UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

RODOLFO AUGUSTO MANIERO

Caracterização funcional do gene codificador para transportador de amônio *ScAMT3;3* de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

Piracicaba 2019

RODOLFO AUGUSTO MANIERO

Caracterização funcional do gene codificador para transportador de amônio *ScAMT3;3* de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

Versão Original

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

2019

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

Maniero, Rodolfo Augusto

Caracterização funcional do gene codificador para transportador de amônio *ScAMT3;3* de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) / Rodolfo Augusto Maniero / orientador, Antonio Vargas de Oliveira Figueira. – Piracicaba, 2019.

120 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.

Arabidopsis thaliana 2. Bioinformática 3. Cana-de-açúcar 4. Engenharia genética
 Genética molecular vegetal 6. Genômica funcional 7. Nitrogênio 8. Saccharomyces cerevisiae 9. Translocação vegetal 10. Transportador de amônio I. Título

CDU 577.21 (633.61 + 631.81.033)

Elaborada por: Marilia Ribeiro Garcia Henyei CRB-8/3631 Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Dedicatória

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) e à Universidade de São Paulo (USP), seu corpo docente, direção e administração, que fizeram deste o período de maior crescimento profissional e pessoal em minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto (Processo n° 2017/00460-2).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos professores Antonio Figueira (CENA/USP) e Joni Lima (UFMG, Belo Horizonte) pela orientação e co orientação, bem como pela confiança e amizade, durante todas as etapas deste projeto.

A todos os colegas de trabalho do Laboratório de Melhoramento de Plantas (CENA/USP) que participaram e contribuíram direta ou indiretamente para o sucesso deste projeto: Albania Patiño, Anieli Baldo, Bruna Factor, Bruna Queiroz, Daniele Paschoal, Danielle Scotton, Eder Silva, Eduardo Bressan, Érica Santos, Felippe Campana, Gabriel Ferreira, Gabriel Ragazzo, Guilherme Dressano, Laecio Sampaio, Larissa Souza, Luís Serezino, Marilia Morandi, Paulo Cassieri, Rafael Rosada, Vitor Ometto e Wlamir Godoy. Dedico carinho especial à doutoranda Alessandra Koltun (UEM, Paraná) pela amizade e suporte desde o início do projeto, e à técnica Cassia Figueiredo (Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, ESALQ/USP) pela paciência e ajuda nos experimentos de histologia e anatomia vegetal. Por último, dedico carinho especial a minha amiga Luciana Chiba e aos meus primeiros estagiários, Lorena Mendonça e Rafael Monteiro, que me proporcionaram ótimos momentos de companhia, amizade e aprendizado. Desejo sucesso a todos!

Por fim, agradeço aqueles que me apoiaram incondicionalmente, apostaram em mim mais que ninguém e compartilham da minha felicidade: minha família.

Certamente este será mais um passo rumo às novas realizações!

"A criação de um único mundo vem de um grande número de fragmentos e caos".

Hayao Miyazaki

RESUMO

MANIERO, R. A. Caracterização funcional do gene codificador para transportador de amônio *ScAMT3;3* de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) 2019. 120 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

Na crescente demanda mundial por energia limpa, a cana-de-acúcar (Saccharum spp.) representa uma importante cultura para geração de energia renovável de baixo custo e reduzido impacto ambiental. Para atender a essa demanda, o uso de fertilização à base de nitrogênio (N) é essencial para manutenção dos níveis de produtividade da cultura de cana-deaçúcar. No entanto, a cultura de cana-de-açúcar apresenta baixa resposta à aplicação de fertilizantes à base de nitrogênio, contribuindo para a poluição ambiental e consequentes reflexos negativos no balanço energético e econômico para essa cultura. O amônio (NH4⁺) é a fonte preferencial de N absorvida pela cana-de-açúcar, porém, o conhecimento sobre a regulação do processo do transporte e distribuição de amônio nessa espécie permanece limitado. O transporte de amônio em plantas é mediado pela família de genes AMMONIUM TRANSPORTER (AMT), mas o impacto da funcionalidade desses transportadores na eficiência de uso de N (NUE) em cana-de-açúcar requer elucidação. Em estudos prévios foram identificados em uma biblioteca de BAC (Bacterial Artificial Chromosome) de canade-açúcar membros da subfamília AMT2 com expressão em diferentes órgãos nessa espécie para a compreensão quanto à função desses genes na planta. O presente projeto objetivou a caracterização funcional do gene ScAMT3;3 da subfamília AMMONIUM TRANSPORTERS2 (AMT2) de cana-de-açúcar em sistemas heterólogos utilizando mutantes de levedura (Saccharomyces cerevisiae) e Arabidopsis thaliana, defectivos no transporte de amônio. A complementação de levedura com ScAMT3;3 foi capaz de restaurar o crescimento do mutante, além de indicar a sua funcionalidade para o transporte de NH₃/H⁺. Experimentos de localização de atividade promotora de ScAMT3;3 em Arabidopsis utilizando genes repórteres GUS e GFP indicaram a expressão preferencial em tecido foliar, principalmente em células do floema, sendo pouco regulada pelo status e fonte de N. Estes dados corroboram à análise de expressão relativa do gene em cana-de-açúcar. Plantas transgênicas expressando ScAMT3;3 sob regulação do promotor constitutivo 35SCaMV geradas no background genético do mutante quádruplo qko (AtAMT1;1; AtAMT1;2; AtAMT1;3 e AtAMT2;1) de Arabidopsis demonstraram que a expressão ectópica de ScAMT3;3 auxilia no influxo de ¹⁵N-amônio raízes e aumenta o acúmulo de biomassa na parte aérea na presença de amônio. Plantas transgênicas expressando promotor endógeno e região codificante de ScAMT3;3 também apresentaram acúmulo de massa fresca na parte aérea em presença de amônio. Experimentos de acúmulo de ¹⁵N-amônio em folhas indicaram que a função de ScAMT3;3 não está associada ao processo de remobilização em deficiência de N, mas sim ao possível processo de translocação em disponibilidade de N.

Palavras-chave: Transportador de amônio. Expressão heteróloga. Cana-de-açúcar. *Saccharomyces cerevisiae. Arabidopsis thaliana.*

ABSTRACT

MANIERO, R.A. Functional characterization of gene encoding ammonium transporter *ScAMT3;3* from sugarcane (*Saccharum* spp.) 2019. 120 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

In the growing world demand for clean energy, sugarcane (Saccharum spp.) represents an important crop for low-cost renewable energy generation with low environmental impact. To meet this demand, the use of nitrogen-based fertilization is essential to maintain the productivity levels of the sugarcane crop. However, sugarcane plants present low response to the application of nitrogen-based fertilizers, contributing to environmental pollution and consequent negative impacts on the energy and economic balance for this crop. Ammonium is the preferred source of N absorbed by sugarcane, but knowledge about the regulation of the transport process and the distribution of ammonium in this species remains limited. Ammonium transport in plants is mediated by the AMMONIUM TRANSPORTER (AMT) gene family, but the impact of the functionality of these carriers on the N use efficiency (NUE) in sugarcane requires elucidation. In previous studies, BAC (Bacterial Artificial Chromosome) libraries of AMT2 subfamily with expression in different organs in this species were identified in order to understand the function of these genes in the plant. The present study aimed at the functional characterization of the ScAMT3;3 gene from the AMT2 subfamily of sugarcane in heterologous systems using mutants of yeast (Saccharomyces cerevisiae) and Arabidopsis thaliana, defective in ammonium transport. Yeast complementation with ScAMT3;3 was able to restore the growth of the mutant, besides indicating its functionality for NH₃/H⁺ transport. Experimental localization of ScAMT3;3 promoter activity in Arabidopsis using GUS and GFP reporter genes indicated preferential expression in leaf tissue, mainly in phloem cells, being poorly regulated by the status and source of N. These data corroborate the results obtained from the analysis of relative expression of the gene in sugarcane. Transgenic plants expressing ScAMT3;3 under regulation of the constitutive 35SCaMV promoter generated in the genetic background of the *qko* mutant (*AtAMT1*;1; *AtAMT1*;2; *AtAMT1*;3 and *AtAMT2*;1) of Arabidopsis demonstrated that the ectopic expression of ScAMT3;3 helps the influx of ¹⁵N-ammonium roots and increases the accumulation of biomass in shoots in the presence of ammonium. Transgenic plants expressing the endogenous promoter and coding region for ScAMT3;3 also presented accumulation of fresh mass in shoots in the presence of ammonia. ¹⁵N-ammonium accumulation experiments on leaves indicated that the function of ScAMT3;3 is not associated to the remobilization process in N deficiency, but to the possible translocation process in N availability.

Keywords: Ammonium transporter. Heterologous expression. Sugarcane. *Saccharomyces cerevisiae. Arabidopsis thaliana.*

SUMÁRIO

1	INTRO	DUÇÃO	. 15
2	REVISÃ	ĂO DE LITERATURA	. 19
2.1	O n	itrogênio nos sistemas atmosfera-solo-planta	. 19
2.2	A c	ultura da cana-de-açúcar no Brasil	. 21
2.3	Efic	ciência no uso de nitrogênio	. 22
2.4	Tra	nsportadores de amônio	. 24
3	OBJETI	VOS	. 27
3.1	Obj	etivos específicos	. 27
4	MATER	RIAL E MÉTODOS	. 28
4.1	Ide	ntificação dos AMTs no genoma de cana-de-açúcar	. 28
4.2	Ana	álises <i>in silico</i> de <i>ScAMT3;3</i> em BACs de cana-de-açúcar	. 29
4.3	Reg	gulação da expressão de <i>ScAMT3;3</i> em cana-de-açúcar	. 30
4.3.2	1	Extração de RNA total de cana-de-açúcar	. 30
4.3.2	2	Síntese de cDNA de cana-de-açúcar	. 31
4.3.3	3	Análise de transcritos reversos de cana-de-açúcar	. 31
4.4	Clo	nagem de <i>ScAMT3;3</i> de cana-de-açúcar	. 32
4.5	Cor	nplementação de mutante de levedura	. 34
4.5.2	1	Recombinação de ScAMT3;3 para vetor de expressão heteróloga em levedura	. 35
4.5.2	2	Produção de células quimiocompetentes de levedura	. 37
4.5.3	3	Transformação genética de levedura	. 38
4.5.4	1	Análise de complementação genética em levedura	. 39
4.6	Cor	nplementação de mutante quádruplo de Arabidopsis	. 40
4.6.2	1	Recombinação de ScAMT3;3 para vetor de expressão heteróloga em planta	. 40
4.6.2	2	Transformação de Agrobacterium tumefaciens	. 41
4.6.3	3	Transformação genética de Arabidopsis via A. tumefaciens	. 42
4.6.4	1	Análise de expressão gênica em eventos transgênicos de Arabidopsis	. 46
4.6.4	4.1	Extração de RNA total e síntese de cDNA de eventos transgênicos de	16
ATA	1.2	Análisa da transcritos reversos am eventos transgânicos de Archidonsis	. 40
4.0.4	+. <i>2</i>	Analize de transcritos reversos em eventos transgenicos de Arabidopsis	. 47 19
4.0.) c	Análica fonotánica de linhas transcânicas de Archidonsis	. 40
4.0.0)	Functional de la constant de la cons	. 49
4.0.0).I 5)	Experimentos in vitro	. 49 50
4.0.0	0.2 C 0 1	Experimentos <i>in vivo</i>	. 30
4.0.0	0.2.1	Experimento de influxo	. 50

4.6.6.2.	2 Experimento de remobilização	51
4.6.6.2.	3 Experimento de translocação	
5 RE	ESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	Identificação dos AMTs em biblioteca de BAC	53
5.2	Caracterização in silico de ScAMT3;3 identificados em BACs	62
5.3	Expressão heteróloga de <i>ScAMT3;3</i> em levedura	74
5.4	Análise de expressão de <i>ScAMT3;3</i> em cana-de-açúcar	78
5.5	Localização da atividade de <i>proScAMT3;3</i> em Arabidopsis	
5.6	Análise de expressão de ScAMT3;3 em transgênicos de Arabidopsis	
5.7	Análise fenotípica de transgênicos de Arabidopsis	
5.7.1	Experimentos in vitro	
5.7.2	Experimentos in vivo	92
6 CC	DNCLUSÕES	104
REFER	ÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

A população mundial é estimada em 7,6 bilhões de pessoas e a previsão é de que em 2050 este número aumente para 9,9 bilhões (HAUB, 2016), tendo como consequência uma crescente demanda pela produção de bioenergia e alimentos (FARGIONE et al., 2008; SCHARLEMANN; LAURANCE, 2008). Tanto o desmatamento para abertura de novas áreas como o uso intensivo de terras cultivadas preexistentes contribuíram para o aumento da produção agrícola necessária para alcançar tal demanda (TILMAN et al., 2011). No entanto, a intensificação da agricultura implica em um aumento expressivo no uso de fertilizantes, sobretudo dos nitrogenados, para manutenção dos altos níveis de produtividade das espécies agrícolas. Devido à baixa eficiência de uso de fertilizantes (FUE), cerca de 45% de todo nitrogênio (N) aplicado no solo é perdido ao ambiente por meio de volatilização e lixiviação (LI et al., 1998; XIANG et al., 2008). Essa perda e o consequente acúmulo de N reativo no solo leva à degradação ambiental devido à acidificação da atmosfera, eutrofização de solos, poluição de lençóis freáticos, água doce e águas costeiras, redução na biodiversidade do ecossistema, aquecimento global, mudanças climáticas e depleção da camada de ozônio (SHIBATA, 2017).

Considerando a segurança energética e de mudanças climáticas, os biocombustíveis renováveis ganharam atenção como potenciais recursos para atender a demanda mundial por matrizes energéticas (BESSOU, 2011). Nesse sentido, o bioetanol obtido a partir da cana-deaçúcar (Saccharum spp.) é o combustível com a maior capacidade de atender à crescente demanda por energia renovável de baixo custo e reduzido poder poluente (SANTOS et al., 2012). O Brasil é o líder mundial na produção de cana-de-açúcar que tem como produtos o açúcar e etanol (MACEDO et al., 2007), demonstrando a importância dessa cultura no mercado agrícola e econômico nacional (DAL-BIANCO et al., 2012). O alto requerimento de N é fundamental para manutenção dos níveis de produtividade na cultura da cana-de-açúcar, uma vez que a baixa disponibilidade de N no solo leva ao acúmulo de fotoassimilados nas folhas como consequência dos menores níveis de N nesse órgão. Por sua vez, o acúmulo de fotoassimilados exerce um feedback negativo na fotossíntese, causando a redução no crescimento/produtividade em cana-de- açúcar (HARTT, 1970; MUCHOW et al., 1996; VAN HEERDEN et al., 2010). Já o excesso de fertilização de N, pode causar o desvio de esqueletos de carbono (C) para a via de assimilação de N (STITT et al., 2002), levando ao menor acúmulo de sacarose nos colmos e como consequência, reduzida produtividade (RESENDE et al., 2006; VAN HEERDEN et al., 2010).

Estudos realizados com fertilizantes nitrogenados marcados (¹⁵NH₄NO₃ e NH₄¹⁵NO₃) demonstraram que, quando comparada a outras gramíneas cultivadas como sorgo e milho, a cana-de-açúcar e espécies ancestrais de Saccharum apresentam uma menor capacidade para absorver nitrato (NO₃⁻) quando comparado a amônio (ROBINSON et al., 2011). Entre essas espécies, a contribuição do nitrato em relação ao N total das plantas foi bem menor em canade-açúcar, sendo somente de 2 a 5%, enquanto em milho o nitrato representou 22% do N total da planta (ROBINSON et al., 2011). Resultados similares foram obtidos em estudos de campo com plantas de cana-de-açúcar que receberam dose comercial de fertilizante nitrogenado. Nesse caso, a absorção de ¹⁵N-nitrato pelas raízes representou somente 15% da absorção de ¹⁵N-amônio (ROBINSON et al., 2011). Portanto, quando existe alta disponibilidade de N, amônio é a fonte preferencial de N para cana-de-açúcar (ROBINSON et al., 2011; SEREZINO, 2015). Apesar dessa preferência, a comparação direta com arroz (Oryza sativa), uma espécie que preferencialmente utiliza amônio como fonte N (SONODA et al., 2003a; 2003b), demonstraram que a recuperação de fertilizantes nitrogenados aplicados ao solo é baixa em cana-de-açúcar, variando entre 20-30% (CHAPMAN, 1994), enquanto que em arroz essa recuperação pode chegar a 50-60% (GHALEY et al., 2010). Entretanto, a baixa resposta à adubação nitrogenada pela cana-de-acúcar requer a análise fisiológica e molecular do transporte de N nessa gramínea.

O transporte de amônio (NH4⁺) através da membrana plasmática é mediado pela família de proteínas *AMMONIUM TRANSPORTER/METHYLAMMONIUM PERMEASE/RHESUS (AMT/MEP/Rh)*, presentes em quase qualquer organismo (VON WIRÉN; MERRICK, 2004). Em plantas, o transporte de NH4⁺ nas células é devido à atuação dos membros da família de transportadores AMT (LOQUÉ; VON WIRÉN, 2004). 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., 2000; D'APUZZO et al., 2004), enquanto *AMT2;1* de *A. 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 genes 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). Diferentemente de monocotiledôneas, no genoma da planta modelo A. thaliana existe apenas um membro da subfamília AMT2 (AtAMT2;1) (SOHLENKAMP et al., 2000; YUAN et al., 2007a). O mutante quádruplo defectivo para quatro genes AMTs (AtAMT1;1, AtAMT1;2, AtAMT1;3 e AtAMT2;1) de A. thaliana, denominado de qko, apresenta somente 10% da capacidade de absorção de amônio quando comparado ao genótipo selvagem 'Col-0' (ecótipo 'Columbia 0'); porém essa reduzida capacidade de aquisição de amônio pela raiz não foi atribuída à atividade do membro da subfamília AMT2 (AtAMT2;1), mas à contribuição realizada pelas proteínas AtAMT1;1, AtAMT1;2 e AtAMT1;3 (YUAN et al., 2007a). Mais recentemente, a função de AtAMT2;1, um membro da subfamília AMT2, foi caracterizada como importante contribuinte na absorção radicular de amônio via sistema de alta afinidade, além de participar na translocação do amônio entre raiz e parte aérea (GIEHL et al., 2017). Pouco se sabe a respeito da presença de outros membros AMT2 e suas funções no transporte de amônio em plantas. Com isso, a caracterização funcional de genes AMTs em diferentes espécies é importante para compreensão da função dessas proteínas de membrana na adaptação órgão-específico na variação da disponibilidade de N (GUTIERREZ, 2012).

