da cultura foi adicionado a 50 mL de meio 2X YPAD (4% bacto peptona, 4% de glicose, 2% extrato de levedura, e 80 mg L<sup>-1</sup> de hemisulfato de adenina) pré-aquecido. O frasco foi então incubado em agitador com 30 °C e 200 rpm por aproximadamente 4 h. A densidade ótica foi monitorada por um espectrofotômetro (DO<sub>600</sub>) em uma diluição de 100 vezes (10  $\mu$ L de suspensão de levedura em 990  $\mu$ L de meio YPAD), até que a densidade ótica das células atingisse uma faixa entre 0,6 e 0,7.

O volume de 50 mL do meio de cultura contendo as células de levedura foi então centrifugado em tubos descartáveis de polipropileno de 50 mL, a 20 °C e 3000 rcf por 5 min, sendo o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso em 25 mL de água Milli-Q estéril, com o auxílio de agitador do tipo vórtex, e então centrifugado a 20 °C e 3000 rcf por 5 min. Este passo de lavagem das células foi repetido duas vezes, e então foi realizada a ressuspensão do precipitado em 1 mL de água ultrapura Milli-Q estéril, o qual foi transferido para microtubos estéreis, centrifugado por 30 s a 13000 g e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 1 mL de água esterilizada e amostras de 100  $\mu$ L foram pipetadas em microtubos, os quais foram estocados em 50% glicerol em *freezer* a -80 °C.

#### 3.5 Transformação de Saccharomyces cerevisiae pelo método de acetato de lítio

A cepa 31019b foi transformada com os plasmídeos contendo os genes de interesse, com as construções denominadas mep:*AtAMT1;1* (controle positivo) mep:*ScAMT2;1*, mep:*ScAMT3;3A* e também com o plasmídeo PDR196 sem inserto (controle negativo) utilizando o método de acetato de lítio/DNA de esperma de salmão/PEG, de acordo com protocolo estabelecido por Gietz e Schiestl (2007) modificado. Para o processo de transformação, um tubo de 1,5 mL contendo DNA carregador (2 mg mL<sup>-1</sup> de DNA de esperma de salmão dissolvido em 10 mM Tris-HCl, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 8,0) foi mantido a 99 °C por 5 min em termobloco para a desnaturação do material, e então colocado imediatamente em gelo. Alternativamente, DNA carregador pré-desnaturado e estocado a -20 °C foi descongelado e mantido em gelo até ser utilizado.

Células de leveduras competentes para transformação foram descongeladas, centrifugadas a 13000 rcf por 30 s e o sobrenadante foi removido. Concomitantemente, foi preparado quantidade suficiente de mix de transformação, o qual foi bem homogeneizado por vórtex [240  $\mu$ L de PEG 4000 (50%), 36  $\mu$ L de LiAc (1 M) e 50  $\mu$ L de DNA carregador e 36  $\mu$ L de água ultrapura Milli-Q estéril; solução referente a uma transformação]. Os componentes do mix foram resfriados a 4 °C antes de serem misturados e mantidos no gelo depois da adição do DNA de esperma de salmão desnaturado.

Um volume de 358  $\mu$ L do mix de transformação juntamente com 2  $\mu$ L de plasmídeo + genes de interesse foi adicionado em cada tubo de transformação contendo as células quimiocompetentes de levedura. Um controle negativo foi incluído, no qual foi adicionado mix de transformação sem DNA plasmidial às celulas de levedura. O pellet celular foi ressuspenso e misturado através de agitador vórtex. Os tubos foram incubados a 42 °C por 40 min em termobloco, e após o choque térmico, foram centrifugados a 13000 rcf por 30 s e o sobrenadante foi removido com uma pipeta. O pellet foi ressuspenso em 1 mL de água ultrapura Milli-Q estéril.

Da suspensão celular, duas concentrações foram plaqueadas: 200  $\mu$ L da solução concentrada e 200  $\mu$ L de uma diluição de 1:10 (em água ultrapura Milli-Q estéril) em meio de cultura sólido YNB [0.17% base nitrogenada para levedura sem aminoácidos e sem sulfato de amônio (YNB-AA/AS), 2% de glicose, 1 mM de arginina, 2% de ágar bacteriológico, 50 mg L<sup>-1</sup> de ampicilina]. As placas de Petri foram incubadas a 30 °C, até colônias isoladas ficarem visíveis (2 a 5 d). Para o cultivo padrão e de seleção de transformantes, o pH dos meios citados não foi ajustado nem tamponado.

As células de levedura transformadas foram inoculadas em meio de cultura líquido YNB contendo 1 mM de arginina e 50 mg L<sup>-1</sup> de ampicilina, por aproximadamente 36 h a 30 °C e 200 rpm. Um volume de 2 mL da levedura pré-cultivada foi centrifugado a 8000 rcf por 3 min. O sobrenadante foi removido, e o pellet foi lavado 3 vezes com 1 mL de água estéril, sendo homogeneizado por vórtex e centrifugado a 8000 rcf por 3 min. Após a tripla lavagem, as células foram ressuspensas em 1 mL de água esterilizada e a densidade ótica ( $DO_{600nm}$ ) da solução (1:10) foi determinada. Para os experimentos, uma diluição seriada das células em suspensão foi realizada ( $DO_{600nm}$  de 1, e subsequente diluição de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ).

### 3.6 Análise de complementação para capacidade de transporte de amônio da levedura mutante complementada com *ScAMT2;1* ou *ScAMT3;3A*

Para avaliar a complementação do mutante defectivo transformado, um volume de 5  $\mu$ L de cada diluição (1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>) das suspensões celulares de levedura mep:*AtAMT1;1* (controle positivo) mep:*ScAMT2;1*, mep:*ScAMT3;3A* e também com o plasmídeo PDR196 sem inserto (controle negativo) foi inoculado em placas de Petri, contendo meio mínimo YNB suplementado com 3% de glicose e uma fonte de nitrogênio, e estas foram incubadas em 30 °C por 6 d.

Cada placa de Petri recebeu 25 mL do meio de cultivo. Reagentes que não foram esterilizados como mencionado abaixo, foram dissolvidos em água e autoclavados a 120 °C por 20 min. MES-Tris, arginina, NH<sub>4</sub>Cl e metilamônio foram preparados em soluções estoques e esterilizados através de filtro de acetato de celulose de 0,2  $\mu$ m estéril e só então foram adicionados à solução autoclavada, em capela de fluxo laminar, assim como o antibiótico de seleção (ampicilina 50 mg L<sup>-1</sup>).

Nesse experimento, foram testadas concentrações crescentes de amônio: 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 5 e 20 mM na forma de NH<sub>4</sub>Cl, 100 mM de seu análogo tóxico, metilamônio (MA) (DUBOIS et al., 1979) (com adição de 0,1% de arginina no meio contendo MA), e placas contendo 1 mM de arginina foram utilizadas como controle positivo de crescimento. O pH dos meios foi ajustado com 20 mM MES-Tris pH 6,0. O tratamento de 5 mM de NH<sub>4</sub>Cl, também foi feito com 20 mM de MES-Tris pH 5,0 e 7,5 para testar a resposta dos transformantes a diferentes níveis de acidez. Neste contexto, o crescimento das células de levedura foi avaliado visualmente e está relacionado à maior ou menor absorção de amônio.

# 3.7 Construção de vetores com as sequências promotoras e gênicas dos *AMTs* para expressão heteróloga em planta, *Arabidopsis thaliana*

Com o intuito de realizar a caracterização funcional *in vivo* em arabidopsis, complementando o estudo de localização da expressão e função dos transportadores de amônio ScAMT2;1 e ScAMT3;3A de cana-de-açúcar, 9 construções foram propostas para expressão heteróloga *in planta*: ligação de cada promotor endógeno referente a ScAMT2;1 e ScAMT3;3A de cana-de-açúcar com os genes repórteres GFP (fluorescent green protein) em vetor pMDC110 (CURTIS; GROSSNIKLAUS, 2003), ou GUS ( $\beta$ -glucuronidase) em vetor pMDC164; ligação de promotor endógeno com o próprio gene em vetor pMDC99, e promotor constitutivo CaMV 35S do vírus do mosaico da couve-flor, fusionado a cada um dos genes em vetor pMDC32. Para tal, as sequências regulatórias e gênicas dos AMTs foram amplificadas, ligadas em vetores de entrada correspondentes, clonadas em *E. coli* e transferidas para os vetores de destino pela tecnologia Gateway e Multisite Gateway para expressão heteróloga em A. thaliana defectiva para o transporte de amônio (YUAN et al., 2007), via Agrobacterium tumefaciens.

# 3.7.1 Amplificação das regiões regulatórias e gênicas dos *AMTs* para expressão heteróloga em planta

A partir da identificação, confirmação e seleção das sequências regulatórias e codificadores dos transportadores de amônio ScAMT2;1 e ScAMT3;3A em BACs, *primers* específicos foram desenhados para a amplificação das mesmas (Tabela 5). Como molde para as amplificações das regiões codificadoras ou regulatórias foram utilizados: 5 ng do gene *ScAMT2;1* sintético em vetor pBSK, 50 ng de cDNA de folha de cana-de-açúcar 'SP80-3280' submetida a tratamento com suficiência de nitrogênio para o gene *ScAMT3;3A*, 25 ng de DNA dos BACs 118\_C18 e 235\_F05 (regiões promotoras de *ScAMT2;1*), e do BAC 023\_O13 (região promotora de *ScAMT3;3A*), em reação e ciclagem já descritas para enzima *HiFi Hot Start High Fidelity Taq* polimerase (Kapa Biosystems) (seção 3.4.1), posteriormente confirmados por eletroforese em gel de agarose e purificados com o uso do kit GFX PCR DNA *and Gel Band Purification* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

**Tabela 5** – Sequências de iniciadores relativos aos genes que codificam proteínas transportadoras de amônio (ScAMT2;1 e ScAMT3;3A) e suas regiões regulatórias em canade-açúcar, utilizados para a clonagem dessas sequências e posterior expressão em planta. Em negrito estão as sequências referentes às bordas de recombinação usadas na tecnologia *Multsite Gateway* para ligação de 2 fragmentos (Mg)

| Nome             | Sequência dos primers                                 | Amplicon |
|------------------|---|----------|
| ScAMT2;1 For     | ATGGCGGCGTCGGG  |          |
| ScAMT2;1 Rev     | CTACAGCTGAATGGTGACGC                                  | 1473 pb  |
| ScAMT3;3A For    | ATGGCAGCAGGTGCGGTAC                                   |          |
| ScAMT3;3A Rev    | TCAAACATTCTGTGTGACTCCTACAGC                           | 1452 pb  |
| Pro1ScAMT2;1 For | CACCGAACGACTGGCGACA                                   |          |
| Pro1ScAMT2;1 Rev | GTCGCTCGGCTCCGTGC                                     | 2936 pb  |
| Pro2ScAMT2;1 For | GGCTTAGCTGTTTGACTTGGTGC                               |          |
| Pro2ScAMT2;1 Rev | GTCGCTCGGCTCCGTGC                                     | 2962 pb  |
| ProScAMT3;3A For | AAAGGCATCTAAACAAGACCTCGA                              |          |
| ProScAMT3;3A Rev | GGCTGGGGGCACTGGATCG                                   | 2008 pb  |
| MgScAMT2;1 F     | GGGGACAACTTTGTATACAAAAGTTGTAATGGCGGCGTCGGG            |          |
| MgScAMT2;1 R     | GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTACAGCTGAATGGTGACGC    | 1531 pb  |
| MgPro2ScAMT2;1 F | GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAGGCTTAGCTGTTTGACTTGGTGC |          |
| MgPro2ScAMT2;1 R | GGGGACAACTTTTGTATACAAAGTTGTGTCGCTCCGGCTCCGTGC         | 3020 pb  |

# 3.7.2 Clonagem das regiões regulatórias e gênicas dos *AMTs* em vetor de entrada para expressão heteróloga em planta

O plasmídeo de entrada para o sistema *Gateway*, utilizado para as construções envolvendo genes e promotores isoladamente, foi o PCR8/GW/TOPO (Thermo Fischer Scientific). Este vetor possui um único resíduo deoxitimidina (T) em sua extremidade 3' para a estratégia de clonagem "TA", sendo esta ligação entre inserto e vetor, não direcional. Este plasmídeo possui as bordas *att*L1 e *att*L2 para a transferência de recombinação dos fragmentos de interesse para o vetor de destino pelo sistema *Gateway*. Assim, os genes e promotores previamente amplificados, purificados de gel de agarose e quantificados, passaram pelo procedimento *A-tailing*. Esses produtos foram então utilizados para ligação ao vetor PCR8, seguindo as recomendações do fabricante.

Como os BACs selecionados para a clonagem das regiões regulatórias apresentam íntrons na região gênica de *ScAMT2;1*, não foi possível realizar uma clonagem direta de promotor + gene desta fonte de DNA de cana-de-açúcar, portanto, esta construção foi obtida através da tecnologia *Multisite Gateway*. A partir dos produtos de PCR purificados dos

elementos 1 e 2 com suas respectivas bordas inseridas, foi feita a reação de recombinação BP com os vetores apropriados para gerar os clones de entrada contendo as sequências de DNA de interesse; PDONR 221 P1P5r para o componente 1: promotor 2 *ScAMT2;1* e pDONR 221 P5P2 para o componente 2: gene *ScAMT2;1*. As reações BP foram realizadas utilizando o kit *Multisite Gateway* (Thermo Fischer Scientific), seguindo as instruções do fabricante.

A reações de recombinação *Gateway* e *Multisite Gateway* foram utilizadas na transformação de *E. coli* por eletroporação (processo descrito na seção 3.4.2), e os transformantes foram selecionados em meio SOC contendo 100 mg L<sup>-1</sup> de espectinomicina para os vetores de entrada PCR8 e em 100 mg L<sup>-1</sup> canamicina para os vetores de entrada PDONR.

A confirmação da presença do inserto foi realizada por digestão do DNA plasmidial, e os clones contendo os fragmentos de interesse foram digeridos com enzimas específicas para identificar a direção do inserto no vetor de entrada e, posteriormente, clones positivos para direção correta do inserto foram sequenciados utilizando os *primers* GW1 e GW2 para PCR8 e M13F e M13R para PDONR, em sequênciador 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fischer Scientific) do Laboratório de Melhoramento de Plantas (CENA/USP).

# 3.7.3 Recombinação das regiões regulatórias e gênicas dos *AMTs* em vetores de destino para expressão heteróloga em planta

Após a confirmação da fidelidade das sequências clonadas, reações de recombinação para os vetores de destino pMDC (Tabela 6) foram realizadas utilizando o kit *Gateway LR Clonase II Enzyme mix* e *Multisite Gateway two-fragment vector construction* (Thermo Fischer Scientific), conforme instruções do fabricante.

Bactérias (cepa DH5A $\alpha$ ) eletrocompetentes foram transformadas com 0,8 µL de cada reação de recombinação, crescidas em meio SOC sob agitação a 120 rpm por 1 h 30 min a 37 °C e a solução concentrada (100 µL) foi plaqueada em meio LB sólido contendo 100 mg L<sup>-1</sup> de canamicina para seleção das bactérias transformadas. Para cada recombinação foram selecionadas 6 colônias, inoculadas posteriormente em 5 mL de meio LB líquido contendo 100 mg L<sup>-1</sup> de canamicina e crescidas a 37 °C *overnight* para a extração de DNA plasmidial por lise alcalina. O DNA obtido foi digerido com as enzimas *Pac*I e *Acs*I a 37° C *overnight* e visualizado em gel TAE de 0,8% agarose corado com SYBR Gold (Thermo Fischer Scientific) sob luz ultravioleta. As construções resultantes foram denominadas 35S:ScAMT2;1, 35S:ScAMT3;3A, Pro1ScAMT2;1:GFP. Pro1ScAMT2;1:GUS, Pro2ScAMT2;1:GFP, Pro2ScAMT2;1:GUS, ProScAMT3;3A:GFP, ProScAMT3;3A:GUS e Pro2ScAMT2;1:ScAMT2;1 (Tabela 6).

| Tabela 6 - Sequências de cana-de-açúcar referentes aos genes       | ScAMT2;1 e ScAMT3;3A e         |
|--|--------------------------------|
| suas regiões regulatórias em seus respectivos vetores de entrada e | e de destino, e as construções |
| resultantes  |                                |

| Saguância           | Votor do ontrodo    | Vetor de | Construção            |
|---------------------|---------------------|----------|-----------------------|
| Sequencia           | vetor de entrada    | uestino  | Construção            |
| Gene ScAMT2;1       | PCR8                | pMDC32   | 35S:ScAMT2;1          |
| Gene ScAMT3;3A      | PCR8                | pMDC32   | 35S:ScAMT3;3A         |
|                     | PCR8                | pMDC110  | Pro1ScAMT2;1:GFP      |
| Promotor 1 ScAMT2;1 | PCR8                | pMDC164  | Pro1ScAMT2;1:GUS      |
|                     | PCR8                | pMDC110  | Pro2ScAMT2;1:GFP      |
| Promotor 2 ScAMT2;1 | PCR8                | pMDC164  | Pro2ScAMT2;1:GUS      |
|                     | PCR8                | pMDC110  | ProScAMT3;3A:GFP      |
| Promotor ScAMT3;3A  | PCR8                | pMDC164  | ProScAMT3;3A:GUS      |
| Promotor 2 ScAMT2;1 | PDONR221 P1P5r (E1) | pMDC99   | Pro2ScAMT2;1:ScAMT2;1 |
| + Gene ScAMT2;1     | PDONR221 P5P2 (E2)  |          |                       |

Clones positivos para a presença das sequências recombinadas de todos os vetores de destino propostos, foram parcialmente sequenciados utilizando o sequênciador 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fischer Scientific) do Laboratório de Melhoramento de Plantas (CENA/USP) para confirmação final de identidade e da direção de inserção do fragmento de interesse, utilizando *primers* específicos para cada vetor (Tabela 7).

**Tabela 7** - Sequências de iniciadores relativos aos vetores de destino da família pMDC, utilizados para sequenciamento objetivando a confirmação da direção correta de inserção dos fragmentos de interesse

| Nome                  | Sequência dos primers  |
|-----------------------|------------------------|
| pMDC32 e pMDC99 Rev   | CTCTAGCCAATACGCAAACCG  |
| pMDC110 e pMDC164 For | ATTCAGGCTGCGCAACTGTTGG |

#### 3.8 Transformação de Agrobacterium tumefaciens

Confirmada a clonagem direcional, os vetores de destino contendo as sequências de interesse foram transformados em Agrobacterium tumefaciens cepa GV3101 eletrocompetentes (processo descrito na seção 3.4.2). As células de agrobactéria foram crescidas em meio SOC sob agitação a 120 rpm por 1 h a 28°C e plaqueada em meio LB sólido contendo 100 mg L<sup>-1</sup> de rifampicina e 100 mg L<sup>-1</sup> de canamicina. As placas foram incubadas a 28 °C por 48 h e após esse período 6 colônias isoladas, de cada construção, foram inoculadas em 3 mL de meio LB líquido contendo 100 mg L<sup>-1</sup> de rifampicina e 100 mg L<sup>-1</sup> de canamicina, e crescidas a 28° C por 12 h sob agitação. Parte das suspensões inoculadas, foi também misturada em 10 µL de água ultrapura Milli-Q estéril e utilizada como template para uma reação de PCR de colônia com *primers* específicos para os genes e regiões regulatórias dos AMTs.

As reações de PCR continham 1X tampão PCR Kapa, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 0,4  $\mu$ M de cada *primer*, 1 U de *Taq* polimerase (Thermo Fischer Scientific) e água ultra pura Milli-Q estéril para um volume final de 25  $\mu$ L. A ciclagem utilizada foi uma desnaturação inicial de 10 min a 95 °C seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 58 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 90 para a confirmação dos genes e de 180 s para as regiões regulatórias, a extensão final foi de 5 min a 72 °C. A identificação dos produtos das reações de PCR foi feita por eletroforese em gel TAE de 0,8% agarose corado com SYBR Gold (Thermo Fischer Scientific) e visualizado em luz ultravioleta. Agrobactérias positivas para a presença dos genes e promotores *AMTs* foram estocadas em glicerol (50%) a -80°C.

### 3.9 Transformação de plantas de arabidopsis com Agrobacterium tumefaciens

A arabidopsis *qko* é um quádruplo mutante defectivo para os transportadores *AtAMT1;1*, *AtAMT1;2*, *AtAMT1;3* e *AtAMT2;1*, possuindo apenas 10% da capacidade de absorção de amônio (YUAN et al., 2007), e esta foi selecionada para a expressão heteróloga dos genes codificadores de proteínas transportadoras de amônio de cana-de-açúcar da subfamília AMT2, com o objetivo de realizar a caracterização funcional dos mesmos.

Sementes de arabidopsis dos genótipos selvagem 'Col-0' (ecotipo 'Columbia 0') e do mutante quádruplo no transporte de alta-afinidade de amônio em *A. thaliana, qko,* 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<sup>-1</sup> de NPK (04:14:08) e 4 g. L<sup>-1</sup> de calcário calcítico em câmara de crescimento à 22°C com 80% de umidade e fotofase 16 h de luz a 200  $\mu mol~m^{-2}\,s^{-1}$ 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<sup>-1</sup> de rifampicina e 100 mg L<sup>-1</sup> de canamicina foram riscadas com as culturas de Agrobacterium cepa GV3101 contendo cada construção de interesse e crescidas a 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 a 28°C. As culturas de bactérias foram então transferidas para microtubos de 2 mL e centrifugadas a 2000 rcf por 10 min. O pellet formado foi ressuspenso delicadamente em uma solução contendo 5% de sacarose e 0,02% do surfactante Silweet-L77 (Momentive, Albany, NY, EUA). Para cada construção foram transformados dois vasos contendo três plantas de arabidopsis, sendo 10 µL da solução de Agrobacterium inoculados em cada botão floral das plantas no vaso (Figura 1). Após a transformação, as plantas foram mantidas em caixas fechadas na câmara de crescimento por 24 h. A transformação foi realizada duas vezes com intervalo de uma semana.



**Figura 1** - Vaso de *Arabidopsis thaliana* com plantas crescidas por 30 d. Detalhe da transformação por *floral dip* (NARUSAKA et al., 2010) modificado, na qual 10 μL da solução de agrobactéria contendo os vetores de destino foram aplicados em cada botão floral da planta.

#### 3.10 Seleção de eventos transgênicos homozigotos

Sementes das plantas transformadas (geração  $T_0$ , T= transgênico) foram coletadas após duas semanas de secagem e esterilizadas em 70% etanol contendo 0,05% de Triton X-100 por 8 min e em seguida lavadas 2 vezes em etanol absoluto por 1 min cada. Após secarem, as sementes foram espalhadas em placas com meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificado: ½ da concentração de sais, sem vitaminas e contendo 1% de ágar e sacarose e 25 mg L<sup>-1</sup> de higromicina. A seleção foi realizada baseando-se no tamanho do hipocótilo e na cor e expansão das folhas das plântulas (KHAIRUNNISA et al., 2014).

As placas foram mantidas no escuro a 4 °C por 4 d, e em seguida foram transferidas para sala de luz a 25 °C sob fotofase de 16 h de luz a 100  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa. Após 14 d, 6 plantas de cada construção transformada, que apresentaram resistência ao antibiótico de seleção (geração T<sub>1</sub>) foram aclimatadas em câmara de crescimento a 22°C com 80% de umidade e fotofase de 14 h de luz a 200  $\mu$ mol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa, representando os diferentes eventos de transformação.

A transformação mediada por *Agrobacterium* de *A. thaliana* ocorre no gametófito feminino, e a integração de T-DNA não é homóloga (DESFEUX et al., 2000), assim todas as plantas  $T_1$ , com fenótipo de resistência à higromicina (Hig R) são hemizigotas, indivíduos diploides apresentando apenas um alelo do gene em estudo (R/\_, onde ´\_` representa a ausência do alelo), independentemente do número de cópias inserido.

Após 40 d, sementes das plantas T<sub>1</sub> secas foram coletadas, esterilizadas e germinadas em meio de seleção. Para cada um dos 6 eventos de transformação obtidos para cada construção transformada, cinco plantas foram selecionadas e aclimatadas. Novamente, após 40 d, sementes dessas plantas foram coletadas, esterilizadas e germinadas em meio de seleção. As plantas crescidas destas sementes, provenientes de autopolinização (R/\_ x R/\_), são denominadas T<sub>2</sub>. Nessa geração é possível avaliar as plantas quanto à segregação (3 R: 1\_). Padrões diferentes podem acorrer devido a possibilidade de ocorência de rearranjos, interações, e inserção de múltiplas cópias no genoma hospedeiro (FINNEGAN; McELROY, 1994; CLUSTER et al., 1996; ISLAM et al., 2007). Além disso, embora em frequência muito baixa, a inserção do gene exógeno pode causar interrupção em genes essenciais (LI et al., 2006) e por isso o crescimento e desenvolvimento das plântulas pode ser prejudicado. Assim, plantas que não apresentaram segregação em T<sub>2</sub> não foram levadas à próxima geração, bem como plantas que apresentaram crescimento ou desenvolvimento comprometido. O genótipo das plantas  $T_2$  que apresentaram taxa de segregação esperadas de 3:1, é constituído por: homozigoto R/R; hemizigoto R/\_ e homozigotos para ausência do gene exógeno \_/\_ e assim as 2 plantas mais vigorosas (Figura 2) de cada placa foram selecionadas e aclimatadas em câmara de crescimento, representando as prováveis plantas  $T_3$  homozigotas. O avanço de mais uma geração foi necessário para confirmar o genótipo das plantas selecionadas.



Figura 2 – Plantas de arabidopsis da geração T<sub>2</sub> crescidas em meio MS modificado com antibiótico de seleção (25 mg L<sup>-1</sup> de higromicina). O círculo preto indica uma planta recessiva; o círculo amarelo indica uma planta presumivelmente hemezigota e o círculo azul indica uma planta presumivelmente homozigota.

As sementes das plantas  $T_3$  autopolinizadas foram coletadas (sementes  $T_4$ ), esterilizadas, e crecidas em meio MS com antibiótico de seleção e após 2 semanas o padrão de segregação foi avaliado. Se estas possuíam genótipo R/\_ houve uma segregação nesta geração, ao contrário das plantas com genótipo R/R que não segregaram e foram então selecionadas (2 a 3 linhagens de cada construção) para os experimentos de caracterização funcional (sementes  $T_3$ ). O processo de transformação de *Arabidopsis thaliana* e obtenção de sementes homozigotas leva no mínimo 9 meses (Figura 3).



Figura 3 - Esquema representando a transformação e seleção de plantas transgênicas de Arabidopsis thaliana com Agrobacterium tumefaciens (T= linhagem transgênica, E= evento). As plantas transformadas representam a geração T<sub>0</sub>, as sementes destas plantas dão origem às diferentes linhagens chamadas de T<sub>1</sub>, essas dão origem às plantas T<sub>2</sub> e assim por diante. Placas com plântulas T<sub>2</sub> que não germinaram em meio seletivo ou apresentaram crescimento e/ou desenvolvimento abnormal foram descartadas. Nas placas contendo as plântulas T<sub>3</sub> é possível realizar a seleção de homozigotos, sementes de plantas que não apresentaram segregação foram descartadas. Placas contendo plântulas T<sub>4</sub> foram utilizadas para confirmação do genótipo das plantas selecionadas para homozigose (R/R). Segregantes foram descartados (R/\_). A linha azul na lateral direita representa o tempo mínimo necessário para cada etapa do processo, totalizando 9 meses para obtenção de linhagens homozigotas.

#### 3.11 Expressão dos AMTs nos eventos de transgenia de Arabidopsis thaliana

A análise da progênie e o estudo da segregação são fundamentais para demonstrar a estabilidade da expressão dos genes introduzidos. Porém, é necessário análise molecular para comprovar a integração do DNA exógeno no genoma de arabidopsis e a expressão do gene, assim 30 plantas de cada evento de transformação foram coletadas das placas de seleção de homozigotos positivas (T<sub>4</sub>) e congeladas imediatamente em N líquido para posterior maceração, extração de DNA por meio do protocolo CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987) e confirmação por PCR (descrito na seção 3.8) de acordo com os produtos esperados das construções, Pro1*ScAMT2;1:GFP*. Pro1*ScAMT2;1:GUS*, Pro2*ScAMT2;1:GFP*. Pro2*ScAMT2;1:GUS*, Pro*ScAMT3;3A:GFP* e Pro*ScAMT3;3A:GUS*.

Linhas independentes podem se comportar de maneiras diferentes devido ao efeito de posição de inserção do transgene (WILSON et al., 1990), refletindo a influência da cromatina ao redor no nível de produção da proteína. Portanto, existe a necessidade de caracterizar as linhas transgênicas homozigotas, para a seleção daquelas que mais expressam o gene de interesse para serem utilizadas nos experimentos de caracterização funcional.

Todas as linhas homozigotas (4 a 6) de cada promotor fusionado a genes repórteres em 'Col 0', foram avaliadas fenotipicamente e 3 destas foram selecionadas para experimentos de localização da expressão dos genes estudados. Assim, os transgênicos com as construções das regiões regulatórias foram confirmados por PCR e por ensaios experimentais. Já para as construções 35S:*ScAMT2;1*, 35S:*ScAMT3;3A*, Pro2*ScAMT2;1:ScAMT2;1* transformadas em 'Col-0' e *qko*, foram coletadas 30 plantas de cada evento de transformação das placas de seleção de homozigotos positivos (T<sub>4</sub>), em duplicatas e estas foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido para posterior maceração, extração do RNA total e síntese se cDNA, a confirmação da transgenia e avaliação da expressão gênica foram realizadas por meio de análise quantitativa de transcritos reversos (RT-q-PCR).

### 3.11.1 Extração de RNA total de arabidopsis

Plantas de arabidopsis foram maceradas manualmente em N líquido em tubos de 1,5 mL, nos quais adicionou-se 750  $\mu$ L de Trizol (Thermo Fischer Scientific), e estes foram vortexados e incubados à temperatura ambiente por 5 min e em seguida centrifugados a 4 °C por 15 min a 9000 rcf. O sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo onde se

adicionou 200  $\mu$ L de CIA (24:1). Os tubos foram agitados e incubados à temperatura ambiente por 5 mim sendo em seguida centrifugados a 4 °C por 15 min a 9000 rcf. Coletou-se a fase aquosa em um novo tubo, onde foi adicionado 500  $\mu$ L de isopropanol. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 15 min sendo posteriormente centrifugadas a 4 °C por 10 min a 9000 rcf. 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 rcf. Depois de seco, o RNA foi eluído em 15  $\mu$ L de água 0,01% DEPC autoclavada, e armazenado a -80 °C.

#### 3.11.2 Síntese de cDNA de arabidopsis e análise de transcritos reversos

O RNA total foi quantificado em NanoDrop (Thermo Scientific) e sua integridade visualizada em gel TAE de 1% agarose corado com SYBR Gold (Thermo Scientific) sob luz ultravioleta. Após a quantificação, cerca de 2  $\mu$ g do RNA de cada amostra foi tratado empregando 1 U de DNAse I (Thermo Scientific) em tampão apropriado, 2 U de RNaseOUT (Thermo Fischer Scientific) e água ultrapura Milli-Q 0,01% DEPC inativa, em reação incubada a 37 °C por 30 min. A reação foi interrompida com a adição de EDTA, e incubada a 65 °C por 10 min. Amostras de 1  $\mu$ g de RNA total tratado foram transferidas para novos tubos com 1  $\mu$ L de oligodT (50 mM) e 1  $\mu$ L de dNTP (1 mM) e estas amostras foram desnaturadas a 65 °C por 5 min, seguido da adição de 4  $\mu$ L de tampão 5X *Reaction*, 40 U de RNAseOUT (Thermo Fischer Scientific) e 200 U da enzima RevertAid *Reverse Transcriptase* (Thermo Fischer Scientific). A reação foi então incubada a 50 °C por 30 min, seguida de incubação a 85 °C por 5 min. O cDNA foi diluído em água ultrapura Milli-Q estéril 1:10 para as análises de transcritos. Para as análises de expressão gênica, (método descrito em 3.2) foi utilizado o gene *ScUbiq2* como referência e *primers* específicos para os genes *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* (Tabela 8).

**Tabela 8** - Sequências de iniciadores relativos aos genes que codificam proteínas transportadoras de amônio em arabidopsis e o gene de referência *Ubiquitina*, utilizados para análise quantitativa de transcritos reversos.

| Nome          | Sequência dos primers   | Amplicon |  |
|---------------|-------------------------|----------|--|
| ScAMT2;1 For  | TGCTGGTGTGGGTGCTGGT     | 200 pb   |  |
| ScAMT2;1 Rev  | GGCGAACTCGAACTGGAA      | 200 pb   |  |
| ScAMT3;3A For | AACGCCGCTATGTCTGCTCT    | 216 nh   |  |
| ScAMT3;3A Rev | ATGAAGGTGGACGACACGCT    | 240 pb   |  |
| AtUbiq2 For   | CCAAGATCCAGGACAAAGAAGGA | 222 mh   |  |
| AtUbiq2 Rev   | TGGAGACGAGCATAACACTTGC  | 222 pb   |  |

#### 3.12 Localização tecido/célula dos AMTs de cana-de-açúcar em arabidopsis

Sementes das plantas homozigotas para as construções Pro1ScAMT2;1:GUS, Pro1ScAMT2;1:GFP, Pro2ScAMT2;1:GUS, Pro2ScAMT2;1:GFP *e* ProScAMT3;3A:GUS, Pro2ScAMT3;3A:GFP foram esterilizadas e germinadas *in vitro* em meio MS com ½ da concentração original de sais, contendo 1 mM de  $NH_4NO_3$ . Após 4 d de vernalização a 4 °C, as placas foram colocadas na posição vertical em sala de luz a 25 °C e fotofase de 16 h luz com intensidade luminosa de 100 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> para germinação das sementes. Após 3 d da germinação, as plântulas foram transferidas para placas contendo MS ½ concentração de sais modificado, com ausência ou presença de diferentes fontes de N e 5 mM MES pH 5,8, sendo que as soluções de MES e de fonte de nitrogênio foram feitas separadamente, esterilizadas por filtro de acetato de celulose de 0.2 µm em capela de fluxo laminar e só então foram adicionadas à solução com os outros reagentes, previamente autoclavada por 20 min a 120 °C.

Os tratamentos foram os seguintes: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (1 mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), -N (sem nitrogênio) e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (2 mM NH<sub>4</sub>Cl). Após 1, 3 e 5 e 10 dias de tratamento, as plantas contendo os promotores fusionados ao gene *uidA GUS (β-Glucuronidase*) foram transferidas para o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-glucuranídeo (X-Gluc; Jersey Lab and Glove Supply, Livingston, NJ, EUA). Para a confecção do tampão *GUS*, 25 mg de X-Gluc foi dissolvido em 2,5 ml de metanol e adicionado a seguinte solução: 25 mL de tampão citrato HCl pH 7,0 (0,1 M citrato de sódio, 0,2 M ácido clorídrico com pH 7,0), 500 µL de ferrocianeto de potásio (0,1 M), 500 µL de ferricianeto de potásio (0,1 M), 250 µL de Triton X-100 (10%) completos para 50 mL com água ultrapura Milli-Q estéril.

As plantas de arabidopsis foram incubadas nessa solução a 37 °C por 4 h 30 min, lavadas em etanol 70% por 1 h. Essas amostras vegetais, juntamente com com arabidopsis contendo os promotores fusionados ao gene repórter *GFP* 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.

### 3.13 Análise fenotípica dos transgênicos de arabidopsis

#### 3.13.1 In vitro

Para os experimentos *in vitro*, realizados em condições laboratoriais controladas, sementes de plantas selvagens ('Col-0'), mutantes (*qko*) e plantas homozigotas contendo as construções 35S:*ScAMT2;1*, 35S:*ScAMT3;3A* ou Promotor2 *ScAMT2;1*:*ScAMT2;1* 

transformadas em 'Col-0' (1 evento) e qko (2 eventos) foram esterilizadas e submetidas a um período de vernalização a 4 °C por 4 d em placas de Petri com meio MS com 1/2 da concentração de sais, contendo como fonte de N apenas 5 mM KNO<sub>3</sub> e 5 mM MES pH 5,8, sendo que as soluções de MES e de fonte de nitrogênio foram feitas separadamente, esterilizadas por filtro de acetato de celulose de 0.2 µm em capela de fluxo laminar e só então foram adicionadas à solução autoclavada com os demais reagentes. 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<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> para germinação das sementes. Após 3 d de germinação, as plântulas foram transferidas para placas com meio MS 1/2 da concentração de sais, contendo diversas concentrações e fontes de N. Os tratamentos foram constituídos por: 3 condições de baixa concentração de N com 0,25 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,5 mM NH<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub> ou 0,5 mM de KNO<sub>3</sub>, e 3 condições de alta concentração de N com 1 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 2 mM NH<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub> ou 2 mM de KNO<sub>3</sub>, sendo os tratamentos formados apenas por NO<sub>3</sub> como fonte de N, controles objetivando a homogeneização do crescimento entre os genótipos. Estas placas foram então transferidas para uma câmara de crescimento a 22 °C com 80% de umidade e fotofase de 16 h de luz a 200 umol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em todos os experimentos in vitro.

Após 14 d de crescimento, as plantas foram coletadas e transferidas para tubos de 1,5 mL, secas em estufa a 60 °C e então a massa das linhas transgênicas e controles não transgênicos foi medida, visando uma correlação com a capacidade de absorção de amônio. Cada placa continha 3 plantas de 4 genótipos, 'Col-0' e *qko* como controles e 'Col' + construção de interesse e *qko* + construção de interesse. As três plantas de cada genótipo em cada tratamento representaram uma amostra composta, da qual tirou-se uma média e esta constituiu uma repetição. Em todos os experimentos, cada tratamento continha 6 réplicas (*n*= 6). As médias foram comparadas pelo teste Tuckey ( $p \le 0.05$ ), no programa SISVAR.

### 3.13.2 In vivo

Os experimentos *in vivo* compreenderam as análises de absorção, translocação e remobilização de amônio em sistema hidropônico através da detecção de <sup>15</sup>N e de caracterização fenotípica. Inicialmente, sementes de 'Col-0' e *qko* e as sementes de 'Col-0' e *qko* superexpressando *ScAMT2;1* ou *ScAMT3;3A* foram esterilizadas e espalhadas em placas de Petri com filtro úmido (estéreis), as quais foram vedadas e submetidas a um período de vernalização de 4 d a 4 °C para superação de dormência. Posteriormente, estas placas vedadas e protegidas da luz, foram colocadas em temperatura ambiente para a germinação e

estiolamento das plântulas, e após 3 d as placas foram transferidas para sala de luz a 25 °C, com fotofase de 16 h luz sob intensidade luminosa de 100  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, onde permaneceram por mais 3 d. As plantas foram então transferidas para sistema hidropônico em câmara de crescimento a 22 °C com 80% de umidade e fotofase 10 h de luz a 200  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa.

O sistema de hidroponia utilizado foi constituído por tubos de 1,5 mL, cortados trasnversalmente para permitir o crescimento das raízes, com lã de vidro para sustentação inicial das plantas, encaixados em isopor e posicionados em potes plásticos de 2 L com solução nutritiva (1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 250 µM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 250 µM CaCl<sub>2</sub>, 100 µM Na-Fe-EDTA, 50 µM KCl, 50 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 µM MnSO<sub>4</sub>, 1 µM ZnSO<sub>4</sub>, 1 µM CuSO<sub>4</sub> e 1 µM NaMoO<sub>4</sub>, pH ajustado para 5,8 utilizando solução de 1 mM KOH) (LOQUÉ et al., 2006) e com sistema de aeração (Figura 4). As plantas foram cultivadas por 45 d em concentração de 2 mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> para o experimento de absorção. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em todos os experimentos *in vivo*, e as médias foram comparadas pelo teste-t a 1% e 5% de probabilidade, no programa SISVAR (FERREIRA, 2011).



Figura 4- Sistema de hidroponia para avaliar o envolvimento dos genes AMTs de cana-de-açúcar estudados em processos de absorção, translocação e remobilização de amônio. O sistema é constituído de placas de isopor posicionados em potes plásticos de 2 L contendo tubos de 1,5 mL cortados transversalmente para permitir o crescimento das raízes, e lã de vidro para sustentação inicial das plantas.

Para o experimento de influxo rápido, os genótipos testados foram 'Col-0', *qko*, 'Col-0' + 35S:*ScAMT2*;1#g2, *qko* +35S:*ScAMT2*;1#G1 e *qko* + 35S:*ScAMT3*;3A#H3, onde os eventos com letras minúsculas indicam transformação no *background* selvagem de arabidopsis, já os eventos de transformantes do mutante são representados por letras maiúsculas. As plantas foram submetidas a tratamento de deficiência de N (sem adição de N, -N) e tratamento de suficiência de N (0,2 mM de NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, +N) por 5 d. Após a imposição dos tratamentos, as raízes das plantas foram lavadas em solução de 1 mM CaSO<sub>4</sub> para eliminar o excesso de amônio apoplástico (LOQUÉ et al., 2006) e em seguida, foram transferidas para 100 mL de solução nutritiva contendo 0,2 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enriquecido com 60% de <sup>15</sup>N-amônio por 10 min, e lavadas novamente em 1 mM CaSO<sub>4</sub>. As raízes foram então cortadas, transferidas para tubos de 1,5 mL e estes foram colocados em estufa a 60 °C para secagem do material vegetal.

A análise do envolvimento dos *AMTs* estudados em funções na parte aérea da planta, foi realizada primeiramente através da fenotipagem das arabidopsis dos genótipos 'Col-0', *qko*, *qko* +35S:*ScAMT2*; *1*#G1 e *qko* + 35S:*ScAMT3*; *3A*#H3 *qko* + 35S:*ScAMT3*; *3A*#H7 crescidas por 45 d em concentração de 2 mM de KNO<sub>3</sub> e submetidas a 13 d de deficiência de nitrogênio (-N). Três rosetas foram fotodocumentadas, assim como folhas individualmente destacadas da roseta representativa do aspecto médio das seis réplicas de plantas (n = 6) de um determinado genótipo, quanto aos sinais de stress relacionados à falta de nitrogênio. Após esta verificação, experimentos específicos para as funções de translocação e remobilização envolvendo o isótopo estável <sup>15</sup>N, foram desenvolvidos com os mesmos genótipos.

No estudo do processo de translocação do amônio das raízes para a parte aérea, as plantas foram submetidas a tratamento de deficiência de N (sem adição de N) por 5 d. Após esse período, as raízes de arabidopsis foram lavadas em solução de 1 mM CaSO<sub>4</sub>, para eliminar o excesso de amônio apoplástico, por 1 min e em seguida foram transferidas para 100 mL de solução nutritiva contendo 4 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enriquecido com 60% de <sup>15</sup>N-amônio por 1 h (LOQUÉ et al., 2006), e lavadas novamente em 1 mM CaSO<sub>4</sub> por 1 min. As raízes e a parte aérea correspondentes foram então cortadas, transferidas para tubo de 1,5 mL e estes foram colocados em estufa a 60 °C para secagem do material vegetal.

Para verificar a participação dos *AMTs* de cana-de-açúcar estudados no processo de remobilização, as plantas dos genótipos já citados foram submetidas a tratamento de ausência de N por 5 dias e após esse período a folha mais velha não senescente de cada roseta de arabidopsis recebeu 10  $\mu$ L de solução nutritiva contendo 50 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enriquecido com 60% de <sup>15</sup>N-amônio em sua superfície (FAN et al., 2009). Após 24 h as folhas velhas que receberam a solução foram coletadas, bem como um *pool* das folhas mais novas das rosetas correspondentes (Figura 5). Foram realizadas 6 réplicas por tratamento (*n*= 6) para cada genótipo em todos os experimentos.



Figura 5- À esquerda a folha mais velha não senescente da roseta de arabidopsis de um determinado genótipo recebendo 10 μL de solução nutritiva contendo 50 mM de 0,2 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enriquecido com 60% de <sup>15</sup>N-amônio em sua superfície. À direita, 24 h depois da aplicação da solução, um pool de folhas novas da roseta foi coletado assim como a folha mais velha que recebeu a solução, as quais foram transferidas para tubos 1,5 mL para a secagem do material vegetal.

Após a secagem, os materiais vegetais foram macerados e preparados para as determinações de <sup>15</sup>N em espectrômetro de massas ATLAS MAT CH4 (Alemanha) de fluxo molecular no Laboratório de Isótopos Estáveis no CENA pelo Prof. Dr. José Albertino Bendassolli.

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Identificação dos transportadores de amônio da subfamília AMT2 em biblioteca de BAC e regulação transcricional em cana-de-açúcar

Em angiospermas, os transportadores de amônio são separados em duas subfamílias chamadas AMT1 e AMT2, sendo que a função fisiológica de membros de AMT2 permanece pouco estudada (SIMON-ROSIN et al., 2003; NEUHÄUSER et al., 2009). Para melhor compreensão dos genes codificadores de proteínas transportadoras de amônio da subfamília AMT2 de plantas, foi realizada a identificação de genes *AMTs* em cana-de-açúcar. A seleção na biblioteca de BAC de cana-de-açúcar (cultivar 'R570') no Laboratório *Genomes and Transposable Elements* do IB/USP da Prof<sup>a</sup>. Marie Anne van Sluys do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB/USP), em colaboração com a Prof<sup>a</sup>. Nathalia de Setta da Universidade Federal do ABC (UFABC), permitiu identificar 18 BACs contendo sequências de genes *AMTs*. Com base nos alinhamentos dessas sequências com *AMTs* de outras monocotiledôneas como arroz, milho e sorgo, foram classificados 2 genes (5 BACs) da subfamília AMT1: *ScAMT1;1* e *ScAMT1;3* e 7 genes (13 BACs) da subfamília AMT2: *ScAMT2;1, ScAMT3;1, ScAMT3;2, ScAMT3;3A, ScAMT3;3B* e *ScAMT4* (Figura 6).

Estudos filogenéticos demonstram que uma duplicação gerou as subfamílias de AMTs durante o processo de evolução, ocorrendo antes da divergência entre monocotiledôneas e dicotiledôneas, e dando origem a grupos evolucionariamente e funcionalmente distintos (MCDONALD et al., 2012; WITTGENSTEIN et al., 2014). Arabidopsis, álamo e soja possuem de 5 a 6 representantes de genes AMT1 (SOHLENKAMP et al., 2000; COUTURIER et al., 2007; KOEGEL et al., 2013; KOBAE et al., 2010), número maior do que o encontrado em sorgo (2 genes; KOEGEL et al., 2013), milho (3 genes; KOEGEL et al., 2013) arroz (3 genes; BAO-ZHEN et al., 2009) e cana-de-açúcar (2 genes), indicando uma diferença organizacional entre monocotiledôneas e dicotiledôneas quanto ao número de membros dessa subfamília (COUTURIER et al., 2007; KOEGEL et al., 2007; KOEGEL et al., 2013). Em particular para a subfamília AMT2, o genoma de cana-de-açúcar apresenta 7 membros demonstrando uma diversidade de representantes. Genes *AMT2* também foram identificados em outras espécies como *Oryza sativa* (9 genes), *Sorghum bicolor* (6 genes), *Zea mays* (4 genes), *Setaria italic* (6 genes), *Glycine max* (10 genes), *Populus trichocarpa* (8 genes),

*Prunus persica* (4 genes), *Solanum lycopersium* (1 gene), *Arabidopsis thaliana* (1 gene), entre outras espécies.

Análises filogenéticas recentes para identificação de sequências de AMT2 em embriófitas, demonstram que em angiospermas a subfamília AMT2 divide-se em dois supergrupos, denominados A e B. No supergrupo A existem três grupos: A1, A2 e A3. O grupo A1 está presente em monocotiledôneas e eudicotiledôneas, sendo representado pelos membros AMT2;1 e AMT2;2. Para o grupo A2, representado por sequências de AMT3;1, o número de genes é variável em monocotiledôneas, enquanto em eudicotiledôneas existe apenas um membro desse grupo, como para *Populus trichocarpa (PtAMT3;1)*, ou nenhum membro, como o caso de *Arabidopsis thaliana*. Já o grupo A3 está presente apenas em monocotiledôneas, compreendendo os membros AMT3;2 e AMT3;3 (WITTGENSTEIN et al., 2014). De acordo com essa classificação, cana-de-açúcar possui 2 membros para o grupo A1, 1 para o grupo A2 e 3 para o grupo A3 (Figura 6). O supergrupo B compreende as sequências de AMT4 da subfamília AMT2 (WITTGENSTEIN et al., 2014), sendo que, em cana-de-açúcar existe 1 membro identificado nesse trabalho (Figura 6).

Assim, os supergrupos A e B estão presentes em angiospermas; porém as sequências de AMT2 em briófitas são intermediárias aos dois supergrupos. Isso sugere que um ancestral comum entre briófitas e angiospermas possuíam duas cópias de AMT2 no genoma, sendo que uma cópia foi perdida em briófitas (WITTGENSTEIN et al., 2014). No genoma de algas verdes foram identificadas sequências similares a AMT2 somente em Chlorophyta, especificamente na ordem Mamiellales; no entanto, essas diferem substancialmente de sequências de AMT2 de plantas terrestres (embriófitas), indicando um processo evolutivo distinto (MCDONALD et al., 2010; MCDONALD et al., 2012). A comparação direta com sequências de AMT2 de procariotos (denominadas MEPa) sugerem que AMT2 de plantas terrestres possuem origem comum a sequência de Archaea, possivelmente adquirida através da transferência horizontal de genes, enquanto um outro processo de transferência horizontal de genes de bactéria seria responsável pelo surgimento de AMT2 em Mamiellales (MCDONALD et al., 2012). Isso indica que AMT2 de plantas terrestres possuem origem a partir de um único ancestral, e portanto, os supergrupos A e B de AMT2 divergiram em angiospermas, possivelmente para cumprir funções distintas no transporte de amônio. Portanto, compreender a funcionalidade e as características dos membros dos supergrupos A e B em angiospermas pode ser relevante para obter uma melhor compreensão do processo evolutivo de genes AMTs em angiospermas (MCDONALD et al., 2012; WITTGENSTEIN et al., 2014).



Figura 6. Árvore filogenética dos AMTs formada por sequências identificadas nos BACs (círculos vermelhos cheios), sequências provenientes da análise de sequenciamento de RNA de alta performance ('SP80-3280') (círculos vermelhos vazios), juntamente com sequências de arroz (OsAMT), milho (ZmAMT) e sorgo (SbAMT), gerada pelo programa MEGA 6.0 empregando máxima parcimônia. Os números de acesso para os AMTs estão indicados juntamente com o nome das proteínas na figura. Em destaque está o agrupamento da subfamília de transportadores de amônio AMT2 e os supergrpos (A e B).

Os genes ScAMT1;1 e ScAMT1;3 da subfamília AMT1 foram caracterizados funcionalmente (VITTI, 2015). Dentre os 7 membros de AMT2 encontrados em cana-deaçúcar, o gene ScAMT2;1 (grupo A1) e o gene ScAMT3;3A (grupo A3) foram selecionados para caracterização funcional no presente trabalho, já que apresentaram níveis de expressão significativos e regulação diferenciada em distintos órgãos desta monocotiledônea. A análise quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) objetivando verificar a expressão basal desses genes, demonstrou que há expressão de ambos os AMT2 em todos os órgãos avaliados. ScAMT2;1 é predominantemente expresso em raízes, seguido de folhas maduras (folha +3) e menos expresso em folhas jovens (folha +1) e colmos (Figura 7A). Portanto ScAMT2;1 está presente em maior quantidade na raiz, sendo aproximadamente 1,2 vezes mais expresso do que o gene ScAMT3;3A neste órgão (Figura 7). ScAMT3;3A é fortemente expresso na parte aérea, com maior acúmulo em folhas maduras (folha +3) e em comparação com ScAMT2;1, exibe aproximadamente 7,5 vezes mais transcritos em colmo, 80 vezes em folha +1 e 39 vezes em folha +3 (Figura 7B). Esses resultados sugerem que possivelmente ScAMT2;1 e ScAMT3;3A posuem funções fisiológicas distintas no transporte de amônio em cana-deaçúcar, sendo que ScAMT2;1 é predominantemente expresso em raízes e ScAMT3;3A na parte área desta gramínea.

Padrões similares foram encontrados para AMT2;1 de *Arabidopsis thaliana* (SOHLENKAMP et al., 2002), *Oryza sativa* (SUENAGA et al., 2003), *Lotus japonicus* (SIMON-ROSIN et al., 2003) e *Sorghum bicolor* (KOEGEL et al., 2013), apresentando expressão em todos os órgãos. Em *Pyrus betulaefolia*, um tipo de pêra nativa da China, o homólogo *PbAMT2* foi expresso em todos os órgãos, com nível de transcrição mais alto para raízes (LI et al., 2015), corroborando os dados de ScAMT2;1 de cana-de-açúcar; no entanto, *PtAMT2;1* de *Populus trichocarpa* possui expressão exclusiva em raízes (COUTURIER et al., 2007).

Comparativamente a *ScAMT3;3A* de cana-de-açúcar, um padrão similar foi observado no subgrupo 3 em *Oryza sativa* onde o maior acúmulo de transcritos de *OsAMT3;2* e *OsAMT3;3* ocorre na parte aérea de arroz (GAUR et al., 2012). No entanto, em *Pyrus betulaefolia*, transcritos de *PbAMT3* foram encontrados exclusivamente na parte aérea das plantas (LI et al., 2015). Em sorgo, de modo geral, *SbAMT3;3* apresentou maior acúmulo nos tecidos estudados em relação a *SbAMT2;1* (raiz, parte aérea, haste, pistilos e estames; KOEGEL et al., 2013), o que está de acordo com os resultados obtidos para *ScAMT3;3A*.



Figura 7 – Análise quantitativa de transcritos reversos de ScAMT2;1(A) e ScAMT3;3A (B) em raízes, colmos e folhas +1 e +3 de cana-de-açúcar cultivada em condição de suficiência de N (0d e +N; 5 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), para identificar o nível de expressão basal destes genes. Barras indicam ±SE, n= 4 réplicas biológicas por tempo amostrado.

Como organismos sésseis, plantas desenvolveram um complexo mecanismo que atua como sensor e desencadeia uma série de respostas mediante às variações de N no solo (REMANS et al., 2006; LIMA et al., 2010). Essas adaptações 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., 2000b; 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., 2000b; GAUR et al., 2012), portanto, a localização e distribuição espacial da expressão dos *AMTs* é importante para compreensão da função fisiológica desses genes em cana-de-açúcar.

A exposição a condições contrastantes de disponibilidade de N por longos períodos leva à alteração do *status* (condição de disponibilidade) de N nos diversos órgãos/tecidos da planta (LOQUÉ; VON WIRÉN, 2004). Assim, com o objetivo de caracterizar a regulação dos genes codificadores de amônio da subfamília AMT2 de acordo com o *status* de N na planta, o perfil transcricional de *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* foi analisado em tecidos de raízes, colmos, folhas recém expandidas (+1) e folhas maduras (+3) de plantas de cana-de-açúcar submetida a condições de suficiência (+N, 5mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) ou deficiência de N (-N, sem adição de N), após 1, 5 e 10 d em tratamento.

A análise do perfil de expressão do gene *ScAMT2;1* em raízes não identificou um padrão de regulação temporal, entretanto, a expressão desse gene foi reduzida pela metade após 5 d de deficiência de N (Figura 8A). Em contraste, em plantas submetidas à suficiência de N por 5 d, *ScAMT2;1* foi induzido de forma transiente em 2,5 vezes (Figura 8A). Apesar disso, *ScAMT2;1* é fracamente regulado pela alteração do *status* de N em raízes.

Para *ScAMT3;3A*, um padrão diferencial de expressão foi encontrado em raízes de cana-de-açúcar, demonstrando de modo geral uma indução progressiva no acúmulo de transcritos em ambas as condições de cultivo (+N e -N) (Figura 8B), com exceção para raízes de plantas submetidas à deficiência de N por 5 d, onde o acúmulo de *ScAMT3;3A* foi 2,6 vezes menor do que a expressão basal. A diferença mais significativa de níveis de transcritos de *ScAMT3;3A* em relação à regulação temporal foi constatada em 10 d, no qual houve produção de cerca de 3,5 vezes mais transcritos em plantas sob suficiência de N em relação ao início do tratamento (0 d) (Figura 8B).

Quanto ao fator disponibilidade de N, a ausência deste nutriente induziu a expressão de *ScAMT3;3A* em cerca de 1,4 vezes após 1 e 10 d de tratamento, enquanto uma queda de 2,6 vezes foi detectada após 5 d em relação ao nível de expressão encontrada em raízes de plantas sob suficiência de N (Figura 8B). Levando-se em consideração os dados apresentados, pode-se concluir que *ScAMT3;3A* é regulado tanto temporalmente quanto pelo *status* de N na planta, sendo no geral, induzido progressivamente em raízes.

Análises de ortólogos a AMT2 sugerem uma regulação distinta de acordo com a espécie. Em álamo, *PtrAMT2;1* não é responsivo à regulação por N (COUTURIER et al., 2007), no entanto, análises de microarranjo de cDNA de arroz detectaram regulação da expressão de *OsAMTs* de acordo com a fonte e disponibilidade de N; maior acúmulo de *OsATM2;1* foi encontrado em raízes de arroz submetidas à deficiência deste nutriente (BAO-ZHEN et al., 2009), e *OsAMT3;3* apresentou alta indução em raízes ressuplementadas com amônio ou nitrato, e sob -N (BAO-ZHEN et al., 2009). Análise de genótipos de arroz

contrastantes para a absorção de nitrogênio apresentam diferentes respostas de expressão do gene *OsAMT2;1* e uma indução de *OsAMT3;3* em raízes submetidas a amônio (GAUR et al., 2012). Em raízes de arabidopsis, *AtAMT2;1* é induzido sob deficiência de N e é fracamente reprimido quando ressuplementado com altas concentrações de nitrato de amônio (SOHLENKAMP et al., 2002; YUAN et al., 2007).



**Figura 8** –Análise quantitativa de transcritos reversos de *ScAMT2;1*(**A**) e *ScAMT3;3A* (**B**) em raízes de cana-de-açúcar submetida à deficiência de N (-N) ou a alto N (+N; 5 mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) nos períodos de 0, 1, 5 e 10 d sob tratamento. Barras indicam  $\pm$ SE, *n*= 4 réplicas biológicas por tempo amostrado.

Devido à importância da interação entre o metabolismo de C e N nessa gramínea, envolvendo diversos órgãos da planta, análises quantitativas de transcritos reversos para os genes *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* sob influência do tempo e da disponibilidade de N foram realizadas em colmos de cana-de-açúcar. *ScAMT2;1* foi induzido cerca de 1,9 vezes em colmos de plantas submetidas a deficiência de N após 1d de tratamento mantendo-se sem alterações significativas até 10 d (Figura 9A). Em colmos de plantas cultivadas em suficiência de N, o nível de expressão de *ScAMT2;1* não se alterou após 1 d, e aumentou em torno de 2,2 vezes depois de 5 e 10 d (Figura 9A). Com base nesses resultados, é possível inferir que *ScAMT2;1* é fracamente afetado pela variação no *status* de N em colmos de cana-de-açúcar, sendo que apenas com 5 d de deficiência de N houve uma redução no acúmulo de transcritos desse gene (Figura 9A).

O gene *ScAMT3;3A* apresentou um perfil de expressão em colmos de cana-de-açúcar com indução progressiva no acúmulo de transcritos até 10 d independente do tratamento de N (Figura 9B), sendo cerca de 2, 2,7 e 3,2 vezes maior após 1, 5 e 10 d respectivamente. Assim, pode-se concluir que o desenvolvimento da cana-de-açúcar é o principal fator na regulação de *ScAMT3;3A* no colmo, sendo que sua expressão nesse órgão não é controlada pelo *status* de N. Esses resultados sugerem uma participação importante de ScAMT3;3A na regulação da homeostase em colmo de cana-de-açúcar.