Considerando a importância da nutrição por amônio e para melhor compreensão da função de genes da família *AMTs* em cana-de-açúcar, em estudos prévios em colaboração com o Prof. Joni Esrom Lima (Laboratório de Fisiologia Vegetal, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG) e da colaboração com Prof.^a Marie-Anne Van Sluys (Instituto de Biociências, USP) e Prof.^a Nathalia de Setta (Universidade Federal do ABC), foi realizada a busca de sequências gênicas de *AMTs* utilizando a biblioteca genômica de BACs de cana-de-açúcar (cultivar R570) disponível no laboratório GaTE (*Genomes and Transposable Elements*). O processo de seleção de clones de uma biblioteca BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*) foi realizado através de *pools* 3D por meio de amplificação quantitativa empregando *primers* com base em sequências do banco de dados SUCEST. Com essa abordagem, foram identificados 18 clones BACs distintos contendo genes *AMTs* em cana-de-

açúcar, sendo 5 clones BACs distintos com sequências para *AMT1* (VITTI, 2015) e 13 clones BACs contendo sequências *AMT2* (KOLTUN, 2016) de cana-de-açúcar.

Visto que são inúmeros os danos econômicos e ambientais ocasionados pela aplicação excessiva de fertilizantes nitrogenados no sistema agrícola, torna-se cada vez mais importante a busca pela redução do uso de adubos à base de N, bem como o uso de variedades vegetais com maior eficiência no uso de N (NUE). Embora o amônio seja a fonte preferencial de absorção pela cana-de-açúcar (SEREZINO, 2015), são escassos os estudos que demonstram a funcionalidade dos diversos transportadores de amônio pertencentes à família de genes *AMMONIUM TRANSPORTER (AMT)*. Sendo assim, este trabalho objetivou a caracterização funcional do gene *ScAMT3;3* da subfamília *AMMONIUM TRANSPORTERS2 (AMT2)* de cana-de-açúcar em sistemas heterólogos utilizando mutantes de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e *A. thaliana*, defectivos no transporte de amônio, para elucidação da função fisiológica deste transportador no processo de absorção e/ou redistribuição de amônio na planta. O gene *ScAMT3;3* foi escolhido com base em análises preliminares de expressão em cana-de-açúcar, no qual esse gene foi induzido em folhas, o que pode indicar uma possível função na homeostase de N neste órgão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O nitrogênio nos sistemas atmosfera-solo-planta

Nitrogênio (N) é um macronutriente essencial ao crescimento e desenvolvimento das plantas (ZHANG; FORDE, 1998; WALCH-LIU et al., 2000; STITT et al., 2002; ALBORESI et al., 2005). Este elemento é encontrado em praticamente todas as moléculas chave, tais como nucleotídeos para formação de DNA e RNA, aminoácidos para formação de peptídeos e proteínas, até mesmo clorofila e outros compostos secundários importantes ao desenvolvimento vegetal (HAYNES, 2012). Embora o N contribua com 1-2% da biomassa seca produzida por uma planta cultivada (SANTI et al., 2013), o elemento é tão importante quanto carbono, hidrogênio e oxigênio, pois juntos constituem mais de 90% da massa seca vegetal (EPSTEIN, 1975; CARNAÚBA, 1990; MALAVOLTA et al., 1997). Por este motivo, a disponibilidade deste elemento nos solos é fator limitante à produtividade agrícola (HAYNES, 2012).

A atmosfera é composta por quase 80% de N (PFAU et al., 2018). Apesar disso, sua forma gasosa (N₂) é inacessível às plantas. Para que o elemento seja disponibilizado para as plantas, ele precisa ser reduzido e incorporado nas formas inorgânica ou orgânica no solo. Estas transformações podem ocorrer por processos naturais, como fixação biológica e física, ou por processos antropogênicos, como a produção de fertilizantes nitrogenados sintéticos.

Os processos naturais de transformação e incorporação de N₂ no solo envolvem desde a fixação biológica de N (FBN), até a ação de fenômenos físicos naturais, tais como relâmpagos e a ação vulcânica (FOWLER et al., 2013). A FBN é a redução do N gasoso em amônia mediada pela ação de microrganismos de vida livre ou simbióticos denominados de diazotróficos (BUJIN, 2015). Este processo é catalisado pela enzima nitrogenase e o amônio gerado é assimilado pelas plantas em glutamato por meio da via Glutamina Sintetase/Glutamato Sintase (POSTGATE, 1998). A amônia produzida pelos microrganismos simbióticos fixadores diazotróficos é excretada e assimilada pelas enzimas da planta.

A primeira forma de fertilização nitrogenada limitava-se ao uso de vários materiais orgânicos, incluindo excrementos de animais ("guano") e restos de matéria orgânica (VOORHEES, 1898). Assim, inicialmente, a disponibilidade de N nas culturas agrícolas era determinada principalmente pelo *status* das reservas naturais de N do solo, fixação biológica mediada por microrganismos simbiontes em nódulos de raízes de leguminosas e o pelo próprio ciclo de N dentro do perímetro das propriedades agrícolas.

Uma vez que as fontes naturais de N se tornaram escassas devido a demandas cada vez maiores na produção de alimentos, o desenvolvimento do processo industrial Haber-Bosch permitiu a produção massiva de fertilizantes nitrogenados a custos relativamente menores e que poderiam aumentar a produção agrícola (ERISMAN et al., 2008; FOLLETT et al., 2010). Durante o processo industrial Haber-Bosch são empregadas altas temperaturas (300 a 500°C) e pressão (cerca de 200 atm) convertendo N₂ e hidrogênio gasoso (H₂) em amônia (NH₃), numa reação mediada por um catalisador metálico (tal como o níquel, Ni) (FOWLER, 2015). Atualmente, 90% do produto deste processo é utilizado na fabricação de fertilizantes nitrogenados, o que tem permitido amplamente a difusão da fertilização em áreas cultivadas por muitas décadas (ETRL, 2012).

Os avanços nas práticas agrícolas associados à síntese industrial de fertilizantes nitrogenados possibilitaram o crescimento da produtividade na agricultura moderna, e consequentemente o aumento na produção de alimentos (GALLOWAY; COWLING, 2002; TILMAN et al., 2002). Paralelamente ao aumento no consumo de fertilizantes nitrogenados e maior produção de alimentos, a população mundial cresceu substancialmente desde o último século (SMIL, 1997). O número de pessoas sustentadas por hectare de terra cultivada subiu de 1,9 para 4,3 entre 1908 e 2008 (ERISMAN et al., 2008). Em razão da maior densidade populacional, a demanda por alimento e energia aumentou drasticamente. Estudos estimam que a produtividade das grandes culturas deva aumentar de 70 a 100% para suprir a demanda por alimento em 2050 (WORLD BANK, 2007; BAULCOMBE et al., 2009). Com isso, a expansão de áreas cultivadas para áreas marginais e a necessidade da manutenção de alta produtividade tem levado ao aumento expressivo da aplicação de fertilizantes nitrogenados sintéticos. Apenas para a produção de alimentos, anualmente são requeridos cerca de 120 milhões de toneladas de N atmosférico, o que representa mais que todos os processos terrestres combinados de fixação de N₂ (ROCKSTRÖM et al., 2009).

As entradas de N provenientes das atividades antropogênicas na agricultura tem impactado significativamente o ciclo do N nos ecossistemas aquáticos e terrestres (GALLOWAY et al., 2004; BURT et al., 2008). Em média, somente cerca de 42 a 47% do N aplicado às culturas agrícolas é de fato colhido como produto do cultivo (ZHANG et al., 2015; MUELLER et al., 2017). Isto significa que praticamente metade da entrada de fertilizante nitrogenado não é utilizada pelas plantas cultivadas (SMIL, 1999; CASSMAN et al., 2002; TILMAN et al., 2002; CIAMPITTI; VYN, 2014). Isto é, cerca de 50% do fertilizante nitrogenado aplicado é perdido ao ambiente na forma de N reativo via nitrificação, desnitrificação, lixiviação e volatilização. Este fato tem causado inúmeros problemas

ambientais e ecológicos, tais como emissão de gases de efeito estufa, eutrofização de corpos d'água, acidificação dos solos e a consequente redução na biodiversidade (MCISAAC et al., 2001; GALLOWAY et al., 2003; BOWMAN et al., 2008).

2.2 A cultura da cana-de-açúcar no Brasil

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma gramínea semiperene de clima tropical e subtropical que se destaca pelo seu potencial na produção de biomassa para geração de açúcar e etanol, sendo esta última uma alternativa sustentável comparada ao combustível fóssil (LYND, 2008; LYND et al., 2008). Ela foi trazida de Portugal ao Brasil por volta de 1515 e, devido sua compatibilidade com as condições edafoclimáticas, seu cultivo se difundiu principalmente nas regiões dos estados do Nordeste e Sudeste (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com 8,63 milhões de hectares cultivados e produção de 615,84 milhões de toneladas na safra de 2018/2019 (CONAB, 2018). Além disso, o Brasil também é o maior produtor de açúcar e segundo maior produtor de etanol, com produção de 31,73 milhões de toneladas de açúcar dos quais 62,6% são destinados à produção de etanol (CONAB, 2018). Em 2018/2019, a exportação de açúcar (17,6 milhões de toneladas) e etanol (CONAB, 2018). Em 2018/2019, 11,4 bilhões em receita (UNICA, 2019), indicando a relevância da cultura na economia nacional brasileira.

A fim de manter níveis altos de produção para atender à demanda por energia, a cultura da cana-de-açúcar tem se expandido cada vez mais para áreas marginais, impulsionando o uso cada vez maior de fertilizantes nitrogenados, causando desbalanço entre a produção e a sustentabilidade da cultura. Entre as safras de 2012/2013 e 2018/2019, a área plantada cresceu 19,5%, sendo que o mesmo nível de crescimento é esperado para as próximas décadas (CONAB, 2018). Além disso, a quantidade de fertilizantes utilizada em cana-de-açúcar em 2015 foi de 3,93 Mton, destacando-a como sendo a terceira cultura de maior consumo de fertilizantes no Brasil, seguida por milho e soja (ANDA, 2019). Estes fatos reforçam a importância de se buscar formas alternativas que visam melhor aproveitamento do N pela cultura visto que o Brasil importa cerca de 70% de sua demanda (FRANCO; NETO, 2007).

A cana-de-açúcar é capaz de retirar grandes quantidades de N do solo (IAA/PLANALSUCAR, 1983), contudo a cultura não responde ou responde muito pouco à aplicação de fertilizantes nitrogenados (ZAMBELLO JUNIOR; ORLANDO FILHO, 1981).

Ensaios utilizando adubo nitrogenado marcado com ¹⁵N mostraram que a absorção do fertilizante pela planta varia em função das condições ambientais e de manejo e que, por este motivo, as recomendações de adubação nitrogenada com base em produtividade podem resultar em aplicações excessivas de N, ocasionando perdas de N reativo ao ambiente (TRIVELIN et al., 2002; GAVA et al., 2003; VITTI, 2003; FORTES et al., 2011; VITTI et al., 2011). Em estudos agronômicos com plantações de cana-de-açúcar demonstram que 26% de todo o N aplicado nos campos é absorvido pela cultura, 32% é imobilizado no solo e os 42% restantes são perdidos por volatilização de amônia (19%), lixiviação (5,6%), emissão de N₂O (1,8%) e outras vias (16%) (OTTO et al., 2016). Logo, o entendimento o entendimento dos processos de absorção, transporte e redistribuição de N em cana-de-açúcar é necessário para o desenvolvimento de cultivares com maior eficiência no uso de N.

2.3 Eficiência no uso de nitrogênio

A eficiência no uso de N (*Nitrogen Use Efficiency* - NUE) é definida originalmente como sendo a relação entre a produção de grãos pela unidade de N disponível no solo (MOLL et al., 1982; 1987). Para plantas de produção de biomassa, assim como a cana-de-açúcar, NUE é calculada em termos de peso fresco ou seco produzido pelo conteúdo de N aplicado na cultura. NUE pode ser subdividida em dois processos fundamentais: a eficiência na absorção (*Nitrogen Uptake Efficiency* - NUPE), isto é, a habilidade da planta em remover N do solo; e a eficiência na utilização (*Nitrogen Utilization Efficiency* - NUtE), ou a habilidade da planta em utilizar e direcionar N para órgãos em formação, a qual está atrelada aos processos de assimilação, translocação e remobilização de N.

N pode ser absorvido pelas plantas na forma de compostos inorgânicos, tais como amônio (NH4⁺) e nitrato (NO3⁻), e até mesmo em formas orgânicas, como proteínas e aminoácidos (PAUNGFOO-LONHIENNE et al., 2008). Em solos agrícolas, NO3⁻ é a fonte nitrogenada mais comum, sendo que a sua concentração pode variar de 0,5 a 10 mM (MARSCHNER, 1993). Além disso, o composto é muito solúvel e facilmente convertido pela ação microbiana e química, ocorrendo em condições anaeróbicas (HAYNES; GOH, 1978). Em contrapartida, amônio é menos solúvel e é fortemente retido na matriz do solo. Portanto, em condições agrícolas, NH4⁺ possui concentrações muito menores em relação a NO3⁻, atingindo concentrações milimolares apenas em casos específicos ou de pós-fertilização (MARSCHNER, 1993). A absorção de N inorgânico através da membrana plasmática das células da epiderme e do córtex da raiz ocorre via transportadores de N específicos (LARSSON; INGEMARSSON, 1989). Dependendo do *status* de N do solo, o elemento pode ser absorvido via sistema de transporte de alta afinidade (*High Affinity Transporter System* - HATS), quando a concentração de N externo for menor que 1 mM, ou via sistema de transporte de alta afinidade (*Low Affinity Transporter System* - LATS), quando a concentração de N externo é maior que 1 mM (VON WIRÉN et al., 1997; GLASS et al., 2002).

Quando as duas formas inorgânicas de N estão presentes no solo e sua disponibilidade é limitada, as plantas tendem a absorver preferencialmente NH_{4^+} (XU et al., 1992). Em cana-de-açúcar, estudos demonstraram a preferência por NH_{4^+} e uma menor capacidade de uso de NO_{3^-} quando plantas são submetidas a condições tanto de deficiência quanto suficiência de N (ROBINSON et al., 2011; SEREZINO, 2015). Por este motivo, a discriminação contra nitrato como fonte nitrogenada pode contribuir significativamente para o acúmulo cada vez maior de nitrato em solos agrícolas e a subsequente perda de N reativo ocasionando impactos negativos ao meio ambiente e altos custos socioeconômicos.

A assimilação de N é a etapa seguinte à absorção e ela ocorre principalmente via enzima Glutamina Sintetase (GS). Em geral, praticamente todo nitrato que é absorvido é transportado para a parte aérea, onde sofre a redução mediada pelas enzimas Nitrito Redutase (NiR) e GS nos plastídios, formando amônio (LAM et al., 1996). Nas células vegetais, tanto o amônio derivado da redução do nitrato como o amônio absorvido pelas raízes são convertidos em amônio, o qual é transportado até o cloroplasto, onde é convertido nos aminoácidos glutamina e glutamato via ciclo Glutamina Sintetase/Glutamato Oxoglutarato Aminotransferase (GS/GOGAT) (LEA; MIFLIN, 1974; LEA; FORDE, 1994; LAM et al., 1996). Dessa forma, N inorgânico é assimilado nas plantas na forma de aminoácidos que são importantes carreadores de N (TA et al., 1984).

Durante a senescência, as proteínas foliares, tais como as proteínas fotossintéticas dos plastídios, são degradadas e podem servir como excelente fonte de N suplementar para a formação de novas folhas ou enchimento de grãos (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010). Este processo é conhecido como remobilização, uma estratégia na qual as plantas otimizam a alocação do nitrogênio já assimilado para outras partes da planta. Este mecanismo está ligado principalmente com o fato de que N é um elemento móvel e que órgãos em senescência podem direcionar seus recursos para órgãos novos em formação, como folhas, flores, frutos e sementes. Além disso, a absorção e assimilação de N durante no período de enchimento de grãos é geralmente insuficiente para suprir a demanda por N. As fontes de amônio livre prontos para serem remobilizados e reincorporados podem vir da enzima Rubisco assim que folhas ficam fotossinteticamente menos eficientes, ou podem vir também como produto da

fotorrespiração. Em plantas C₃, 50% do conteúdo de proteínas solúveis totais são devido à Rubisco, enquanto que em plantas C₄ este valor é de 20% (MAE et al., 1983; SAGE et al., 1987).

Visto que os processos de absorção, assimilação, e remobilização fundamentam o NUE, e que NUE é um dos meios mais efetivos no aumento da produção agrícola com melhor aproveitamento do uso de N sem causar efeitos adversos ao meio ambiente (CASSMAN et al., 2003; DAVIDSON et al., 2015), é de extrema importância o estudo e o conhecimento das bases moleculares e fisiológicas envolvidas nestes processos em cana-de-açúcar para posterior aplicação em programas de melhoramento genético.