<u>Colmos</u>

Figura 9 – Análise quantitativa de transcritos reversos de ScAMT2;1(A) e ScAMT3;3A (B) em colmos de cana-de-açúcar submetida à deficiência de N (-N) ou a alto N (+N; 5 mM de NH4NO3) nos períodos de 0, 1, 5 e 10 d sob tratamento. Barras indicam ±SE, n= 4 réplicas biológicas por tempo amostrado.

A limitação na disponibilidade de N no solo leva a menor aquisição de N pela planta, causando efeitos drásticos na produção de biomassa e produtividade devido à redução metabólica em vários órgãos (KRAPP et al., 2011). Em condições de baixa disponibilidade de N, as plantas evoluíram a habilidade de regular, além do transporte de N em raízes, o processo de remobilização de N a partir de órgãos fonte. Durante o processo de remobilização, o N assimilado em biomoléculas é liberado na forma de amônio por reações metabólicas presente em processos fisiológicos, como fotorrespiração, biossíntese de fenilpropanóides e remobilização de reservas celulares (XU et al., 2012). Nesse contexto, o processo de transporte de amônio entre células, tecidos ou órgãos é mediado por proteínas AMTs (LOQUÉ et al., 2004; XU et al., 2012), comprovando, portanto, a relevância de verificar se ScAMT2;1 ou ScAMT3;3A estão envolvidos em processos de transporte de amônio na parte aérea de cana-de-açúcar.

O nível de transcritos de *ScAMT2;1* em folhas jovens (+1) não foi alterado de acordo com o tempo nem com a variação no *status* de N (Figura 10A). Já em folhas maduras (+3), houve uma indução de cerca de 2,3 vezes no acúmulo de transcritos de *ScAMT2;1* em relação ao nível basal após 1 d, mantendo-se sem alterações significativas nos subsequentes períodos avaliados (Figura 10C). Em plantas cultivadas em suficiência de N, *ScAMT2;1* foi induzido tardiamente em folhas maduras, após 10 d em cerca de 1,8 vezes, enquanto a deficiência de N levou a um acúmulo de aproximadamente 2,7 e de 3,9 vezes, após 1 e 5 d respectivamente. (Figura 10C). Considerando esses resultados, é possível inferir que *ScAMT2;1* é regulado temporalmente e de acordo com a disponibilidade de N apenas em folhas maduras de cana-de-açúcar.

Com o perfil de transcritos do gene *ScAMT3;3A* em folhas jovens, observou-se redução no acúmulo de transcritos ao longo dos períodos avaliados, porém, a variação da disponibilidade de N não afetou a regulação de *ScAMT3;3A* (Figura 10B). Em folhas maduras, *ScAMT3;3A* foi induzido 2,2 vezes após 1 d de tratamento de deficiência de N, nível que se manteve até 10 d (Figura 10D). Folhas maduras de plantas sob suficiência de N acumularam 1,9 vezes mais transcritos após 1 d de tratamento, retornando ao nível basal de expressão em 5 d, seguido de nova indução de 1,72 vezes no período de 10 d. Pela observação dos dados analisados, é possível inferir que *ScAMT3;3A* é induzido por deficiência de N em folhas maduras, mas não em folhas jovens (Figura 10C e D).

Levando-se em consideração os resultados expostos, conclui-se que ambos os genes de cana-de-açúcar apresentam regulação sob deficiência de N apenas em folhas maduras, o que pode indicar a importância de ScAMT2;1 e ScAMT3;3A durante o processo de remobilização

de N nessa monocotiledônea. Cabe ressaltar, que *ScAMT3;3A* apresenta cerca de 39 vezes mais transcritos do que *ScAMT2;1* em folhas maduras de cana-de-açúcar, indicando uma função primordial desse gene no transporte de amônio nesse órgão.



Figura 10 – Análise quantitativa de transcritos reversos de ScAMT2;1(A e C) e ScAMT3;3A (B e D) em folhas jovens (+1) e maduras (+3) de cana-de-açúcar submetida à deficiência de N (-N) ou a alto N (+N; 5 mM de NH4NO3) nos períodos de 0, 1, 5 e 10 d sob tratamento. Barras indicam ±SE, n= 4 réplicas biológicas por tempo amostrado.

O gene *OsAMT3;3A* é diferencialmente regulado na parte aérea de dois genótipos de arroz contrastantes para a absorção de nitrogênio (GAUR et al., 2012), sendo também regulado nesse órgão na presença de nitrato (BAO-ZHEN et al., 2009). A expressão de *PbAMT3* em folhas de *P. betulaefolia* também foi sujeita à regulação pelo suprimento de N, com repressão de transcritos sob condições de deficiência de N e indução da expressão em condições de suficiência e ressuprimento de  $NH_4^+$  (LI et al., 2015). Em cana-de-açúcar, a indução significativa da expressão de *ScAMT3;3A* em folhas maduras durante a deficiência de N sugere uma função importante desta proteína na homeostase de N nesse órgão, sendo provável que esteja envolvido no processo de remobilização de N ou atuando no transporte de amônio proveniente da translocação do xilema.

Em resumo, o padrão diferencial de expressão dos dois membros da subfamília AMT2 indica a participação desses transportadores em processos fisiológicos distintos, os quais requerem uma regulação fina do transporte de amônio em raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar. Para melhor compreensão da função fisiológica de ScAMT2;1 e ScAMT3;3A, foram realizados estudos funcionais dessas proteínas através de experimentos de expressão heteróloga em levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e planta (*Arabidospis thaliana*), defectivos no transporte de amônio.

# 4.2 Caracterização *in silico* de *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* identificados em biblioteca de BAC de cana-de-açúcar

Detectaram-se cinco BACs contendo sequências gênicas para o transportador de amônio *ScAMT2;1* (032\_A12, 038\_G02, 118\_C18, 216\_D16 e 235\_F05) e dois BACs contendo sequências para *ScAMT3;3A* (023\_O13 e 178\_C24). Esses BACs foram sequenciados integralmente pelo grupo da Prof<sup>a</sup>. Marie Anne van Sluys e a presença das sequências de *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* foi confirmada. Considerando o caráter poliplóide e redundante do genoma de cana-de-açúcar (GARSMEUR et al., 2010; WANG et al., 2010) foi realizada uma série de análises *in silico* com as diversas sequências promotoras e gênicas de *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* dos BACs identificados para cada um dos genes, com o propósito de selecionar os alvos para a caracterização funcional.

O primeiro passo para a comparação dos BACs foi o mapeamento dos genes adjacentes aos *AMT2* alvos identificados nos BACs, através de anotação dos genes e elementos móveis circundantes aos genes *AMT2*, com a perspectiva de verificar se as sequências gênicas encontradas eram alelos e detectar a presença de elementos transponíveis (TEs) na região regulatória. O DNA repetitivo está presente em todos os organismos vivos, podendo representar mais de 50% do DNA nuclear em gramíneas, portanto, a avaliação da presença e contribuição dos TEs é essencial para o entendimento da genômica de cana-de-açúcar (ROSSI et al., 2001).

Com o mapeamento das sequências de DNA de cana-de-açúcar completas presentes em quatro BACs encontrados para *ScAMT2;1*, pode-se constatar a presença de retrotranposons, em sua maioria alocados em regiões intergênicas, mas há casos de sobreposições às regiões codantes, como o de *ScAMT2;1*. O BAC 032\_A12 foi identificado tardiamente e a anotação to DNA total não foi realizada, assim este não foi incluído nestas análises. Os BACs 038\_G02 e 118\_C18 apresentam o transposon de longas repetições terminais (LTR) 2 e os BACs 216\_D16 e 235\_F05 possuem o LTR-transposon 1 e 3 respectivamente, na região 3' de suas sequências codantes de *ScAMT2;1*, estando estes em orientação contrária ao gene alvo (Figura 11). As excisões parciais dos elementos móveis podem alterar a sequência original da região, produzindo pequenas deleções, inversões e introduções de DNA randômico para preencher a região, gerando assim variações alélicas vinculadas à excisão dos elementos (FESCHOTTE; PRITHAM 2007). As implicações do flanqueamento do gene *AMT* pelos TEs apresentados, para sua regulação e funcionalidade são desconhecidas e precisam de investigações mais aprofundadas. Baseado na disposição dos genes e TEs anotados nas regiões 5` e 3` de *ScAMT2;1* dos distintos BACs é possível inferir que os BACs 216\_D16 e 235\_F05 possuem genes AMT2;1 alelos (Figura 11). Por outro lado, os BACs 038\_G02 e 118\_C18 apresentam maior similaridade na região 3' a *ScAMT2;1*, entretanto, com grandes diferenças entre genes e elementos móveis identificados (Figura 11). Com isso, essa análise sugere que possivelmente os BACs 216\_D16 e 235\_F05 possuem *ScAMT2;1* distintos dos BACs 038\_G02 e 118\_C18.



**Figura 11.** Mapa de 4 BACs de cana-de-açúcar da cultivar 'R570' (BACs 038\_G02, 118\_C18, 216\_D16 e 235\_F05) identificados para a sequência gênica *ScAMT2;1*, com suas respectivas sequências de genes identificados e hipotéticos (formas preenchidas), além de elementos móveis (formas não preenchidas).

Para o outro membro da subfamília AMT2 de cana-de-açúcar, *ScAMT3;3A*, foram identificados 2 BACs contendo esta sequência gênica: BAC 023\_013 e BAC 178\_C24. O mapeamento destes BACs demonstra uma similaridade entre as sequências na região 3' ao gene; porém a região 5' apresenta diferenças substanciais (Figura 12). Novamente, todos os elementos móveis encontrados foram classificados como retrotranposons, no entanto, nenhum sobreposto a *ScAMT3;3A*. Considerando os genes anotados na região 5' e 3' de ScAMT3;3A nos BACs 023\_013 e 178\_C24 é possível sugerir que as sequências identificadas para este gene são alélicas.



**Figura 12**. Mapa de 2 BACs identificados para a sequência gênica *ScAMT3;3A*, com suas respectivas sequências de genes identificados e hipotéticos (formas preenchidas), além de elementos móveis (formas não preenchidas).

De acordo com as anotações do mapa para BACs contendo os genes *ScAMT2;1* ou *ScAMT3;3A*, TEs presumíveis foram identificados próximos aos genes alvo (Figuras 11 e 12). Para melhor compreensão da possível existência desses TEs, as regiões regulatórias 5' à região codante dos genes *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* dos distintos BACs foram avaliadas quanto à predição de presença de TE pelo programa Censor. Para os estudos relacionados às regiões regulatórias do transportador *ScAMT2;1*, sequências de aproximadamente 3000 pb *upstream* ao códon de iniciação de transcrição (ATG) foram definidas como a sequência promotora, e para *ScAMT3;3A* um total de 2000 pb foi avaliado.

Quanto às avaliações das regiões regulatórias dos *AMTs*, nota-se entre os BACs identificados para *ScAMT2;1* uma tendência de agrupamento entre 216\_D16 e 235\_F05, previamente identificada no mapeamento do DNA total dos BACs, sendo que os outros dois BACs apresentaram maior número de diferenças entre os elementos transponíveis tanto nesta região específica quanto no DNA total do BAC. Foi possível identificar TEs nos promotores de *ScAMT2;1*, sendo em sua maioria transposons, dentre alguns retrotransposons LTR e não LTR (Figura 13). Com base nesses resultados de predição de TE em regiões regulatórias do gene *ScAMT2;1* dos distintos BACs é possível inferir que os BACs 032\_A12, 038\_G02, 216\_D16 e 235\_F05 possivelmente possuem inserções de transposons, no entanto, os parâmetros de qualidade para detecção do transposons indicam maior probabilidade da presença destes TEs no grupo formado pelos BACs 216\_D16 e 235\_F05.
Promotor BAC032\_A12

PromotorBAC235\_F05 663 702

|                    |              |       |                 |              |             |                    |                |     |               | -                 |               |
|--------------------|--------------|-------|-----------------|--------------|-------------|--------------------|----------------|-----|---------------|-------------------|---------------|
| Name               | From         | To    | Name            | From         | <u>1</u>    | 2                  | <u>Class</u>   | Dir | Sim           | Pos/Mm:Ts         | <u>Score</u>  |
| PromotorBAC032_A12 | 749          | 788   | hAT-1_PPe       | 3668         | 370         | 96                 | DNA/hAT        | d   | 0.8250        | 1.5000            | 218           |
| PromotorBAC032_A12 | 1393         | 1468  | RTE2_ZM         | 3427         | 350         | 93                 | NonLTR/RTE     | d   | 0.9610        | 99.0000           | 607           |
| PromotorBAC032_A12 | 2554         | 2745  | TSB2            | 35           | 22          | 4 D                | NA/Harbinger   | c   | 0.8063        | 1.6000            | 934           |
| romotor BAC038 G02 |              |       |                 |              |             |                    |                |     |               |                   |               |
|                    |              |       |                 |              |             |                    |                |     |               |                   |               |
|                    |              |       |                 |              |             |                    |                |     |               |                   |               |
|                    |              |       |                 |              |             |                    |                |     |               |                   |               |
| Name               | Enom         | То    | Name            | Enor         |             |                    | Class          | Die | Sim           | Pos/Mm:Ts         | Score         |
| PromotorBAC038 602 | 864          | 903   | hAT-1 PPe       | 3668         | 370         | 26                 | DNA/bAT        | d   | 0.8250        | 1,5000            | 218           |
| PromotorBAC038_602 | 1305         | 1513  | TSB1B           | 1            | 20          | 7 0                | NA/Harbinger   |     | 0.8398        | 2.0000            | 1118          |
|                    | 1000         |       | <u></u>         |              |             | <u> </u>           | and a striger  |     | 0.0000        | 210000            |               |
| Promotor BAC       | 118_         | C18   |                 |              |             |                    |                |     |               |                   |               |
|                    |              |       |                 |              |             |                    |                |     |               |                   |               |
|                    |              |       |                 |              |             |                    |                |     |               |                   |               |
|                    |              | -     |                 |              |             |                    |                |     |               |                   |               |
|                    |              |       |                 |              |             |                    | -              |     |               |                   |               |
| Name               | From         | To    | Name            | E            | rom         | To                 | <u>Class</u>   |     | <u>ir Si</u>  | m Pos/Mm:T        | s Score       |
| PromotorBAC118_C18 | 703          | 768   | LINE1-4_SB      | <u>i</u> !   | 506         | 574                | NonLTR/L1      |     | c 0.7         | 313 1.4167        | 258           |
| PromotorBAC118_C18 | 866          | 964   | hAT-9N_SB1      |              | 233         | 329                | DNA/hAT        |     | c 0.68        | 337 1.8000        | 201           |
| PromotorBAC118_C18 | 990          | 1531  | LTR-18C_0S-L    | <u>.TR</u> 1 | 476         | 2033               |                |     | c 0.6         | 2.0333            | 544           |
| PromotorBAC118_C18 | 1543         | 1910  | ENSPM4_OS       | 4            | 757         | 5063               | DNA/EnSpm/CAC  | TA  | c  0.68       | 1.7619            | 329           |
| Promotor BAG       | 216          | D16   | 6               |              |             |                    |                |     |               |                   |               |
| Tromotor Bill      |              |       | 0               |              |             |                    |                |     |               |                   |               |
|                    |              |       |                 |              |             |                    |                |     |               |                   |               |
|                    |              |       |                 |              |             |                    |                |     |               |                   |               |
|                    |              |       |                 |              |             |                    |                |     |               |                   |               |
| Name               | From         | To    | Name            |              | From        | <u>n</u> <u>To</u> | <u>Class</u>   |     | <u>)ir Si</u> | <u>m</u> Pos/Mm:T | <u>s</u> Scor |
| PromotorBAC216_D16 | 701          | 740   | hAT-1_PP        | <u>e</u>     | 3668        | 3 370              | DNA/hAT        |     | a 0.8         | 250 1.5000        | 218           |
| PromotorBAC216_D16 | 2131         | 2229  | HARB-N30        | 581          | 1           | 99                 | DNA/Harbing    | ger | a  0.9        | 1.3333            | 696           |
| PromotorBAC216_D16 | 2237         | 2344  | RLG_SCTat_2     | <u>1-I</u>   | 5257        | 1536               | C DNA (Heating |     | a 0.8         | 1.3750            | 794           |
| PromotorBAC216_D16 | 2345         | 2540  | <u>HARB-N30</u> | 501          | 94          | 29                 | o [DNA/Harbing | ger | a 10.8        | 1.2857            | 997           |
| Promotor BAG       | 7235         | F05   |                 |              |             |                    |                |     |               |                   |               |
| DAG                |              | _1.02 | ,               |              |             |                    |                |     |               |                   |               |
|                    |              |       |                 |              |             |                    |                |     |               |                   |               |
|                    |              |       |                 |              |             |                    |                |     |               |                   |               |
| iI                 |              |       |                 |              |             |                    |                |     |               |                   |               |
| Nama               | <b>F</b> nom | To    | Name            |              | <b>E</b> no |                    | Class          |     |               | m Dec/Mm          | E E con       |

 PromotorBAC235\_F05
 2093
 2191
 HARB-N30\_SBi
 1
 99
 DNA/Harbinger
 d
 0.9000
 1.3333
 696

 PromotorBAC235\_F05
 2199
 2306
 RLG\_scTat\_2\_1-1
 5257
 5365
 LTR/Gypsy
 d
 0.8899
 1.3750
 794

 PromotorBAC235\_F05
 2307
 2502
 HARB-N30\_SBi
 94
 296
 DNA/Harbinger
 d
 0.8281
 1.2857
 997

 Figura 13- Análises das regiões regulatórias de ScAMT2;1
 provenientes dos BACs para presença de

3668 3706

<u>hAT-1\_PPe</u>

DNA/hAT

d 0.8250

1.5000

218

**Figura 13**- Análises das regiões regulatórias de *ScAMT2;1* provenientes dos BACs para presença de transposons pelo programa Censor, indicando nome, classificação, direção e pontuações para similaridade de alinhamento dos elementos móveis encontrados.

Para as regiões regulatórias de *ScAMT3;3A*, constatou-se a presença de 6 elementos móveis para o BAC023\_O13 sendo 4 deles transposons clássicos e 2 retrotransposons com um representante de cada subclasse (LTR e não LTR) apresentando parâmetro de similaridade com altos valores, de 75% a 84% e alto *score* de BLAST com o banco de dados. Já para o BAC178\_C24, foram detectados 2 elementos móveis de DNA com alta similaridade (em torno de 75%) e alto *score* para um deles (Figura 14). Portanto, a partir dos dados

avaliados, pode-se propor que a região 5' regulatória de *ScAMT3;3A* do BAC023\_O13 possivelmente possui a inserção de dois transposons, enquanto no BAC178\_C24 é provável a existência de uma única inserção alterando a sequência promotora deste gene.

| Name               | From                | <u>To</u> | Name            | From  | <u>To</u> | <u>Class</u>  | <u>Dir</u> | <u>Sim</u> | Pos/Mm:Ts | <u>Score</u> |  |
|--------------------|---------------------|-----------|-----------------|-------|-----------|---------------|------------|------------|-----------|--------------|--|
| PromotorBAC023_013 | 1                   | 151       | TSB2            | 1     | 139       | DNA/Harbinger | c          | 0.8071     | 1.2778    | 673          |  |
| PromotorBAC023_013 | 247                 | 292       | <u>R4-1_CPB</u> | 3073  | 3117      | NonLTR/R4     | d          | 0.7826     | 1.2857    | 238          |  |
| PromotorBAC023_013 | 897                 | 1078      | Tourist1a_SB    | 6     | 188       | DNA/Harbinger | d          | 0.8415     | 2.0000    | 1086         |  |
| PromotorBAC023_013 | 1137                | 1343      | TSB1B           | 1     | 209       | DNA/Harbinger | d          | 0.8049     | 1.6364    | 994          |  |
| PromotorBAC023_013 | 1688                | 1755      | Polinton-1_CB   | 14532 | 14601     | DNA/Polinton  | с          | 0.7465     | 2.0000    | 229          |  |
| PromotorBAC023_013 | 1931                | 1979      | Copia-95_SB-I   | 107   | 160       | LTR/Copia     | d          | 0.7843     | 1.5000    | 200          |  |
|                    |                     |           |                 |       |           |               |            |            |           |              |  |
| Promotor BAC178_   | Promotor BAC178_C24 |           |                 |       |           |               |            |            |           |              |  |

| Promotor | BAC023 | 013 |
|----------|--------|-----|

| Name               | From | <u>To</u> | Name          | From  | To    | <u>Class</u>  | <u>Dir</u> | Sim    | Pos/Mm:Ts | Score |
|--------------------|------|-----------|---------------|-------|-------|---------------|------------|--------|-----------|-------|
| PromotorBAC178_C24 | 317  | 548       | <u>TSB1</u>   | 2     | 234   | DNA/Harbinger | c          | 0.7576 | 1.7857    | 980   |
| PromotorBAC178 C24 | 1675 | 1742      | Polinton-1 CF | 14532 | 14601 | DNA/Polinton  | C          | 0.7465 | 2,0000    | 229   |

**Figura 14-** Análises das regiões regulatórias de *ScAMT3;3A* presentes nos BACs para presença de transposons pelo programa Censor, indicando nome, classificação, direção e pontuações para similaridade de alinhamento dos elementos móveis encontrados.

Ainda com intuito de definir quais sequências gênicas e promotoras de *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* seriam alvo para a caracterização funcional, foram realizadas uma série de alinhamentos para identificar possíveis variações de nucleotídeos e aminoácidos nos distintos BACs. Para as análises das sequências gênicas de *ScAMT2;1*, foram alinhadas as sequências presentes nos *BACs* (032\_A12, 038\_G02, 118\_C18, 216\_D16 e 235\_F05) com a sequência de transcrito (comp105883\_c0\_seq13) obtida através de sequenciamento de RNA de alta performance de tecidos de cana-de-açúcar ('SP80-3280'), realizado no Laboratório de Melhoramento de Plantas CENA/USP, o que permitiu identificar polimorfismos de nucleotídeos entre as sequências gênicas alinhadas (dados não apresentados).

Foi encontrada no BAC 032\_A12 a adição de uma citosina logo no início de sua sequência (posição 106 a partir do ATG), tal diferença pode ser proveniente de possíveis erros no processo de sequenciamento deste BAC ou de uma mutação (inserção) causada ou não

pela movimentação de elementos transponíveis, que levou a uma mudança no quadro de leitura da proteína a partir do aminoácido 36, alterando todos os aminoácidos subsequentes e assim o gene (Figura 15).



Figura 15 – Alinhamento em aminoácidos das sequências gênicas traduzidas conceitualmente para ScAMT2;1. Comp105883\_c0\_seq13 se refere à sequência de transcrito obtida por meio de RNA-seq de tecidos de cana-de-açúcar ('SP80-3280'). As demais sequências foram obtidas por sequenciamento de clones de biblioteca de BAC de cana-de-açúcar (cultivar 'R570').

Dos polimorfismos de nucleotídeos encontrados entre os 4 BACs restantes para *ScAMT2;1* e o comp105883\_c0\_seq13, sete implicaram em modificações na tradução (Figura 15), e estas dividiram as sequências gênicas em dois grupos, já identificados previamente, sendo o primeiro formado pelo comp105883\_c0\_seq13, BAC 038\_G02 e BAC118\_C18 compreendendo o alelo 1, e o grupo 2 pelos BACs 216\_D16 e 235\_F05, apresentando o alelo 2. Houve uma única variação dentro do grupo 1 onde a sequência proveniente do

BAC 038\_G02 apresentou uma glutamina na posição 85 enquanto o comp105883\_c0\_seq13 e o BAC 118\_C18 traduziram uma arginina. Portanto, a sequência de nucleotídeos encontrada na análise de RNA de alta performance apresentou maior similaridade (99%) com o BAC118\_C18, o qual compreende um gene de 1473 pb, 490 aminoácidos e uma massa molecular calculada de ~53 KD (Figura 16). A presença de íntrons na estrutura gênica do BAC em questão impediu a amplificação direta desta fonte de DNA, visto que a expressão heteróloga seria feita com organismo divergente do original e o processamento do RNA heterogêneo poderia não ocorrer corretamente. Tal fato somado à complexidade do DNA de cana-de-açúcar e a baixa expressão relativa do gene *ScAMT2;1*, levou à utilização de um gene sintético, feito com o molde encontrado na análise de RNA-seq.



**Figura 16.** Estrutura do gene *ScAMT2;1*, proveniente do BAC 118\_C18, compreendendo 1473 pb, 490 aminoácidos e ~53KD. O DNA genômico possui dois íntrons. As caixas representam os éxons e as linhas os íntrons.

Para os estudos relacionados às regiões regulatórias do transportador *ScAMT2;1*, sequências de aproximadamente 3000 pb *upstream* ao códon de iniciação de transcrição (ATG) foram definidas como a sequência promotora, levando em conta possíveis inserções de elementos móveis. O alinhamento das sequências da região regulatória do gene *ScAMT2;1* presentes nos BACs (Figura 17) permitiu, novamente, a identificação de dois grupos na região de cerca de 1kb anterior ao códon de iniciação do gene, sendo o grupo 1 formando pelos BACS 038\_G02 e 118\_C18 e o grupo 2 pelos BACs 216\_D16 e 235\_F05.