2.4 Transportadores de amônio

O transporte de amônio é mediado pelas proteínas transmembrana pertencentes à superfamília *AMMONIUM TRANSPORTER/METHYLAMMONIUM PERMEASE/RHESUS* (*AMT/MEP/Rh*) (LUDEWIG et al., 2007). Estas proteínas compartilham alto grau de conservação e estão presentes em praticamente todos os domínios de vida, incluindo bactérias, fungos, plantas e animais (VON WIRÉN; MERRICK, 2004). O primeiro transportador de amônio a ser identificado foi MEP1 em *Saccharomyces cerevisiae* (MARINI et al., 1994). Em seguida, a partir da complementação de mutantes de levedura defectivos para o transporte de amônio, novos transportadores foram sendo identificados como MEP2 e MEP3 de levedura, e diversos AMTs de plantas (MARINI et al., 1997). Posteriormente, proteínas homólogas a MEP e AMT foram identificadas em animais e agrupadas na família de proteínas Rh em humanos (LUDEWIG et al., 2001).

As proteínas transportadoras de amônio de plantas, denominadas de AMTs, foram amplamente estudadas em diversas espécies, sendo variável o número de subfamílias e quantidade de membros em cada subfamília (Tabela 1).

Nome	Espécie	Número de Membros	Referência	
Arabidopsis	Arabidopsis thaliana	5 AMT1 e 1 AMT2	GAZZARRINI et al., 1999	
Tomateiro	Solanum lycopersicum	3 AMT1 e 1 AMT2	LAUTER et al., 1996 VON WIRÉN et al., 2000	
Álamo	Populus trichocarpa	6 AMT1 e 8 AMT2	COUTURIER et al., 2007	
			VON WIRÉN et al., 1997	
A	Oryza sativa	10 distribuídos entre	SAIKI et al., 2002	
Arroz		AMT1 a AMT2	SONODA et al., 2003	
			SUENAGA et al., 2003	
Milho	Zea mays	2 AMT1 o 5 AMT2	GU et al., 2013	
WIIIIO		5 AMITES AMIZ	VON WITTGENSTEIN et al., 2014	
Sorgo	8 distribuídos entre		KOECEL at al. 2012	
Solgo	sorgnum bicolor	AMT1 a AMT2	KOEGEL et al., 2015	
Trigo	Triticum aestivum	23 AMTs	LI et al., 2017	
Cono de exércit	Sacohamun an-		VITTI, 2015	
Cana-de-açucar	Saccharum spp.	2 AMTT e 2 AMT2	KOLTUN, 2016	

Tabela 1. Membros AMTs identificados em espécies vegetais

Estudos de caracterização fisiológica e análise de expressão de transcritos de *AMTs* em plantas indicam conjuntos de transportadores que atuam no controle fino para adaptação da absorção de N em resposta à demanda interna e suprimento externo de N (LOQUÉ; VON WIRÉN, 2004; LANQUAR; FROMMER, 2010; YUAN et al., 2013; GIEHL et al., 2017). Adicionalmente a estes estudos, AMTs podem apresentar localizações distintas e regulação dependendo da condição externa de N disponível, produção de esqueletos de carbono pela fotossíntese e ciclo circadiano, facilitando a absorção de amônio nas raízes, a translocação entre raiz e parte aérea e a remobilização entre folhas maduras e novas em formação (LOQUÉ et al, 2006; GAZZARRINI et al., 1999).

A planta modelo *A. thaliana*, primeira espécie vegetal a ter seus AMTs caracterizados, possui seis genes *AMTs* dos quais cinco são expressos em raízes (*AtAMT1;1*, *AtAMT1;2*, *AtAMT1;3*, *AtAMT1;5* e *AtAMT2;1*), três em parte aérea (*AtAMT1;1*, *AtAMT1;4* e *AtAMT2;1*) e um em pólen (*AtAMT1;4*) (GAZZARRINI et al., 1999; LOQUÉ et al., 2006; NEUHÄUSER et al., 2007; LUDEWIG et al., 2007; YUAN et al., 2008; LIMA et al., 2010). Estes genes foram separados em duas subfamílias, sendo *AMT1* mais próximos de AMT de bactéria e *AMT2* mais próximos de MEP de levedura. Estudos de absorção indicam que AtAMT1;1, AtAMT1;2 e AtAMT1;3 são responsáveis por até 95% da absorção total de N (LOQUÉ et al.,

2006; YUAN et al., 2007a). Em cana-de-açúcar, apesar de quatro membros AMTs terem sido caracterizados anteriormente (VITTI, 2015; KOLTUN, 2016), sendo dois membros de cada subfamília (*AMT1* e *AMT2*), são escassas as informações a respeito da função fisiológica das proteínas transportadoras de amônio no controle da homeostase de N na planta, dado a importância da cultura. Dessa forma, este trabalho foca no estudo funcional do transportador de amônio ScAMT3;3 de cana-de-açúcar utilizando como sistemas heterólogos mutantes de levedura e Arabidopsis defectivos para o transporte de amônio.

3 OBJETIVOS

Realizar a caracterização funcional do gene *ScAMT3;3* da subfamília *AMMONIUM TRANSPORTER2* (*AMT2*) de cana-de-açúcar em sistemas heterólogos utilizando mutantes de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e *Arabidopsis thaliana*, defectivos no transporte de amônio, para auxiliar na elucidação do papel deste transportador no processo de absorção e redistribuição de amônio na planta.

3.1 Objetivos específicos

- Caracterização *in silico* da sequência completa de *ScAMT3;3* em clones de biblioteca de BAC do genoma da cana-de-açúcar;
- 2) Expressão gênica de ScAMT3;3 em cana-de-açúcar;
- Clonagem da sequência completa do gene ScAMT3;3 da subfamília AMT2 a partir da biblioteca de clone BAC do genoma de cana-de-açúcar;
- Caracterização funcional do gene *ScAMT3;3* de cana-de-açúcar por meio de complementação de levedura mutante defectiva para o transporte de amônio;
- Transformação genética de Arabidopsis thaliana, ecótipos 'Col-0' e qko, e seleção de eventos de transformação genética com base em análise de expressão de ScAMT3;3 em Arabidopsis;
- 6) Caracterização fenotípica das plantas transgênicas de Arabidopsis mutantes complementadas com *ScAMT3;3* utilizando ensaios *in vitro* para avaliação de biomassa e ensaios *in vivo* para avaliação de absorção ¹⁵N em raízes, remobilização e translocação de ¹⁵N em folhas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Identificação dos AMTs no genoma de cana-de-açúcar

A identificação dos AMTs foi realizada em pool 3D utilizando a biblioteca genômica de BACs de cana-de-açúcar da cultivar R570, disponível no laboratório da Profª. Marie-Anne Van Sluys do Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo (IB/USP), em colaboração com a Prof^a. Nathalia de Setta da Universidade Federal do ABC (UFABC). A identificação desses genes foi realizada por reações de PCR em tempo real utilizando primers específicos, os quais foram previamente identificados pelo Prof. Joni Lima (UFMG) em colaboração com o Prof. Renato Vicentini da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com base em sequência de genes ortólogos de A. thaliana e O. sativa no SUCEST. O processo de seleção de clones BAC foi realizado por meio de 3 reações de PCR em tempo real: (i) amplificação dos Superpools 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. As amplificações foram realizadas com primers validados previamente utilizando o DNA genômico de cana-de-açúcar e um controle positivo do marcador, geralmente a sequência-alvo do primer clonada em um plasmídeo. A partir da identificação dos AMTs em clones de BAC específicos no pool 3D, esses foram sequenciados utilizando a plataforma 454/Roche para obtenção das sequências do clone contendo cada transportador de amônio de cana-de-açúcar. Essa etapa já foi cumprida e dois clones BAC com DNA genômico contendo sequências do gene ScAMT3;3 de cana-deaçúcar foram selecionadas para estudo funcional neste trabalho.

Foram empregadas análises filogenéticas entre o gene *ScAMT3;3* contido em BACs aqui selecionadas e bancos de dados genômicos recentemente disponibilizados tanto para o parental selvagem (*Saccharum spontaneum*) quanto para a cultivar híbrida (*Saccharum spp.*). Para isto, sequências AMTs de *Sorghum bicolor* (KOEGEL et al., 2013), foram utilizadas como guia para encontrar AMTs de cana-de-açúcar, uma vez que os genomas de sorgo e cana-de-açúcar apresentam alta colinearidade e conservação (GUIMARAES et al., 2011). Sequências AMTs de *S. spontaneum* cv. 'AP85-441' e (ZHANG et al., 2018; número de acesso NCBI <u>GCA_003544955.1</u>) e *Saccharum* spp. cv. 'SP80-3280' (RIAÑO-PACHÓN et al., 2017; número de acesso NCBI <u>GCA_002018215.1</u>) foram pesquisadas por BLAST usando proteínas AMT de sorgo (SbAMT; KOEGEL et al., 2013). As sequências obtidas foram filtradas conforme *E-value* menor que 10⁻¹⁰, além de exclusão de sequências

redundantes e duplicadas usando Jalview 2 (WATERHOUSE et al., 2009), MEGA X (KUMAR et al., 2018) e BioEdit 7 (HALL, 2011). Em seguida, as sequências foram escaneadas por meio do banco de dados *Conserved Domain Database* (CDD) do NCBI (MARCHLER-BAUER, 2011) para encontrar motivo de assinatura característico de proteínas AMT. As sequências AMTs foram então alinhadas usando MAFFT 7 (KATOH et al., 2017). Os alinhamentos foram importados no programa MEGA X para construção de árvores filogenéticas usando o método *Neighbor-Joininig* (NJ) com parâmetros padrões do programa, exceto pelo *bootstrap* igual a 1000. O alinhamento múltiplo entre sequências AMT3;3 de BACs, *S. spontaneum* e *Saccharum* spp. foi realizado por meio do módulo ClustalW dentro do programa BioEdit. A identidade das sequências de aminoácidos foi estimada usando LALIGN (https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN form.html). Com a finalidade de esquematizar a estrutura gênica das sequências *ScAMT3;3* dos clones de BAC, foi utilizado o programa *Exon-Intron Graphic Maker* (http://wormweb.org/exonintron).

4.2 Análises in silico de ScAMT3;3 em BACs de cana-de-açúcar

Foram realizadas várias de análises *in silico* com as diversas sequências promotoras e gênicas de *ScAMT3;3* identificadas nos clones BAC de cana-de-açúcar, com o propósito de selecionar o alvo para a caracterização funcional. O primeiro passo para a comparação dos clones foi o mapeamento dos genes pelo programa Artemis (RUTHERFORD et al., 2000), com a perspectiva de verificar se as sequências gênicas encontradas eram alelos e identificar a presença de elementos transponíveis (TEs) na região regulatória. Para auxiliar nessa escolha, os promotores também foram analisados e comparados por meio do programa PlantPAN 2.0 (CHOW et al., 2015). A identificação de possíveis variações de nucleotídeos e aminoácidos entre as sequências encontradas foi feita por meio de alinhamentos múltiplos progressivos com o algoritmo ClustalW no programa BioEdit 7 ou MEGA X, incluindo para comparação 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.

Ainda para verificar a identidade dessas sequências como *AMT*, a presença de elementos característicos da superfamília de transportadores *MEP/AMT/Rh* foi confirmada. As sequências gênicas codificando o transportador ScAMT3;3 de cana-de-açúcar foram traduzidas pelo programa ORF Finder (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html</u>) e analisadas no banco de dados do UniProt (<u>http://www.uniprot.org/</u>) 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/) 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-[GK]-x-R foi verificado pelo programa WebLogo (http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi/). 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.

4.3 Regulação da expressão de ScAMT3;3 em cana-de-açúcar

Plantas de cana-de-açúcar da cultivar 'SP80-3280' foram cultivadas ao longo de 2 meses em solução nutritiva contendo 1 mM de NH4NO3, 1 mM KH2PO4, 1 mM MgSO4, 250 μM K2SO4, 250 μM CaCl2, 100 μM Na-Fe-EDTA, 50 μM KCl, 50 μM H3BO3, 5 μM MnSO4, 1 μM ZnSO4, 1 μM CuSO4 e 1 μM NaMoO4, com pH ajustado para 5,8 utilizando solução de 2 mM KOH (LOQUÉ et al., 2006). Após esse período, as plantas foram transferidas para solução nutritiva ausente em nitrogênio (-N), ou com 4 mM KNO3 (NO3⁻), 4 mM NH4Cl (NH4⁺), ou solução nutritiva contendo 2 mM NH4NO3 (+N) por 14 dias, sendo que para cada tratamento amostras de raízes, colmo, folhas maduras (+3) e folhas novas recém expandidas (+1) foram coletadas em triplicata e congeladas em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA total.

4.3.1 Extração de RNA total de cana-de-açúcar

As amostras de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar coletadas foram submetidas à extração de RNA total com o intuito de realizar as análises de expressão gênica de *ScAMT3;3*. Para isto, foi empregado o método de extração de RNA total com cloreto de lítio conforme descrito por Leal et al. (2007). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidas para um microtubo de 2 mL, ao qual foi adicionado 1 mL de tampão de extração pré-aquecido a 65°C (2 % CTAB; 2% PVP; 2 M NaCl; 100 mM Tris; 25 mM EDTA; 2% β-mercaptoetanol). Após a homogeneização em banho-maria a 65°C por cerca de 30 min, as amostras foram colocadas no gelo por 1 min, seguida da adição de 1 mL de CIA (clorofórmio:álcool-isoamílico 24:1) e de uma centrifugação a 9.000 g por 10 min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, adicionando um volume igual de CIA, que foi emulsionado seguido de uma centrifugação a 9.000 g por 10 min a 4°C. Novamente, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL para posterior precipitação do RNA total, com solução de 10 M de LiCl (0,1 vol) e incubação a 4°C por 12 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 9.000 g por 30 min a 4°C, seguido do descarte do sobrenadante. O *pellet* formado foi lavado duas vezes com 500 μ L de 75% etanol e centrifugado a 9.000 g por 10 min a 4°C. Por fim, foi feita a ressuspensão do *pellet* em 30 μ L de água 0,01% DEPC (dietilpirocarbonato) autoclavada e o RNA foi armazenado a -80°C.

4.3.2 Síntese de cDNA de cana-de-açúcar

O RNA total extraído de cana-de-açúcar foi quantificado em NanoDrop e sua integridade foi visualizada em gel TAE (40 mM de Tris-Base, 20 mM de ácido acético glacial, 1 mM de EDTA pH 8,0, pH ajustado para 8,3) de 1% agarose corado com 1,5% (v/v) brometo de etídeo. Após a quantificação, cerca de 2 µg do RNA de cada amostra foi tratado empregando 1 U de DNAse I (Life Technologies Inc.) em tampão apropriado, 2 U de RNAseout (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, EUA) e água ultrapura DEPC inativa, em reação incubada a 37°C por 30 min. A reação foi parada com a adição de EDTA, e incubada a 65°C por 10 min. Amostras de 1 µg de RNA total tratado acrescidas de oligodT₁₈ (0,5 µg µL⁻¹) foram desnaturadas a 70°C por 10 min e incubadas a 4°C por 2 min, seguido da adição de 4 µL de 5X *First-Strand Buffer*, 1 mM dNTP, 40 U de RNAseOUT, 1 µL de DTT 0,1 M e 20 U da enzima SuperScript III RT (Invitrogen Co.). A reação foi então incubada a 55°C por 1 h, seguida de incubação a 70°C por 10 min e 4°C por 2 min. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C.

4.3.3 Análise de transcritos reversos de cana-de-açúcar

Para a análise quantitativa de transcritos reversos foi utilizado 5 μ L KAPA SYBR FAST (Kapa Biosystems, Cidade do Cabo, África do Sul), 0,2 μ M de cada iniciador (Tabela 2), 1 μ L do cDNA 3:7 (v/v) e água Milli-Q estéril para um volume final de reação de 10 μ L. Todas as reações de qRT-PCR continham um controle negativo (sem cDNA) e foram realizadas no RotorGene-6000 (Qiagen, Hilden, Alemanha). O perfil da reação foi designado com duas temperaturas iniciais: 50°C por 10 min e 95°C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de três passos: 95°C por 20 s, 60°C por 25 s e 72°C por 25 s. Após a amplificação, determinou-se a curva de dissociação entre 72 e 95°C. Em todos os experimentos os valores dos C_Q foram utilizados para determinar a diferença da expressão gênica, de acordo com método "Delta Delta" (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O gene *Ubiquitina2* (*Ubq2*) de cana-de-açúcar foi utilizado como gene de referência. O gene *ScAMT2;1*, um transportador de amônio da subfamília *AMT2* identificado previamente (KOLTUN, 2016), foi utilizado na comparação da expressão relativa de *ScAMT3;3*. Para a análise semiquantitativa de transcritos reversos a reação foi interrompida durante o ciclo 25, e o produto de reação foi corado com SYBR Gold, carregado em gel agarose 2% (p/v) com tampão 1X TAE e submetido a 3 V cm⁻¹.

Tabela 2. Sequências de iniciadores (*primers*) relativos aos genes *ScAMT3;3* e *ScAMT2;1*, e gene de referência (*Ubiquitina2*), utilizados para análise quantitativa de transcritos reversos em cana-de-açúcar

Nome	Sequências dos primers	Amplicon	
RTqScUbq2 For CTTCTTCTGTCCCTCCGATG		1/10 pb	
RTqScUbq2 Rev	TCCAACCAAACTGCTGCTC	149 po	
RTqScAMT3;3 For	CCGGACTCCAGAGGTGCATT	267 nh	
RTqScAMT3;3 Rev	AACGCCGCTATGTCTGCTCT	207 р0	
RTqScAMT2;1 For	GGAGCTGCTGGAGATCGAGT	1/19 nh	
RTqScAMT2;1 Rev	CGATGGCGAACAGGATGAGC	147 р0	

4.4 Clonagem de ScAMT3;3 de cana-de-açúcar

A partir da identificação das sequências dos transportadores de amônio dos clones de BACs, *primers* específicos foram desenhados para amplificação por PCR das sequências codificante e promotora do *ScAMT3;3* de cana-de-açúcar (Tabela 3). As reações de PCR foram realizadas utilizando PCR *buffer* 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada *primer*, 0,2 µM de cada dNTP e 1 U de *HiFi Hot Start High Fidelity* (Kapa Biosystems). Para região promotora, foi empregado o uso de 50 ng de BAC_023_013, enquanto a amplificação da região codificante (*Open Reading Frame* - ORF) de *ScAMT3;3* foi feita com 1 µL de cDNA 3:7 (v/v) da cultivar 'SP80-3280'. A ciclagem foi de 5 min a 95°C; 40 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 60°C e 90 s a 72°C, e extensão final de 10 min a 72°C. Também foi realizada uma segunda reação de PCR utilizando o *primer* Pro#ORF ScAMT3;3 para introdução de borda coesiva na região promotora e posterior ligação do fragmento com a sua respectiva ORF numa terceira reação de PCR (Figura 1).

Tabela 3. Sequências de iniciadores (*primers*) relativos ao gene que codifica proteína transportadora

 de amônio e sua região regulatória em cana-de-açúcar utilizados para a clonagem

Nome	Sequências dos primers	Amplicon	
ScAMT3;3 For	ATGGCAGCAGGTGCGGTAC	1.452 pb	
ScAMT3;3 Rev	MT3;3 Rev TCAAACATTCTGTGTGACTCCTACAGC		
ProScAMT3;3 For	AAAGGCATCTAAACAAGACCTCGA	1 977 ph	
ProScAMT3;3 Rev	GGCTGGGGCACTGGATCG	1.077 pb	
Pro#ORF ScAMT3;3	ACCTGCTGCCATGGCTGGGGCACT	-	



Figura 1. Representação esquemática das PCRs para união de fragmentos de promotor e região codificante de *ScAMT3;3*

A identificação dos produtos das reações de PCR foi feita por eletroforese em gel TAE de 1% agarose corado com SYBR® Gold (Life Technologies) e visualizado em luz ultravioleta. Os produtos foram purificados com o uso do kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification*® (GE Healthcare; Buckinghamshire, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos foram clonados em vetor de entrada pCR8/GW/TOPO (Life Technologies Co.) de acordo com as instruções do fabricante. Quatro clones positivos para a presença do fragmento de interesse foram sequenciados utilizando o sequenciador 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fischer Scientific; Waltham, MA, EUA) do Laboratório de Melhoramento de Plantas (CENA/USP).

Bactérias eletrocompetentes cepa DH5 α foram transformadas com 1 µL de cada construção e crescidas em meio SOC (20 g L⁻¹ de triptona, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 0,5 g L⁻¹ de NaCl, 180 µL de 20% glicose, pH 7,0) sob agitação a 150 rpm por 1 h a 37°C. O meio contendo as bactérias foi plaqueado em meio LB sólido contendo 100 mg L⁻¹ de espectinomicina para seleção das bactérias transformadas e crescidas a 37°C por 12 h. Para cada construção foram selecionadas 12 colônias, que foram inoculadas separadamente em 5 mL de meio LB líquido com 100 mg L⁻¹ de espectinomicina e crescidas a 37°C *overnight* para extração de DNA plasmidial por lise alcalina. O DNA obtido foi digerido com *EcoR*I a 37°C *overnight* e visualizado em gel 1% agarose em TAE corado com SYBR® Gold sob luz ultravioleta. Clones positivos para a presença do fragmento de interesse foram sequenciados utilizando o sequenciador 3500 Genetic Analyzer do Laboratório de Melhoramento de Plantas (CENA/USP).

4.5 Complementação de mutante de levedura

A cepa 31019b de levedura defectiva no transporte de alta-afinidade a amônio foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Nicolaus von Wirén do IPK-Gatersleben (Department of Physiology and Cell Biology, Alemanha). Para a construção gênica contendo sequência dos *AMTs*, *primers* específicos foram desenhados a partir das sequências gênicas identificadas no genoma de cana-de-açúcar (clones de BAC) e cDNA de raízes e parte aérea da cultivar 'SP80-3280' foram utilizados para amplificação a serem clonadas em vetor pDR196 para expressão em levedura (MARINI et al., 1997). Vetores pDR196 vazios foram utilizados como controle negativo e *AtAMT1;1* de *A. thaliana* clonado em pDR196 como controle positivo (LOQUÉ et al., 2007). A transformação das leveduras mutantes foi realizada de acordo com MARINI et al. (1997). Experimentos funcionais de complementação das leveduras foram
realizados em meio YNB, suplementado com 3% de sacarose, 50 mM de tampão MES-Tris (pH 5,5) e as concentrações 1, 5 e 10 mM de NH4Cl ou 5 mM de arginina, como únicas fontes de N (MARINI et al., 1997; YUAN et al., 2007a). Para genes da subfamília *AMT2*, levedura expressando os genes de cana-de-açúcar também foram submetidas à análise de complementação em diferentes pH (4,5 a 6,5), considerando a possível função no transporte de NH₃⁺, como descrito previamente em ortólogos de Arabidopsis (LUDEWIG et al., 2001).

4.5.1 Recombinação de ScAMT3;3 para vetor de expressão heteróloga em levedura

Para o experimento de expressão heteróloga em levedura, foi construído um único vetor de expressão superexpressando o gene *ScAMT3;3*. Para isto, foram desenhados *primers* para amplificação da sequência codificadora completa de *ScAMT3;3*, contendo bordas com sítios de restrição enzimática específicos para posterior formação de bordas coesivas e ligação em quadro em vetor de destino pDR196 (Tabela 4). O gene *AtAMT1;1* de *A. 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 4. Sequências de iniciadores relativos aos genes que codificam as proteínas transportadoras de amônio *AtAMT1;1* e *ScAMT3;3* utilizados para a clonagem dos genes para complementação de levedura. Em negrito estão as sequências referentes aos sítios de restrição adicionados

Nome	Sequências dos primers	Sítio de restrição	Amplicon	
LevAtAMT1;1 For	GAATTCATGTCTTGCTCGGCCAC	EcoRI	1.518 pb	
LevAtAMT1;1 Rev	CTCGAG TCAAACCGGAGTAGGTG	XhoI		
LevScAMT3;3 For	ACTAGTATGGCAGCAGGTGCGGTA	SpeI	1.464 ph	
LevScAMT3;3 Rev	CTCGAGTCAAACATTCTGTGTGACTC	XhoI	1.404 pb	

As reações de PCR foram realizadas utilizando 1X tampão PCR Kapa, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1 U de HiFi *Hot Start High Fidelity Taq* polimerase de alta fidelidade que possui atividade exonuclease (Kapa Biosystems), 0,4 µM de cada *primer*, 10 ng de DNA plasmidial contendo *ScAMT3;3* em pCR8 previamente sequenciado, 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 µL. 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 de acordo com as instruções do fabricante, e posteriormente quantificados em fluorômetro Hoefer DyNA Quant 200 (Hoefer Inc.; Holliston, MA, EUA). A partir do produto de PCR purificado e adenilado, foi realizada a reação de ligação dessas sequências no vetor pGEM-T Easy (Promega; Madison, WI, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, 1 µL da solução de ligação de cada vetor e inserto de interesse foi adicionado a 40 µL de solução de células eletrocompetentes de E. coli (cepa DH5a) em cubetas de 0,2 mm e transformadas com eletroporador MicroPulser (Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, CA, EUA). Bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo 100 mg L⁻¹ de ampicilina, 0,4 mM de IPTG (indutor de β -galactosidase) e 100 mg L⁻¹ 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⁻¹ de ampicilina e crescidas a 37°C *overnight* para extração do DNA plasmidial por lise alcalina. O DNA plasmidial foi quantificado em fluorômetro Hoefer DyNA Quant 200, e a presença do inserto de interesse foi confirmada por digestão com EcoRI a 37°C overnight, visualizada em gel 0,8% agarose em TAE corado com SYBR Gold. Clones positivos para a presença do fragmento de interesse foram sequenciados utilizando o sequenciador 3500 Genetic Analyzer do Laboratório de Melhoramento de Plantas (CENA/USP) a fim de confirmar a fidelidade das sequências de interesse no plasmídeo de entrada.

Após a confirmação da fidelidade das sequências clonadas, uma segunda digestão foi realizada com as distintas enzimas correspondentes a cada gene (*EcoR*I e *Xho*I para *AtAMT1;1* com tampão Tango 2X, e *Spe*I e *Xho*I para *ScAMT3;3* 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 0,8% agarose em TAE corado com SYBR Gold. 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⁻¹ de ampicilina. 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 nomeadas mep:*AtAMT1;1* e mep:*ScAMT3;3*.

4.5.2 Produção de células quimiocompetentes de levedura

Foi empregada uma cepa mutante de S. cerevisiae 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 mep 1Δ mep 2Δ ::LEU2 mep 3Δ ::KanMX2) (MARINI et al., 1997), disponibilizada pelo Prof. Dr. Nicolaus von Wirén, 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⁻¹ 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⁻¹ de hemisulfato de adenina) pré-aquecido. O frasco foi então incubado em agitador a 30°C e 200 rpm por aproximadamente 4 h. A densidade ótica foi monitorada por um espectrofotômetro com 600 nm de absorbância (DO_{600nm}) em uma diluição de 100 vezes (10 µL de suspensão de levedura em 990 µL de meio YPAD), até que a densidade óptica das células atingisse uma faixa entre $0,6 \in 0,7$.

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 3.000 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 3.000 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 13.000 rcf e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 1 mL de água esterilizada e amostras de 100 μ L foram pipetadas em microtubos, os quais foram estocados em 50% glicerol em *freezer* a -80°C.

4.5.3 Transformação genética de levedura

A cepa 31019b foi transformada com os plasmídeos contendo os genes de interesse, com as construções denominadas mep:*AtAMT1;1* (controle positivo), mep:*ScAMT3;3* 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⁻¹ de DNA de esperma de salmão dissolvido em 10 mM Tris-HCl, 1 mM Na₂-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 levedura competentes para transformação foram descongeladas, centrifugadas a 13.000 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 μ L de PEG 4000 (50%), 36 μ L de LiAc (1 M) e 50 μ L de DNA carregador e 36 μ 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 µL do mix de transformação juntamente com 2 µL de plasmídeo contendo os 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 células 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 13.000 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 µL da solução concentrada e 200 µL 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) (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EUA), 2% de glicose, 1 mM de arginina, 2% de ágar bacteriológico, 50 mg L⁻¹ 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⁻¹ de ampicilina, por aproximadamente 36 h a 30° C e 200 rpm. Um volume de 2 mL da levedura pré-cultivada foi centrifugado a 8.000 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 8.000 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).

4.5.4 Análise de complementação genética em levedura

Para avaliar a complementação do mutante defectivo transformado, um volume de 5 μ L de cada diluição (1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³) das suspensões celulares de levedura mep:*AtAMT1;1* (controle positivo), mep:*ScAMT3;3* 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, NH₄Cl e metilamônio foram preparados em soluções estoques e esterilizados através de filtro de acetato de celulose de 0,2 μm estéril e só então foram adicionados à solução autoclavada, em capela de fluxo laminar, assim como o antibiótico de seleção (ampicilina 50 mg L⁻¹).

Nesse experimento, foram testadas concentrações crescentes de amônio: 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 5 e 20 mM na forma de NH4Cl, 100 mM de seu análogo tóxico, metilamônio (MeA) (DUBOIS et al., 1979) (com adição de 0,1% de arginina no meio contendo MeA), 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 NH4Cl, 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 com a maior ou menor absorção de amônio.

4.6 Complementação de mutante quádruplo de Arabidopsis

4.6.1 Recombinação de ScAMT3;3 para vetor de expressão heteróloga em planta

Para o experimento de expressão heteróloga em planta, serão utilizadas quatro construções gênicas diferentes. Após a confirmação da fidelidade das sequências clonadas em vetor de entrada pCR8, reações de recombinação para os vetores de destino pMDC (CURTIS; GROSSNIKLAUS, 2003) (Tabela 5) foram realizadas utilizando o kit *Gateway LR Clonase II Enzyme mix* (Life Technologies Co.), conforme instruções do fabricante.

Tabela 5. Sequências de cana-de-açúcar referentes ao gene *ScAMT3;3* e sua região regulatória em seus respectivos vetores destino e as construções resultantes

Sequência	Vetor de destino	Construção
Promotor ScAMT3;3	pMDC110	proScAMT3;3:GFP
Promotor ScAMT3;3	pMDC164	proScAMT3;3:GUS
ORF ScAMT3;3	pMDC32	35S:ScAMT3;3
Promotor <i>ScAMT3;3</i> + ORF <i>ScAMT3;3</i>	pMDC99	proScAMT3;3:ScAMT3;3

Bactérias (cepa DH5 α) 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⁻¹ 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⁻¹ 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 0,8% agarose em TAE corado com SYBR Gold. As construções resultantes (já obtidas) foram denominadas *proScAMT3;3*:GUS, 35S:*ScAMT3;3* e *proScAMT3;3*:*ScAMT3;3* (Tabela 5).

Clones positivos para a presença das sequências recombinadas de todos os vetores de destino propostos foram parcialmente sequenciados utilizando o sequenciador 3500 Genetic Analyzer 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 6).

Tabela 6. 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	Sequências dos primers
pMDC32 e pMDC99 Rev	CTCTAGCCAATACGCAAACCG
pMDC110 e pMDC164 For	ATTCAGGCTGCGCAACTGTTGG

4.6.2 Transformação de Agrobacterium tumefaciens

Confirmada a clonagem direcional, os vetores de destino contendo as sequências de interesse transformados em Agrobacterium tumefaciens cepa GV3101 foram eletrocompetentes. 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⁻¹ de rifampicina e 100 mg L⁻¹ 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⁻¹ de rifampicina e 100 mg L⁻¹ 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 molde 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 MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 μ M de cada *primer*, 1 U de *Taq* polimerase (Life Technologies Inc.) e água ultrapura Milli-Q estéril para um volume final de 25 μ 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, 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 TAE de 0,8% agarose corado com SYBR Gold. Agrobactérias positivas para a presença dos genes e promotores *AMTs* foram estocadas em glicerol (50%) a -80°C.

42

4.6.3 Transformação genética de Arabidopsis via A. tumefaciens

Sementes do mutante quádruplo *qko* para transportadores de alta-afinidade a amônio em Arabidopsis foram fornecidas pelo Prof. Nicolaus von Wirén. *qko* é um quádruplo mutante de Arabidopsis 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., 2007a), e foi selecionado 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. Sementes de Arabidopsis do ecótipo 'Col-0' foram selecionadas como controle positivo nos diversos experimentos.

Sementes do ecótipo 'Col-0' e do mutante quádruplo qko foram germinadas em potes de 300 mL contendo substrato e vermiculita (2:1 p/v) em câmara de crescimento a 22° C com 80% de umidade e fotoperíodo 16 h de luz a 200 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa. Após as plantas atingirem estádio de florescimento, essas foram utilizadas para a transformação genética por floral dip mediada por A. tumefaciens. Para isso, placas de meio LB sólido contendo 100 mg L⁻¹ de rifampicina e 100 mg L⁻¹ de canamicina foram inoculadas com as culturas de A. tumefaciens cepa GV3101 positivas para cada construção de interesse e cultivadas 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 cultivadas 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 2.000 g por 10 min. O pellet formado foi ressuspendido delicadamente em uma solução contendo 5% de sacarose e 0,02% do surfactante Silwet-L77 (Momentive, Tarrytown, NY, EUA). Para a transformação genética de Arabidopsis foi empregada a técnica *floral dip*, a qual consiste na aplicação da suspensão de células em botões florais da planta (Figura 2). As plantas transformantes foram selecionadas em meio MS com antibiótico higromicina correspondente ao vetor de transformação, e linhas homozigotas T3 serão selecionadas por análise de segregação. Sementes de linhas T3 independentes para no mínimo dois eventos distintos de transformação genética foram utilizados para os experimentos de análise fenotípica.



Figura 2. Foto de planta sendo transformada pelo método floral dip

Sementes das plantas transformadas (geração T₀) foram coletadas após duas semanas de secagem e esterilizadas em 70% etanol contendo 0,05% de Triton X-100 por 10 min e em seguida lavadas em etanol absoluto por 1 min. Depois de secas, as sementes foram espalhadas em placas com meio MS modificado contendo metade da concentração de sais, sem vitaminas, contendo 1% de ágar e sacarose e 25 mg L⁻¹ de higromicina. A seleção foi realizada com base no tamanho do hipocótilo e na cor e expansão das folhas das plântulas (EE 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 fotoperíodo de 16 h de luz a 100 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa. Após 14 d, 6 plantas de cada construção transformada, que apresentaram resistência ao antibiótico de seleção (geração T₁) foram aclimatadas em câmara de crescimento a 22°C com 80% de umidade e fotofase de 14 h de luz a 200 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa, representando os diferentes eventos de transformação. A transformação mediada por Agrobacterium em Arabidopsis ocorre no gametófito feminino, e a integração de T-DNA não é homóloga (DESFEUX et al., 2000), assim todas as plantas T1 com fenótipo de resistência à higromicina (HygR) são hemizigotas, ou seja, indivíduos diplóides 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 T₁ secas foram coletadas, esterilizadas e germinadas em meio de seleção. Para cada um dos 6 eventos de transformação obtidos para cada construção transformada, 5 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 T₂. Nessa geração é possível avaliar as plantas quanto à segregação ($3 R: 1_$). Padrões diferentes podem ocorrer devido a possibilidade de ocorrência 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 T₂ não foram levadas à próxima geração, bem como plantas que apresentaram crescimento ou desenvolvimento comprometido.