|                                      | 10                               | 20                         | 30                                      | 40                        | 50  | 60                                      | 70                                      | 80                        |
|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|---|---------------------------|---|---|---|---------------------------|
| Prom BAC 032_A12                     |                                  |                            |   |                           |   |   |   |                           |
| Prom BAC 038 G02                     | CAACACACGTGTTA                   | CCAGCACCACA                | GATGGTTTCC                              | ATTGATTGT                 | IAATTIAACTC                               | CATCCCAGCA                              | ATTGCAGGGT                              | TGTTTTCTG                 |
| Prom BAC 118_C18<br>Prom BAC 216 D16 |                                  |                            |   |                           |   |   |   |                           |
| Prom BAC 235_F05                     |                                  |                            |   |                           |   |   |   |                           |
|                                      |                                  |                            |   |                           |   |   |   |                           |
|                                      | 110                              | 120                        | 130                                     | 140                       | 150                                       | 160                                     | 170                                     | 180                       |
| Prom BAC 032_A12                     |                                  | TTTAAAGATA                 | TATTTCGCAT                              | TATTTGTCA                 | TTCACCTTTTC                               | ACAAGTTATG                              | ССААТАТАТА                              | ССАТАТСТА                 |
| Prom BAC 038_G02                     | ACATGTIACATGAI                   | ATTIAAAGATA                | TATTTCGCAT                              | COTTTGTCA                 | TTCACCTTTTC                               | ACAAGTTATG                              |   | IGATATCTA                 |
| Prom BAC 216 D16                     |                                  |                            |   |                           | CAGAGAGAGCT                               | TG                                      | CAAATATAA                               | CGATATCTA                 |
| Prom BAC 235 F05                     |                                  |                            |   |                           |   |   |   |                           |
|                                      |                                  |                            |   |                           |   |   |   |                           |
|                                      |                                  | 220                        | 230                                     | 240                       | 250<br>                                   | 260<br>  -                              | 270                                     | 280                       |
| Prom BAC 032_A12                     | AGGCTIAGCTGTTT                   | GACTTGGTGCA                | TAAACAATTO                              | ATGCAATAG                 | CCGCCGTATTA                               | ATCIAGIACI                              | ACCTGTTACC                              | CACATACTA                 |
| Prom BAC 118 C18                     | AGGCCCAGTGCCCT                   | CCCTCGGCACC                | GCTGCAATCG                              | AGA                       | CCAC                                      | GACTAG GGCC                             | CCGAGGGAG                               | GAGACGGCA                 |
| Prom BAC 216_D16                     | AGGCTTAGCTGTTT                   | GACTTGGTGCA                | ТАААСААТТС                              | ATGCAATAG                 | CCGCCGTATTA                               | ATCIAGIACI                              | ACCTGTTACC                              | CAGATACTA                 |
| Prom BAC 235_F05                     | -GGCTTAGCTGTTT                   | GACTTGGTGCA                | TAAACAATTG                              | ATGCAATAG                 | CCGCCGIATIA                               | ATCIAGIACI                              | ACCTGTTACC                              | CACATACIA                 |
|                                      | 310                              | 320                        | 330                                     | 340                       | 350                                       | 360                                     | 370                                     | 380                       |
| Prom BAC 022 412                     | TTCTCC ACT AC ATT                |                            | ATCC ACC ACC                            |                           |   | CTTT ATT ATC                            |   |                           |
| Prom BAC 038 G02                     | TTGTCCACTAGATT                   | CACCTTGCCAG                | ATCCAGGAGG                              | CAAGCTTCA                 | ATTCATTATA                                | CTTTATTATG                              | GCCCCAGAAG                              | AAGTTTATC                 |
| Prom BAC 118_C18                     | CCTCCCGGTGGGCC                   | GACCGCTGGC                 | AGGCAGGCTC                              | CAA <mark>ACT</mark> CCTC | CCAACATCGGA                               | FCCT-CCACG                              | ATGT <mark>C</mark> GCC <mark>AG</mark> | CA-TACGTA                 |
| Prom BAC 216_D16<br>Prom BAC 235_F05 | TTGTCCACTAGATT                   | CACCTTGCCAG                | ATCCAGGAGG                              | CAAGCTTCA                 | ΑΑΤΤΟΑΤΊΑΙΑ<br>ΑΑΤΤΟΑΤΊΑΙΑ                | CTTIATIATG(<br>CTTIATIATG)              | CCCCAGAAG                               | AAGTTTATC                 |
| 110m DAC 200_100                     | HOICEACHACHAT                    | CACCITOCCAC                | ATCCAGCAGC                              | CANCELLCA                 | AIICAIIAIA                                | CITIATIATO                              | Decection                               | ANOTTIATO                 |
|                                      | 410                              | 420                        | 430                                     | 440                       | 450                                       | 460                                     | 470                                     | 480                       |
| Prom BAC 032 A12                     | ATCATTCAGCAGTG                   | TTACATGATGG                | TGCACATGTC                              | TCCCAGCAG                 | TTCAGCTCCAG                               | TCAGTATTTC                              | AGTGCACCT                               | GGGTGCTTT                 |
| Prom BAC 038 G02                     | ATGATTCAGCAGTG                   | TTACATGATGG                | TGGACATGTC                              | TCCCAGCAG                 | TTGAGCTCCAG                               | TGAGTATTTC                              | AGTGCACCT                               | GGGTGCTTT                 |
| Prom BAC 118_C18<br>Prom BAC 216 D16 | TCCGCGCCCAACGGG                  | TCAGCTIG                   | EGCGCAGOTO                              | CICCAGCIG                 | T-GCGTCICGA                               | CGGTCCCTGG<br>TGACTATTTC                | CEGEGECEGETE                            | CCGATCGGC                 |
| Prom BAC 235_F05                     | ATGATTCAGCAGTG                   | TTACATGATGG                | TGGACATGTC                              | TCCCAGCAG                 | TTCAGCTCCAG                               | TGAGIATTIC                              | AGTGCACCT                               | GGGTGCTTT                 |
|                                      |                                  |                            |   |                           |   |   |   |                           |
|                                      | 510                              | 520                        | 530                                     | 540                       | 550                                       | 560                                     | 570                                     | 580                       |
| Prom BAC 032_A12                     | TGCATAATTGCATG                   | TAGAACAGTA                 | CTAATGGT A                              | CTTCATAAA                 | IAGTTATTCTC                               | ATACTGGTTG                              | CTCTTGTCTC                              | CACCTGTTT                 |
| Prom BAC 038_G02<br>Prom BAC 118_C18 | TGCATAATTGMATG                   | TAGAA JAGTA                | CTAATGGT A                              | CTTCATAAA                 |   | ATACTGGTTG                              | TCTTGTCTC                               | CACCTGTTT<br>CACCCTC      |
| Prom BAC 216_D16                     | TGCATAATTGCATG                   | TAGAACAGTA                 | CTAATGGT-A                              | CTTCATAAA                 | IAGTIATTCTC                               | ATACTGGTTG                              | CTCTTGTCTC                              | CACCTGTTT                 |
| Prom BAC 235 F05                     | TGCATAATTGCATG                   | TAGAACAGTA                 | CTAATGGT A                              | CTTCATAAA                 | IAGTTATTCTC                               | ATACTGGTTG                              | CTCTTGTCTC                              | CACCTGTTT                 |
|                                      | <b>610</b>                       | <b>CDD</b>                 | 620                                     | 640                       | 65.0                                      | 660                                     | 670                                     | 69.0                      |
|                                      |                                  |                            |   |                           |   |   |   |                           |
| Prom BAC 032_A12<br>Prom BAC 038_G02 | ATGTGCTTCAACAC<br>ATGTGCTTCAACAC | TTCATGCAAGC                | ATACATCATT                              | GACATTGO                  | GATATCAAGTT                               | GTGTTTAGAA/<br>GTGTTTAGAA/              | ATTCGTTGG                               | TCATCAT                   |
| Prom BAC 118_C18                     | CCGCAGT-CCACGA                   | GCCAEGGCAAG                | CCC <mark>CCTC</mark> CTT               | GGTGCC1AG                 | GETGCCTGCC                                | GGTTCTCCAA                              | ATCCGTTCC                               | TGCCTCCCC                 |
| Prom BAC 216_D16                     | ATGTGCTTCAACAC                   | TTCATGCAAGC                | ATAGATGATT                              | GACATTGO                  | GATATCAAGTT                               | GTGTTTAIAA/                             | ATTCGTTGG                               | TGATGAT                   |
| Prom BAC 255_F05                     | ATGIGCTICAACAC                   | TICATGCAAGC                | ATAGATGATT                              | GACATIG                   | CATATCAAGIT                               | GIGITIA                                 | ALICGIIGG                               |                           |
|                                      | 710                              | 720                        | 730                                     | 740                       | 750                                       | 760                                     | 770                                     | 780                       |
| Prom BAC 032 A12                     | TTACAATTTAC                      | AAACCGTACCA                | GTTCACATTA                              | GCAACCGCCG                | GGGTTACACG                                | GTCATTTC                                | TTACACGGT                               | GTTGTTTCC                 |
| Prom BAC 038_G02                     | TTAGAATTTAC                      | AAACCGTACCA                | GTTCACATIA                              | GCAACCGCC                 | CGGGTTACACG                               | GTCATTTC                                | CTTACACGGT                              | GTTGTTTCC                 |
| Prom BAC 118 C18                     | TCCGTCCCCCACCC                   | CACCGAGCC                  | G <mark>GAGT</mark> CAGGT               | GCGCTCCTC                 | GA <mark>GCCCCA</mark> AGA                | GCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC | CTCAGCCGCC                              | TACAA TT <mark>C</mark> C |
| Prom BAC 216_D16<br>Prom BAC 235 F05 | TTAGAATTTAC                      | AAACCGTACCA<br>AAACCGTACCA | GTTCACATIA<br>GTTCACATIA                | GCAACCGCCG                | CGGGTTAGACG                               | GTCATTTCO                               | CTTACACGGT<br>CTTACACGGT                | GTTGTTTCC<br>GTTGTTTCC    |
| -                                    |                                  |                            |   |                           |   |   |   |                           |
|                                      | 810                              | 820                        | 830                                     | 840                       | 850                                       | 860                                     | 870                                     | 880                       |
| Prom BAC 032_A12                     | TTGTTTCTGAGCTA                   | CTAGGTCTGTT                | GTCTAATTT                               | GTTCTCAGC                 | IATCAATTGTG                               | TGC TGTCAC                              | ATCCACA                                 | TTTTCC                    |
| Prom BAC 038_G02                     | TTGTTTCTGAGCTA                   | CIAGGTCTGTT                | GTTTAATGTT                              | GTTCTCAGC                 | IATCAATTGTG                               | TGC-TGTGAG                              | ATCCACA                                 | <mark>TTTTCG</mark>       |
| Prom BAC 118_C18<br>Prom BAC 216 D16 | TTGTTTCTCAGCIA                   | CIAGACACCGTT               | GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG | GCAGGAAGC                 | IATCAATTGTG                               | TGCATGECAG                              | ATCCACA                                 | TTTTCC                    |
| Prom BAC 235_F05                     | TTGTTTCTCAGCTA                   | CTAGGTCTGTT                | GTCTAATGTT                              | GTTCTCAGC                 | IATCAATTGTG                               | TGC-TGTGAG                              | ATCCACA                                 | TTTTCG                    |
|                                      | 910                              | 920                        | 930                                     | 940                       | 950                                       | 960                                     | 970                                     | 980                       |
| Prom BAC 032 412                     | TCCTCCATCCAT                     | TTTTGGCATGC                | TCTCCTTTCT                              |                           |   | .                                       |   | CAACAT                    |
| Prom BAC 038_G02                     |                                  | TTTTGGCATGC                | TCTGCTTTGT                              | TCAGAAACC                 | TGTATAGGACC                               | TGTATAGGGT                              | IATCTTGCTG                              | СААСАТ                    |
| Prom BAC 118_C18<br>Prom BAC 216 D16 | TGCGGTGTGGGAGGA<br>TGGTGCATCCAT  | CGACGAGGAGG<br>TTTTGGCATGC | CCGACCCCCC<br>TCTGCTTTGT                | GAGCTGGTC                 | CCCGCAGCACA<br>TGTATAGGACC                | GCCGACGCAGG<br>TGTATAGGGT               | COTCTAGTCG                              | CGCCTCCGG<br>CAACAT       |
| Prom BAC 235_F05                     |                                  | TTTTGGCATGC                | TCTGCTTTGT                              | TCAGAAACC                 | TGTATAGGACC                               | TGTATAGGGT                              | IATCTTGCTG                              | CAACAT                    |
|                                      |                                  | 1022                       | 1000                                    | 1040                      | 1050                                      | 1060                                    | 1070                                    | 1000                      |
| P                                    | 1010                             | 1020                       | 1030                                    | 1040                      | 1020                                      | 1060                                    |   | 1080                      |
| Prom BAC 032_A12<br>Prom BAC 038 G02 | GCCTTGTTAGGGCC                   | ACACAGATGGT                | TTCCACTTGA                              | ATGTTCG-G                 | TTAATTCCATC                               | CCACTATTCC/                             | AGTTTGTTT                               | TTCTGTGGC                 |
| Prom BAC 118_C18                     | CATCCCTCCGCGTC                   | GGGGGCGGA <mark>G</mark> A | CCCCACCTCC                              | GCGACCCAG                 | GCGC <mark>T</mark> GA <mark>C</mark> GCG | CCGGAATCCG                              | GCCCTCCACC                              | GA <mark>C</mark> CGTGGC  |
| From BAC 216_D16<br>Prom BAC 235 F05 | GCCTTGTTAGGGCC<br>GCCTTGTTAGGGCC | ACACAGATGGT<br>ACACAGATGGT | TTCCACTTGA<br>TTCCACTTGA                | ATGTTCG-G                 | TTAATTCCATC<br>TTAATTCCATC                | CCACTATTCC/<br>CCACTATTCC/              | AGTTTGTTT<br>AGTTTGTTT                  | TTCTGTGGC<br>TTCTGTGGC    |
|                                      |                                  |                            |   |                           |   |   |   |                           |
|                                      | 1110<br>                         | 1120<br>                   | 1130<br>                                | 1140                      | 1150                                      | 1160                                    | 1170                                    | 1180                      |
| Prom BAC 032 A12<br>Prom BAC 038 G02 | CCAGACGTTTT<br>CCAGACGTTTT       | TAGCACATATT                | TGGCATTAC                               | TAGTCATTT<br>TAGTCATTT    | GCTGTTTTACA<br>GCTGTTTTACA                | TTTATGT                                 | IGATTGCTAA                              | TGCAACCTA                 |
| Prom BAC 118_C18                     | CTGT CACGT CT                    | T-GGCCATCTT                | TCCTCTIACO                              | CCCCCABCC                 | GGAGGACGGCA                               | EGGCCTCGC/                              | GGTCGCGTA                               | EGC GGC CAC               |
| Prom BAC 216 D16                     | CCAGACGTTTT                      | TGGCACATATT                | TGGCATTAC                               | TAGTCATTT<br>TAGTCATTT    | GCTGTTTTACA                               | TTTATGT                                 | IGATTGCTAA                              | TGCAACCTA                 |
|                                      | new correct                      |                            |   | and the second second     |   | TIMIOT                                  |   |                           |



|                                      | 2510                                 | 2520                     | 2530                     | 2540                     | 2550                     | 2560                     | 2570                       | 2580                   |
|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------|
| Prom BAC 032 A12                     | CTTCTGGTGCTTATT                      | GCAAGTATGA               | AGTCTGCAAA               | ACTCCATCAG               | CCGCATGACC               | ATCAGCCCAT               | TTCATTACCT                 | TTACACTACC             |
| Prom BAC 038_G02                     | CTTCTGGTGCTTATT                      | GCAAGTATC/               | AGTCTGCAA                | ACTCCATCAG               | CCGCATGACC               | ATCAGCCCAT               | TTCATTACCT                 | TTACACTACC             |
| Prom BAC 118_C18<br>Prom BAC 216 D16 | CTTCTGGTGCTTATTC                     | GCAAGTATGA               | AGTCTGCAAA               | ACTCCATCAG               | CCCCATGACC               | ATCAGCCCAT               | ITCATTACCT                 | TTACACTACC             |
| Prom BAC 235_F05                     | CTTCTGGTGCTIATTO                     | GCAAGTATGA               | AGTCTGCAAA               | ACTCCATCAG               | CCGCGTGACC/              | ATCAGCCC                 |                            | <mark>c</mark>         |
|                                      |                                      |                          |                          |                          |                          |                          |                            |                        |
|                                      | 2610                                 | 2620                     | 2630                     | 2640                     | 2650                     | 2660                     | 2670                       | 2680                   |
| Prom BAC 032_A12                     | CCTTCCGTTTGAGGT                      | TTCATTCGT                | CGACTTGAATO              | TCCTCAACT                | ACACGCACA                | AAATGACAC                | IAAAA                      |                        |
| Prom BAC 038_G02<br>Prom BAC 118 C18 | CCTTCCGTTTCAGGT                      | FTCATTCGTC<br>FTCATTCGTC | CGACTTGAATC              | TCCTCAACT<br>TCCTCAACT   | ACACGCACAC               | AAATGACAC                | 14444                      |                        |
| Prom BAC 216_D16                     | CCTTCCGTTTCAGGT                      | TTCATTCGT                | CGACTTGAAT               | TCCTCAACT                | ACACGCACA                | AAATGACAC                | IAAGGTGTG                  | TTTAGTTTCC             |
| Prom BAC 235_F05                     | CCTTCCGTTTCAGGT                      | TTCATTCGT                | CGACTTGAATO              | TCCTCAACT/               | ACACGCACA                | AAATGACAC                | IAA <mark>GC</mark> GTGTG' | TTTAGTTTCC             |
|                                      |                                      |                          |                          |                          |                          | 0.000                    |                            |                        |
|                                      |                                      |                          | 2/30                     | 2/40                     | 2/50                     | 2/60                     |                            | 2/80                   |
| Prom BAC 032_A12<br>Prom BAC 038_G02 | ATTCAAGTCGCCAT-                      |                          | ATGCAATGCAC              | САА                      | CCATGTTC                 | CTGTCA                   |                            |                        |
| Prom BAC 118_C18                     | ATTCAAGTTGTGAT                       |                          | ATGCAATGCAC              | CAA                      | CCATGTTO                 | CTGTCA                   |                            |                        |
| Prom BAC 216_D16                     | TTTIASGTTTTGETCO                     | CATCATTT                 | ACAAAATAGA               | CTAAACACC/               | ATGTAAAATT<br>ATGTAAAATT | TTTGCCAAAAA              | AGTTATCCAC                 | CCTGTTCGGC             |
| From BAC 255_F05                     | 2010                                 | 2020                     | 2020                     | 2840                     | 2950                     | 2860                     | 2070                       | 2000                   |
|                                      |                                      |                          |                          | 2040                     |                          | 2000                     | 20/0                       |                        |
| Prom BAC 032_A12                     | GTCTGG-AGGCGTG                       |                          | TCTCTAGCG                | GCACAAGGCA               | AACAACGG                 | AAAAGCGC                 | TCTACGCAAC                 | ACACCGCAT              |
| Prom BAC 118 C18                     | GTCTGG-AGGCGTG                       |                          | -TCTCTAGCG               | GCACAAGGGA<br>GCACAAGGCA | AAGGACGG<br>AAGGACGG     | AAAAGCGC                 | TCTACGCAAC                 | ACGCCGCAT              |
| Prom BAC 216_D16                     | G <mark>CTTATCAGCCGTGGT</mark>       | ACAGTGTTT                | ТТСТСТ <mark>САТА</mark> | ACANAACAGC               | CACAGCCAGC               | TTAIAAGCCG               | CAGAAACAGC                 | CTGCCGAAC              |
| Prom BAC 235_FU5                     | GCTTATCAGCCGTGGT                     | ACAGTGTTT                | TTCTCT CATA              | ACASAACAGO               | CACAECCAGC               | TTAIAAGCCG               | CACAAACAGC                 | CIGCCG <sup>2</sup> AC |
|                                      | 2910                                 | 2920                     | 2930                     | 2940                     | 2950                     | 2960                     | 2970                       | 2980                   |
| Prom BAC 032 A12                     | GGCTGCCGGGTTGACC                     | TTCCTG                   |                          |                          | <mark>TCTG</mark>        | GGTCTCTCTT               | ссСст                      | CGCAATCC               |
| Prom BAC 038 G02                     | GGCTGCCGGGTTGACC                     | ттсстб                   |                          |                          | ТСТС                     | GGTCTCTCTT               | с <mark>ссст</mark>        | CGCAATCC               |
| Prom BAC 118_C18<br>Prom BAC 216 D16 | CATTTTGGATTGGGC                      | TTCCTG<br>CTCAACAGG      | ССАААААААС               | AAAAAAGCCA               | AAAAGCTCTA               | ACCCACCCCA               | CGCCT<br>TICAAAAAII'TT     | CGCAATCC-              |
| Prom BAC 235_F05                     | CATTTTGGATTTGGGC                     | CTCAAGAGG                | ССААААААААС              | AAAAAAGCCA               | AAAAGCTCTA               | ACCCACCCCA               | T <mark>GAAAAA</mark> TT   | CGCATTTTG              |
|                                      |                                      |                          |                          |                          |                          |                          |                            |                        |
|                                      | 3010                                 | 3020                     | 3030                     | 3040                     | 3050                     | 3060                     | 3070                       | 3080                   |
| Prom BAC 032_A12<br>Prom BAC 038 G02 | eec                                  | TTCATG<br>TTCATG         | CCT                      | GTCAC<br>GTCAC           | GAACTCCCCG<br>GAACTCCCCG | CCGTCCA<br>CCGTCCA       | ATIATGG<br>ATIATG-         | GTGTGTTTA              |
| Prom BAC 118_C18                     | ccc                                  | <mark>TTCAT</mark> G     | сст                      | GTCAC                    | GAACTCCCCG               | CCGTCCA                  | <mark>ATTATG</mark> -      |                        |
| Prom BAC 216_D16<br>Prom BAC 235 F05 | CCIATAAAAATTTIAG<br>CCIATAAAAATTTIAG | CATTTTGTA                | TTTTATCATT<br>TTTTATCATT | CTAAAGTAGT<br>CTAAAGTAGT | TGGCATTTTG<br>TGGCATTTTG | CATTCCATGG<br>CATTCCATGG | GGAACTAAAC<br>GGAACTAAAC   | ACAGCCIAA<br>ACAGCCIAA |
| -                                    |                                      |                          |                          |                          |                          | _                        |                            |                        |
|                                      | 3110                                 | 3120                     | 3130                     | 3140                     | 3150                     | 3160                     | 3170                       | 3180                   |
| Prom BAC 032_A12                     | TGAAAAGTTACGGTAA                     | CAC                      | -TTTTCGTTC               | TTATTTGGTA               | AAATTIGICG               | AACCATGGAT               | ТААТТ <mark>АСА</mark> СТ  | CAAAAGATT              |
| Prom BAC 038_G02<br>Prom BAC 118 C18 |                                      |                          |                          |                          |                          |                          |                            |                        |
| Prom BAC 216_D16                     | TTGTCATATGCAATGC                     | ACCAACGAT                | GTTCCTGTCA               | TCTTCAGAAC               | AGTCTGCAGG               | CGTGTCTCTA               | GCGGCACAAG                 | GCAAAGAAC              |
| Prom BAC 235_FU5                     | TTGTCATATGCAATGC                     | ACCAACGAT                | GTTCCTGTCA               | TCTTCAGAAC               | AGTCTGCAGG               | CGTGTCTCTA               | GCGGCAGAAG                 | GGAAAGAAC              |
|                                      | 3210                                 | 3220                     | 3230                     | 3240                     | 3250                     | 3260                     | 3270                       | 3280                   |
| Prom BAC 032 A12                     | -CACAAACTATGCAAT                     | TAGTTATT                 | TTTTACCTAC               | ATTTAAT                  | ACTCCATCCA               | TGTCTAAA                 | GATTCGATAT                 | GATAGGTGC              |
| Prom BAC 038 G02                     |                                      |                          |                          |                          |                          |                          |                            |                        |
| Prom BAC 118_C18<br>Prom BAC 216_D16 | CAACACGCCGCATACC                     | GTGTGCCAT                | TCGTGGCTGC               | CGGGTTCACC               | ттсстбтстб               | GGTCTCTCTT               | CGCCTCGCAA                 | CCCAATTGG              |
| Prom BAC 235_F05                     | CAACACGCCGCATACC                     | GTGTGCCAT                | TCGTGGCTGC               | CGGGTTGACC               | TTCCTGTCTG               | GGTCTCTCTT               | CGCCTCGCAA                 | CCCAATTGG              |
|                                      | 3310                                 | 3320                     | 3330                     | 3340                     | 3350                     | 3360                     | 3370                       | 3380                   |
| Prom BAC 032 A12                     | GETTCGCATGCAAGTC                     | AACACAGCO                | TATCATCCAC               | TTGGTTAGCO               | TGCACAGTT                | ATCGCAGATO               | AAGCACAGT                  | TCATGAAGCC             |
| Prom BAC 038_G02                     |                                      |                          | ATCGAC                   | TTGGTTAGCO               | TGCACAGTT                | ATCGCAGAT                | AAGCACAGT                  | TCATGAAGCC             |
| Prom BAC 118_C18                     |                                      |                          |                          | TTGGTTAGCO               | TGCACAGTT                | ATCGCAGAT                | AAGCACAGT                  | TCATGAAGCC             |
| Prom BAC 235 F05                     | TGTCACGAACTCCCCG                     | CCGTCCAAT                | TATCATCCAC               | TTGGTTAGCC               | TGCACAGTT                | ATCGCAGAT                | CAAGCACAGT                 | TCATGAAGCC             |
| _                                    |                                      |                          |                          |                          |                          |                          |                            |                        |
|                                      | 3410                                 | 3420                     | 3430                     | 3440                     | 3450                     | 3460                     | 3470                       | 3480                   |
| Prom BAC 032_A12                     | ATCACCCATATAAAGT                     | CCTAGTCGC                | ATCGIATIAA               | ACGCGCGC                 | GCACACACT                | GCATAGCAG                | AGCAGCTAGC                 | CACCACCCAA             |
| Prom BAC 038_G02<br>Prom BAC 118_C18 | ATCACCCA                             | AGTCGC                   | ATCGTATTAA               | ACGCGCGCAC               | CACACACTO                | GCATAGCAC                | AGCAGCTAGC                 |                        |
| Prom BAC 216 D16                     | ATCACCCATATAAAGT                     | CCTAGTCGC                | ATCGATTAA                | ACGCGCGCAC               | GCACACACT                | GCATAGCAC                | AGCAGCTAGC                 | CACCACCGAA             |
| Prom BAC 235 F05                     | ATCACCCATATAAAGT                     | CCTAGTCGC                | ATCGNATIAA               | ACGCGCGCAC               | GCACACACT                | GCATAGCAG                | AGCAGCTAGC                 | CACCACCGAA             |
|                                      | 0510                                 | 2520                     | 25.00                    |                          |                          |                          |                            |                        |
| B B10                                | 3510                                 | 3520                     | 353U<br>                 |                          |                          |                          |                            |                        |
| Prom BAC 032_A12<br>Prom BAC 038 G02 | CCTCCGCCCCGTCCCC                     | TCCTGCACG                | CAGCCCAGCC<br>CAGCCCAGCC | AC                       |                          |                          |                            |                        |
| Prom BAC 118_C18                     | CCTCCGCCCCGTCCCG                     | TCCTGCACO                | GAGCCCAGCC               | AC                       |                          |                          |                            |                        |
| Prom BAC 216_D16<br>Prom BAC 235_F05 | CCTCCGCCCCGTCCCG                     | TCCTGCACO                | CAGCCCAGCC               | AC                       |                          |                          |                            |                        |

**Figura 17** – Alinhamento em nucleotídeos das regiões regulatórias para *ScAMT2;1* dos 5 BACs (032\_A12, 038\_G02, 118\_C18, 216\_D16 e 235\_F05), identificados por sequenciamento de clones de biblioteca de BAC de cana-de-açúcar (cultivar 'R570').

Segundo os dados apresentados, fica evidente a separação dos BACs em dois grupos, nos quais ambos possuem elementos transponíveis na região regulatória putativa de *ScAMT2;1*. Por conseguinte, um representante de cada um dos grupos formados entre os BACs foi selecionado para análises de elementos regulatórios conservados na região promotora pelo programa PlantPAN. Esta análise apresentou poucas regiões conservadas entre os promotores avaliados, e estas encontram-se em posições diferentes (Figura 18), indicando uma variação significativa na região regulatória dos genes *ScAMT2;1* dos BACs 118\_C18 e 235\_F05, mesmo essas apresentando alta identidade entre as sequências ORF para esse gene.



**Figura 18** – Comparação das regiões regulatórias para *ScAMT2;1* do BACs 118\_C18 representando o grupo 1 e 235\_F05 representando o grupo 2, realizada pelo programa PlantPAN, indicando elementos regulatórios (ilhas CpG e repetições em tandem) e regiões conservadas (traços alaranjados ligados uns aos outros por traços e pontilhados em cor-de-rosa) entre os promotores estudados.

A falta de identificação de sequências conservadas nos promotores e diferenças na presença e posicionamento de TEs (Figuras 13 e 18), aliada à falta de sequências gênicas mais próximas ao alelo do grupo 2 no RNA-seq, suscitou duas hipóteses: tal alelo não estaria sendo expresso devido a variações de aminoácidos ou devido a inserções de TEs alterando a sequência promotora. Dessa forma, um BAC de cada grupo identificado foi selecionado para a amplificação e clonagem da região promotora presumível de *ScAMT2;1*, proveniente dos BACs 118\_C18 e 235\_F05, afim de verificar a funcionalidade de ambos.

Os alinhamentos das sequências gênicas dos BACs identificados para *ScAMT3;3A* com a sequência de transcrito parcial proveniente do RNA-seq (comp96041\_c0\_seq1\_parcial) mostrou polimorfismos de nucleotídeos na sequência codificante (dado não mostrado). Essas variações refletiram em sete alterações na sequência de aminoácidos (Figura 19).



Figura 19 – Alinhamento de aminoácidos das regiões gênicas para ScAMT3;3A dos 2 BACs (023\_013, 178\_C24) identificados por sequenciamento de clones de biblioteca de BAC de cana-de-açúcar (cultivar 'R570') e sequência de transcrito parcial proveniente do RNA-seq (comp96041\_c0\_seq1\_parcial).

O alinhamento de aminoácidos das regiões gênicas para *ScAMT3;3A* dos 2 BACs (023\_O13 e 178\_C24) identificados por sequenciamento de clones de biblioteca de BAC de cana-de-açúcar (cultivar 'R570') e sequência amplificada de cDNA de cana-de-açúcar 'SP80-3280', mostrou diferenças em suas sequências nucleotídicas e duas variações de aminoácidos. A sequência proteica proveniente da amplificação de cDNA de cana-de-açúcar 'SP80-3280' apresentou uma glutamina ao invés de arginina na posição 106 e uma arginina na posição 466 enquanto o BAC 023\_O13 possui uma histidina, já em relação ao BAC 178\_C24 as diferenças foram em três aminoácidos: treonina por alanina (369), isoleucina por

metionina (435) e isoleucina por valina (475) (dados não mostrados). O gene *ScAMT3;3A* procedente do BAC\_023\_013, mais próximo da sequência gênica amplificada de cDNA de cana-de-açúcar, apresenta estrutura formada por 2 éxons e um íntron e sua região codante compreende 1452 pb, 484 aminoácidos e uma massa molecular calculada de ~52 KD (Figura 20). É interessante notar que os membros da subfamília gênica *AMT1* são desprovidos de íntrons, exceto o gene LjAMT1 de *Lotus japonicus* (SALVEMINI et al., 2001), enquanto os membros da subfamília AMT2 contêm íntrons em suas sequências genômicas (SOHLENKMAP et al., 2000; SUENAGA et al., 2003; COUTURIER et al., 2007; GUETHER et al., 2009; LI et al., 2015). Dessa forma, os genes *AMT2* de cana-de-açúcar estudados mantiveram a tendência da subfamília.



Figura 20. Estrutura do gene ScAMT3;3A, proveniente do BAC 023\_013 compreendendo 1453 pb, 484 aminoácidos e ~52 KD. O DNA genômico possui um íntron. As caixas representam os éxons e as linhas o íntron.

A região regulatória do gene *ScAMT3.3A* foi definida como uma sequência de aproximadamente 2000 pb *upstream* ao códon de iniciação da transcrição desse gene (ATG), levando em consideração o alto número de possíveis transposons nesta região. O alinhamento (Figura 21) das sequências promotoras dos *BACs* 023\_O13 e 178\_C24 apresentou, mais uma vez, uma variação considerável, tornando difícil escolher o clone de BAC a ser utilizado para as clonagens e experimentos de caracterização funcional.



**Figura 21** – Alinhamento em nucleotídeos das regiões regulatórias para *ScAMT3;3A* dos 2 BACs (023\_013 e 178\_C24) identificadas por sequenciamento de clones de biblioteca de BAC de cana-de-açúcar (cultivar 'R570').

Apesar das diferenças nucleotídicas, a análise comparativa das regiões promotoras (Figura 22), envolvendo elementos regulatórios, demonstrou a existência de região conservada entre os promotores avaliados para o gene ScAMT3;3A dos dois BACs. Com base nessas considerações, e o fato de que a proteína correspondente ao alelo amplificado de cDNA de cana-de-açúcar 'SP80-3280' assemelha-se mais com o produto da sequência gênica do BAC 023\_O13, este foi escolhido para a clonagem da região promotora presumível de *ScAMT3;3A* para ser realizada a caracterização funcional.



Figura 22 – Comparação das regiões regulatórias para ScAMT3;3A dos BACs 023\_013 e 178\_C24, realizada pelo programa PlantPAN, indicando fatores de transcrição, elementos regulatórios (ilhas CpG e repetições em tandem) e regiões conservadas (traços alaranjados ligados uns aos outros por traços e pontilhados em cor-de-rosa) entre os promotores estudados.

Para melhor caracterização das sequências gênicas referentes a *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* encontradas nos BACs de cana-de-açúcar, análises para identificar os domínios proteicos regulatórios de transportadores de amônio, foram realizadas. A superfamília de transportadores MEP/AMT/Rh é caracterizada por possuir 11 domínios transmembranares, com o N terminal para a face exterior e o C terminal para o interior da membrana, e um motivo assinatura conservado de 26 aminoácidos (MARINI et al., 1997; MARINI; ANDRE, 2000; SCHWACKE et al., 2003; LOQUÉ; VON WIRÉN, 2004; ELLERBECK et al., 2013). Para esta verificação, as sequências codantes dos transportadores *ScAMT2;1* (proveniente do RNA-seq) e *ScAMT3;3A* (proveniente do cDNA de cana-de-açúcar 'SP80-3280') 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 para essas proteínas foram preditos pelo programa TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/).