O genótipo das plantas T₂ 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 3 plantas mais vigorosas (Figura 3) de cada placa foram selecionadas e aclimatadas em câmara de crescimento, representando as prováveis plantas T₃ homozigotas. O avanço de mais uma geração (T₄) foi necessário para confirmar o genótipo das plantas selecionadas.



Figura 3. Foto de placa com plantas em seleção. Os critérios considerados foram: planta mais vigorosa, homozigota resistente (**A**); planta hemizigota para o gene de seleção (**B**); planta menos vigorosa, não homozigota e sem transgene de resistência (**C**)

As sementes das plantas T₃ autopolinizadas foram coletadas (sementes T₄), esterilizadas, e crescidas em meio MS com antibiótico de seleção e após 2 semanas, o padrão de segregação foi avaliado. Se estas possuíam genótipo R/_, então houve uma segregação nesta geração. Por outro lado, plantas T₄ com genótipo R/R que não segregaram foram então selecionadas (2 a 3 linhagens de cada construção) para os experimentos de caracterização funcional (sementes T₃). O processo de transformação de Arabidopsis e obtenção de sementes homozigotas leva pelo menos 9 meses (Figura 4).



Figura 4. Diagrama de seleção de plantas transgênicas

4.6.4 Análise de expressão gênica em eventos transgênicos de Arabidopsis

A análise da progênie e o estudo da segregação são fundamentais para demonstrar a estabilidade da expressão dos genes introduzidos. Porém, é necessário a 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 (T₄) e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido para posterior maceração, extração de DNA por meio do protocolo CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987) e confirmação por PCR de acordo com os produtos esperados das construções.

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 2 ou 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:*ScAMT3;3* e *proScAMT3;3:ScAMT3;3* transformadas em 'Col-0' e *qko*, cerca de 10 plantas de cada evento de transformação das placas de seleção de homozigotos positivos (T4) foram coletadas em duplicatas, e estas foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido para posterior maceração, extração do RNA total e síntese de cDNA. A confirmação da transgenia e avaliação da expressão gênica foram realizadas por meio de análise quantitativa de transcritos reversos (qRT-PCR).

4.6.4.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA de eventos transgênicos de Arabidopsis

Plantas das diversas linhas transgênicas de *A. thaliana, qko* e 'Col-0' não transformadas, foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidas para um microtubo de 1,5 mL. Posteriormente foi adicionado 1 mL de Trizol (Life Technologies Co.) para realização da extração de RNA de acordo com as instruções do fabricante. O RNA precipitado foi lavado duas vezes com 75% etanol e centrifugado a 4°C por 6 min a 9.000 *g*. Depois de seco, o RNA foi eluído em 15 μ L de água 0,01% DEPC (dietilpirocarbonato) autoclavada e armazenado a -80°C.

O RNA total extraído foi quantificado em NanoDrop e sua integridade confirmada via eletroforese. Após a quantificação, 2 μ g do RNA de cada amostra foi tratado com 1 U de DNAse I em tampão apropriado, 2 U de RNAseOUT e água ultrapura DEPC, em reação incubada a 25°C por 15 min. A reação foi parada com a adição de 2,5 mM EDTA, e incubada a 65°C por 10 min. Amostras de 1 μ g de RNA total e 2,5 μ M de oligodT₁₈ foram desnaturadas a 70°C por 10 min e incubadas a 4°C por 2 min, em seguida foi adicionado 1X *First-Strand Buffer*, 5 mM DTT, 1 mM dNTP, e 20 U da enzima SuperScript III RT. A reação foi então incubada a 55°C por 1 h, seguida de 70°C por 15 min e 4°C por 2 min.

4.6.4.2 Análise de transcritos reversos em eventos transgênicos de Arabidopsis

A análise de qRT-PCR do gene *ScAMT3;3* em transgênicos de *Arabidopsis* foi realizada em reações contendo 1X KAPA SYBR FAST, 0,2 μ M de cada iniciador (Tabela 7), 1 μ L de cDNA 3:7 (v:v) e água Milli-Q estéril para um volume final de reação de 10 μ L. O perfil da reação incluindo um controle negativo (sem cDNA) foram realizadas no RotorGene-6000 (Qiagen), programado para um perfil térmico com duas temperaturas iniciais: 50°C por 10 min e 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de três passos: 95°C por 20 s, 60/62°C por 25 s e 72°C por 25 s. Após a amplificação, a curva de dissociação foi determinada entre 72 e 95°C. Os valores dos C_Q (*quantification cycle*) foram utilizados para determinar a diferença da expressão gênica, de acordo com método "Delta Delta" (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001): razão = 2^{- Δ (Δ Cq</sub>) sendo Δ C_Q = C_Q (gene alvo) – C_Q (gene referência) e o $\Delta = \Delta$ C_Q (tratamento) - Δ C_Q (controle). O gene *Ubiquitina2* de Arabidopsis foi utilizado como gene de referência.}

Tabela 7. Sequências de iniciadores relativos ao gene que codifica proteína transportadora de amônio inserida em Arabidopsis e o gene de referência *Ubiquitina2* de Arabidopsis, utilizados para análise quantitativa de transcritos reversos

Nome	Sequências dos primers	Amplicon	
RTqScAMT3;3 For	CCAAGATCCAGGACAAAGAAGGA	229 pb	
RTqScAMT3;3 Rev	TGGAGACGAGCATAACACTTGC		
RTqAtUbq2 For	CCGGACTCCAGAGGTGCATT	267 pb	
RTqAtUbq2 Rev	AACGCCGCTATGTCTGCTCT		

4.6.5 Localização tecido-específico de ScAMT3;3 em Arabidopsis

Sementes das plantas homozigotas para as construções *proScAMT3;3*:GUS e *proScAMT3;3*:GFP foram esterilizadas e germinadas *in vitro* em meio MS com metade da concentração original de sais, acrescido de 1 mM de NH4NO₃, 1% de sacarose e ágar, e pH ajustado para 5,8. 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 μ mol m⁻² s⁻¹ para a germinação das sementes. Após 3 d da germinação, as plântulas foram transferidas para placas contendo meio de cultura com sais MS, em ausência (-N) ou presença de diferentes fontes de N (NH4NO₃ ou NH4Cl), acrescidos de 1 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 μ m 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: -N (ausência de nitrogênio), 2 mM de NH₄NO₃ e 2 mM de NH₄Cl. Após 5 dias de tratamento, as plantas contendo os promotores fusionados ao gene *uidA* GUS foram transferidas para o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-glucuranídeo (Jersey Lab and Glove Supply, Livingston, NJ, EUA) a 37°C por 4 h e 30 min, e lavadas em etanol 70% por 1 h. Para a confecção do tampão GUS, 25 mg de X-Gluc foi dissolvido em 2,5 ml de metanol e adicionado à solução de 25 mL de tampão citrato HCl pH 7,0 (0,1 M citrato de sódio, 0,2 M ácido clorídrico, pH 7,0), 500 μ L de ferrocianeto de potássio (0,1 M), 500 μ L de ferricianeto de potássio (0,1 M), 500 μ L de ferricianeto de potássio (0,1 M), 250 μ L de Triton X-100 (10%) completos para 50 mL com água ultrapura Milli-Q estéril.

Imagens de plantas expressando *proScAMT3;3*:GUS, já coradas em azul e sem clorofila, foram registradas em estereomicroscópio Leica S8AP0 (Leica Microsystems GmbH; Heidelberg, Alemanha). Para os cortes anatômicos de folha, cotilédones foram hidratados em água por meio de série etílica e posteriormente foram fixados em solução Karnovsky (2,5% glutaraldeído, 2,5% formaldeído em tampão 50 mM cacodilato de sódio, pH 7,2, 1 mM CaCl₂). Em seguida, amostras foram embebidas em resina histológica (Leica Microsystems GmbH) segundo procedimentos do fabricante. Secções foram cortadas em espessura de 5 µm com micrótomo de rotação Leica RM2235 (Leica Microsystems GmbH). Cortes foram montados em lâminas com Entelan (Merck; Darmstadt, Alemanha) e observados em microscópio óptico Leica DM500 (Leica Microsystems GmbH).

Para as plantas expressando *proScAMT3;3*:GFP, imagens foram obtidas com microscópio confocal de escaneamento a laser Nikon C2+ (Nikon Instruments Inc.; Melville,

NY, EUA). O comprimento de onda de emissão/excitação de 488 nm / 490-540 nm foi usado para detecção de sinais GFP. Cotilédones foram cortados e lavados em ClearSee Solution (KURIHARA et al., 2015) para remoção de pigmentos e autofluorescência do tecido vegetal.

4.6.6 Análise fenotípica de linhas transgênicas de Arabidopsis

4.6.6.1 Experimentos in vitro

Para os experimentos *in vitro*, sementes de plantas selvagens ('Col-0'), mutantes (*qko*) e plantas homozigotas contendo as construções 35S:ScAMT3;3 transformada em 'Col-0' (3 eventos) e *proScAMT3;3:ScAMT3;3* transformadas em 'Col-0' (1 evento) e *qko* (3 eventos) foram esterilizadas e submetidas a um período de vernalização a 4°C por 4 d em placas de Petri com meio MS com ½ da concentração de sais, contendo 2 mM KNO₃ e 1 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⁻² s⁻¹ para germinação das sementes. Após 3 d de germinação, as plântulas foram transferidas para placas com meio MS ½ da concentração de sais, contendo diversas concentrações e fontes de N.

Para experimentos com 35S:*ScAMT3;3*, as condições de tratamento foram de baixa concentração de N (0,5 mM KNO₃ ou 0,5 mM NH₄Cl) e alta concentração de N (2 mM NH₄Cl). Para experimentos com *proScAMT3;3:ScAMT3;3*, as condições de tratamento foram de ausência de N (sem adição de N), alta concentração de N (2 mM NH₄Cl) e excesso de N (10 mM NH₄Cl). Cada placa recebeu 3 plantas de cada genótipo/linha. Estas placas foram transferidas para uma câmara de crescimento a 22°C, 80% de umidade e fotofase de 16 h de luz a 200 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em todos os experimentos *in vitro*. Após 14 d de crescimento, as plantas foram pesadas em balança analítica separando-se raiz de parte aérea. Cada tratamento apresentou 33 réplicas (n = 33 plantas) para experimentos com *proScAMT3;3:ScAMT3;3*. Médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p \le 0,05$), pelo programa RStudio.

4.6.6.2 Experimentos in vivo

Os experimentos *in vivo* compreenderam as análises de absorção (influxo), remobilização e translocação de amônio em sistema hidropônico por meio da detecção de ¹⁵N. Inicialmente, sementes de 'Col-0' e *qko* e as sementes de 'Col-0' e *qko* superexpressando *ScAMT3;3* 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 µmol m⁻² s⁻¹, 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 µmol m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa.

O sistema de hidroponia utilizado foi constituído por tubos de 1,5 mL, com os fundos cortados transversalmente para permitir o crescimento das raízes, com lã de vidro para sustentação inicial das plantas, encaixados em placa de isopor e posicionados em potes plásticos de 2 L com solução nutritiva (1 mM KH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 250 μ M K₂SO₄, 250 μ M CaCl₂, 100 μ M Na-Fe-EDTA, 50 μ M KCl, 50 μ M H₃BO₃, 5 μ M MnSO₄, 1 μ M ZnSO₄, 1 μ M CuSO₄ e 1 μ M NaMoO₄, pH ajustado para 5,8 utilizando solução de 1 mM KOH) (LOQUÉ et al., 2006) e com sistema de aeração. As plantas foram cultivadas por 45 d em concentração de 4 mM de KNO₃ para o experimento de influxo rápido. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em todos os experimentos *in vivo*, e as médias foram comparadas pelo teste t de Student ($p \le 0,05$) pelo programa RStudio.

4.6.6.2.1 Experimento de influxo

Para o experimento de influxo rápido, os genótipos testados foram *qko* e suas respectivas linhas transgênicas superexpressando *ScAMT3;3* (*qko*+35S:*ScAMT3;3* #1, #2 e #3). As plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: deficiência de N (sem adição de N, -N) e amônio (2 mM de NH₄Cl, NH₄⁺) por 3 d. Após a imposição dos tratamentos, as raízes das plantas foram lavadas por 1 min em solução de 1 mM CaSO₄ para remover o excesso de amônio apoplástico (LOQUÉ et al., 2006) e em seguida, foram transferidas para 200 mL de solução nutritiva contendo 0,2 mM de (NH₄)₂SO₄ enriquecido com ¹⁵N-amônio 60% atm por 10 min, e lavadas novamente por 1 min em 1 mM CaSO₄.

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. Cada vaso de hidroponia continha 4 plantas (n = 4 réplicas biológicas). O material seco foi macerado e preparado para a determinação de ¹⁵N em espectrômetro de massas de fluxo molecular ATLAS MAT modelo CH4 (Alemanha) no Laboratório de Isótopos Estáveis no CENA, pelo Prof. Dr. José Albertino Bendassolli. A quantidade de ¹⁵N-amônio absorvida pelas raízes foi expressa em µmoles g⁻¹ MS⁻¹ h⁻¹:

4.6.6.2.2 Experimento de remobilização

Para o experimento de remobilização, os genótipos testados foram 'Col-0', *qko* e duas linhas transgênicas expressando *ScAMT3;3* sob regulação do promotor *proScAMT3;3* (*qko+proScAMT3;3:ScAMT3;3 #*1 e *#*3). As plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: deficiência de N (sem adição de N, -N) e amônio (2 mM de NH4Cl, NH4⁺) por 3 d. Após a imposição dos tratamentos, a folha mais velha não senescente de cada roseta de Arabidopsis recebeu 10 µL de solução nutritiva contendo 50 mM de (NH4)₂SO4 contendo ¹⁵N-amônio enriquecido a 60% atm em sua superfície (FAN et al., 2009) (Figura 5). Após 24 h, as folhas velhas que receberam a solução foram coletadas, bem como um *pool* das folhas mais novas das rosetas. Ao todo, foram utilizadas 4 réplicas biológicas por tratamento (*n* = 4). O material vegetal foi seco em estufa a 60°C, macerado e preparado para determinação de ¹⁵N. A quantidade de ¹⁵N-amônio acumulada nas folhas foi expressa em µmoles g⁻¹ MS⁻¹.



Figura 5. Vaso do sistema de hidroponia com 6 plantas de Arabidopsis no momento de aplicação de solução ¹⁵N-amônio (**A**). Visualização aproximada da região delimitada pelo retângulo vermelho, mostrando a folha madura na qual recebeu 10 µL de solução nutritiva contendo 50 mM de ¹⁵N-amônio (**B**)

4.6.6.2.3 Experimento de translocação

Para o experimento de remobilização, foi empregada metodologia proposta por Hsu e Tsay (2013), com modificações. Os genótipos testados foram *qko* e duas linhas transgênicas expressando ScAMT3;3 sob regulação do promotor proScAMT3;3 (qko+proScAMT3;3:ScAMT3;3 #1 e #3). As plantas foram cultivadas por 45 d em solução nutritiva contendo 4 mM KNO3 como única fonte de N e então transferidas para solução nutritiva contendo 2 mM NH4Cl. Após 3 d de tratamento, plantas foram transferidas para solução nutritiva sem N, acrescida de 5 mM de (NH₄)₂SO₄ contendo ¹⁵N-amônio enriquecido a 60% atm. Raízes das plantas foram lavadas por 1 min com 1 mM CaSO₄ antes de depois da imersão em solução contendo ¹⁵N-amônio. Após 1 h, foram coletadas raízes, bulk de folhas maduras (folhas 1 a 9) e *bulk* de folhas novas (folhas 10 até o meristema apical). Uma parcela do experimento foi devolvida à solução nutritiva contendo 2 mM NH4Cl e após 24 h, raízes, folhas maduras e folhas novas foram coletadas. Ao todo, foram utilizadas 6 réplicas biológicas por tratamento (n = 6). O material vegetal foi seco em estufa a 60°C, macerado e preparado para determinação de ¹⁵N. A quantidade absoluta de ¹⁵N-amônio acumulada nas folhas foi expressa em µmoles g⁻¹ MS⁻¹ enquanto a quantidade absorvida de ¹⁵N-amônio absorvida pelas raízes foi expressa em µmoles g⁻¹ MS⁻¹ h⁻¹.

5 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

5.1 Identificação dos AMTs em biblioteca de BAC

A partir de biblioteca de BACs (*Bacterial Artificial Chromosome*) de genoma de canade-açúcar cultivar R570 disponível no laboratório de Biologia Molecular de Plantas da Prof^a. Marie-Anne Van Sluys no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, foi realizada a identificação de sequências gênicas completas do gene *ScAMT3;3*, membro pertencente à subfamília *AMT2*, em dois clones BACs (023_013 e 178_C24). Estes clones foram sequenciados integralmente pelo grupo de pesquisa da Prof^a. Marie-Anne van Sluys e a presença da sequência de *ScAMT3;3* foi confirmada. Uma vez que o genoma de cana-deaçúcar apresenta caráter poliplóide e redundante (GARSMEUR et al., 2010) foram feitas diversas análises *in silico* tanto com as regiões promotoras quanto as codificantes do gene *ScAMT3;3* identificados nos dois clones de BACs. O objetivo desta análise *in silico* foi de selecionar a sequência alvo mais relevante (potencialmente expressa) para dar procedimento à caracterização funcional do gene.

Antes mesmo da divisão entre monocotiledôneas e dicotiledôneas, duplicações genéticas geraram as subfamílias de transportadores de amônio *AMT1* e *AMT2*, que compõem grupos distintos evolutivamente e funcionalmente (MCDONALD et al., 2012; WITTGENSTEIN et al., 2014). Plantas como Arabidopsis (*A. thaliana*), álamo (*Populus trichocarpa*) e soja (*Glycine max*) possuem entre 5 a 6 representantes de genes *AMT1* (SOHLENKAMP et al., 2000; COUTURIER et al., 2007; KOBAE et al., 2010; KOEGEL et al., 2013), enquanto que o número de genes encontrados e caracterizados dessa subfamília em sorgo (*Sorghum bicolor*) foi de 2 membros, 3 em milho (*Zea mays*), 3 em arroz (*Oryza sativa*) e 2 cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) (BAO-ZHEN et al., 2009; KOEGEL et al., 2013; VITTI, 2015). É provável que o número diferencial de genes da subfamília *AMT1* reflita na diferença organizacional entre monocotiledôneas e dicotiledôneas (COUTURIER et al., 2007; KOEGEL et al., 2007; KOEGEL et al., 2013).

Em relação à subfamília *AMT2*, o genoma de cana-de-açúcar possui uma diversidade maior de representantes, tendo sido identificados 7 membros (KOLTUN, 2016). Genes desta subfamília também foram identificados em *O. sativa* (9 genes), *S. bicolor* (6 genes), *Z. mays* (4 genes), *Setaria italica* (6 genes), *G. max* (10 genes), *P. trichocarpa* (8 genes), *Prunus persica* (4 genes), *Solanum lycopersicum* (1 gene), *A. thaliana* (1 gene), entre outras espécies.

A análise de filogenia realizada para a identificação de sequências de AMT2 em embriófitas dividiram esta subfamília nos supergrupos A e B (VON WITTGENSTEIN et al., 2014). O supergrupo A é composto pelos grupos A1, A2 e A3. O grupo A1 está presente em monocotiledôneas e eudicotiledôneas, sendo representado pelos membros *AMT2;1* e *AMT2;2*. No grupo A2, composto por sequências de *AMT3;1*, o número de genes é variável em monocotiledôneas, enquanto em eudicotiledôneas existe apenas um membro desse grupo, como para *P. trichocarpa* (PtAMT3;1), ou nenhum membro, como o caso de Arabidopsis. Por último, genes do grupo A3 estão presentes apenas em monocotiledôneas, sendo AMT3;2 e AMT3;3 seus únicos representantes (WITTGENSTEIN et al., 2014). De acordo com essa classificação, cana-de-açúcar possui dois membros do grupo A3 (ScAMT2;1 e ScAMT2;3), dois no grupo A2 (ScAMT3;1 e ScAMT3;2) e dois no grupo A3 (ScAMT3;3A e B). O supergrupo B compreende as sequências de *AMT4* da subfamília *AMT2* (WITTGENSTEIN et al., 2014), sendo que cana-de-açúcar apresenta 1 membro identificado como ScAMT4 (VITTI, 2015).

Apesar dos supergrupos A e B serem encontrados em angiospermas, algumas sequências de AMT2 de briófitas estão presentes nos dois supergrupos. Em algas verdes foram identificadas sequências gênicas semelhantes a AMT2 apenas em membros da divisão Chlorophyta e ordem Mamiellales. Contudo, estas sequências possuem uma divergência grande quando comparadas às sequências AMT2 de embriófitas, indicando um processo evolutivo distinto (MCDONALD et al., 2010; 2012). Isto sugere que um ancestral comum entre os dois grupos de plantas apresentava duas cópias de AMT2 no seu genoma e que uma cópia em briófitas tenha sido perdida ao longo do processo evolutivo (WITTGENSTEIN et al., 2014). Quando as sequências de AMT2 de procariotos, também denominadas de $MEP\alpha$, são comparadas diretamente com as de plantas terrestres, pode-se inferir que uma possível transferência horizontal de genes tenha ocorrido, já que as sequências são muito parecidas com as de AMT2 de Archaea. Além disso, outro processo de transferência horizontal de genes de bactéria seria responsável pelo surgimento de AMT2 em Mamiellales (MCDONALD et al., 2012). Estima-se que sequências de AMT2 de embriófitas tenham se originado a partir de um único ancestral comum e que, portanto, os supergrupos A e B teriam divergido em angiospermas, possibilitando a divisão nas suas funções como transportadores de amônio. Logo, entender a função 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).

Cultivares cana-de-açúcar híbridos modernas de (Saccharum spp.) são interespecíficos, cujo genoma nuclear é composto pela combinação dos genomas das espécies Saccharum officinarum, com alto potencial produção de para açúcar, e Saccharum spontaneum, planta com baixo teor de açúcar (DANIELS; ROACH, 1987; D'HONT; GLASZMANN, 2011). Portanto, o genoma de cana-de-açúcar híbrida apresenta alto grau de poliploidia, tipicamente 2n = 8x = 80, com n = 10 (n sendo o número haplóide de cromossomos em organismos eucariotos e x o número de monoploide de cromossomos em organismos poliplóides) (D'HONT et al., 1996.). Estima-se que o genoma de cultivares modernos de cana-de-açúcar seja composto por aproximadamente 80% dos cromossomos de S. officinarum, 10 a 15% de S. spontaneum, e 5 a 10% de cromossomos recombinantes (D'HONT et al., 1996). Devido à complexidade genética ocasionada pela alta poliploidia, aneuploidia e hibridização interespecífica, diversos projetos foram criados na tentativa de se entender o genoma da cana-de-açúcar, incluindo o desenvolvimento de mapas genéticos, a produção de bibliotecas de ESTs (Expressed Sequence Tags), BACs e transcriptomas, e finalmente uso de sequenciamento e montagem do genoma (SOUZA et al., 2011; ZHANG et al., 2014; OKURA et al., 2016; RIAÑO-PACHÓN et al., 2017; ZHANG et al., 2018).

No início deste trabalho a identificação dos membros AMTs em cana-de-açúcar foi realizada por meio de sequências armazenadas em bibliotecas de clones BAC sequenciados, conforme mencionado anteriormente. Recentemente, a sequência do genoma de *S. spontaneum* foi disponibilizada (ZHANG et al., 2018). Deste modo, foi realizada uma busca por BLAST usando sequências AMTs de sorgo (*Sorghum bicolor*). Análises filogenéticas e a análise do motivo de assinatura para a proteína foram conduzidas para entender as relações evolutivas e moleculares entre ScAMT3;3 de biblioteca BAC de cana-de-açúcar cv. R570 e de seu parental selvagem *S. spontaneum*. No genoma de sorgo existem 8 sequências homólogas (Tabela 1). Dentre as 30 sequências homólogas a AMTs dentro do genoma de *S. spontaneum*, a sequência Sspon.03C025059297 não foi utilizada nas análises devido alta divergência em relação às demais sequências, apesar de ser classificada como AMT.

Gene	Locus ID	Tamanho de	D:~-	Tamanho da	No. hélices	N. Gran	No. íntrons
		CDS (pb)	Direçao	proteína (aa)	transmembrana	ino. exons	
SsAMT1;1A	Sspon.05A022801161	1.488	-	496	11	1	0
SsAMT1;1B	Sspon.05B016943895	1.482	-	494	11	1	0
SsAMT1;1C	Sspon.05C014374467	1.488	-	496	11	1	0
SsAMT1;1D	Sspon.05D024411468	1.488	-	496	11	1	0
SsAMT1;3A	Sspon.04A023309391	1.460	+	484	10	1	0
SsAMT1;3B	Sspon.04B020006733	1.461	-	485	10	1	0
SsAMT1;3D	Sspon.04D047239540	1.461	-	485	10	1	0
SsAMT2;1A	Sspon.07A034255374	1.473	+	490	11	3	2
SsAMT2;1B	Sspon.07B013795112	1.473	+	490	11	3	2
SsAMT2;1C	Sspon.07C010886070	1.473	+	490	11	3	2
SsAMT2;1D	Sspon.07D013385600	1.473	+	490	11	3	2
SsAMT2;2B	Sspon.03B018068922	1.494	+	496	11	3	2
SsAMT2;2C	Sspon.03C025054142	1.494	+	496	11	3	2
SsAMT2;2D	Sspon.03D015904303	1.494	-	496	11	3	2
SsAMT3;1B	Sspon.03C013841470	1.466	-	487	11	2	1
SsAMT3;1C	Sspon.03C019321296	1.467	-	488	11	2	1
SsAMT3;1D	Sspon.03D012410790	1.467	-	488	11	2	1
SsAMT3;2A	Sspon.01A109176852	1.452	+	483	11	2	1
SsAMT3;2B	Sspon.01B105233578	1.452	-	483	11	2	1
SsAMT3;2D	Sspon.01D109982685	1.452	+	483	11	2	1
SsAMT3;3A	Sspon.04A031681449	1.452	+	483	11	2	1
SsAMT3;3B	Sspon.04B027370567	1.452	-	483	11	2	1
SsAMT3;3B	Sspon.04B027384025	1.452	+	483	11	2	1
SsAMT3;3C	Sspon.04C030909860	1.452	-	483	11	2	1
SsAMT3;3D	Sspon.04D032010432	1.452	-	483	11	2	1
SsAMT3;3	Sspon.tig000014131	945	+	315	7	1	0
SsAMT4B	Sspon.01B121582941	1.423	-	472	11	2	1
SsAMT4D1	Sspon.01D094799176	1423	-	472	11	2	1
SsAMT4D2	Sspon.01D095238110	1423	-	472	11	2	1
SsAMT5C	Sspon.03C025059297	339	+	112	0	1	0

Tabela 1. Caracterização de genes *AMTs* em cana-de-açúcar *Saccharum spontaneum* cv. 'AP85-441' (número de acesso do projeto no NCBI <u>PRJNA483885</u>)

A análise filogenética realizada indicou a formação de dois ramos principais, sendo um deles formado por sequências de transportadores de amônio da subfamília AMT1 e o outro por sequências da subfamília AMT2 (Figura 6). Além disso, evidenciou-se que ambos os clones de BAC para ScAMT3;3 estão contidos no mesmo clado que o seu ortólogo SbAMT3;3 e que eles compartilham similaridade com pelo menos 6 sequências AMTs de seu parental selvagem. Por último, os alelos do gene *ScAMT3;3* estão localizados nos cromossomos 4A, 4B, 4C e 4D, havendo uma duplicação no cromossomo 4D. Uma sequência parcial de ScAMT3;3 também foi encontrada em um grupo de sequências não classificadas dentro do mesmo banco de dados (Sspon.tig000014131). Esta sequência não foi incluída nas análises futuras.



Figura 6. Representação filogenética das subfamílias AMT1 e AMT2 formada por sequências de sorgo (SbAMT), os dois clones BAC contendo ScAMT3;3 (BAC_023_013 e BAC_178_C24) e sequências oriundas de sequenciamento do genoma de *Saccharum spontaneum* cv. 'AP85-441' (número de acesso do projeto no NCBI <u>PRJNA483885</u>). A análise foi conduzida no programa MEGA X empregando o princípio de evolução mínima

Considerando que os clones de BAC_023_013 e 178_C24 são fragmentos de cromossomos de cana-de-açúcar cultivar híbrida cv. R570, foram conduzidas análises para verificar se estas sequências ScAMT3;3 são mais similares às de *S. spontaneum* ou *S. officinarum*. Para isto, foram utilizadas sequências de *contigs* oriundas do projeto mais recente do sequenciamento do genoma de *Saccharum* spp. cv. 'SP80-3280' (RIAÑO-PACHÓN et al., 2017). Após a busca pelas sequências utilizando sequências AMTs de sorgo como referência, e filtragem de dados redundantes, as sequências de aminoácidos foram conduzidas às análises filogenéticas a fim de confirmar a presença de ScAMT3;3 na cultivar híbrida. Ao todo, 16 sequências AMTs foram encontradas (Tabela 2).

Gene	Locus ID	Tamanho de CDS (pb)	Direção	Tamanho da proteína (aa)	No. hélices transmembrana	No. éxons	No. íntrons
ScAMT1;1	SP80-3280.192437	291	+	97	1	1	0
ScAMT1;3	SP80-3280.191182	1.461	-	487	10	1	0
ScAMT2;1	SP80-3280.17361	672	-	224	5	1	0
ScAMT2;2	SP80-3280.150648	1.623	-	505	11	3	2
ScAMT2;2	SP80-3280.198958	1.359	+	324	8	3	2
ScAMT3;1	SP80-3280.194637	1.554	-	518	11	2	1
ScAMT3;2	SP80-3280.113064	1.506	+	502	11	2	1
ScAMT3;2	SP80-3280.136980	1.458	+	486	11	2	1
ScAMT3;2	SP80-3280.192956	972	-	324	8	1	0
ScAMT3;3	SP80-3280.164158	861	+	287	6	1	0
ScAMT4	SP80-3280.96315	1.365	+	455	11	2	1
ScAMT4	SP80-3280.173378	1.365	-	455	11	2	1
ScAMT4	SP80-3280.197107	1.617	-	503	11	3	2
ScAMT4	SP80-3280.130766	1.455	+	485	8	1	0
ScAMT4	SP80-3280.139017	1.434	-	478	4	2	1
ScAMT4	SP80-3280.195709	1.404	-	468	6	1	0

Tabela 2. Caracterização de genes *AMTs* em cana-de-açúcar *Saccharum* spp. cv. 'SP80-3280' (número de acesso ao projeto no NCBI <u>PRJNA272769</u>)

A partir dos resultados obtidos, observa-se que apenas uma sequência parcial da cultivar híbrida foi similar à de sequências oriundas de clones de BAC (Figura 7). Não é possível confirmar a existência de duplicações, nem mesmo informar a respeito da localização cromossômica do gene no genoma de cana-de-açúcar. Apesar disso, notou-se que ambas as sequências ScAMT3;3 de BAC compartilham alta similaridade com pelo menos uma sequência AMT3;3 de *Saccharum* spp. cv. 'SP80-3280'.



Figura 7. Representação filogenética das subfamílias *AMT1* e *AMT2* formada por sequências de sorgo (SbAMT), dois clones BAC contendo ScAMT3;3 (BAC_023_013 e BAC_178_C24) e sequências de *contigs* oriundas de sequenciamento do genoma de *Saccharum* spp. cv. 'SP80-3280' (número de acesso ao projeto no NCBI <u>PRJNA272769</u>). A análise foi conduzida no programa MEGA X empregando o princípio de evolução mínima

A sequência de aminoácidos deduzidas dos dois clones de BACs contendo o gene em estudo foram alinhados juntamente com sequências traduzidas de ScAMT3;3 clonada de cDNA oriundo de Saccharum spp. cv. 'SP80-3280' e sequências ScAMT3;3 identificadas em genoma de S. spontaneum de modo a identificar possíveis variações em nucleotídeos e aminoácidos. O alinhamento das proteínas derivadas dos clones BAC com as proteínas traduzidas de cDNA de 'SP80-3280' e genoma do parental selvagem de cana-de-açúcar mostrou diferenças em suas sequências de alguns nucleotídeos (dados não mostrados) e algumas variações de aminoácidos (Figura 8). Para a sequência ScAMT3;3 proveniente do clone BAC 023 O13 em relação à sequência clonada de cDNA de 'SP80-3280' para análise funcional, observam-se 2 variações de aminoácidos, sendo uma arginina (R) ao invés de glutamina (Q) na posição 106 e uma histidina (H) ao invés de arginina (R) na posição 466 (Figura 8). Já para a sequência ScAMT3;3 proveniente do clone BAC_178_C24, foram observadas uma isoleucina (I) ao invés de metionina (M) na posição 435 e uma valina (V) ao invés de isoleucina (I) na posição 475 (Figura 8). O alinhamento múltiplo demonstrou que a sequência obtida da clonagem de cDNA de 'SP80-3280' apresentou similaridade de 100% e identidade de 99,6% com o clone BAC_023_013. Enquanto isso, a região codificante de ScAMT3;3 clonada de cDNA de 'SP80-3280' mostrou 99,4% de identidade e 100% de similaridade com o clone BAC 178 C24. Por último, ScAMT3;3 de 'SP80-3280' apresentou 99,8% de identidade e 100% de similaridade com a sequência Sspon.04C030909860 de S. spontaneum. Estes dados revelaram que a sequência codificante clonada de ScAMT3;3 para os estudos funcionais é mais próxima à sequência do clone BAC_023_013 e que ela se trata de um alelo possivelmente contido no cromossomo 4C em S. spontaneum.



Figura 8. Alinhamento das proteínas de ScAMT3;3 obtidas da tradução de sequências dos clones de BACs, região codificante de *ScAMT3;3* clonada a partir de cDNA de *Saccharum* spp. 'SP80-3280', e sequências homólogas oriundas do genoma de *Saccharum spontaneum* cv. 'AP85-441'. A análise foi conduzida no programa MEGA X empregando o princípio de evolução mínima.

O gene *ScAMT3;3* proveniente do clone BAC_023_013, exibe uma estrutura formada por dois éxons e um íntron, sendo que sua região codificante é composta por 1.452 pb (483 aminoácidos) (Figura 9). Vale a pena ressaltar que, em geral, membros da subfamília de genes *AMT1* não apresentam íntrons na sequência gênica, com exceção ao gene *LjAMT1* de *Lotus japonicus* (SALVEMINI et al., 2001). Por outro lado, genes da subfamília *AMT2* apresentam íntrons em suas sequências genômicas (SUENAGA et al., 2003; COUTURIER et al., 2007; GUETHER et al., 2009). O gene *ScAMT3;3* proveniente do BAC_178_C24 apresentou três éxons e dois íntrons (Figura 8), confirmando que o gene *ScAMT3;3* tenha mantido a tendência da subfamília *AMT2* em apresentar íntrons na sua sequência.