A análise dos AMTs de cana-de-açúcar no programa TMHMM resultou em 11 domínios com alta probabilidade de ocorrência para ambas as proteínas estudadas (Figura 23A e B), com N terminal voltada para o exterior da membrana e o C terminal para o citoplasma, estando de acordo com o padrão da superfamília. Estas também apresentam o motivo assinatura conservado para o grupo MEP/AMT/Rh (Figura 23C), o qual está localizado entre os aminoácidos 188-213 na proteína ScAMT2;1 e entre os aminoácidos 198-223 em ScAMT3;3A (dados não apresentados).



Figura 23–Domínios transmembranas preditos no programa TMHMM para A. ScAMT2;1. e B. ScAMT3;3A. C. Representação WebLogo para o motivo assinatura de 26 aminoácidos conservados entre 41 membros da superfamília MEP/AMT/Rh, que está depositado no banco de dados do Prosite (número de acesso PS01219).

A superfamília de transportadores de amônio pode ser encontrada em todos os domínios da vida, apresenta uma similaridade baixa entre seus representantes (< 25%) e ainda assim, exibe características similares para o transporte desse cátion. Isso ocorre, devido à presença de regiões conservadas para a funcionalidade dessas proteínas. Embora a similaridade de transportadores de amônio de plantas e de *E. coli* ou *A. fulgidus* seja relativamente baixa (20-50%) é impressionante como a modelagem molecular tem mostrado que as proteínas de plantas parecem manter estruturas terciárias e quaternárias similares, particularmente os domínios transmembranares (TMD), os *loops* citoplasmáticos e o carboxi terminal (C-terminal), com os *loops* extracelulares mostrando alguma divergência, principalmente em tamanho (LOQUÉ et al., 2007; NEUHÄUSER et al., 2007; 2009; GUETHER et al., 2009; ORTIZ-RAMIREZ et al., 2011). Estudos demonstraram que

85

mudanças no sítio de ligação extracelular de alguns transportadores de planta podem resultar na inibição ou redução da atividade do transporte, além disso mutações adicionais têm identificado outros importantes aminoácidos, ambos na entrada do poro e nos *loops* citoplasmáticos (PANTOJA, 2012).

Como previamente identificado em ortólogos de AMTs, entre os aminoácidos conservados estão o triptofano W148 e serina S219 em EcAmtB, supostamente essenciais para a formação da estrutura do sítio de ligação com amônio (PANTOJA, 2012). A maioria desses resíduos são bem conservados, com a exceção do S219, o qual é substituído por alanaina (Ala) ou ácido aspártico (Asp) nas proteínas AMT2. Uma análise mais detalhada nos poros presumíveis, foi realizada no homólogo de E. coli EcAmtB. A maioria dos resultados sobre o papel dos resíduos localizados no sítio de ligação/recrutamento de amônio tem demonstrado que a substituição da Fenilalanina F107, W148 e S219 por Ala ou Leucina (Leu), não modificam o nível de expressão da EcAmtB, entretanto, algumas mudanças foram observadas nas propriedades de transporte (FONG et al., 2007; JAVELLE et al., 2008, HALL; KUSTU, 2011). Esta poderia ser uma explicação para a menor capacidade de transporte das proteínas AMT2 de plantas quando comparadas com a subfamília AMT1. A substituição natural de S219 por Ala em AtAMT2;1 e LjAMT2;1 juntamente com resultados de mutantes de EcAmtB219A desafiam o papel proposto pela S219 na ligação de amônio através de pontes de hidrogênio e sugere que outros aminoácidos estejam envolvidos na ligação de amônio (PANTOJA, 2012).

Evidências bioquímicas demonstraram que as proteínas MEP/AMT formam trímeros com uma orientação extra-citosólica do N terminal e intra-citosólica do C terminal (LUDEWIG et al., 2003; GRAFF et al., 2010). As análises de indução de mutações pontuais no transportador de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) SIAMT1;1 demonstraram que a deleção ou substituição de duas cisteínas (C3S e C27S) 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 foi confirmada quando o N-terminal do transportador SIAMT1;3 de tomateiro foi analisado. Esse transportador possui um N-terminal pequeno em comparação aos 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 AMT2 e/ou AMT1 de arabidopsis (Arabidopsis thaliana), tomateiro (Solanum lycopersicum), arroz (Oryza sativa), milho (Zea mays), sorgo (Sorghum bicolor) álamo (Populus trichocarpa), lotus (Lotus japonicus) além das sequências para membros da subfamília AMT1 e AMT2 de cana-de-acúcar ScAMT1:1, ScAMT1:3 (comp110189\_c0\_seq1 e comp110189\_c0\_seq3), ScAMT2;1, ScAMT3;3A e ScAMT3;3B (comp105883\_c0\_seq13, comp96041\_c0\_seq1\_parcial e comp93349\_c1\_seq1\_parcial) obtidas através de sequenciamento de RNA de alta performance (Figura 24). 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 24A e B), o que indica a provável formação de trímeros de proteínas AMTs na membrana plasmática de células dessa gramínea. Em contrapartida, estas cisteínas estão ausentes em todos os transportadores estudados para a subfamília AMT2, fato este que não exclui a existência de um mecanismo que permita a formação de trímeros entre estas proteínas.

Comparações entre membros das famílias AMT, MEP, e Rh já demonstraram que a conservação dos resíduos de cisteína são encontrados apenas nos membros da família AMT1 de plantas (GAZZARRINI et al., 1999; VON WIRÉN et al., 2000a; SALVEMINI et al., 2001; SUENAGA et al., 2003; D'APUZZO et al., 2004), sendo ausentes nos membros da subfamília de plantas AMT2 (SOHLENKAMP et al., 2000). Adicionalmente, resíduos de cisteína no N-terminal não estão presentes na maioria dos homólogos de MEP e AMT dos procariotos, incluindo as proteínas cristalizadas AmtB de *E. coli* e Amt-1 de *Archaeoglobus fulgidus* (KHADEMI et al., 2004; ANDRADE et al., 2005; GRAFF et al., 2010). Portanto, a estabilização dos trímeros dos transportadores de amônio MEP ou AMT não pertencentes a plantas deve ser independente das cisteínas do N-terminal (GRAFF et al., 2010).



Figura 24 – Alinhamento em aminoácidos do N-terminal de membros da subfamília AMT1 e/ou AMT2 de arabidopsis (AtAMT), tomateiro (SIAMT), arroz (OsAMT), milho (ZmAMT), sorgo (SbAMT), álamo (PtAMT) e lotus (LjAMT). Comp110189\_c0\_seq1, comp110189\_c0\_seq3, comp105883 c0 seq13. comp96041 c0 seq1 parcial comp93349\_c1\_seq1\_parcial referem-se às sequências de transcritos obtidas por meio de RNA-seq de tecidos de cana-de-açúcar ('SP80-3280'). Alinhamentos realizados no ClustalW e agrupamentos para: A. AMT1. B. AMT2. e C. Representação WebLogo para os resíduos conservados entre as proteínas AMT1 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.

A região C-terminal das proteínas AMTs também possui função regulatória nesses transportadores de membrana. Um aminoácido localizado nesta região que desempenha papel crucial na manutenção da funcionalidade destas proteínas é a glicina 456 (G456; SIAMT1;1) (LUDEWIG et al., 2003). A mudança de G456 por Asp inativa o transporte de SIAMT1;1 e também de seu parálogo SIAMT1;2, sendo esta a primeira evidência de que transportadores

de amônio formam oligômeros, processo esse primeiramente descrito para os transportadores homólogos MEP de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (G413; MARINI et al., 2000). Observações similares foram reportadas para AMT em fungo, *Aspergillus nidulans* (MONAHAN et al., 2002).

Da mesma forma, mutações na G456 equivalente em transportadores de  $NH_4^+$  de tomateiro inativaram transportadores coexpressos de uma maneira dominante. Inibição cruzada por subunidades de mutantes foram tomadas como uma evidência para homo oligomerização e possivelmente hetero oligomerização em AMTs de plantas (LUDEWIG et al., 2003). A glicina 458 foi encontrada em todos os AMTs de plantas avaliados neste trabalho, sejam eles da subfamília AMT1 ou AMT2, incluindo as proteínas de cana-de-açúcar (Figura 25). Embora esses dados evidenciem a importância do C terminal citosólico na atividade de transporte dos AMTs, a relevância fisiológica dessas observações permanece a ser elucidada.

Outro aminoácido comprovadamente importante localizado no C-terminal é a Treonina 460 (T460). Um processo de regulação alostérica foi descrita para AtAMT1;1 de arabidopsis, no qual a ativação ou inativação do complexo proteico depende de modificações conformacionais ocasionadas pela fosforilação da T460, sendo que este mecanismo regula o influxo de amônio nas raízes impedindo que esse nutriente possa causar toxidez nas células (LOQUÉ et al., 2007; LANQUAR et al., 2009). A extremidade N terminal das proteínas da família AMT1 é fundamental para a estabilização do oligômero (três proteínas), sendo que a absorção de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> é fortemente reduzida quando o oligômero é desfeito (GRAFF et al., 2010). Estudos iniciais têm demonstrado que proteínas carregando a mutação T460D são inativas, e quando expressas com transportadores funcionais de AtAMT1;1 (LOQUÉ et al., 2007) ou AtAMT1;2 (NEUHÄUSER et al., 2007), também inibem o transporte destas por interação cruzada. Assim, a regulação dessa família de transportadores pode ser alcançada por interações do C terminal com os *loops* citoplasmáticos dentro do mesmo monômero, ou com trímeros vizinhos, fornecendo uma maior flexibilidade de regular a capacidade de transporte nas raízes mediante a presença de amônio (YUAN et al., 2013).

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 das subfamílias AMT1 e AMT2 de várias espécies, permitiu identificar que a Treonina 460 não é conservada nas proteínas ScAMT2;1 e ScAMT3;3A de cana-de-açúcar, (Figura 25). A conservação desse mecanismo regulatório pode ser comum entre os AMT1 homólogos de plantas, onde T460 é bem conservada, com a exceção do AtAMT1;5 (A463). No entanto,

estudos recentes 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). Ainda está por ser elucidado se outros mecanismos ou resíduos no C terminal de transportadores de AMT2 ou AtAMT1;5 participam de um mecanismo regulatório pós-traducional similar (PANTOJA, 2012).

Apesar da essencialidade de alguns aminoácidos para o processo de transporte de amônio, é possível que as propriedades individuais dos transportadores não sejam decorrentes da presença ou ausência de um aminoácido em particular, mas mais provavelmente do resultado de uma combinação de grupos de resíduos que estabelecem condições singulares próprias de cada membro da família (PANTOJA, 2012).

|                              | 440                                      | 450                      | ₩   | 470        | 480  | Α |
|------------------------------|--|--------------------------|---|------------|--|---|
| AtAMT1;1_P54144.1            | FFILKRAKLI                               | LRIS <mark>SE</mark> DEM | AGMDMTRHGGI                               | EAYMYEDDD  | SHKAI  |   |
| AtAMT1;2_Q9ZPJ8.1            | FYGLERINL                                | LRIS <mark>AE</mark> DEM | AGMDMTRHGGI                               | EAY YNDEDI | OVSTRPWG   |   |
| AtAMT1;3_Q9SQH9.2            | FFILKRLNLI                               | LRIS <mark>EQHEM</mark>  | <b>QCMDMTRHGG</b>                         | EAYIYIDNDI | )  |   |
| AtAMT1;4_Q9SVT8.1            | FFILHRLKLI                               | LRIPAE <mark>DE</mark> I | AGMDPTSHGG                                | AYMYTEDE   | IRNG-I   |   |
| AtAMT1;5_Q9LK16.1            | FFILRRLNLI                               | LRIS <mark>EQH</mark> EM | R <mark>GMD</mark> LAG <mark>HGG</mark> I | EAYIYIDNDI | )  |   |
| S1AMT1;1_P58905.1            | FYILER                                   | LRIS <mark>SEDEM</mark>  | AGMD <mark>L TRHGG</mark> I               | AYTHEEDPI  | KLGM   |   |
| S1AMT1;2_004161.1            | FYLLHK?KLI                               | LRISRDDET                | AGMDL TRHGGI                              | EAYIYIDEDE | EGSSMP-G   |   |
| SIAMT1;3_Q9FVN0.1            | FYLLORLGI                                | LRISSDEEV                | AGLDISSHGG                                | AYDASQEES  | SN   |   |
| OsAMT1;1_Q7XQ12.1            | FYGLERLGLI                               | LRISAEDE I               | SCMDL TRHGGI                              | EAYNYHDEDE | EHDKSGVG   |   |
| OsAMT1;2_Q6K9G1.1            | FLVLNRLGLI                               | LRIS <mark>AE</mark> DEM | ACMDQTRHGGI                               | EAYAYHDDD/ | ASGKPDRSVG   |   |
| OsAMT1;3_Q6K9G3.1            | FYVLHRFGLI                               | LRVSPATEN                | EGMDPTCHGGI                               | FGYVDEDEGI | RRVRAKS  |   |
| ZmAMT1;1A_AFW58821.1         | FYALKRICLI                               | LRISADDEM                | SCMDL TRHGGI                              | EAYNYHDEDI | PGDKAGVG   |   |
| ZmAMT1;1B_NP_001141280.1     | FYALKRLDLI                               | LRISADDEM                | SCMDLTRHGGI                               | EAYED      | PGDNAGVG   |   |
| ZmAMT1;3_NP_001130456.1      | FLALNKIGLI                               | LR <mark>VS</mark> AEDEN | ACMD <mark>OTRHGG</mark> I                | EAYAYHDDDI | LS-LSSR  |   |
| SbAMt1;1_XP_002446777.1      | FYALKRLDLI                               | LRISADDEM                | SCMDL TRHGGI                              | EAYNYHDEDI | PGDKSGVG   |   |
| SbAMT1;3_XP_002452468.1      | FLAINRIGLI                               | LR <mark>MS</mark> AEDEM | ACMD <mark>QTRHGG</mark> I                | EAYAYHDED  | IS-LSSR  |   |
| ScAMT1;1_comp110189_c0_seq1  | FYALKRLDLI                               | LRISADDEM                | SCMDLTRHGGI                               | EAYVYHDEDI | PGDKAGVG   |   |
| ScAMT1;3_comp110189_c0_seq3  | FLALNRLELI                               | RMSADDEL                 | ACMDOTRHGGI                               | EAY Y DED  | IS-LSSR  |   |
| AtAMT2_ NP_181363.1          | LLAIRVFIP                                | LRMAEEELG                | IGDDAAHGEE/                               | AYALWGDGE  | KFDATRHVQQ   | Б |
| OsAMT2;1_Q84KJ7.1            | LLGIGLFIP                                | LRMPDEQ1                 | IIGDDAAHGEE/                              | AYALWGDGE  | <b>KFDATRHDLSRG</b>                                | D |
| PtAMT2;1_ XP_002309151.1     | LLFIRLFIP                                | LRMPEEQLA                | IGDDAVHGEE/                               | AYALWGDGE  | KYDPTRHGRN   |   |
| LjAMT2;1_AAL08212            | LLAIQLFIP                                | LRMPDYQLE                | IGDDAVHGEE/                               | AYALWGDGE  | KYDPTKHG   |   |
| ScAMT2;1_comp105883_c0_seq13 | LFAIGLLVP1                               | LRMPDDQL                 | IIGDDAAHGEE/                              | AYALWGDGE  | <b>KFDATRHDLAAR</b>                                |   |
| ScAMT2;1_BAC38_G02           | LFAIGL                                   | LRMPDDQL                 | IGDDAAHGEE/                               | AYALWGDGE  | <b>KFDATRHDLAAR</b>                                |   |
| ScAMT2;1_BAC118_C18          | LFAIGLLVP                                | RMPDDQL                  | IIGDDAAHGEE/                              | AYALWGDGE  | <b>KFDATRHDLAAR</b>                                |   |
| ScAMT2;1_BAC216_D16          | LLVIGLVVP                                | LRMPDDQL                 | IIGDDAAHGEE/                              | AYALWGDGE  | <b>REDATRHDLAAR</b>                                |   |
| ScAMT2;1_BAC235_F05          | LLVIGLVVP                                | LRMPDDQL                 | IIGDDAAHGEE/                              | AYALWGDGE  | <b>KFDATRHDLAAR</b>                                |   |
| ScAMT3;3A_BAC023_013         | CVLIGLVLP                                | LRISDAQLL                | .IGDDAVHGEE/                              | AYAIWAEGEI | LNDVTHHD   |   |
| ScAMT3;3A_BAC178_C24         | CVLIGLVLP                                | LRMSDAQLL                | .IGDDAVHGEE/                              | AYAIWAEGEI | LNDVTRHD   |   |
| 4-                           | <b>_ V</b>                               |                          | • •                                       |            |  | С |
|                              | π  |                          | Υc  | Ιν ,       |  |   |
|                              |  |                          |   |            | HUSU   |   |
|                              |  | 5                        |   | l Y        |  |   |
|                              | 8 6 0                                    | <b>T</b> N               | 0 4 0                                     | 0 0        | 9 0 <del>-</del> 0 6                               |   |
| 5 4 2 4 5 4 7 N              | 45 45 45 45 45 45 45 45 45 45 45 45 45 4 | 46                       | 46<br>46<br>46                            | 46 46      | 66<br>74<br>74<br>74<br>74<br>74<br>74<br>74<br>74 | C |

Figura 25 – Alinhamento em aminoácidos do C-terminal de membros da subfamília AMT1 e/ou AMT2 e arabidopsis (AtAMT), tomateiro (SIAMT), arroz (OsAMT), milho (ZmAMT), sorgo (SbAMT), álamo (PtAMT) e lotus (LjAMT). Comp110189\_c0\_seq1, comp110189\_c0\_seq3, comp105883\_c0\_seq13, referem-se às sequências de transcritos obtidas por meio de RNA-seq de tecidos de cana-de-açúcar ('SP80-3280'). A. Alinhamento realizado no ClustalW, agrupamento da subfamília AMT1 e. B. subfamília AMT2. C. Representação WebLogo para os resíduos conservados entre as proteínas AMT1 e AMT2. A seta azul indica a Glicina 456 (G456) e a seta vermelha indica a Treonina 460 (T460). Os números de acesso para os distintos AMTs estão indicados juntamente com o nome das sequências.

## **4.3** Expressão heteróloga de *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* de cana-de-açúcar em levedura defectiva para o transporte de amônio

Saccharomyces cerevisiae tem sido o organismo eucarioto de escolha para muitos estudos em genética molecular (STRATHERN et al., 1982; NINNEMANN et al., 1994; GAZZARRINI et al., 1999; VON WIRÉN et al., 2000b; SALVEMINI et al., 2001; SONODA et al., 2003; COUTURIER et al., 2007; YUAN et al., 2007; KOEGEL et al., 2013; LI et al., 2015). Para caracterizar a capacidade de transporte de amônio dos genes de cana-de-açúcar *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A*, foram realizados experimentos de expressão heteróloga em cepa de levedura 31019b, mutante triplo defectivo para absorção de amônio (*MATa mep1* $\Delta$ *mep2* $\Delta$ ::*LEU2 mep3* $\Delta$ ::*KanMX2 ura3*; MARINI et al., 1997).

Para avaliar a complementação do mutante transformado, um volume de 5 µl de cada diluição das suspensões celulares de levedura  $(1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3})$  foi inoculado em placas de Petri contendo meio mínimo YNB suplementado com crescentes concentrações de amônio: 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 5 e 20 mM na forma de NH<sub>4</sub>Cl e com 100 mM de seu análogo tóxico, metilamônio (MA) (DUBOIS et al., 1979). Placas com meio de cultivo contendo 1 mM de arginina foram utilizadas como controle positivo de crescimento. O gene *AtAMT1;1* de *Arabidopsis thaliana*, já descrito como codificador de proteína transportadora de amônio, o qual atua no sistema de transporte de alta afinidade (HATS) e possui alta capacidade de transporte de amônio (MAYER; LUDEWIG, 2006; LOQUÉ et al., 2007), foi inserido na levedura para representar o controle positivo. A levedura mutante transformada com o vetor PDR196 vazio representou o controle negativo. Neste contexto, o crescimento das células de levedura foi avaliado visualmente e está relacionado à maior ou menor absorção de amônio.

Na presença de arginina como fonte de N, todas as leveduras cresceram de maneira similar para todos os experimentos realizados, validando a relação das diferenças encontradas nos demais meios de cultivo com a presença e concentração de amônio (Figuras 26, 28 e 30). Em condições de suplemento de baixas concentrações de amônio, 0,2 e 0,5 mM, a levedura mep+*ScAMT2;1* quase não diferiu do controle negativo e apresentou reduzido crescimento quando comparado a mep:*AtAMT1;1* (Figura 26). Com o aumento da concentração externa de amônio para 1, 2 e 3 mM, a levedura mep+*ScAMT2;1* apresentou restauração da capacidade de crescimento de células principalmente sob de 2 e 3 mM de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> mostrando diferença mais significativa com o controle negativo nestas concentrações exógenas de amônio (Figura 26). Esses resultados indicam que ScAMT2;1 possui a habilidade de transportar amônio, sendo sua capacidade reduzida quando comparada à AtAMT1;1 (Figura 26). Esta diferença de

capacidade de transporte de amônio foi descrita também na comparação direta em arabidopsis; apesar de AtAMT2;1, assim como AtAMT1;1, exibir alta afinidade pelo substrato ( $K_m$  de 21 µM a pH 6,1), sua capacidade de transporte de amônio foi menor que o de AtAMT1;1 em pelo menos uma ordem de magnitude (SOHLEMKAMP et al., 2000). Portanto, ScAMT2;1 se assemelha a AtAMT2;1 na reduzida capacidade de transporte de amônio quando expresso de forma heteróloga em mutante triplo de levedura defectivo para absorção de amônio.

Em experimentos com *AMTs* de arroz, levedura mutante transformada com OsAMT2;1 foi capaz de crescer em meio suplementado com alto N (5 mM de  $NH_4^+$ ), mas não em baixo N (1 mM de  $NH_4^+$ ), sugerindo que este AMT possa atuar como transportador de amônio com propriedades bioquímicas diferentes (SUENAGA et al., 2003). Em contraste, AtAMT2 (SOHLEMKAMP et al., 2000) e LjAMT2;1 (SIMON-ROSIN et al., 2003) foram capazes de complementar a levedura mutante em meio de crescimento com 0,5 mM de  $NH_4^+$ , e PbAMT2 e PbAMT3 de *P. betulaefolia* restituíram substancialmente o crescimento em células de *triple mep* crescidas em 0,1 e 0,5 mM de  $NH_4^+$  (LI et al., 2015). Em álamo, *PtrAMT2;1* foi capaz de complementar a deficiência de crescimento da cepa 31019b em 1 mM de  $NH_4^+$  (COUTURIER et al., 2007). Esses resultados evidenciam uma diversidade na capacidade bioquímica de transporte de amônio de acordo com variações nas proteínas em espécies distintas.



**Figura 26**- Experimento de complementação de levedura defectiva para o transporte de amônio com inoculação de 5 μl de cada diluição das suspensões celulares de 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> dos genótipos mep:*AtAMT1;1* como controle positivo, mep:PDR196 vazio como controle negativo e mep:*ScAMT2;1* em concentrações crescentes de amônio em pH 6,0.

O substrato de proteínas AMTs/Rh pode variar entre os mecanismos de transporte do tipo uniporte para  $NH_4^+$  ou co-transporte de  $NH_3/H^+$  (NEUHÄUSER et al., 2014). Análises de estruturas de proteínas cristalizadas de bactérias e fungos, aliadas a estudos de modelagem computacional e de mutações dirigidas indicam que  $NH_4^+$  é deprotonado antes da passagem pelo poro através de ação de uma histidina, e após a passagem pelo lúmem do poro,  $NH_3$  é reprotonado e liberado ao citosol da célula (JAVELLE et al., 2008). No entanto, outros estudos sugerem que  $NH_4^+$  seja recrutado pelo poro para que ocorra o transporte para o citosol (FONG et al., 2007). Em plantas, estudos recentes demonstram a existência de ortólogos a AMT2 que realizam o transporte de  $NH_3$ , sendo que em estudos com oócitos e leveduras, essas proteínas não apresentaram transporte eletrogênico (GUETHER et al., 2009), o que difere de membros da subfamília AMT1 (NEUHÄUSER et al., 2009).

Amônia é uma base fraca (pKa 9,25), a qual é mais que 99% protonada ( $NH_4^+$ ) em pH neutro. Com o aumento do pH de 5,0 para 7,5, a concentração de  $NH_3$  aumenta 316 vezes, enquanto a de  $NH_4^+$  muda em torno de 1% apenas. Considerando que o pH altera a forma predominante entre  $NH_3/NH_4^+$ , estudo de complementação de *triple mep* pelos *AMTs* de canade-açúcar também foi realizado em 5 mM de amônio com acidez variada; pH 5,0, 6,0 e 7,5 (Figura 27). De uma maneira geral, mep:*AtAMT1;1*, mep:PDR196 e mep:*ScAMT2;1* cresceram em correlação positiva com o aumento do pH, indicando que nestas condições o amônio apresenta uma taxa significativa de deprotonação e liberação do gás amônia (forma não ionizada do amônio,  $NH_3$ ), o qual difunde facilmente nas células (MARTINELLE et al., 1996, SOHLENKAMP et al., 2002).

A inserção do gene *ScAMT2;1* reativou o crescimento da levedura defectiva quando cultivada em 5 mM de  $NH_4^+$  em pH 5,0 e 6,0; porém, não houve diferença de crescimento com o controle negativo em pH 7,5, indicando difusão de amônia independente do genótipo. O maior crescimento em pH 6,0 em relação a pH5,0 pode indicar que ScAMT2;1 realize co-transporte de NH3/H<sup>+</sup>. Sob alto amônio (20 mM) também não houve diferença para crescimento entre o controle negativo e a levedura expressando o AMT2 de cana-de-açúcar. Em estudos de AMTs de arabidopsis, a comparação direta no transporte de AtAMT1;1 ou AtAMT1;2 com AtAMT2;1 em leveduras mutantes cultivadas sob condições crescentes de pH demonstram que AtAMT2;1 aumenta significamente a capacidade de crescimento de células e o  $V_{max}$  com o concomitante aumento de pH externo (SOHLENKAMP et al., 2002; NEUHÄUSER et al., 2014).

Quanto às análises de leveduras crescidas em meio suplementado com o análogo tóxico do amônio, metilamônio, a adição de 100 mM de MA sob pH 6,0 levou a um reduzido crescimento de células expressando mep:AtAMT1;1, contudo mep:PDR196 e mep:ScAMT2;1 apresentaram crescimento similar, demonstrando baixa ou nenhuma sensibilidade a MA (Figura 27). Estudo de absorção de metilamônio por AtAMT2;1 constatou que o influxo de MA marcado com <sup>14</sup>C em oócitos de *Xenopus* foi significantemente menor quando comparado a AtAMT1;2 (NEUHÄUSER et al., 2009). Além disso, o transporte de AtAMT2;1 de arabidopsis é considerado eletroneutro, levando em conta que MA não desencadeia alterações de cargas ou correntes durante o transporte via AtAMT2;1, conclui-se que este gene de arabidopsis possivelmente realiza o co-transporte de NH<sub>3</sub>/H<sup>+</sup> com recrutamento de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> na região local do poro (NEUHÄUSER et al., 2009). Com base nessas similaridades entre os resultados de complementação de levedura mutante expressando ScAMT2;1 e AtAMT2;1 é possível especular que o gene de cana-de-açúcar possui similar propriedade bioquímica para recrutamento de  $NH_4^+$  pela proteína ScAMT2;1 e possível co-transporte de  $NH_3/H^+$  através do lúmem da proteína. Certamente, análise de expressão em células de oócitos de Xenopus seriam necessários para validar essa hipótese.



**Figura 27**- Experimento de complementação de levedura defectiva para o transporte de amônio com inoculação de 5  $\mu$ l de cada diluição das suspensões celulares de 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> dos genótipos mep:*AtAMT1;1* como controle positivo, mep:PDR196 vazio como controle negativo e mep:*ScAMT2;1* em concentrações crescentes de amônio em pH 5,0, 6,0 e 7,5, além de metilamônio e arginina.

Células de levedura mutante expressando *ScAMT3;3A* não apresentaram complementação da função de absorção de amônio em condições de cultivos de baixo  $N < 1 \text{ mM NH}_4^+$ , sendo que o crescimento da *triple mep* foi restituído apenas sob 1, 2 e 3 mM de NH\_4^+ em pH 6,0, embora a diferença entre o controle negativo e mep+*ScAMT3;3A* seja sutil (Figura 28). Genes da subfamília AMT2 de sorgo, *SbAMT3;1* e *SbAMT4* também complementaram a levedura *triple mep* em células crescidas em 1 e 2 mM de NH\_4^+ (KOEGEL et al., 2013), o que sugere similar capacidade de transporte entre esses ortólogos de cana-de-açúcar e sorgo.



**Figura 28**- Experimento de complementação de levedura defectiva para o transporte de amônio com inoculação de 5  $\mu$ l de cada diluição das suspensões celulares de 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> dos genótipos mep:*AtAMT1;1* como controle positivo, mep:PDR196 vazio como controle negativo e mep:*ScAMT3;3A* em concentrações crescentes de amônio em pH 5,0, 6,0 e 7,5, além de metilamônio e arginina.