Figura 9. Representação esquemática das sequências gênicas de *ScAMT3;3* provenientes dos clones BAC_023_013 e BAC_178_C24 mostrando as suas respectivas regiões promotoras (caixas vazias), codificantes (caixas cheias) e intrônicas (linhas entre caixas cheias). Barras em preto indicam escala de 500 pb

5.2 Caracterização in silico de ScAMT3;3 identificados em BACs

Visando caracterizar detalhadamente as sequências gênicas referentes ao gene *ScAMT3;3* encontradas nos dois clones de BAC de cana-de-açúcar, várias análises *in silico* foram conduzidas para identificação dos domínios proteicos regulatórios de transportadores de amônio. A superfamília de transportadores *MEP/AMT/Rh* caracteriza-se por apresentar 11 domínios transmembranares, tendo seu N-terminal voltado para a face exterior e seu C-terminal voltada para a face citosólica da membrana plasmática, além de um motivo de assinatura conservado de 26 aminoácidos, seguindo o padrão D-[FYWS]-[AS]-G-[GSC]-x(2)-[IV]-x(3)-[SAG](2)-x(2)-[SAG]-[LIVMF]-x(3)-[LIVMFYWA](2)-x-[GK]-x-R (MARINI et al., 1997; MARINI; ANDRÉ, 2000; LOQUE; WIREN, 2004). Para validar tais características nas sequências em estudo, a região codificante do transportador ScAMT3;3 (proveniente do cDNA de cana-de-açúcar 'SP80-3280') foi primeiramente traduzida com uso do programa ORF Finder (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/</u>) e analisada nos bancos de dados UniProt (<u>http://www.uniprot.org/</u>) e Prosite (<u>http://us.expasy.org/prosite</u>). Os domínios transmembrana para essa proteína foram preditos a partir do programa TMHMM (<u>http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</u>).

A análise da proteína transportadora de amônio de cana-de-açúcar no programa TMHMM resultou em 11 domínios com alta probabilidade de ocorrência (Figura 10A), tendo seu N-terminal voltado para o exterior da membrana e o C-terminal para o citoplasma, estando de acordo com o padrão esperado da superfamília. Esta sequência também apresentou o motivo de assinatura conservado para o grupo *MEP/AMT/Rh* (Figura 10B), o qual está localizado entre os aminoácidos 198-223 (Figura 10C).



Figura 10. (**A**) Domínios transmembran preditos no programa TMHMM para proteína ScAMT3;3, oriunda de RNA-seq da cultivar 'SP80-3280'. (**B**) Representação WebLogo para o motivo de assinatura de 26 aminoácidos conservados da superfamília *MEP/AMT/Rh*, depositado no banco de dados do Prosite pelo número de acesso <u>PS01219</u>. (**C**) Representação gráfica do motivo de assinatura conservado entre 41 membros da superfamília *MEP/AMT/Rh* (caixa verde)

A superfamília *AMT* pode ser encontrada em praticamente todos os domínios da vida e, embora apresente uma similaridade baixa entre seus representantes (< 25%), ainda assim exibe características similares para o transporte do cátion. Isso ocorre devido à presença de regiões conservadas para a funcionalidade dessas proteínas. Apesar da similaridade de transportadores de amônio de plantas e de *E. coli* ou *Archaeoglobus fulgidus* ser relativamente baixa (20-50%), as proteínas *AMT* de plantas mantém a similaridade de suas estruturas terciárias e quaternárias, os domínios transmembrana, os *loops* citoplasmáticos e a região C-terminal. São encontradas divergências apenas nos *loops* extracelulares, principalmente em termos de tamanho (LOQUÉ et al., 2007; NEUHAUSER et al., 2007; NEUHÄUSER et al., 2009; GUETHER et al., 2009). Alterações no sítio de ligação extracelular de alguns transportadores de planta podem resultar na inibição ou redução da atividade do transportador; além disso, mutações adicionais têm identificado outros importantes aminoácidos, ambos na entrada do poro e nos *loops* citoplasmáticos (PANTOJA, 2012).

Entre os aminoácidos conservados em genes ortólogos de AMTs estão o triptofano W148 e serina S219 em cepas de E. coli EcAmtB, supostamente essenciais para a formação da estrutura do sítio de ligação com amônio (PANTOJA, 2012). A maioria destes resíduos são bem conservados, com a exceção do S219, o qual é substituído por alanina ou aspartato nas proteínas AMT2. Uma análise mais detalhada nos poros presumíveis foi realizada no homólogo de EcAmtB. A maioria dos resultados sobre o papel dos resíduos localizados no sítio de ligação/recrutamento de amônio tem demonstrado que a substituição de triptofano W148 e serina S219 por alanina ou leucina, não modificam o nível de atividade de EcAmtB, entretanto, algumas mudanças foram observadas nas propriedades de transporte (NEUHÄUSER et al., 2009). Esta poderia ser uma explicação para a menor capacidade de transporte das proteínas AMT2 de plantas quando comparadas com membros da subfamília AMT1. A substituição natural de S219 por alanina em AtAMT2;1 e LjAMT2;1 juntamente com resultados de mutantes de EcAmtB219A desafiam o papel proposto para S219 na ligação com o amônio por meio de pontes de hidrogênio e sugere que outros aminoácidos estejam envolvidos na ligação de amônio (PANTOJA, 2012), como o caso de simulações realizadas em EcAmtB que indicam que ácido aspártico D160 estabiliza o NH4⁺ indiretamente no vestíbulo externo ao poro, e a água atua como receptor de H⁺ do NH₄⁺ no processos de co-transporte de NH₃/H⁺ no poro (BOSTICK; BROOKS, 2007; NEUHÄUSER et al., 2014).

Evidências bioquímicas demonstraram que as proteínas MEP e 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 funcionais de mutações pontuais

no transportador de tomateiro (*S. lycopersicum*) SIAMT1;1 demonstraram que a deleção ou substituição de duas cisteínas (C3S e C27S) por serina 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, tomateiro (S. lycopersicum), arroz (O. sativa), milho (Z. mays), sorgo (S. bicolor), álamo (P. trichocarpa), lotus (L. japonicus), além das sequências para membros da subfamília AMT1 AMT2 de cana-de-açúcar ScAMT1;1, ScAMT1:3 (comp110189 c0 seq1 comp110189_c0_seq3), ScAMT2;1 (comp105883_c0_seq13, e BACs 032_A12, 038_G02, 118_C18, 216_D16 e 235_F05) e ScAMT3;3 (BACs 023_O13 e 178_C24). 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 (Figura 11A, 11B e 11C), 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 ScAMT3;3. 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; SALVEMINI et al., 2001; D'APUZZO et al., 2004), sendo ausentes nos membros da subfamília AMT2 de plantas (SOHLENKAMP et al., 2002). 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 (GRAFF et al., 2010). Portanto, a estabilidade 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), sendo possivelmente similar ao caso de ScAMT3;3.



Figura 11. Alinhamento múltiplo em sequências de aminoácidos do N-terminal de membros da subfamília *AMT1* e/ou *AMT2* de Arabidopsis (AtAMT), tomateiro (S1AMT), arroz (OsAMT), milho (ZmAMT), sorgo (SbAMT), álamo (PtAMT) e lotus (LjAMT). Comp110189_c0_seq1, comp110189_c0_seq3 e comp105883_c0_seq13 se referem 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 pretas 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 Glicina456 (G456; SlAMT1;1) (LUDEWIG et al., 2003). A mudança de G456 por Asp inativa o transporte de SlAMT1;1 e de seu parálogo SlAMT1;2, sendo esta a primeira evidência de que transportadores de amônio formam oligômeros, processo esse primeiramente descrito para os transportadores homólogos MEP de levedura *S. cerevisiae* (G413; MARINI; ANDRÉ, 2000).

Da mesma forma, mutações na G456 equivalente em transportadores de amônio de tomateiro inativaram transportadores co-expressos de uma maneira dominante (LUDEWIG et al., 2003). Inibição cruzada por subunidades de mutantes foram tomadas como uma evidência para homooligomerização e possivelmente heterooligomerização em AMTs de plantas (LUDEWIG et al., 2003). A Glicina532 foi encontrada em todos os AMTs de plantas aqui avaliadas, sejam eles da subfamília *AMT1* ou *AMT2*, incluindo as proteínas de cana-de-açúcar (Figura 12A, 12B e 12C). 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.



Figura 12. Alinhamento em aminoácidos do C-terminal de membros da subfamília *AMT1* e/ou *AMT2* e *Arabidopsis thaliana* (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 cinza indica a Glicina 532 (G532) e a seta preta indica a Treonina 536 (T536)

Outro aminoácido comprovadamente importante localizado no C-terminal é a Treonina536 (T536), equivalente à T460 em AtAMT1;1. 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 do resíduo 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).

O alinhamento da sequência do C-terminal dos transportadores de amônio identificados em clones 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;3 de cana-de-açúcar. 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 em AtAMT1;1 T460 é fosforilado *in vivo* sob condições de provisão de amônio (YUAN et al., 2013). Portanto, é provável que proteínas ScAMT3;3 não possuem regulação similar no C-terminal.

A região promotora do gene *ScAMT3;3* foi definida arbitrariamente como uma sequência de 2.000 pb *upstream* ao códon de iniciação da transcrição desse gene (ATG), levando em consideração o alto número de possíveis transposons nesta região. O alinhamento das sequências promotoras dos clones BACs 023_O13 e 178_C24, juntamente com sequências ScAMT3;3 identificadas em *S. spontaneum* e cv. 'SP80-3280' revelou que a região mais próxima ao códon de iniciação da transcrição do gene é muito conservada, porém existe grande heterogeneidade na região mais distal do promotor (Figura 13A). Apesar disso, ambas regiões promotoras de BAC foram mais similares às de *S. spontaneum* (Figura 13B).



Ð Figura 13. Alinhamento em nucleotídeos das regiões regulatórias para ScAMT3;3 dos clones BAC (023_013 e 178_C24), S. spontaneum cana-de-açúcar híbrido cultivar 'SP80-3280' (A) e análise filogenética de regiões promotoras de ScAMT3;3 (B).
Para verificar possível presença de elementos móveis na região regulatória de *ScAMT3;3*, os dois clones BAC 023_O13 e 178_C24 foram analisados pelo programa Censor. Foram identificados 6 elementos móveis para o clone BAC_023_O13, dois quais quatro são transposons clássicos (*DNA/Hairbinger* e *DNA/Polintron*) e dois são retrotransposons (*LTR* e não *LTR*). O parâmetro de similaridade obtida apresentou valores de 75% a 84% e alto *Score* de alinhamento local com o banco de dados (Figura 14A). Em relação ao clone BAC_178_C24, foram detectados apenas 2 elementos móveis, ambos transposon clássicos, com similaridade de aproximadamente 75% e *Score* elevado para um deles (Figura 14B). Com estas informações conclui-se que o clone BAC_023_O13 possui inserção de dois transposons, enquanto o clone BAC_178_C24 apresenta possivelmente uma única inserção na região 5' regulatória do gene *ScAMT3;3*.

<⊕ 0⊖>										
					_		_	_		
						_				
Name	From	To	Name	From	To	<u>Class</u>	Dir	Sim	Pos/Mm:Ts	<u>Score</u>
Pro_BAC_023_013	1	151	TSB2	1	139	DNA/Harbinger	c	0.8071	1.2778	673
Pro_BAC_023_013	247	292	<u>R4-1_CPB</u>	3073	3117	NonLTR/R4	d	0.7826	1.2857	238
Pro_BAC_023_013	897	1078	Tourist1a_SB	6	188	DNA/Harbinger	d	0.8415	2.0000	1086
Pro_BAC_023_013	1137	1343	<u>TSB1B</u>	1	209	DNA/Harbinger	d	0.8049	1.6364	994
Pro_BAC_023_013	1688	1755	Polinton-1_CB	14532	14601	DNA/Polinton	с	0.7465	2.0000	229
Pro BAC 023 013	1932	1990	MuDR-N303 OS	296	361	DNA/MuDR	d	0.7903	1.8000	206

Pro_BAC_178_C24 (<u>SVG Plot</u>; <u>Alignments</u>; <u>Masked</u>)

	(⊕0⊖)										
									_		
;											
	Name	From	To	Name	From	To	<u>Class</u>	Dir	Sim	Pos/Mm:Ts	<u>Score</u>
	Pro_BAC_178_C24	23	101	MuDR-N116B_OS	1939	2011	DNA/MuDR	с	0.7105	1.2857	201
	Pro_BAC_178_C24	317	548	<u>TSB1</u>	2	234	DNA/Harbinger	с	0.7576	1.7857	980
	Pro_BAC_178_C24	1675	1742	Polinton-1_CB	14532	14601	DNA/Polinton	с	0.7465	2.0000	229
	Pro_BAC_178_C24	1919	1982	MuDR-N303_05	296	361	DNA/MuDR	d	0.7424	1.5556	221

Figura 14. Análise de regiões regulatórias (2.008 pb *upstream* ao códon ATG) de *ScAMT3;3* nos clones BAC_023_013 (**A**) e BAC_178_C24 (**B**) para presença de elementos móveis de transposição (retângulos em vermelho ou lilás) pelo programa Censor, indicando nome, classificação, posição e pontuações para similaridade de alinhamento local dos elementos móveis encontrados

Apesar das diferenças na sequência de nucleotídeos, as sequências promotoras de ambos clones BACs para ScAMT3;3 foram alinhadas e analisadas para verificar presença de elementos regulatórios, tais como ilhas CpG e repetições em tandem. Ilhas CpG são definidas como sendo regiões do genoma nas quais o conteúdo de guanina (G) ou citosina (C) excede 50%, e a frequência de CpG é aproximadamente igual à frequência GpC (GOLDMAN, 2001). CpG refere-se ao dinucleotídeo formado por uma ligação fosfodiéster entre C e G na mesma fita de DNA. Elas são muito raras devido à ocorrência de mutações ocasionadas por metilação do DNA em C por 5-metilcitosina. Apesar disso, as ilhas CpG são frequentemente encontradas em regiões regulatórias do genoma, principalmente em promotores tecidoespecíficos. Repetições em tandem são sequências repetidas de DNA adjacentes umas às outras. Estas regiões possuem alta propensão a mutações, visto que erros durante a replicação do DNA podem alterar o número de unidades de repetição muito mais frequentemente que as próprias mutações pontuais em nucleotídeos (RANDO; VERSTREPEN, 2007). Em regiões regulatórias, as repetições em tandem são elementos variáveis e que podem facilitar o ajuste fino da expressão de genes por meio de alterações na estrutura final da cromatina (VINCES, 2009). A análise comparativa das regiões promotoras dos clones de BACs para ScAMT3;3 envolvendo elementos regulatórios demonstrou a existência de região conservada entre os promotores avaliados para o gene ScAMT3;3 dos dois clones BAC, porém não foram encontradas ilhas CpG e nem mesmo repetições em tandem (Figura 15). Com base nestas considerações, e o fato de que a sequência genômica de ScAMT3;3 de BAC_023_013 contém apenas um íntron, esta sequência foi escolhida para a clonagem da região promotora e região codificante para sua caracterização funcional.



Figura 15. Comparação das regiões regulatórias (2.008 pb *upstream* ao códon ATG) para *ScAMT3;3* dos clones BAC_023_013 e BAC_178_C24, realizada pelo programa PlantPAN 2.0, indicando ausência de elementos regulatórios (ilhas CpG e repetições em tandem) e presença de regiões conservadas (retângulos alaranjados interligados por linhas cor de rosa) entre os promotores estudados

5.3 Expressão heteróloga de ScAMT3;3 em levedura

Com o objetivo de caracterizar a capacidade de transporte de amônio pelo produto do gene *ScAMT3;3* de cana-de-açúcar, foi realizado um experimento de complementação da cepa de levedura mutante 31019b, mutante triplo defectivo para absorção de amônio (*MATa mep1* Δ *mep2* Δ ::*LEU2 mep3* Δ ::*KanMX2 ura3*) (MARINI et al., 1997). Muitos estudos visando caracterizar a funcionalidade e capacidade de transporte de amônio tem empregado esta cepa de levedura (GAZZARRINI et al., 1999; WIREN et al., 2000; LUDEWIG et al., 2003; LOQUÉ et al., 2006a; GU et al., 2013).

O experimento consistiu na produção de três eventos de transformação genética das cepas de levedura mutante a partir do método modificado empregando acetato de lítio/DNA de esperma de salmão/PEG (GIETZ; SCHIESTL, 2007). Em cada evento, foi utilizado como inserto o vetor pDR196 vazio, o vetor pDR196 contendo a região codificante de *ScAMT3;3* e o vetor pDR196 contendo a região codificante *AtAMT1;1*. O gene *AtAMT1.1* de *A. thaliana* já foi descrito e funcionalmente caracterizado como uma proteína transportadora de amônio, atuando no sistema de transporte de alta afinidade (HATS) e possui alta capacidade de transporte de amônio (MAYER; LUDEWIG, 2006; LOQUÉ et al., 2006a; LOQUE et al., 2007). Portanto, os genótipos obtidos em cada evento de transformação foram denominados de mep:pDR196, mep:*AtAMT1;1* de mep:*AtAMT1;1*, mep:pDR196 e mep:*ScAMT3;3*. Um volume de 5 µL de cada diluição de suspensões celulares de cada genótipo de levedura foi

inoculado em placas de Petri contendo meio mínimo YNB suplementado com concentrações crescentes de amônio (NH4⁺) sob a forma de cloreto de amônio (NH4Cl) (0,2, 0,5, 1, 2, 3, 5 e 20 mM) ou 100 mM de seu análogo tóxico, metilamônio (MeA) (GAZZARRINI et al., 1999). Placas com meio YNB suplementado com 1 mM de arginina (Arg) foram utilizadas como controle positivo experimental. O crescimento das leveduras foi avaliado visualmente, podendo correlacionar a capacidade de complementação do mutante defectivo no transporte, além de permitir inferir uma maior ou menor absorção de amônio (Figura 16).