A proteína ScAMT3;3A, da mesma maneira que ScAMT2;1, foi incapaz de transportar metilamônio, pois não houve diferença de crescimento entre as células de levedura complementadas com a atividade de ScAMT3;3A e células de levedura *triple mep* quando cultivadas em meio contendo 100 mM de MA (Figura 29). Além disso, o controle positivo expressando AtAMT1;1 apresentou evidente sensibilidade à exposição a esta molécula quando comparado a ScAMT3;3A (Figura 29). Logo, ScAMT2;1 e ScAMT3;3A diferem dos membros AMT1 de plantas quanto à capacidade de transportar MA (NINNEMANN et al., 1994; SIEWE et al., 1996; SOUPENE et al., 1998), assim como AMT2 de outras espécies como LjAMT2;1 de *Lotus japonicus* (SIMON-ROSIN et al., 2003), PtrAMT2;1 de álamo (COUTURIER et al., 2007), Mep3p de *S. Cerevisiae* (ROON et al., 1975) e GinAMT2 de

*Glomus intraradices* um fungo arbuscular micorrízico (PÉREZ-TIENDA et al., 2011), sendo esta uma característica que distingue os grupos AMT1 e AMT2 (SIMON-ROSIN et al., 2003; LI et al., 2015).



**Figura 29**- Experimento de complementação de levedura defectiva para o transporte de amônio com inoculação de 5  $\mu$ l de cada diluição das suspensões celulares de 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> dos genótipos mep:*AtAMT1*;*1* como controle positivo, mep:PDR196 vazio como controle negativo e mep:*ScAMT3*;*3A* em concentrações crescentes de amônio em pH 5,0, 6,0 e 7,5, além de metilamônio e arginina.

Para comparação direta quanto à capacidade de transporte de amônio entre ScAMT2;1 e ScAMT3;3A, os experimentos de complementação de levedura defectiva no transporte de amônio foram realizados de forma comparativa entres os genes de cana-de-açúcar. Os resultados comprovaram, mais uma vez, a habilidade dessas proteínas na complementação da capacidade de transportar amônio em cepas de levedura mutante quando comparada ao controle negativo mep:PDR196, cultivadas em 2 e 3 mM de amônio (Figura 30). Ainda, sob 2 mM de amônio externo, *ScAMT2;1* apresenta uma tendência maior de crescimento das células quando comparado a ScAMT3;3A, o que não é evidente na concentração de 3 mM de amônio (Figura 30). Esses resultados podem sugerir que ScAMT2;1 possui maior afinidade a amônio do que a proteína ScAMT3;3A de cana-de-açúcar, e portanto, distintas capacidades de transporte entre essas proteínas AMT2. No entanto, experimentos de análise quantitativa de influxo de MA em células de levedura serão necessários para comprovar essa hipótese. A variação de pH 5,0 para pH 6,0 no meio de cultura contendo as leveduras mutantes expressando as proteínas ScAMT2;1 ou ScAMT3;3A, levou a maior capacidade de transporte

de amônio de maneira a confirmar a possibilidade do recrutamento de amônio e transporte de  $NH_3/H^+$  para ambos os genes da subfamília AMT2 de cana-de-açúcar.

Em resumo, estes experimentos demonstraram que as proteínas ScAMT2;1 e ScAMT3;3A complementaram a função dos genes de levedura, codificando proteínas de membrana com papel de transporte de amônio, com possível capacidades distintas de transporte entre si.



**Figura 30**- Experimento de complementação de levedura defectiva para o transporte de amônio com inoculação de 5 μl de cada diluição das suspensões celulares de 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> dos genótipos mep:*AtAMT1;1* como controle positivo, mep:PDR196 vazio como controle negativo, mep:*ScAMT2;1* e mep:*ScAMT3;3A* em concentrações crescentes de amônio em pH 5,0, 6,0 e 7,5, além de arginina.

## 4.4 Localização dos AMTs de cana-de-açúcar em arabidopsis

Múltiplas formas de transportadores de amônio em plantas superiores permitem uma maior flexibilidade na regulação e especialização em organelas, células, tecidos ou órgãos, além de possibilitar a absorção de amônio em uma vasta gama de concentrações (D'APUZZO et al., 2004). Com o objetivo principal desse trabalho de caracterizar a função fisiológica dos transportadores de amônio AMT2 de cana-de-açúcar, experimentos de localização da expressão órgão/tecido específica desses genes foram realizados em plantas do tipo selvagem de *A. thaliana* ('Col-0') transformadas com construções contendo os promotores de cada

membro da subfamília AMT2 fusionado aos genes repórteres *GUS* ( $\beta$ -*Glucuronidase*) (JEFFERSON et al., 1987) ou *GFP* (*green fluorescent protein*).

Para verificar a regulação por *status* de N das regiões cis-regulatórias dos genes *ScAMT2;1* e *ScAM3;3A* em arabidopsis, as plantas transgênicas contendo as construções Pro1*ScAMT2;1:GUS*, Pro2*ScAMT2;1:GUS* ou Pro*ScAMT3;3A:GUS* foram cultivadas em condição suficiente de N (1 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) por 4 d e em seguida foram transferidas para meios de cultivo contendo + N (1 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, controle), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (2 mM NH<sub>4</sub>Cl) e - N (sem adição de N) por 1, 3, 5 e 10 d. A avaliação da expressão do gene repórter foi baseada na intensidade colorimétrica resultante da reação química mediada pela enzima  $\beta$ -*Glucuronidase*.

Plantas de arabidopsis contendo Pro2*ScAMT2;1:GUS* apresentaram expressão principalmente nos tecidos vasculares, com maior intensidade sob cultivo exclusivo de amônio nos diferentes períodos avaliados, demonstrando que amônio induz a expressão de ScAMT2;1 em cotilédones e folhas de arabidopsis. Sob -N, a atividade GUS regulada pelo promotor de *ScAMT2;1* é evidentemente reduzida a partir de 3 d até 10 d de tratamento, indicando que a ausência de N regula negativamente a expressão gênica de *ScAMT2;1* na parte aérea (Figura 31A).

Atividade GUS também foi detectada em plantas expressando promotor de *ScAMT3;3A* na região vascular da parte aérea de arabidopsis, independente do tratamento ao qual foram submetidas, sendo que a expressão desse gene é pouco alterada pela disponibilidade e fontes distintas de N (nitrato de amônio e amônio) (Figura 31B); com exceção para 10 d de deficiência de N, no qual houve uma reduzida expressão do gene repórter fusionado à região regulatória de *ScAMT3;3A* em cotilédones e folhas de arabidopsis sob -N. Portanto, *ScAMT3;3A* é reprimido tardiamente na parte aérea em deficiência prolongada de N (Figura 31B).

A comparação direta da expressão dirigida pelos promotores de *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* indica que ambos os genes são expressos em cotilédones e folhas jovens na presença de nitrato de amônio; porém, amônio efetivamente induz a expressão de *ScAMT2;1* em folhas, enquanto *ScAMT3;3A* mantém sua expressão sob diferentes fontes e disponibilidade de N, sendo negativamente regulado apenas em condições de deficiência de N prolongada. Em vista dos resultados apresentados, pode-se concluir que existe uma regulação distinta dos genes *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* quando expressos de forma heteróloga em *Arabidopsis thaliana*. O fato de os maiores níveis de *ScAMT2;1* sob deficiência de N, se assemelha aos maiores níveis de *scAMT3;3A* em folhas de cana-de-açúcar cultivada na

ausência de N (Figura 10C e D), demonstrando uma regulação conservada para esse gene entre as espécies. Porém, a indução de *ScAMT2;1* observada em folhas de cana-de-açúcar não foi similar à encontrada em arabidopsis, sendo que *ScAMT2;1* não foi induzido temporalmente sob deficiência de N na parte aérea de arabidopsis. Isso pode indicar distintos mecanismos de sinalização de indução de *ScAMT2;1* em folhas de cana-de-açúcar quando comparada a arabidopsis.



Figura 31 – Avaliação qualitativa da atividade GUS na parte aérea de plantas de arabidopsis transgênicas expressando o gene repórter sob regulação dos promotores endógenos de canade-açúcar Pro2ScAMT2;1 e ProScAMT3;3A em resposta a tratamentos de fontes e disponibilidade de nitrogênio por 1, 3, 5 e 10 d.

Nas raízes, os promotores endógenos de *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* apresentam atividade GUS em regiões mais internas, que compreendem a endoderme/periciclo e o tecido vascular (Figuras 32, 33, 34). De maneira geral, a expressão de GUS foi detectada durante a iniciação das raízes laterais, o que indica a atividade de *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* em células da endoderme e periciclo (Figura 32A e C). Porém, somente plantas transgênicas expressando Pro2*ScAMT2;1:GUS* apresentaram atividade do gene repórter na região meristemática de raízes laterais (Figura 32B e D), o que reafirma uma regulação distinta entre os genes *AMT2* de cana-de-açúcar. *ScAMT2;1* é preferencialmente induzido na presença de amônio em raízes laterais (Figura 32A). Por outro lado, *ScAMT3;3A* apresenta regulação diferencial apenas sob limitação temporal de N, no qual esse gene possui evidente redução em raízes laterais quando comparado aos outros tratamentos (Figura 32C). Portanto, *ScAMT3;3A* possui regulação

distinta na parte aérea e em raízes sob deficiência de N (Figuras 32C e D). Em resumo, em raízes laterais, os genes *AMT2* avaliados possuem padrões de regulação diferenciados, sugerindo funções divergentes no transporte de amônio.



Figura 32 – Avaliação qualitativa da atividade GUS no início (A e C) e nas pontas (B e D) de raízes laterais de plantas de arabidopsis transgênicas expressando o gene repórter sob regulação dos promotores endógenos de cana-de-açúcar Pro2ScAMT2;1 e ProScAMT3;3A em resposta a tratamentos de fontes e disponibilidade de nitrogênio por 3, 5 e 10 d.

Na zona de diferenciação, ambos os promotores estudados induziram atividade GUS em todos os tempos e condições avaliadas (Figura 33), com exceção para 3 e 5 d de deficiência de N, nos quais Pro*ScAMT3;3A* reprimiu a expressão deste gene (Figura 33B). Essa regulação transiente da expressão de GUS dirigida pelo promotor de *ScAMT3;3A* corrobora os resultados gerados na análise do perfil transcricional em raízes de cana-de-açúcar sob deficiência de N (Figura 8), indicando regulação similar desse gene em raízes dessas duas espécies.



**Figura 33**- Avaliação qualitativa da atividade GUS na zona de elongação de raízes de plantas de arabidopsis transgênicas expressando o gene repórter sob regulação dos promotores endógenos de cana-de-açúcar Pro2*ScAMT2;1* e Pro*ScAMT3;3A* em resposta a tratamentos de fontes e disponibilidade de nitrogênio por 1, 3, 5 e 10 d.

A análise da atividade GUS regulada por Pro2*ScAMT2;1* e Pro*ScAMT3;3A* em raízes primárias, permitiu a identificação da expressão gênica em tecidos mais internos, como região vascular, endoderme e periciclo, sem expressão na região meristemática (Figura 34). Para o promotor 2 de *ScAMT2;1*, maior atividade GUS foi observada sob longos períodos de restrição de N (10 d em –N), enquanto na presença de N, não houve diferença significativa da expressão em raiz. Padrão similar foi encontrado para AtAMT2 em arabidopsis, com expressão em tecidos vasculares de raízes, folhas, hastes e flores; na região cortical das raízes, e, diferentemente de cana-de-açúcar, com expressão apical em raízes (SOHLENKAMP et al., 2002). Para o promotor de *ScAMT3;3A*, a presença de amônio mantem níveis constantes de expressão do gene repórter; porém, a presença de nitrato de amônio, aparentemente induz a expressão desse gene de forma tardia (Figura 34). Sob limitação temporal de N, a atividade GUS foi reduzida em plantas de arabidopsis+Pro*ScAMT3;3A:GUS*, quando comparada à presença das fontes inorgânicas de N (Figura 34). Portanto, a regulação de *ScAMT3;3A* difere em raízes laterais e raiz primária, possivelmente coordenando a distribuição de amônio de acordo com a disponibilidade exógena de N no solo.



Figura 34 – Avaliação qualitativa da atividade GUS em raízes primárias de plantas de arabidopsis transgênicas expressando o gene repórter sob regulação dos promotores endógenos de canade-açúcar Pro2ScAMT2;1 e ProScAMT3;3A em resposta a tratamentos de fontes e disponibilidade de nitrogênio por 1, 3, 5 e 10 d.

Em resumo, esses resultados de expressão heteróloga do promotor 2 de *ScAMT2;1* e promotor de *ScAMT3;3A* fusionados a GUS em arabidopsis demonstram que esses genes são possivelmente expressos em células da endoderme, periciclo e região vascular nas raízes, e também na região vascular de folhas realizando o transporte de amônio intra e intercelular, e que a fonte e disponibilidade de N regulam a expressão diferencialmente entre os membros de *AMT2* de cana-de-açúcar.

Inicialmente, levantou-se a hipótese de que o promotor do grupo 2 (alelo 2- BACs 216\_D16 e 235\_F05) de BACs para *ScAMT2;1* não seria funcional devido a presença de TEs nesta região; porém esta premissa foi descartada para o promotor 2 e surpreendentemente foi confirmada para o promotor do grupo 1 (alelo 1- BACs 038\_G02 e 118\_C18). Plantas transgênicas contendo Pro1*ScAM2;1:GUS* não apresentaram diferença das plantas controles de arabidopsis 'Col-0' não transformadas (dados não mostrados), apesar de análises moleculares comprovarem a presença do gene *GUS* e desse promotor endógeno de cana-de-açúcar nessas plantas. Dado o exposto, conclui-se que este promotor não é funcional, sendo que, as análises de predição de elementos móveis sugerem a possível interferência desses em regiões essenciais para a regulação dirigida por este promotor (Figura 18). Os elementos

transponíveis são sequências que possuem a habilidade de transposição de uma localização cromossômica para outra, e consequentemente de introduzir inovações positivas ou negativas nos aspectos regulatórios e codificantes dos genes (JURKA et al., 2007; FESCHOTTE, 2008; LEVY et al., 2008; PRAY; ZHAUROVA, 2008; FEDOROFF, 2012; REBOLLO et al., 2012).

A fim de validar os resultados obtidos para as plantas transgênicas Pro1*ScAMT2;1:GUS*, Pro2*ScAMT2;1:GUS* e Pro*ScAMT3;3:GUS*, as mesmas regiões regulatórias de cada gene foram fusionadas ao gene repórter *GFP* e transformadas em plantas de arabidopsis do tipo selvagem ('Col-0'). Plantas transgênicas expressando essas construções gênicas foram inicialmente cultivadas e submetidas a diferentes fontes:  $+ N (1 \text{ mM NH}_4\text{NO}_3)$  ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (2 mM NH<sub>4</sub>Cl) e à disponibilidade de N: - N (sem adição de N).

Ao contrário dos resultados obtidos para o experimento com GUS, não houve detecção de sinal de GFP nas plantas em tratamento por 1, 3 e 5 dias, sendo estas visualizadas apenas em 10 d ou 12 d (Figura 35). As plantas de arabidopsis+Pro2*ScAMT2;1:GFP* apresentaram expressão de GFP na parte aérea, no hipocótilo e região vascular dos cotilédones quando submetidas ao tratamento de amônio e limitação de N (-N) por 10 d, confirmando a indução desse promotor nestas condições. Porém, sob nutrição de nitrato de amônio, não foi identificada expressão de GFP dirigida por esse promotor na parte área, sugerindo uma regulação negativa pela presença de nitrato como fonte de N (Figura 35).

No sistema radicular, o promotor 2 de *ScAMT2;1* induziu fluorescência GFP principalmente na presença de amônio e sob restrição de N em raízes primárias, na zona de diferenciação e no ápice das raízes (Figura 35). Entretanto, sob cultivo de nitrato de amônio, este promotor não induz a expressão de GFP na raiz primária. Em raízes laterais, a indução ocorre nos mesmo tratamentos, sendo detectada mais fortemente sob deficiência de N (Figura 35). Além disso, a avaliação de plantas de arabidopsis+Pro2*ScAMT2;1:GFP* cultivadas por 10 d na ausência de N em microscópio confocal, indicou a localização celular desse *AMT* na membrana plasmática de células radiculares, sendo expresso em tecidos mais internos da raiz, como endoderme na região vascular (Figura 36).

Para as plantas de arabidopsis transformadas com o promotor de *ScAMT3;3A* fusionado a GFP, a fluorescência foi identificada nas mesmas regiões observadas para Pro2*ScAMT2;1*, no entanto, com uma indução baixa e tardia após 12 d de tratamento, e apenas em plantas cultivadas na ausência de N. A expressão de GFP foi induzida pelo promotor de *ScAMT3;3A* na parte aérea ficou evidente sob limitação de N em folhas e cotilédones de arabidopsis, indicando uma função desse gene no transporte de amônio nessa condição (Figura 35). Em raízes, a regulação dirigida pelo promotor de *ScAMT3;3A*, indica

que este gene é predominantemente expresso em raízes laterais e primária sob condições de deficiência prolongada de N, mas pouco expresso em +N (Figura 35), sugerindo a função de *ScAMT3;3A* também em raízes quando N é limitante na rizosfera por longos períodos.



Figura 35 – Localização da expressão transiente de GFP dirigida pelos promotores endógenos de cana-de-açúcar Pro2ScAMT2;1 e ProScAMT3;3A em arabidopsis submetida a tratamentos de fontes e disponibilidade de Nitrogênio por 10 d para Pro2ScAMT2;1 e 12 d para ProScAMT3;3A.



**Figura 36** – Localização da expressão transiente de GFP dirigida pelos promotores endógenos de cana-de-açúcar Pro2*ScAMT2;1* em arabidopsis submetida a tratamentos de -N por 10 d, analisada em microscópio confocal. Ep: epiderme, co: cortex, en: endoderme.

Expressão transiente da fusão AtAMT2:GFP em células da epiderme de folha levaram a fluorescência GFP na membrana plasmática e no envelope nuclear (SOHLENKAMP et al., 2002). Resultados similares foram encontrados para expressão transiente com fusões das proteínas LjAMT2;1:GFP de *Lotus Japonicus* (SIMON-ROSIN et al., 2003). Em cana-de-açúcar, os resultados obtidos sugerem que os genes *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* são expressos mais internamente em células das raízes, o que provavelmente corresponde às células da endoderme/periciclo e vascular.

Os resultados negativos de indução de GUS quando fusionado ao promotor 1 de *ScAMT2;1* foram repetidos para GFP; arabidopsis+Pro1*ScAMT2;1:GFP* não apresentou expressão transiente do gene repórter em nenhum tempo ou tratamento de disponibilidade e variabilidade de fonte de N (dados não mostrados), reiterando a não funcionalidade desta região regulatória proveniente do BAC 118\_C18.

Esses resultados indicam que existe uma sobreposição na localização de *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* na parte aérea na região vascular, sendo que *ScAMT2;1* apresenta regulação na presença de amônio, e *ScAMT3;3A* é induzido sob deficiência prolongada de N, o que pode indicar a participação desses genes em processos distintos no transporte de amônios na parte aérea de cana-de-açúcar. A indução diferencial desses genes em células das raízes de arabidopsis também evidenciam funções aditivas e distintas no transporte de amônio em raízes de cana-de-açúcar.

Em resumo, os resultados das análises de localização realizadas nas plantas de arabidopsis transformadas com os promotores de *ScAMT2;1* ou *ScAMT3;3A* fusionados aos genes repórteres *GUS* ou *GFP*, demonstraram a existência de uma organização espacial dos transportadores de amônio de cana-de-açúcar regulada pelo *status* de N da planta e também de acordo com a fonte inorgânica de N e reafirmam a diferença de expressão desses dois transportadores estudados.

## 4.5 Expressão heteróloga de *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* de cana-de-açúcar em mutante quádruplo para transportadores de amônio em *Arabidopsis thaliana*

Considerando que os resultados de expressão heteróloga dos genes *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* em levedura comprovaram o envolvimento desses genes com o transporte de amônio, e que os resultados de localização desses genes *AMT2* indicaram funções aditivas no transporte de amônio e regulação diferencial na parte aérea e raízes, foram realizados experimentos de complementação funcional de arabidopsis mutante em quatro transportadores de amônio (*qko*). 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, o que torna esse genótipo uma ferramenta valiosa para estudos funcionais relacionado a transportadores de amônio (YUAN et al., 2007).

Após a clonagem e transformação das plantas de arabidopsis do tipo selvagem ('Col-0'), o qual contém todos os AMTs da espécie, e do mutante quádruplo (*qko*) com as construções 35S:ScAMT2;1, 35S:ScAMT3;3A e Pro2ScAMT2;1:ScAMT2;1, análises de expressão dos diferentes eventos de transformação (geração T<sub>3</sub>) foram realizados para definir quais linhas seriam utilizadas para a análise funcional (Figura 37).

Devido ao fato de a planta de arabidopsis não possuir o gene do grupo AMT3, não foi possível comparar os níveis de expressão dos transgênicos em relação ao tipo selvagem. Portanto, um evento de cada construção inserida em 'Col-0' foi utilizado como padrão de comparação e assim, os resultados foram analisados de forma relativa a essas linhas. Os eventos selecionados foram aqueles que apresentaram maior acúmulo de transcritos do gene estudado, sendo: g2, G1 e G4 da construção 35S:ScAMT2;1, os eventos h1, H1 e H3 para 35S:ScAMT3;3 e os eventos i3, I2 e I3 da construção Pro2ScAMT2;1:ScAMT2;1, onde letras minúsculas indicam eventos de transformação no *background* selvagem de arabidopsis, já os eventos de transformantes do mutante são representados por letras maiúsculas. Foram selecionados, portanto, um evento de transformação em 'Col-0' e dois em *qko* para as construções de superexpressão de *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* e de promotor endógeno2 + *ScAMT2;1*.



## Eventos de transformação

**Figura 37** – Análise quantitativa de transcritos reversos para *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* nos distintos eventos de transformação de arabidopsis. As barras em preto e com eventos denominados com letras minúsculas correspondem às construções transformadas em 'Col-0'. As barras em cinza e com eventos denominados com letras maiúsculas correspondem às construções transformadas no mutante *qko*. O controle utilizado para normalização da expressão gênica foi um evento de cada construção transformada em 'Col-0', e o gene referência foi *UBQ2*. Barras indicam ±SE, *n*= 2 *pools* de plantas.
# 4.6 Caracterização fenotípica das plantas transgênicas de arabidopsis complementadas com *ScAMT2;1* ou *ScAMT3;3A* de cana-de-açúcar

### 4.6.1 In vitro

Com o objetivo de confirmar o envolvimento dos genes *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* de cana-de-açúcar no transporte de amônio e de investigar suas funções específicas, experimentos para a caracterização fenotípica das plantas transgênicas de arabidopsis de eventos previamente selecionados (Figura 37) foram realizados sob nutrição de diferentes fontes inorgânicas de N, em condições *in vitro*. Para isso, plantas de 'Col-0', *qko* não transformadas e 'Col-0' e *qko* complementadas com superexpressão ou promotor endógeno dos genes *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* foram cultivadas em meio MS modificado contendo como fonte de N apenas 5 mM KNO<sub>3</sub>, objetivando a homogeneização do crescimento das plantas, e em seguida foram transferidas para meios de cultivo contendo baixa concentração de N: 0,5 mM de NH<sub>4</sub>Cl, 0,25 mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> ou 0,5 mM de KNO<sub>3</sub> e alto N: 2 mM de NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM de NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub> ou 2 mM de KNO<sub>3</sub>, totalizando 6 tratamentos. Após 14 d de cultivo, a biomassa seca das plantas foi avaliada com o intuito de relacionar seu acúmulo com a maior absorção de amônio.

Quando as plantas foram cultivadas em meio contendo apenas nitrato como fonte única de N (0,5 e 2 mM KNO<sub>3</sub>), não houve diferença para acúmulo de biomassa entre as plantas dos genótipos selvagem ('Col-0'), mutante (*qko*) e 'Col-0' e *qko* transformadas com 35S:*ScAMT2*;1, 35S:*ScAMT3*;3A ou Prom2*ScAMT2*;1:*ScAMT2*;1 para todos os eventos testados, sugerindo que a expressão dos *AMTs* de cana-de-açúcar e a repressão dos *AMTs* de arabidopsis (*qko*) não alteram a capacidade de aquisição de nitrato (Figuras 38A, B, C e F; 39A, B, C e F; 40A, B, C e F). Já quando os distintos genótipos foram submetidos ao crescimento em duas concentrações de N-amônio (0,5 e 2 mM de NH<sub>4</sub>Cl), o quádruplo mutante (*qko*) teve um crescimento significativamente menor do que o genótipo selvagem ('Col-0'), tendo em média uma queda no acúmulo de biomassa total de aproximadamente 54% em 0,5 mM de amônio e de 25% em 2 mM amônio, devido à reduzida capacidade de influxo dessa fonte de N (YUAN et al., 2007) (Figuras 38A, B, E e H; 39A, B, E e H; 40A, B, E e H). Com o aumento da concentração de amônio, essa diferença foi menor entre 'Col-0' e *qko*, devido provavelmente ao transportador presente no mutante, AtAMT1;5 assim como à atividade do sistema de transporte de baixa afinidade, LATS (YUAN et al., 2007). As plantas de arabidopsis *qko* transformadas com as construções 35S:*ScAMT2;1* apresentaram aumento de biomassa significativo em relação ao mutante *qko*, sendo de cerca de 64% e 27% para os eventos G1 e G4, respectivamente, quando cultivados em baixa concentração de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (0,25 mM) e de cerca de e 94% e 26% em 1 mM desta mesma fonte (Figura 38A, B, D e G). Como esperado, a diferença de crescimento entre os transgênicos e o controle mutante *qko* é menor quando as plantas são cultivadas em nitrato de amônio, devido a presença de nitrato, o qual é igualmente absorvido pelas raízes dos distintos genótipos avaliados. Neste caso o aumento da concentração de nitrato de amônio levou a um maior acúmulo de biomassa pelo transgênico de qko+35S:*ScAMT2;1*#G1 possivelmente devido à maior disponibilidade de amônio.

Sob nutrição exclusiva de amônio, plantas de *qko* superexpressando o gene *ScAMT2;1* evento G1 tiveram uma produção de biomassa significativamente maior do que *qko*, sendo de cerca de 121%, e esta foi de 32% para o evento G4 em relação a *qko* não transformado, quando cultivados em 0,5 mM de  $NH_4^+$  (Figura 38A, B e E). Resultados similares foram obtidos na concentração de 2 mM de amônio para a construção 35S:*ScAMT2;1* no *background* de *qko*, com aumento de cerca de 65% e 51% no acúmulo de biomassa para os eventos G1 e G4, respectivamente, em relação ao mutante controle (Figura 38A, B, E e H). Esses resultados demonstram que a expressão ectópica de *ScAMT2;1* no *background* de *qko* foi capaz de restaurar o crescimento do mutante, o que comprova que ScAMT2;1 de cana-de-açúcar é capaz de transportar amônio em raízes.

Resultados surpreendentes foram obtidos com a superexpressão de *ScAMT2;1* no *background* genético de 'Col-0' sob nutrição por amônio. Plantas 'Col-0'+35S:*ScAMT2;1* apresentaram uma tendência de acúmulo de biomassa total, sendo superior em 18% em relação à biomassa do genótipo selvagem quando cultivadas em 1 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, e de 12% e 28% quando cultivadas em 0,5 e 2 mM de amônio respectivamente (Figura 38A, B, E G e H). Esses dados demonstram que a superexpressão de *ScAMT2;1* de cana-de-açúcar leva a maior aquisição de amônio mesmo na presença de AMTs endógenos de arabidopsis em 'Col-0', provavelmente resultante de interação entre essas proteínas AMTs de Arabidopsis ou devido a uma regulação diferencial do gene de cana-de-açúcar ScAMT2;1 na presença de amônio.







Figura 38 – Fenótipos de crescimento de plantas mutantes (*qko*), linhas transgênicas e selvagens ('Col-0') para eventos da construção 35:*ScAMT2;1* em meio MS modificado em baixo N A: 0,5 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (KNO<sub>3</sub>), 0,25 mM NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub> ou 0,5 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (NH<sub>4</sub>Cl) e alto N B: 2 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (KNO<sub>3</sub>), 1 mM NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub> ou 2 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (NH<sub>4</sub>Cl) por 14 d. C, D, E, F, G, H: Biomassa seca (MS) (g) de plantas de genótipos selvagem ('Col-0'), mutante (*qko*) e linhas transgênicas em baixo e alto N com diferentes fontes deste nutriente. Barras indicam ±SE, n=6. Para as análises estatísticas, o teste Tuckey foi realizado.

Já para o experimento de fontes de N com plantas transgênicas de 2 eventos distintos expressando 35S:ScAMT3;3A, houve diferença significativa de acúmulo de biomassa entre estes genótipos e o controle *qko* não transformado na presença de 1 mM de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, mas não sob baixas concentrações dessa fonte mista de N (Figura 39A, B, D e G). Nessas condições de suplemento exógeno de N, o evento H1 teve um acúmulo 14,6% maior de biomassa do que *qko*, o que pode indicar uma maior absorção de amônio devido a atividade de ScAMT3;3A (Figura 39A e G). Já o evento H3 não possui diferenças em relação ao *qko* nas mesmas condições de cultivo (Figura 39B e G). No entanto, quando as plantas foram cultivadas sob nutrição exclusiva de amônio, plantas de *qko*+35S:*ScAMT3;3A*#H1 apresentaram uma redução de crescimento em comparação ao mutante *qko* controle, enquanto o evento H3 possui níveis similares ao *qko* quando cultivadas em 0,5 mM de NH4<sup>+</sup> (Figura 39A, B e E). Em alta concentração exógena de amônio (2 mM), o evento H1 apresenta valores semelhantes de biomassa ao mutante *qko* (Figura 39A, B e H).

Esses resultados indicam que possivelmente ScAMT3;3A não atua efetivamente na aquisição de amônio mesmo quando expresso de forma ectópica em raízes, sendo que, apenas sob altas concentrações de amônio *ScAMT3;3A* evento H3 apresentou maior acúmulo de biomassa quando comparado a plantas controle, exercendo, provavelmente, uma pequena contribuição aditiva na absorção de N sob alto amônio. Essas análises corroboram os dados obtidos no experimento de complementação de levedura defectiva para o transporte de amônio, no qual ScAMT3;3A restituiu o crescimento do mutante apenas em alto amônio (Figuras 28, 29 e 30). Entretanto, em relação à arabidopsis 'Col-0', a superexpressão do gene de cana-de-açúcar ScAMT3;3A não resultou em alterações no acúmulo de biomassa quando comparado a plantas controle não transformadas, evidenciando que ScAMT3;3A possivelmente não atua na absorção de amônio em raízes (Figura 39).

Baseado nesses resultados de superexpressão de genes AMT2 em mutante de arabidopsis, pode-se concluir que ScAMT3;3A possui reduzida habilidade de restaurar a capacidade de absorção de amônio em raízes, quando comparado a *ScAMT2;1* (Figuras 38 e 39). Esses dados também corroboram os níveis de expressão basal desses genes em raízes e parte aérea de cana-de-açúcar, sendo *ScAMT2;1* preferencialmente expresso em raízes e *ScAMT3;3A* em folhas (Figura 10B e D). Com isso, é possível inferir que ScAMT2;1 e ScaMT3;3A possuem funções fisiológicas distintas em cana-de-açúcar.







Figura 39 – Fenótipos de crescimento de plantas mutantes (*qko*), linhas transgênicas e selvagens ('Col-0') para os eventos da construção 35:*ScAMT3;3A* em meio MS modificado em baixo N A: 0,5 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (KNO<sub>3</sub>), 0,25 mM NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub> ou 0,5 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (NH<sub>4</sub>Cl) e alto N B: 2 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (KNO<sub>3</sub>), 1 mM NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub> ou 2 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (NH<sub>4</sub>Cl) por 14 d. C, D, E, F, G, H: Biomassa seca (MS) (g) de plantas de genótipos selvagem ('Col-0'), mutante (*qko*) e linhas transgênicas em baixo e alto N com diferentes fontes deste nutriente. Barras indicam ±SE, n=6. Para as análises estatísticas, o teste Tuckey foi realizado.

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). Para verificar se a atividade dos promotores endógenos de cana-de-açúcar permite a regulação dos genes *AMT2* de cana-de-açúcar em condições de fontes de nitrogênio distintas, *ScAMT2;1* dirigido pelo promotor endógeno foi inserido no *background* de 'Col-0' e *qko*.

Em condições de meio de cultivo com adição de nitrato de amônio em concentrações crescentes, ocorreu maior crescimento de plantas *qko* expressando *ScAMT2;1* evento I2, sendo que estes apresentaram um aumento de 18% e 23% em 0,25 e 1 mM de  $NH_4NO_3$ , respectivamente, em relação ao controle *qko* não transformado, indicando que há uma correlação positiva entre o aumento da concentração de amônio e o acúmulo de biomassa devido à expressão de ScAMT2;1 (Figuras 40A, B, D e G).

Quando plantas de *qko* complementadas com Pro2*ScAMT2*;*1*:*ScAMT2*;*1* foram cultivadas sob concentrações crescentes de amônio exógeno (0,5 e 2 mM), diferenças fenotípicas foram observadas apenas sob alto amônio (Figura 40A, B, E e H). Em alta concentração (2 mM), a complementação de plantas *qko* com *ScAMT2*;*1* levou a um aumento de 29% para o evento I1 e 20% para I2 na biomassa total, quando comparados ao mutante *qko* não transformado (Figura 40A, B e H). Esses resultados reafirmam que ScAMT2;1 é funcional no transporte de amônio em raízes, mesmo quando sob regulação do promotor endógeno de cana-de-açúcar, sugerindo efetivamente a função de ScAMT2;1 no transporte de amônio em raízes (Figura 40).

Em relação ao evento transformado no *background* de 'Col-0', ('Col-0'+ Pro2*ScAMT2;1:ScAMT2;1*), este apresentou 14% de aumento em relação ao controle selvagem em 1mM de nitrato de amônio, e sob nutrição exclusiva de  $NH_4^+$  levou a um acúmulo de 27% e de 22% na biomassa quando cultivado em 0,5 e 2 mM de  $NH_4^+$  respectivamente, em relação a 'Col-0' (Figura 40A, B, D, F e G). Esses resultados reiteram que esse gene *AMT2* de cana-de-açúcar atua de forma aditiva aos genes endógenos *AMTs* de arabidopsis durante a aquisição de amônio, resultando em acúmulo de biomassa maior que o de 'Col-0' (Figura 40).

Devido a restrições de tempo na condução desse projeto, não foi possível avaliar a atividade de ScAMT3;3A dirigida pelo promotor endógeno de cana-de-açúcar neste trabalho; porém, esta construção está em andamento e será transformada em arabidopsis para futuras avaliações.







Figura 40 – Fenótipos de crescimento de plantas mutantes (*qko*), linhas transgênicas e selvagens ('Col-0') para eventos da construção Pro2*ScAMT2;1:ScAMT2;1* em meio MS modificado em baixo N A: 0,5 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (KNO<sub>3</sub>), 0,25 mM NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub> ou 0,5 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (NH<sub>4</sub>Cl) e alto N B: 2 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (KNO<sub>3</sub>), 1 mM NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub> ou 2 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (NH<sub>4</sub>Cl) por 14 d. C, D, E, F, G, H: Biomassa seca (MS) (g) de plantas dos genótipos selvagem ('Col-0'), mutante (*qko*) e linhas transgênicas em baixo e alto N com diferentes fontes deste nutriente. Barras indicam ±SE, n=6. Para as análises estatísticas, o teste Tuckey foi realizado.

## 4.6.2 In vivo

Para a caracterização fenotípica *in vivo* das plantas transgênicas de arabidopsis, foram realizados experimentos de influxo rápido de <sup>15</sup>N-amônio (LOQUÉ et al., 2006). Plantas de arabidopsis dos genótipos selvagem ('Col-0'), mutante (*qko*) e as distintas linhas transgênicas 'Col-0'+35S:*ScAMT2*; *1*#g2, *qko*+35S:*ScAMT2*; *1*#G1 e *qko*+35S:*ScAMT3*; *3A* #H3, foram cultivadas por 45 d em solução nutritiva contendo 2 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e em seguida foram transferidas para soluções contrastantes de disponibilidade de N, +N (0,2 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ou -N (sem adição de N) por 5 d. Após esse período, foram realizadas as análises de influxo rápido de amônio na faixa de alta afinidade (HATS) com 0,2 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 60% enriquecido com <sup>15</sup>N-amônio.

Sob +N, plantas mutantes (*qko*) apresentaram um influxo de <sup>15</sup>N-amônio em raízes de 60% em relação a 'Col-0' (Figura 41A). Já sob -N, o influxo em raízes de *qko* foi de apenas 13,4% (Figura 41B), corroborando a menor capacidade de transporte de amônio em raízes do quádruplo mutante em relação ao genótipo selvagem devido à ausência de atividade dos quatro transportadores de amônio em *qko*. Em condições de suficiência de N, a comparação no *background* de *qko* demonstra que a superexpressão de *ScAMT2;1* não levou a maior aquisição de amônio em relação negativa de *ScAMT2;1* na presença de nitrato de amônio identificadas em raízes de arabidopsis+Pro2*ScAMT2;1*:*GFP* (Figura 35). A superexpressão de *ScAMT3;3A* no *background* de *qko* também não levou à maior aquisição de amônio comparado às raízes do mutante não transformado na presença de N (+N) indicando que ScAMT3;3A não atua nesse processo fisiológico em raízes.

Durante a restrição de N, plantas de *qko* tiveram um influxo de amônio 4 vezes maior do que plantas de *qko* em suficiência de N (Figura 41A e B), comprovando que ainda existe uma indução no sistema de absorção dependente de N em *qko* conferido pelo transportador AtAMT1;5 (YUAN et al., 2007). A capacidade de absorção de <sup>15</sup>N em raízes de plantas *qko*+35S:*ScAMT2;1* aumenta 87% com relação a raízes de *qko* (Figura 41B), quando privadas de nitrogênio. Surpreendentemente, em raízes de plantas de *qko* superexpressando *ScAMT3;3A*, o influxo de <sup>15</sup>N-amonio foi menor do que o encontrado nas plantas controle *qko* em tratamento de deficiência de N (Figura 41B), apresentando uma redução de absorção de <sup>15</sup>N-amônio de cerca de 10% e demonstrando que ScAMT3;3A não realiza a absorção de amônio mesmo sob deficiência de N (Figura 41B). Levando-se em conta essas observações, fica difícil especular a função fisiológica de ScAMT3;3A em raízes. A redução na aquisição de amônio pode indicar uma função no efluxo dessa fonte inorgânica de N, no entanto, experimentos adicionais precisam ser realizados.

A comparação no *background* de 'Col-0' demonstra um padrão distinto de resposta aos tratamentos de N, mostrando que em suficiência de N, 'Col-0'+35S:*ScAMT2;1* absorveu 8 vezes mais N quando comparada a 'Col-0' não transformada, o que reitera o efeito aditivo de ScAMT2;1 de cana-de-açúcar na aquisição de amônio em condições de +N, mesmo quando os AMTs de arabidopsis estão ativos (Figura 41A).

#### Absorção



**Figura 41** - Influxo de <sup>15</sup>N-amônio em raízes de plantas de arabidopsis selvagens ('Col-0`), mutantes (*qko*) e linhas transgênicas para as construções 35:ScAMT2;1 e 35S:ScAMT3;3A. O influxo de <sup>15</sup>N foi realizado com 0,2 mM de <sup>15</sup>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em raízes de plantas submetidas a condições contrastantes de disponibilidade de N por 5 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 (\* $p \le 0,05$  e \*\* $p \le 0,001$ , teste-t de Student).

Em resumo, experimentos de influxo rápido de amônio em raízes de plantas transgênicas de arabidopsis expressando *ScAMT2;1* ou *ScAMT3;3A* comprovam funções distintas desses genes na raiz, sendo que *ScAMT2;1* atua na absorção de amônio, enquanto *ScAMT3;3A* não realiza essa função nas condições deste experimento.

Concentrações significativas de  $NH_4^+$  tem sido medidas no xilema (FINNEMANN; SCHJOERRING, 1999; YUAN et al., 2007), indicando que uma parte considerável de N é translocada para a parte aérea nessa forma, assim sugere-se que AMTs estejam envolvidos no carregamento do xilema e subsequentemente movimentação da solução apoplástica da folha para as células foliares (SCHJOERRING et al., 2002). Após ser absorvido, o NH4<sup>+</sup> é principalmente assimilado nas raízes pelas enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (NADH-GOGAT) e, posteriormente, transportado através do xilema para a parte aérea, principalmente na forma de glutamina (FUKUMORITA; CHINO, 1982; BLOOM et al., 1992). Quando a planta é submetida à elevadas concentrações externas de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, há dificulade em controlar o influxo para dentro das células e, consequentemente, quantidades significativas de amônio podem ser transportadas pelo xilema até a parte aérea (SCHOERRING, et al., 2002; BRITTO; KRONZUCKER, 2005). Além disso, a presença de um sistema de transporte de amônio na parte aérea é necessária para realizar a remobilização desta fonte de N em condições de deficiência de N, na senescência das folhas, e em muitas outras vias envolvendo N, como processos catabólicos e anabólicos (TSCHOEP et al., 2009; XU et al., 2012).

Com a perspectiva de detectar as funções de AMTs de cana-de-açúcar na parte aérea de plantas sob condições limitantes de disponibilidade de N, plantas dos genótipos 'Col-0', *qko* não transformadas e *qko* superexpressando os genes *ScAMT2;1* ou *ScAMT3;3A* foram cultivadas em solução nutritiva por 45 d em solução contendo 2mM de KNO<sub>3</sub>, para homogenizar o crescimento das plantas sem permitir que o processo de absorção interfirisse na visualização dos resultados de transporte de N na parte aérea. Em seguida, a plantas foram submetidas a deficiência de N (-N, sem adição de N na solução nutritiva) por 13 d, e então o fenótipo visual das plantas foi avaliado.

Como esperado, o controle 'Col-0', o qual possui todos os transportadores de amônio, apresentou alterações fenotípicas, com folhas maduras com alguns sinais de amarelecimento e acúmulo de antocianinas, que são sintomas típicos de deficiência de N em folhas maduras (DIAZ et al., 2006; KRAPP et al., 2011) (Figura 42). Já o controle mutante *qko* não transformado apresentou sinais de deficiência de N mais acentuados, sendo evidente o maior acúmulo de antocianinas em suas folhas, com coloração púrpura e verde-pálido (Figura 42).

Os mutantes *qko* de arabidopsis complementados com os genes *ScAMT2;1* (evento G1) e *ScAMT3;3A* (eventos H1 e H3) expressaram fenótipos de sintomas de deficiência de N intermediários a *qko* e 'Col-0', indicando que esses genes desempenham funções de transporte de N na parte aérea.



Figura 42 – Análise fenotípica de parte aérea de plantas de arabidopsis selvagens ('Col-0'), mutantes (qko) e linhas transgênicas para as construções 35:ScAMT2;1 (evento G1) e 35S:ScAMT3;3A (eventos H1 e H3) submetidas a condições de deficiência de N (0 N) por 13 d. À esquerda 3 rosetas de cada genótipo e à direita folhas da roseta representativa da média de vigor das 6 rosetas avaliadas da mais madura para a mais jovem.

A indução de AMTs em folhas é atribuída ao transporte de amônio originado de processos como a redução do nitrato a nitrito obtido do solo, pelo catabolismo e anabolismo de compostos aminos endógenos (LEA; IRELAND, 1999; XU et al., 2012), pela fotorrespiração onde o amônio liberado nas mitocôndrias e reassimilado em cloroplastos deve ser transportado através da membrana de ambas as organelas (D´APUZZO et al., 2004), durante a senescência das folhas (MATTSSON; SCHJOERRING, 2003; HOWITT; UDVARDI, 2000; VON WIRÉN et al., 2000b), e durante o dia, devido às maiores taxas de transpiração na qual altos níveis de amônio podem ser translocados via xilema (VON WIRÉN et al., 2000b). Estudos demonstraram que sob deficiência de nitrogênio externo a principal

fonte de N remobilizada entre parte aérea e raízes é proveniente de aminoácidos (KRAPP et al., 2011). Além disso, os transportadores também podem exercer um papel secundário na recuperação de amônio perdido das células da raiz e e da parte aérea (SIMON-ROSIN et al., 2003).

Com o intuito de investigar as funções específicas dos genes *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* na parte aérea dos transformantes, experimentos para verificar a translocação do amônio foram realizados. Para o experimento de translocação, plantas de arabidopsis dos genótipos selvagem ('Col-0'), mutante (*qko*) e as distintas linhas transgênicas *qko*+35S:*ScAMT2;1*#G1 e *qko*+35S:*ScAMT3;3A* #H1 e #H3, foram cultivadas por 45 d em solução nutritiva contendo 2 mM de KNO<sub>3</sub>, e em seguida foram transferidas para soluções sem adição de N (-N) por 5 d. Após esse período, foram realizadas as análises de influxo de amônio por 1 h com 4 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 60% enriquecido com <sup>15</sup>N-amônio em raízes e em folhas das diferentes linhas.

O mutante quádrulo (*qko*) defectivo para o transporte de amônio apresenta significativa redução no acúmulo de <sup>15</sup>N-amônio em suas raízes, sendo esta em torno de 51% em relação ao genótipo selvagem 'Col-0' (Figura 43). Pode-se também, reafirmar a funcionalidade da proteína ScAMT2;1 na função de aquisição de amônio pelas raízes de arabidopsis, considerando que o acúmulo de <sup>15</sup>N derivado de amônio em raízes de *qko*+35S:*ScAMT2;1* foi 72% maior que o mutante *qko* não transformado (Figura 43). Ao contrário dos resultados obtidos nos experimentos anteriores de influxo rápido, plantas de *qko*+35S:*ScAMT3;3A*#H1 apresentaram um aumento significativo no acúmulo de <sup>15</sup>N-amônio em suas raízes em relação ao mutante *qko*, com um excedente de 21,4%, indicando que ao longo de 1 hora sob alto amônio, a atividade de ScAMT3;3A também contribui para aquisição de amônio (Figura 43). Porém, fica evidente com a comparação no acúmulo de <sup>15</sup>N derivado de amônio em raízes de plantas *qko* expressando ScAMT2;1 ou ScAMT3;3A que o gene ScAMT2;1 efetivamente acumula mais N-amônio em raízes, partipando na absorção dessa fonte inorgânica de N (Figura 43).

A diferença significativa no acúmulo de <sup>15</sup>N derivado de amônio na parte aérea de plantas 'Col-0' quando comparado a *qko* não transformado, representada por um excedente de 41%, demonstra a atividade de proteínas AMTs sendo reguladas para a translocação de N para os órgãos fotossintetizantes (Figura 43B). A parte aérea das linhas transgênicas superexpressando *ScAMT2;1* no *background* de *qko* mostraram um acúmulo de <sup>15</sup>N 36% maior que *qko*, enquanto em plantas superexpressando o gene de cana-de-açúcar *ScAMT3;3A* não houve diferença significativa (Figura 43B). Dado o exposto, é possível inferir que a proteína ScAMT2;1 de cana-de-açúcar possui um efeito aditivo na função de translocação de amônio da raiz para a parte aérea, enquanto a proteína ScAMT3;3A não possui envolvimento

nesta função (Figura 43B). Com base na localização de ScAMT2;1:GUS e GFP na região vascular quando expresso em raízes de arabidopsis (Figuras 32, 33, 34, 35, 36) e reduzida regulação de ScAMT2;1 devido a variação da disponibilidade de N em cana-de-açúcar (Figuras 32, 33, 34, 35) é possível inferir que esse gene possivelmente atua no carregamento de amônio em células do xilema, realizando a translocação de amônio da raiz para a parte aérea em cana-de-açúcar. Os experimentos precisam ser confirmados, no entanto, um padrão similar ao de ScAMT2;1 foi encontrado em arabidospis para AtAMT2;1 com localização em tecidos vasculares de raízes, folhas, hastes e flores; com expressão na região cortical das raízes e assim foi sugerido que esse gene atua na translocação de amônio da raiz para a parte aérea nessa espécie (YUAN et al., 2007), sendo que essa hipótese ainda não foi confirmada.



**Figura 43** – Acúmulo de <sup>15</sup>N-amônio em raízes e em parte aérea, representando a translocação de Nderivado de amônio em plantas de arabidopsis selvagens ('Col-0'), mutantes (*qko*) e linhas transgênicas para as construções 35:ScAMT2;1#G1 e 35S:ScAMT3;3A#H1 e H3. O influxo de <sup>15</sup>N foi realizado por 1 h com 4 mM de <sup>15</sup>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com 60% de enriquecimento, em raízes de plantas submetidas à deficiência de N (0 N) por 5 d. A: raiz ; **B**: parte aérea. Barras indicam ±SE (n= 5). Diferenças significativas em relação ao controle *qko* são indicadas por asteriscos (\* $p \le 0.05$  e \*\* $p \le 0.001$ , teste-t de Student).

Estudos adicionais foram realizados para investigar o processo de remobilização de N de folhas maduras para folhas jovens. Para isso, plantas de arabidopsis dos genótipos selvagem ('Col-0'), mutante (*qko*) e as distintas linhas transgênicas *qko*+35S:*ScAMT2;1*#G1 e

qko+35S:ScAMT3;3A #H1 e #H3, foram cultivadas por 45 d em solução nutritiva contendo 2 mM de KNO<sub>3</sub>, e em seguida foram transferidas para meio de cultivo sem adição de N por 5 d. Após esse período, uma solução de 50 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 60% enriquecido com <sup>15</sup>N-amônio foi adicionada a folhas maduras não senescentes das rosetas dos distintos genótipos. Após 24 h da aplicação do <sup>15</sup>N-amônio, as folhas maduras e folhas jovens foram coletadas para análise de <sup>15</sup>N cumulativo.

Pela avaliação dos dados, nota-de que, como previsto, o controle selvagem 'Col-0' apresentou a maior taxa de remobilização, na qual o N encontrado nas folhas jovens representou em torno de 33% do total encontrado nas folhas, enquanto o N detectado em folhas jovens de *qko* representaram apenas 4% do total (Figura 44A e B). Estes dados mostram a baixa capacidade deste mutante em remobilizar o nitrogênio das folhas senescentes para as folhas em desenvolvimento. As linhas transgênicas estudadas apresentaram-se intermediárias às plantas controles; *qko*+35S:*ScAMT2;1* remobilizou 9,4% de sua fonte de N proveniente de folhas maduras para folhas jovens, já em plantas *qko*+35S:*ScAMT3;3A* o transporte de <sup>15</sup>N derivado de amônio para folhas jovens foi de 10,7% para o evento H1 e 15,6% para o evento H3, representando um deslocamento cerca de 2,3, 2,6 e 3,8 vezes maior em relação a *qko* respectivamente (Figura 44A e B).

O experimento permite concluir que a proteína ScAMT3;3A está envolvida na remobilização de nitrogênio na parte aérea da planta, possivelmente promovendo o carregamento do floema e permitindo o deslocamento do N das folhas maduras para as folhas jovens, atuando como dreno para o crescimento e desenvolvimento de novas folhas. Tais resultados estão de acordo com as análises de perfil transcricional de cana-de-acúcar, os quais mostram altos níveis basais dessa proteína nas folhas desta gramínea, principalmente nas folhas maduras (+3) (figura 10B e D).

Os resultados de remobilização por detecção de <sup>15</sup>N (Figura 44) aliados ao fenótipo encontrado no experimento de longo período de deficiência (Figura 42), levam à conclusão de que a proteína ScAMT3;3A participa do processo de reutilização de nitrogênio na parte aérea, transportando amônio para folhas em desenvolvimento e que a proteína ScAMT2;1 exerce uma contribuição nessa função, porém muito pequena, e que provavelmente o melhor desempenho de plantas superexpressando *ScAMT2;1* frente a um período crítico de deficiência possa ser resultado do processo de translocação do amônio das raízes para a parte aérea.



**Figura 44** –Detecção de <sup>15</sup>N-amônio em folhas maduras e folhas jovens, representando a remobilização em plantas de arabidopsis selvagens ('Col-0'), mutantes (*qko*) e linhas transgênicas para as construções 35:ScAMT2;1 e 35S:ScAMT3;3A. O influxo de <sup>15</sup>N foi realizado com 50 mM de <sup>15</sup>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em folhas maduras de plantas submetidas a condições de deficiência de N (0 N) por 5 d. A: Acúmulo de <sup>15</sup>N-amônio em folhas maduras e jovens; B: porcentagem representada pelo <sup>15</sup>N detectado nas folhas maduras e jovens. Barras indicam ±SE (n= 4). Diferenças significativas em relação ao controle *qko* são indicadas por asteriscos (\* p < 0,05 e \*\* p < 0,001, teste-t de Student).

# 5. CONCLUSÕES

 $\checkmark$  A seleção em biblioteca de BAC de cana-de-açúcar permitiu identificar 9 genes *AMTs* em 18 BACs, sendo 2 genes da subfamília AMT1 (5 BACs) e 7 genes da subfamília AMT2 (13 BACs).

✓ Análises de expressão gênica de ScAMT2;1 e ScAMT3;3A em cana-de-açúcar demonstraram maior acúmulo em raízes e em folhas maduras, respectivamente, e ainda que estes genes apresentam padrões de regulação distintos de acordo com a ontogenia e status de N da planta.

✓ A localização da expressão órgão/tecido específico de *ScAMT2;1* e *ScAMT3;3A* de cana-de-açúcar, utilizando seus promotores endógenos fusionados aos genes repórteres *GUS* ou *GFP*, permitiu identificar a expressão desses *AMT2* na região mais interna das raízes, provavelmente correspondente a células da endoderme/periciclo e vascular, e na região varcular na parte aérea, sendo regulados pela disponibilidade e fonte de N. A localização da expressão célula específica identificou *ScAMT2;1* na membrana plasmática de células de raízes.

✓ A caracterização funcional de levedura mutante para o transporte de amônio expressando *ScAMT2;1* ou *ScAMT3;3A* demonstra que estes genes restauram a função de transporte de amônio, porém, com capacidades distintas, sendo que ScAMT2;1 realiza maior absorção de amônio; no entanto, este experimento não indicou sensibilidade dessas proteínas a metilamônio.

✓ A caracterização funcional de plantas de *qko* superexpressando *ScAMT2;1* ou *ScAMT3;3A*, e transformadas com *ScAMT2;1* dirigido por seu promotor endógeno, quando crescidas exclusivamente em amônio como fonte de N, demonstra que as plantas transgênicas têm um aumento significativo na produção de biomassa em relação a *qko*, indicando que essas proteínas são capazes de transportar amônio.

 $\checkmark$  O influxo e acúmulo de <sup>15</sup>N-amônio *in vivo* em raízes e parte aérea de plantas de arabidopsis mutante (*qko*) superexpressando *ScAMT2;1* ou *ScAMT3;3A* demonstrou que ScAMT2;1 atua na absorção de amônio pelas raízes e provavelmente no carregamento do xilema, enquanto ScAMT3;3A está possivelmente envolvida na remobilização de amônio na parte aérea, podendo atuar aditivamente na absorção de amônio em raízes sob alto amônio.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, S.L.A.; DICKMANNS, A.; FICNER, R.; EINSLE, O. Crystal structure of the archaeal ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 102, p. 14994-14999, 2005.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS - ANDA. Anuário Estatístico do Setor de Fertilizantes. São Paulo, 2008.

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

AUSTIN, A.T.; BUSTAMANTE, M.M.C.; NARDOTO, G.B.; MITRE, S.K.; PÉREZ, T.; OMETTO, J.P.H.B.; ASCARRUNZ, N.L.; FORTI, M.C.; LONGO, K.; GAVITO, M.E.; ENRICH-PRAST, A.; MARTINELLI, L.A. Latin America' s nitrogen challenge. **Science**, Washington, DC, v. 340, n. 6129, p.149, 2013.

BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; 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.; LI, S.; LI, H.; ZHU, S.; SHI, W.; SU, Y. Molecular basis and regulation of ammonium transporter in rice. **Rice Science**, Amsterdam, v. 16, n. 4, p. 314-322, 2009.

BASANTA, M.V.; DOURADO NETO, D.; REICHARDT, K.; BACCHI, O.O.S.; OLIVEIRA, J.C.M.; TRIVELIN, P.C.O.; TIMM, L.C.; TOMINAGA, T.T.; CORRECHEL, V.; CÁSSARO, F.A.M.; PIRES, L.F.; MACEDO, J.R. Management effects on nitrogen recovery in a sugarcane crop grown in Brasil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 116, p. 235-248, 2003.

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.

BLOOM, A.J.; SUKRAPANNA, S.S.; WARNER, R.L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, n. 4, p. 1294–1301, 1992.

BRITTO, D.T.; KRONZUCKER, H.J. Nitrogen acquisition, PEP carboxylase, and cellular pH homeostasis: new views on old paradigms. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, n. 11, p. 1396-1409, 2005.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P.C.O.; CONTIN, T.L.M.; DIAS, F.L.F.; ROSSETTO, R.; MARCELINO, R.; COIMBRA, R.B.; QUAGGIO, J.A. Ammonia volatilisation from urease inhibitor-treated urea applied to sugarcane trash blankets. **Scientia Agricola**, Piracicaba, Brasil, v. 65, p. 397-401, 2008.

CEREZO, M.; TILLARD, P.; FILLEUR, S.; MUÑOS, S.; DANIEL-VEDELE, F.; GOJON A. Major alterations of the regulation of root NO3- uptake are associated with the mutation of *Nrt2.1* and *Nrt2.2* genes in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 262-27, 2001.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS - CGEE. Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil, 2009. Brasília, DF: MCTI, CGEE, 2009. http://www.cgee.org.br/publicacoes/biotenaol.php. Acesso em 2 Fev. 2016.

CHAPMAN, L.S.; HAYSOM, M.; SAFFIGNA, P.G. The recovery of <sup>15</sup>N 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.

CHOW, C.; ZHENG, H.; WU, N.; CHIEN, C.; HUANG, H.; LEE, T.; CHIANG-HSIEH, Y.; HOU, P.; YANG, T.; CHANG, W. PlantPAN 2.0: an update of plant promoter analysis navigator for reconstructing transcriptional regulatory networks in plants. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 44, p. D1154–D1160, 2015. doi:10.1093/nar/gkv1035.

CLUSTER, P.D.; O'DELL, M.; METZLAFF, M.; FAVELL, R.B. Details of T-DNA structural organization from a transgenic Petunia population exhibiting co-expression. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 32. p. 1197-1203, 1996.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira- 4. Levantamento - Cana-de-açúcar. Brasília, DF, 2016. Disponível em: <u>http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16 04 14 09 06 31 boletim cana p</u> <u>ortugues - 40 lev - 15-16.pdf.</u> Acesso 01 jun. 2016.

CORDEIRO, L. Fixação do nitrogênio. In: KERBAUY, G. (Org.) **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2008. p. 51-64.

COUTURIER, J.; MONTANINI, B.; MARTIN, F.; BRUN, A.; BLAUDEZ, D.; CHALOT, M. The expanded family of ammonium transporters in the perennial poplar plant. **New Phytologist**, London, v. 174, p. 137-150, 2007.

CROOKS, E.G.; HON, G.; CHANDONIA, J.; BRENNER, S.E. WebLogo: A sequence logo generator. **Genome Research**, Coldo Spring Harbor, v.14, p. 1188-1190, 2004.

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.; ALAOUI, H.E.; BARBULOVA, A.; BETTI, M.; DIMOU, M.; KATINAKIS, P.; MARQUEZ, A.; MARINI, A.; UDVARDI, M.K.; CHIURAZZI, M. Characterization of three functional high-affinity ammonium transoporters in *Lotus japonicus* with differential transcriptional regulation and spatial expression. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, p. 1763-1774, 2004.

DECHORGNAT, J.; NGUYEN, C.T.; ARMENGAUD, P.; JOSSIER, M.; DIATLOFF, E.; FILLEUR, S.; DANIEL-DEDELE, F.X. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 1349-1359, 2011.

DIVISÃO DE POPULAÇÃO DO DEPARTAMENTO DE ECONOMIA E ASSUNTOS SOCIAIS DAS NAÇÕES UNIDAS - DESA. **Relatório Perspectivas da População Mundial**: Revisão de 2010. Bruxelas, Bélgica, 2010. Disponível em http://www.un.cv/files/PT-SWOP11-WEB.pdf 2010. Acesso em: 10 fev. 2014.

DESFEUX, C.; CLOUGH, S.J.; BENT, A.F. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the arabidopsis floral-dip method. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, p. 895-904, 2000.

DIAZ, C.; SALIBA-COLOMBANI, V.; LOUDET, O.; BELLUOMO, P.; MOREAU, L.; DANIEL-VEDELE, F.; MOROT-GAUDRY, J.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 47, p. 74-83, 2006.

DIRZO, R.; RAVEN, P.H. Global state of biodiversity and loss. Annual Review of Environment and Resources, Palo Alto, v. 28, p. 137–167, 2003.

DONATO, V.M.T.S.; ANDRADE, A.G.; SOUZA, E.S.; FRANÇA, J.G.E.; MACIEL, G.A. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 11, p. 1087-1093, 2004.

DOYLE, J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresch leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Irvine, v.19 p. 11-15, 1987.

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.

ELLERBECK, M.; SCHÜBLER, A.; BRUCKER, D.; DAFINGER, C.; LOOS, F.; BRACHMANN, A. Characterization of three ammonium transporters of the glomeromycotan fungus *Geosiphon pyriformis*. **Eukaryotic Cell**, Washington, DC, v. 12, p. 1554-1562, 2013.

ERISMAN, J.W.; BLEEKER, A.; GALLOWAY, J.; SUTTON, M.S. Reduced nitrogen in ecology and the environment. **Environmental Pollution**, Barking, v. 150, p. 140-149, 2007.

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 Cyclying in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 86, p. 211-223, 2010.

FAN, S.C.; LIN, C.S.; HSU, P.K.; TSAY, Y.F. The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for the source-to-sink remobilization of nitrate. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, p. 2750-2761, 2009.

FAN, X.; JIA, L.; SMITH, S.J.; MILLER, A.J.; SHEN, Q. Comparing nitrate storage and remobilization in two rice cultivars that differ in their nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 1729–1740, 2007.

FAO. FAOSTAT. Rome, 2015. Disponivel em: <<u>http://faostat.fao.org/></u>. Acesso em: 1 jul. 2016.

FARONI, C.E. Eficiência agronômica das adubações nitrogenadas de plantio e após o primeiro corte avaliada na primeira soqueira de cana-de-açúcar. 2008. Tese (Doutorado)
– Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FARQUHAR, G.D.; FIRTH, P.M.; WETSELAAR, R.; WEIR, B. On the gaseous exchange of ammonia between leaves and the environment: determination of the ammonia compensation point. **Plant Physiology**, Rockville, v. 66, p. 710-714, 1980.

FEDOROFF, N. Transposable elements, epigenetics, and genome evolution. Science, Washington, DC, v. 338, p. 758-767, 2012.

FERREIRA, D.F. SISVAR: A computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 35, p.1039-1042, 2011.

FESCHOTTE, C. The contribution of transposable elements to the evolution of regulatory networks. **Nature Reviews. Genetics**, London, v. 9, p. 397-405, 2008.

FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E.J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 41, p. 331-368, 2007.

FINNEGAN, J.; McELROY, D. Transgene inactivation: plants fight back. **Biotechnology**, Cambridge, v. 12, p. 883-888, 1994.

FINNEMANN, J.; SCHJOERRING, J.K. Translocation of  $NH_4^+$  in oilseed rape plants in relation to glutamine synthetase isogene expression and activity. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 105, p. 469-477, 1999.

FLAVELL, R.; CRUZ, C.H.B.; CHRISTIE, M.; ALLEN, J.; KELLER, M.; GILNA, P.; KELL, D. Moving forward with biofuels. **Nature Outlook Biofuels**, London, v. 474, n. 7352, p. S44-S48, 2011.

FOLEY, J.A.; RAMANKUTTY, N.; BRAUMAN, K.A.; CASSIDY, E.S.; GERBER, J.S.; JOHNSTON, M.; MUELLER, N. D.; O'CONNELL, C.; RAY, D.K.; WEST, P.C.; BALZER C.; BENNET, E.M.; CARPENTER, S.R.; HILL, J.; MONFREDA, C.; POLASKY, S.; ROCKSTRÖM, J.; SHEEHAN, J.; SIEBERT, S.; TILMAN, D.; ZAKS, P.M. Solutions for a cultivated planet. **Nature**, London, v. 478, p. 337-342, 2011.

FONG, R.N.; KIM, K.S.; YOSHIHARA, C.; INWOOD, W.B.; KUSTU, S. The W148L substitution in the *Escherichia coli* ammonium channel AmtB increases flux and indicates that the substrate is an ion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 104, p. 18706–18711, 2007.

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.

FRANCO, H.C.J.; TRIVELIN, P.C.O.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; OTTO, R. Aproveitamento pela cana-de-açúcar da adubação nitrogenada de plantio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 2763-2770, 2008.

FUKUMORITA, T.; CHINO, M. Sugars, amino acid and inorganic contents in rice phloem sap. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 23 p. 273-283, 1982.

GALLOWAY, J.N.; COWLING, E.B. Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. **Ambio**, Stockholm, v. 31, p. 64–71, 2002.

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.

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.; TRIVELIN, P.C.O.; OLIVEIRA, M.W.; PENATTI, C.P. Crescimento e acúmulo de nitrogênio em cana-de-açúcar cultivada em solo coberto com palha. **Pesquisa** Agropecuária Brasileira, Brasília, DF, v. 36, p. 1347-1354, 2001.

GAVA, G.J.C.; TRIVELIN, P.C.O.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, M.W. Recuperação do nitrogênio (<sup>15</sup>N) da ureia e da palhada por soqueira de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 621-630, 2003.

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 and Soil**, The Hague, v. 332, p. 233–246, 2010.

GIETZ, R.D.; SCHIESTL, R.H. High-efficiency yeast transformation using LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Nature Protocols**, London, v. 2, p.31-34, 2007.

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.

GLASS, A.D.M.; BRITTO, D.T.; KAISER, B.N.; KRONZUCKER, H.J.; KUMAR, A.; OKAMOTO, M.; RAWAT, S.R.; SIDDIQI, M.Y.; SLIM, S.M.; VIDMAR, J.J.; ZHUO, D. Nitrogen transport in plants, with an emphasis on the regulation of fluxes to match plant demand. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Hoboken, v. 164, p. 199–207, 2001.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. Science, Washington, DC, v. 315, p. 808–810, 2007.

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 and Cell Physiology**, Kyoto, v. 54, n. 9, p. 1515–1524, 2013.

GUETHER, M.; NEUHÄUSER, B.; BALESTRINI, R.; DYNOWSKI, M.; LUDEWIG, U.; BONFANTE, P. A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant Physiology**, Rockville, v. 150, p. 73-83, 2009.

HALL, J.A.; KUSTU, S. The pivotal twin histidines and aromatic triad of the *Escherichia coli* ammonium channel AmtB can be replaced. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 108, p. 13270-13274, 2011.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, London, v. 41, p. 95-98, 1999.

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

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.

HOWITT, S.M.; UDVARDI, M.K. Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1465, p. 152-170, 2000.

ISLAM, A.; HASSAIRI, A.; REDDY, V.S. Analysis of molecular and mosphological characteristics of plants transformed with antifungal gene. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 361, p. 47-52, 2007.

JAVELLE, A.; LUPO, D.; RIPOCHE, P.; FULFORD, T.; MERRICK, M.; WINKLER, F.K. Substrate binding, deprotonation, and selectivity at the periplasmic entrance of the *Escherichia coli* ammonia channel AmtB. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 105. p. 5040-5045, 2008.

JEFFERSON, R.A.; KAVANAGH, T.A.; BEVAN, M.W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, London, v. 6, p. 3901-3907, 1987.

JONES, D.L.; JOHN, R.H.; WILLET, V.B.; FARRAR, J.F.; HODGE, A. Dissolved organic nitrogen uptake by plants- an important N uptake pathway? **Soil Biology and Biochemestry**, Oxford, v. 37, p. 413-423, 2005.

JURKA, J.; KAPITONOV, V.V.; KOHANY, O.; JURKA, M.V. Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 8, p. 241-259, 2007.

KHADEMI, S.; O'CONNELL III, J.; REMIS, J.; ROBLES-COLMENARES, Y.; MIERCKE, L.J.W.; STROUD, R.M. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: Structure of AmtB at 1.35 Å. **Science**, Washington, DC, v. 305, p. 1587-1594, 2004.

KHAIRUNNISA, M.B.; ZETI-AZURA, M.H.; AZMI, S.N.; ZAMRI, Z. Effective hygromycin concentration for selection of Agrobacterium-mediated transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Malaysian Applied Biology**. Kuala Lumpur, v. 43. P. 119-123. 2014.

KOBAE, Y.; TAMURA, Y.; TAKAI, S.; BANBA, M.; HATA, S. Lozalized expression of arbuscular mycorrhiza-inducible ammonium transporters in soybean. **Plant and Cell physiology**, Kyoto, v. 51, p. 1411-1415, 2010.

KOEGEL, S.; LAHMIDI, N.A.; ARNOULD, C.; CHATAGNIER, O.; WALDER, F.; INEICHEN, K.; BOLLER, T.; WIPF, D.; WIEMKEN, A.; COURTY, P. 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, 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.

KRAPP, A.; BERTHOMÉ, R.; ORSEL, M.; MERCEY-BOULET, S.; YU, A.; CASTAINGS, L.; ELFTIEH, S.; MAJOR, H.; RENOU, J.; DANIEL-VEDELE, F. Arabidopsis roots and shoots show distinct temporal adaptation patterns toward nitrogen starvation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 157, n. 3, p. 1255–1282, 2011.

LAM, H.M.; COSCHIGANO, K.T.; OLIVEIRA, I.C.; MELO-OLIVEIRA, R.; CORUZZI G.M. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into aminoacids in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 569–593, 1996.

LANQUAR, V.; LOQUÉ, D.; HÖRMANN, 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.J.; AZEVEDO, R. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. Annals of Applied Biology, London, v. 149, p. 243-247, 2006.

LEA, P.J.; IRELAND, R.J. Nitrogen metabolism in higher plants. In: SINGH, B. (Ed.). **Plant amino acids**: biochemistry and biotechnology.New York: Marcel Dekker, 1999. p. 1-47.

LEAL, 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, n. 3, p. 279–292, 2007.

LEAL, M.R.L.V.; GALDOS, M.V.; SCARPARE, F.V.; SEABRA, J.E.A.; WALTER, A.; OLIVEIRA, C.O.F. Sugarcane straw availability, quality, recovery and energy use: a literature review. **Biomass Bioenergy**, Oxford, v. 53, p.11-19, 2013.

LEVY, A.; SELA, N.; AST, G. TranpoGene and microTranspoGene: transposed elements influence on the transcriptome of seven vertebrates and invertebrates. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, p. D47-D52, 2008.

LI, H.; CONG, Y.; CHANG, Y.; LIN, J. Two AMT2-type ammonium transporters from *Pyrus betufolia* demonstrate distinct expression characteristics. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 120, p. 441-451, 2014.

LI, H.; CONG, Y.; LIN, J.; CHANG, Y.H. Molecular cloning and identification of an ammonium transporter gene from pear. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 120, p. 441-451, 2015.

LI, Y.; ROSSO, M.G.; ÜLKER, B.; WEISSHAAR, B. Analysis of T-DNA insertion site distribution patterns in *Arabidopsis thaliana* reveals special features of genes without insertions. **Genomics**, San Diego, v. 87, p. 645-652, 2006.

LIMA, J.E.; KOJIMA, S.; HIDEKI, T.; VON WIRÉ, N. Ammonium triggers lateral root branching in *Arabidopsis* in an AMMONIUM TRANSPORTER1;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**, Amsterdam, v. 25, p. 402-408, 2001.

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

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.; 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.

LUDEWIG, U.; WILKEN, S.; WU, B.; JOST, W.; OBRDLIK, P.; EL BAKKOURY, M.; MARINI, A.M.; ANDRÉ, B.; HAMACHER, T.; BOLES, E.; VON WIRÉN, N.; FROMMER, W.B. Homo-and hetero-oligomerization of ammonium transporter-1 uniporters. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, p. 45603-45610, 2003.

MARIANO, E.; LEITE, J.M.; MEGDA, M.X.V.; TORRES-DORANTE, L.; TRIVELIN, P.C.O. Influence of nitrogen form supply on soil mineral nitrogen dynamics, nitrogen uptake, and productivity of sugarcane. **Agronomy Journal**, Madison, v. 107, p. 641-650, 2015.

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.

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

MARINI, A.M.; VISSERS, S.; URRESTARAZY, A.; ANDRÉ, B. Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Sccharomyces cerevisiae*. **EMBO** Journal, Oxford, v. 13, n. 15, p. 3456-3463, 1994.

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

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. 2. ed. New York: Academic Press, 1995.

MARTIN, A.; LEE, J.; KICHEY, T.; GERENTES, D.; ZIVY, M.; TATOUT, C.; DUBOIS, F.; BALLIAU, T.; VALOT, B.; DAVANTURE, M.; TERCÉ-LAFORGUE, T.; QUILLERÉ, I.; COQUE, M.; GALLAIS, A.; GONZALES-MORO, M.; BETHENCOURT, L.; HABASH, D.Z.; LEA, P.J.; CHARCOSSET, A.; PEREZ, P.; MURIGNEUX, A.; SAKAKIBARA, H.; EDWARDS, K.J.; HIREL, B. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. **Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 3252–3274, 2006.

MARTINELLE, K.; WESTLUND, A.; HÄGGSTRÖM, L. Ammonium ion transport- a cause of cell death. **Cytotechnology**, Dordrecht, v. 22, p. 251-254, 1996.

MARTINELLI, L.A.; FILOSO S. Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: environmental and social challenges. **Ecological applications**, Tempe, AZ, v. 18, p. 885-898, 2008.

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.

MATTSSON, M.; SCHJOERRING, J.K. Senescence-induced changes in apoplastic and bulk tissue ammonia concentrations of ryegrass leaves. **New Phytologist**, London, v. 160, p 489-499. 2003.

MAYER, M.; LUDEWIG, U. Role of AMT1;1 in  $NH_4^+$  acquisition in *Arabidopsis* thaliana. **Plant Biology**, New York, v. 8, p. 522-528, 2006.

McDONALD, S.M.; PLANT, J.N.; WORDEN, A.Z. The mixed lineage nature of nitrogen transport and assimilation in marine eukaryotic phytoplankton: a case study of *Micromonas*. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 27, p. 2268-2283, 2010.

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**, New York, v. 29, p. 51–60, 2012.

MENDES, L.C. **Eficiencia nutricional de cultivares de cana-de-açúcar**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Viçosa, Viçosa, 2006.

MILLER, A.J.; CRAMER, M.D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 274, p. 1-36, 2004.

MILLER, A.J.; FAN, X.; ORSEL, M.; SMITH, S.J.; WELLS, D.M. Nitrate transport and signalling. Journal of Experimental Botany, Oxford, v. 58, n. 9, p. 2297–2306, 2007.

MILLER, S.A. Minimizing land use and nitrogen intensity of bioenergy. **Environmental** Science & Technology, Washington, DC, v. 44, n. 10, p. 3932–3939, 2010.

MONAHAN, B.J.; FRASES, J.A.; HYNES, M.J.; DAVIS, M.A. Isolation and characterization of two ammonium permease genes, meA and mepA, from *Aspergillus nidulans*. Eukaryotic Cell, Washington, DC, v. 1, p. 85-94, 2002.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbioloa e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MUELLER, N.D.; GERBER, J.S.; JOHNSTON, M.; RAY, D.K.; RAMANKUTTY, N.; FOLEY, J.A. Closing yield gaps through nutrient and water management. **Nature**, London, v. 490, n. 7419, p. 254–257, 2012.

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.

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

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

NASS, L.L.; PEREIRA, P.A.A.; ELLIS, D. Biofuels in Brazil: an overview. **Crop Science**, Madison, v. 47, p. 2228-2237, 2007.

NEUHÄUSER, B.; DYNOWSKI, M.; LUDEWIG, U. Channel-like NH3 flux by ammonium transporter AtAMT2. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 583, p. 2833–2838, 2009.

NEUHÄUSER, B.; DYNOWSKI, M.; MAYER, M.; LUDEWIG, U. Regulation of  $NH_4^+$  transport by essential cross talk between AMT monomers through the carboxyl tails. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, p. 1651-1659, 2007.

NEUHÄUSER, B.; LUDEWIG, U. Uncoupling of ionic currents from substrate transport in the plant ammonium transporter AtAMT1;2. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 289, p. 11650-11655, 2014.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; KALAKI, R.B.; GERBASI, T.; RODRIGUES, J.M.; CANTO, F.; SIMPRINI, E.S.; ROVANHOL, P.; CONSOLI, M.H. A dimensão do setor sucroenergético: mapeamento e quantificação de safra 2013/2014. Ribeirão Preto: FEA-RP/USP, 2014. p. 45.

NINNEMANN, O.; JAUNIAUX, J. C.; FROMMER, W. B. Identification of a high affinity NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporter from plants. **EMBO Journal**, London, v. 13, p. 3464-3471, 1994.

OECD. **OECD-FAO agricultural outlook 2015**. Paris: OECD, 2015. Doi:10.1787/agr outlook-2015-en.

OLIVEIRA, F.A.; BERNARDI, A.C.C.; BITTENCOURT, V.C.; CARAMELLO, 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, I.C.; BREARS, T.; KNIGHT, T.J.; CLARCK, A.; CORUZZI, G.M. Overexpression of cytosolic glutamate synthetase. Relation to nitrogen, light, and photorespiration. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, p. 1170–1180, 2002.

OLIVEIRA, L.C.A.; FABRIS, J.D.; PEREIRA, M.C. Óxido de ferro e suas aplicações em processos catalíticos: uma revisão. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 123-130, 2013.

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

ORTIZ-RAMIREZ, C.; MORA, S.I.; TREJO, J.; PANTOJA, O. PvAMT1;1, a highly selective ammonium transporter that functions as  $H^+/NH_4^+$  symporter. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 286, p. 31113-31122, 2011.

OTTO, R.; CASTRO, S.A.Q.; MARIANO, E.; CASTRO, S.G.Q, FRANCO, H.C.J.; TRIVELIN, P.C.O. Nitrogen use efficiency for sugarcane-biofuel production: what is next? **Bioenergy Research**, New York, v. 9, p. 1-18, 2016.

PACHECO, F. Energias renováveis: breves conceitos. **Conjuntura e Planejamento**, Salvador, n. 149, p. 4-11, 2006.

PANTOJA, O. High affinity ammonium transporters: molecular mechanism of action. **Frontiers in Plant Scince**, Lausanne, v. 3, article 34, p. 1-10, 2012.

PEOPLES, M.B.; FRENEY, J.R.; MOSIER, A.R. Minimizing gaseous losses of nitrogen. In: BACON, P.E. **Nitrogen fertilizer in the environment**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 565–606.

PÉREZ-TIENDA, J.; TESTILLANO, P.S.; BALESTRINI, R.; FIORILLI, V.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. GintAMT2, a new member of the ammonium transporter family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 48, p. 1044-1055, 2011.

PIMENTEL, D.; PATZEK, T. Ethanol production: energy and economic issues related to U.S. and Brazilian sugarcane. **Natural Resources Research**, New York, v. 16, p. 235-242, 2007.

PRAY, L.; ZHAUROVA, K. Barbara McClintok and the discovery of the jumping genes (tranpososns). **Nature Education**, London, v.1, p. 169, 2008.

REBOLLO, R.; ROMANISH, M.T.; MAGER, D.L. Transposable elements: an abundant and natural source of regulatory sequences for host genes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 46, p. 21-42, 2012.

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.

RENTSCH, D.; LALOI, M.; ROUHARA, I.; SCHMELZER, E.; DELROT, S.; FROMMER, W.B. *NTR1* encodes a high affinity oligopeptide transporter in *Arabidopis*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 370, n. 3, p. 264-268, 1995.

RESENDE, A.; XAVIER, R.; DE OLIVEIRA, O. Long-term effects of pre-harvest burning and nitrogen and vinasse applications on yield of sugar cane and soil carbon and nitrogen stocks on a plantation in Pernambuco, N.E. Brazil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 281, p. 339-351, 2006.

ROBERTSON, G.P.; VITOUSEK, P.M. Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource. Annual Review of Environment and Resources, PaloAlto, v. 34, p. 97-125, 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, e. 19045, 2011.

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

ROBINSON, N.; FLETCHER, A.; WHAN, A.; VINALL, K.; BRACKIN, R.; LAKSHMANAN, P. SCHMIDT, S. Sustainable sugarcane production systems: reducing plant nitrogen demand. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology**, Brisbane, v. 30, p. 212-219, 2008.

ROON, R.J.; EVEN, H.L.; DUNLOP, P.; LARIMORE, F.L. Mtthylamine and ammonia transport in *Sccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology, Washington, DC, v. 122, p. 502-509, 1975.

ROSSI, M.; ARAUJO, P.G.; VAN SLUYS.M. Survey of transposable elements in sugarcane expressed sequence tags (ESTs). Genetics and Molecular Biology, Ribeirão Preto, v. 24, p. 147-154, 2001.

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

RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAM, M.; SILVA, P.C.C.; COUTO, J.L.; SANTOS, A.R. Absorção de íon amônio e nitrato e seus efeitos no desenvolvimento do girassol em soluação nutritiva. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Aracaju, v. 10, n. 2, p. 1519-5228, 2010.

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.

SEREZINO, L.H.D. Caracterização fisiológica e transcricional dos processos de aquisição e remobilização de nitrato em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). 2015. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

SCHIMEL, J.P.; BENNETT, J. Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. **Ecology**, Brooklyn, v. 85, p. 591-602, 2004.

SCHJOERRING, J.K.; HUSTED, S.; MÄCK, G.; MATTSSON, M. The regulation of ammonium translocation in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 883-890, 2002.

SCHRÖDER, J.J.; SCHOLEFIELD, D.; CABRAL. F.; HOFMAN, G. The effects of nutrient losses from agriculture on ground and surface water quality: the position of science in developing indicators for regulation. **Environmental Science and Policy**, Exeter, Devon, v. 7, p. 15-23, 2004.

SCHWACKE, R.; SCHNEIDER, A.; VAN DER GRAAF, E.; FISCHER, K.; CATONI. E.; DESIMONE, M.; FROMMER, W.B.; FLÜGGE, U.I.; KUNZE, R. ARAMEMNON: a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, p. 16-26, 2003.

SIEWE, R.M.; WEIL, B.; BURKOVSKI, A.; EIKMANNS, B.J.; EIKMANNS, M.; KRÄMER, R. Functional and genetic characterization of the (methyl)ammonium uptake carrier of *Corynebacterium glutamicum*. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 271, p. 5398-5403, 1996.

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**, Campinas, v. 2, n. 2, p. 7–15, 1990.

SIMMONS, B.A.; LOQUE, D.; BLANCH, H.W. Next-generation biomass feedstocks for biofuel production. **Genome Biology**, London, v. 9, n. 12, p. 242, 2008.

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**, The Hague, v. 51, p. 99–108, 2003.

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.

SKOCAJ, D.M.; EVERINGHAM, Y.L.; SCHROEDER, B.L. Nitrogen management guidelines for sugarcane production in Australia: can these be modified for wet tropical conditions using seasonal climate forecasting?. **Springer Science Review**, Dordrecht, v. 1, p. 51-71, 2013.

SOHLENKAMP, C.; SHELDEN, M.; HOWITT, S.; UDVARDI, M. Characterization of *Arabidopsis* AtAMT2, a novel ammonium transporter in plants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 467, p. 273-278, 2000.

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.
SOUPENE, E.; HE, L.; YAN, D.; KUSTU, S. Ammonia acquisition in enteric bacteria: physiological role of the ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 95, p. 7030-7034, 1998.

SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. O nitrogênio na natureza. In: FERNANDES, M.S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 216-252, 2006.

STARCK, J.M.; HART, S.C. High rates of nitrification and nitrate turnover in undisturbed coniferous forests. **Nature**, London, v. 385, p. 61-64, 1997.

STRATHERN, J.N.; KLAR, A.J.S.; HICKS, J.B.; ABRAHAM, J.A.; IVY, J.M.; NASMYTH, K.A.; McGILL, C. Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the *MAT* locus. **Cell**, Cambridge, MA, v. 31, p. 183-182, 1982.

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.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Laurence, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TESTER, M.; LANGRIDGE, P. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. **Science**, Washington, DC, v. 327, p. 818-822, 2010.

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

THORBURN, P.J.; JAKKU, E.; WEBSTER, A.J.; EVERINGHAM, Y.L. Agricultural decision support systems facilitating co-learning: a case study on environmental impacts of sugarcane production. **International Journal of Agricultural Sustaintability**, Clevedon, v. 9, p.1-12, 2011.

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

TILMAN, D.; CASSMAN, K.G.; MATSON, P.A.; NAYLOR, R.; POLASKY, S. Agricultural sustainability and intense production practices. **Nature**, London, v. 418, p. 671-677, 2002.

TILMAN, D.; FARGIUONE, J.; WOLFF, B.; DÁNTONIO, C.; DOBSON, A.; HOWARTH, R.; SCHINDLER, D.; SCHLESINGER, W.H.; SIMBERLOFF, D.; SWACKHAMER, D. Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science**, Washington, DC, v. 292, n. 5515, p. 281–284, 2001.

TILMAN, D.; SOCOLOW, R.; FOLEY, J.A.; HILL, J.; LARSON, E.; LYND, L.; PACALA, S.; REILLY, J.; SEARCHINGER, T.; SOMERVILLE, C.; WILLIAMNS, R. Beneficial biofuels - the food, energy, and environment trilemma. **Science**, Washington, DC, v. 325, n. 5938, p. 270-271, 2009.

TIPPMANN, H. Analysis for free: Comparing programs for sequence analysis. Briefings in **Bioinformatics**, Oxford, v. 5, p 82-87, 2004.

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.

TRIVELIN, P.C.O.; VICTORIA, R.L.; RODRIGUES, J.C.S. Aproveitamento por soqueira de cana-de-açúcar de final de safra do nitrogênio da aquamônia-<sup>15</sup>N e ueia-<sup>15</sup> N aplicado ao solo em complemento à vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, p. 1375-1385, 1995.

TSCHOEP, H.; GIBON, Y.; CRILLO, P.; ARMENGAUD, P.; SZECOWKA, M.; NUNES-NESI, A.; FERNIE, A.R.; KOEHL, K.; STITT, M. Adjustment of growth and central metabolism to a mild but sustained nitrogen-limitation in *Arabidopsis*. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 32, p. 300-318, 2009.

UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO - UNICA. Disponível em: <<u>http://www.unica.com.br/faq/></u>. Acesso em: 1 jul, 2016.

VALE, F.R.; VOLK, R.J.; JACKSON, W.A. Simultaneous influx of ammonium and potassium into maize roots: kinetics and interactions. **Planta**, Berlin, v. 173, p. 424-431, 1988.

VINALL, K.; SCHMIDT, S.; BRACKIN, R.; LAKSHMANAN, P.; ROBINSON, N. Amino acids are a nitrogen source for sugarcane. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 39, p. 503–511, 2012.

VITOUSEK, P.M.; ABER, J.D.; HOWARTH, R.W.; LIKENS, G.E.; MATSON, P.A.; SCHINDLER, D.W.; SCHLESINGER, W.H.; TILMAN D.G. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. **Ecologial Applications**, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 737-750, 1997.

VITOUSEK, P.M.; NAYLOR, R.; CREWS, T.; DAVID, M.B.; DRINKWATER, L.E.; HOLLAND, E.; JOHNES, P.J.; KATZENBERGER, J.; MARTINELLI, L.A.; MATSON, P.A.; NZIGUHEBA, G.; OJIMA, D.; PALM, C.A.; ROBERTSON, G.P.; SANCHEZ, P.A.; TOWNSEND, A.R.; ZHANG, F.S. Agriculture nutrient imbalances in agicultural development. **Science**. Washington, DC, v. 324, p. 1519-1520, 2009.

VITTI, A.C. Adubação nitrogenada da cana-de-açúcar (soqueira) colhida mecanicamente sem a queima prévia: manejo e efeito na produtividade. 2003. 114 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Enrgia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

VITTI, M. Caracterização funcional de genes codificadores de transportadores de amônio em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). 2015. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

VON WIRÉN, N.; GAZZARRINI, S.; GOJON, A.; FROMMER, W.B. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. **Current Opnion in Plant Biology**, New York, v. 3, p. 254-261, 2000b.

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, n. 2, p. 167–175, 2000a.

XU, G.; FAN, X.; MILLER, A.J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. Annual Review of Plant Biology, Palo Alto, v. 63, p. 153–182, 2012.

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. 263–76, 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, M.Y.; SIDDIQI, M.Y.; RUTH, T.J.; GLASS, A.D.M. Ammonium uptake by rice roots: II Kinetics of <sup>13</sup>NH4<sup>+</sup> influx across the plasmalemma. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, p. 1259-1267, 1993.

WHAN, A.; ROBINSON, N.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S.; AITKEN, K. A quantitative genetics approach to nitrogen use efficiency in sugarcane. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 37, p. 448-545, 2010.

WILSON, C.; BELLEN, H.J.; GEHRING, W.J. Position effects on eukaryotic gene expression. **Annual Review of Cell Biology**, Palo Alto, v. 6, p. 679-714, 1990.

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, p. 11, 2014. doi: 10.1186/1471-2148-14-11.

YUAN, L.; GU, R.; XUAN, Y.; SMITH-VALLE, E.; LOUQUÉ, 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, p. 974-984, 2013.

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.