Em presença de arginina como fonte de N, todos os genótipos de levedura cresceram de maneira similar, validando a relação das diferenças encontradas nos demais meios de cultivo com presença e concentrações variadas de amônio.

mutante Células de levedura expressando ScAMT3:3 não apresentaram complementação da função de absorção de amônio em concentrações 0,2 e 0,5 mM de NH4⁺ em pH 6,0. Isto é, o crescimento do mutante foi complementado devido restituição da capacidade de transporte sob 1, 2, 3 e 5 mM de NH4⁺ em pH 6,0, mesmo que a diferença entre o controle negativo e mep: ScAMT3; 3 tenha sido muito tênue quando comparado a AtAMT1;1 que possui maior capacidade de transporte de NH4⁺ (YUAN et al., 2007b). Genes da subfamília AMT2 de sorgo, SbAMT3;1 e SbAMT4 também complementaram mutantes triplos de levedura em células crescidas a pelo menos 1 ou 2 mM de NH4⁺ (KOEGEL et al., 2013), sugerindo similaridades na capacidade de transporte entre esses ortólogos de cana-de-açúcar e sorgo.



Figura 16. Análise funcional de *ScAMT3;3* em levedura defectiva para o transporte de alta afinidade de amônio. Leveduras mutantes foram transformadas com vetores pDR196 contendo o gene *AtAMT1;1* ou *ScAMT3;3*. Transformantes foram selecionados em meio YNB contendo Arg e 5 μ L da suspensão de células de levedura foram adicionadas, além de cada diluição das suspensões celulares de 1, 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ dos transformantes mep:*AtAMT1;1* como controle positivo, mep:pDR196 vazio como controle negativo e mep:*ScAMT3;3* em concentrações crescentes de cloreto de amônio (NH₄⁺) ou metilamônio (MeA) em pH 5, 6 ou 7,5, além de arginina (Arg). As células foram cultivadas a 28°C por 5 dias

O pH altera a forma predominante entre NH₃/NH₄⁺. Amônia (NH₃) é uma base fraca (pK_a = 9,25), a qual apresenta-se mais que 99% na forma protonada (NH₄⁺) em pH neutro (LUDEWIG et al., 2003). Com o aumento do pH de 5,0 para 7,5, a concentração de NH₃ aumenta 316 vezes, enquanto a concentração de NH₄⁺ altera pouco (MAYER; LUDEWIG, 2006). Desta forma, espera-se encontrar mais NH₄⁺ em pH 5,0 e mais NH₃ em pH 7,5. A complementação de mutantes triplos de levedura com o *ScAMT3;3* foi realizada a 5 mM de amônio em condições de pH distintas (5,0, 6,0 e 7,5). A variação de pH 5,0 para pH 7,5 no meio de cultura contendo as leveduras mutantes expressando a proteína ScAMT3;3 levou à maior capacidade de transporte de amônio de maneira a confirmar a possibilidade do recrutamento de amônio no vestíbulo externo do poro e transporte de NH₃/H⁺ para o gene da subfamília *AMT2* de cana-de-açúcar.

Análises de estruturas de proteínas cristalizadas de AmtB em *E. coli*, aliadas a estudos de modelagem computacional e de mutações dirigidas indicam que NH₄⁺ é deprotonado antes da passagem pelo poro através da ação de uma histidina, e após a passagem pelo lúmen do poro, NH₃ é reprotonado e liberado ao citosol da célula (JAVELLE et al., 2008). No entanto, outros estudos em AmtB de *E. coli* sugerem que NH₄⁺ 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 NH₃, 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; 2014).

A proteína de cana-de-açúcar ScAMT3;3 foi incapaz de transportar o análogo tóxico a amônio, metilamônio (MeA), pois não houve diferença de crescimento entre as células de levedura complementadas com a atividade de ScAMT3;3 e células de levedura mep:pDR196 (controle negativo) quando cultivadas em meio contendo 100 mM de MeA. Além disso, o controle positivo expressando *AtAMT1;1* apresentou evidente sensibilidade à exposição a esta molécula quando comparado a ScAMT3;3 a 100 mM de MeA. Esses resultados confirmam que a atividade de ScAMT3;3 seja diferente dos membros AMT1 de plantas (LOQUÉ et al., 2006b; NEUHÄUSER et al., 2009; NEUHÄUSER; LUDEWIG, 2014) quanto à capacidade de transportar MeA. Ainda, estes resultados evidenciam a ausência de capacidade de transporte de MeA em relação a membros AMT2 de outras espécies, como LjAMT2;1 de *L. 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; NEUHÄUSER; LI et al., 2014; LUDEWIG, 2014), sendo que proteínas AMT2s não são capazes de transportar MeA.

Em resumo, a análise para a capacidade de transporte de amônio utilizando um sistema de expressão heteróloga em levedura mutante demonstrou que a proteína ScAMT3;3 é funcional no transporte de amônio, mas reduzida quando comparado a membros AMT1, o que denota diferenças nas propriedades bioquímicas para recrutamento de NH4⁺ ou co-transporte de NH₃/H⁺ (NEUHÄUSER; LUDEWIG, 2014).

5.4 Análise de expressão de ScAMT3;3 em cana-de-açúcar

Além da função de absorção de amônio em raízes, proteínas AMTs atuam na manutenção da homeostase de amônio em outros tecidos (VON WIRÉN et al., 2000, GAUR et al., 2012). Portanto, compreender o padrão de expressão do gene *ScAMT3;3* é importante para inferir quanto a sua função fisiológica em cana-de-açúcar.

Em trabalhos anteriores, foi demonstrado que genes de cana-de-açúcar da subfamília *AMT1 (ScAMT1;1 e ScAMT1;3)* apresentam expressão basal maior nas raízes de cana-de-açúcar, quando comparada à expressão em folhas e colmos, sugerindo a função principal desses genes no transporte de amônio em raízes (VITTI, 2012). A expressão do gene *ScAMT3;3* em cana-de-açúcar foi analisada para verificar o acúmulo de transcritos em nível de tecido/órgão; o gene *ScAMT2;1*, outro membro da subfamília gênica AMT2 previamente identificado (KOLTUN, 2016), foi utilizado como controle comparativo nas análises de expressão em tecidos/órgãos de cana-de-açúcar.

Na comparação direta entre o perfil transcricional dos genes AMT2 de cana-de-açúcar, ScAMT3;3 e ScAMT2;1, sob condição de suplemento de N (2 mM NH4NO3), a análise semiquantitativa mostra que o acúmulo de transcritos é maior para ScAMT3;3 em todos os órgãos e tecidos da planta, principalmente em tecido foliar (Figura 17A). ScAMT2;1, apesar de ter acúmulo de transcritos menor em relação a ScAMT3;3, o acúmulo entre tecidos é maior em colmos (Figura 17A). A análise quantitativa do acúmulo de transcritos confirma que ScAMT3;3 acumula entre 7 e 8 vezes mais em folhas de diversos estágios de desenvolvimento, quando comparada às raízes e colmo de cana-de-açúcar (Figura 17B). Em relação ao nível de expressão relativa do gene ScAMT2;1 em raízes, o acúmulo de ScAMT3;3 nas folhas chega a ser de 35 a 40 vezes maior (Figura 17B), sugerindo que este transportador apresente função relevante no transporte de amônio principalmente em folhas relativo aos outros tecidos de cana-de-açúcar.



Figura 17. Análises de expressão de *ScAMT3;3* em diferentes órgãos e tecidos de cana-de-açúcar cultivar 'SP80-3280', cultivada em suplemento de N, obtidas por PCR semiquantitativa (**A**) e PCR quantitativa (**B**) de transcritos reversos. Os genes *ScUBQ2* e *ScAMT2;1* foram utilizados como genes de referência nas análises. Barras representam médias \pm desvio padrão, n = 3. Asterisco (*) representa diferença estatística em relação à expressão relativa de *ScAMT2;1* em raízes, segundo teste t de Student ($p \le 0,01$)

Para melhor compreensão da função de ScAMT3;3 em cana-de-açúcar, foi verificada a regulação da expressão desse *AMT2* de acordo com o *status* de N. A análise do perfil transcricional de *ScAMT3;3* em raízes de cana-de-açúcar mostrou pouca alteração no acúmulo de transcritos em relação à condição +N, indicando que a expressão deste gene nas raízes não é afetada pelo *status* e nem pela fonte de N aplicada (Figura 18). Por outro lado, o gene *ScAMT2;1* demonstrou indução maior de transcritos em raízes quando sob NO₃⁻ em relação à condição +N. (Figura 18). Esses resultados demonstram que esses genes parálogos são diferentemente regulados em raízes de cana-de-açúcar, para realizar a função de transporte de amônio nesse órgão.



Figura 18. Análise de expressão dos transportadores de amônio *ScAMT3;3* e *ScAMT2;1* em raízes de cana-de-açúcar por qRT-PCR. *ScUBQ2* foi utilizado como gene normalizador nas análises de expressão relativa. Barras representam médias \pm desvio padrão, n = 3. Asterisco (*) representa diferença estatística em relação ao tratamento +N, segundo teste t de Student ($p \le 0,05$). Sigla *ns* indica ausência de diferença estatística entre médias e a média do tratamento +N

Por ser uma cultura robusta e eficiente na produção de biomassa, a cana-de-açúcar se destaca pelo seu potencial na produção de açúcar e bioetanol (NASS et al., 2007). Isto porque seus colmos podem acumular até 20% do seu peso fresco em sacarose (WANG et al., 2013). A absorção de N, assimilação de C via fotossíntese e a alocação de C e N entre os órgãos são processos fisiológicos que influenciam diretamente no acúmulo de biomassa (GASTAL; LEMAIRE, 2002). Devido à importância da interação entre o metabolismo de C e N na parte aérea dessa gramínea, análises quantitativas de transcritos reversos do gene *ScAMT3;3* e *ScAMT2;1* foram realizadas em colmos e folhas. A expressão do gene *ScAMT3;3* foi fracamente regulada pelo *status* e fonte de N em colmo, enquanto a expressão de *ScAMT2;1* foi induzida apenas em condição de nutrição exclusiva por NO₃⁻ (Figura 19).



Figura 19. Análise de expressão do transportador de amônio *ScAMT3;3* e *ScAMT2;1* em colmos de cana-de-açúcar. *ScUBQ2* foi utilizado como gene normalizador nas análises de expressão relativa. Barras representam médias \pm desvio padrão, n = 3. Asterisco (*) representa diferença estatística em relação ao tratamento +N, segundo teste t de Student ($p \le 0.05$)

As análises quantitativas de transcritos reversos de *ScAMT3;3* e *ScAMT2;1* em folhas maduras e folhas novas indicaram padrão similar ao identificado em raízes e colmo. Em geral, tanto para *ScAMT3;3* quanto para *ScAMT2;1*, foram observados em menores níveis de expressão relativa em folhas novas em comparação com folhas maduras para todos os tratamentos testados (Figura 20). Mesmo assim, a expressão do gene *ScAMT3;3* se manteve praticamente inalterada para as folhas maduras e folhas novas entre os diferentes tratamentos, com exceção da condição de NO₃⁻, na qual observou-se uma leve indução da expressão do gene em relação à condição +N numa ordem de 0,25 vezes a mais em folhas maduras (Figura 20). Da mesma forma, a expressão relativa de *ScAMT2;1* em nutrição por NO₃⁻ foi 1,13 vezes maior em folhas maduras em relação à condição +N, e uma supressão de 0,51 vezes do nível de transcritos em condição de NH₄⁺ em folhas novas. Esses resultados indicam que *ScAMT3;3* não é regulado pelo *status* de N em folhas e sua expressão é inalterada de acordo com a ontogenia da folha, resultando num padrão de expressão constitutivo em tecidos da parte aérea, e diferindo do padrão do parálogo *ScAMT2;1*.



Figura 20. Análise de expressão do transportador de amônio *ScAMT3;3* e *ScAMT2;1* em folhas maduras (**A**) e novas (**B**) de cana-de-açúcar. *ScUBQ2* e tecido foliar maduro em suprimento de N (+N) foram utilizados como normalizadores nas análises de expressão relativa. Barras representam médias \pm desvio padrão, n = 3. Asterisco (*) representa diferença estatística em relação ao nível de expressão relativa em folha madura no tratamento +N, segundo teste t de Student ($p \le 0.05$)

Em resumo, os resultados de expressão em cana-de-açúcar demonstram provável atividade de *ScAMT3;3* em folhas, independente de fonte e *status* de N externo.

5.5 Localização da atividade de *proScAMT3;3* em Arabidopsis

Para elucidar a participação do transportador de amônio em cana-de-açúcar nos processos fisiológicos, foram conduzidos experimentos de localização da expressão tecido-específica de *ScAMT3;3* em plantas transgênicas de *A. thaliana* ecótipo 'Col-0'. Estas plantas foram transformadas com construções contendo o promotor de *ScAMT3;3* (*proScAMT3;3*, 1.877 pb) fusionado aos genes repórteres *uidA* (GUS) codificando uma β -Glucuronidase (JEFFERSON et al., 1.987) ou *GFP* (*green fluorescent protein*), originando linhas transgênicas homozigotas (T₄) denominadas de *proScAMT3;3*:GUS e *proScAMT3;3*:GFP, respectivamente.

Buscando entender a regulação da expressão gênica pelo *status* e fonte de N em Arabidopsis, plantas *proScAMT3;3*:GUS foram cultivadas em condição de suficiência de N (1 mM NH4NO₃) por 7 d quando foram então transferidas para meios de cultivo *in vitro* contendo 1 mM NH4NO₃ (+N), sem N adicionado (-N) ou 2 mM NH4Cl (NH4⁺) e crescidas

Folhas

por 5 d. Após o período de tratamento, as plantas foram coletadas e submetidas ao ensaio histoquímico de atividade GUS. A expressão do gene repórter foi feita a partir da intensidade da coloração azul resultante da reação química mediada pela enzima β -*Glucuronidase* (Figura 21).

Plantas expressando promotor *ScAMT3;3* apresentaram atividade GUS localizada principalmente na região vascular da parte aérea, incluindo hipocótilo, cotilédones e folhas (Figuras 21A, 21B, 21C, 21M e 21N). Em plantas adultas, foram observadas diferenças na atividade promotora de *ScAMT3;3* de acordo com *status* de N externo, sendo que em -N as folhas novas apresentaram menor atividade GUS comparada às folhas novas de plantas em NH4⁺ (Figuras 21M e 21N). Além disso, pouca diferença na atividade GUS foi observada entre folhas maduras e novas de plantas em NH4⁺ (Figura 21M), ou até mesmo entre plantas em +N e NH4⁺ (Figuras 21A e 21C). Com estes resultados, é possível afirmar que o promotor de *ScAMT3;3* é levemente regulado pelo *status* de N em diferentes folhas, mas independente da fonte de N, assim como observado em cana-de-açúcar (Figura 20).

A fim de se obter a localização celular da atividade GUS promovida pela regulação do promotor de *ScAMT3;3* em Arabidopsis, foram realizados cortes histológicos transversais do tecido cotiledonar de plantas transgênicas *proScAMT3;3*:GUS. A visualização em microscópio óptico de luz das secções transversais de cotilédones mostrou intensa atividade promotora de *ScAMT3;3* em células do floema para todos os tratamentos testados (Figuras 21G, 21H e 21I), indicando que a função de transporte de amônio mediado por ScAMT3;3 ocorre em células vasculares específicas.

As raízes também apresentaram atividade GUS, principalmente na região da endoderme/periciclo e tecidos vasculares de raízes laterais, mas não em raiz primária, independente do *status* de N (Figuras 21J, 21K e 21L). Pelos radiculares induzidos pela deficiência de N (-N) apresentaram atividade mais intensa de GUS, indicando que a regulação de *proScAMT3;3* também ocorre em raízes. Quando em condição de baixa disponibilidade de N, ocorreu o desenvolvimento de pelos radiculares (Figura 21J), os quais auxiliam no processo de aquisição de amônio, resultando na maior taxa de absorção devido ao aumento de área total de raiz produzida (ROBINSON; RORISON, 1983). Em trabalho anterior com *AtAMT2;1*, o único membro da subfamília AMT2 em Arabidopsis, também foi detectada atividade GUS em tecidos vasculares de folhas, caule e raízes (SOHLENKAMP et al., 2002).



Figura 21. Ensaio histoquímico de atividade GUS em parte aérea (**A**, **B** e **C**), cotilédones (**D**, **E** e **F**), corte transversal de cotilédones exibindo feixes vasculares (**G**, **H** e **I**), raízes laterais (**J**, **K** e **L**) e folhas de plantas adultas (**M** e **N**) de Arabidopsis 'Col-0' expressando o gene repórter regulado pelo promotor endógeno *ScAMT3;3* de cana-de-açúcar em diferentes condições de disponibilidade e fonte de N. Em **G**, **H** e **I**, *x* e *f* significam xilema e floema, respectivamente

Com estes resultados, pode-se afirmar que a atividade do promotor do gene *ScAMT3;3* ocorre em células do floema nas folhas jovens, independente da fonte de N. Além disso, a atividade do promotor *ScAMT3;3* ocorre também em raízes laterais, independente de *status* e fonte de N. Esses resultados confirmam que a função de ScAMT3;3 ocorre principalmente na parte aérea de cana-de açúcar.

Com o intuito de confirmar os resultados encontrados para as plantas transgênicas *proScAMT3;3*:GUS, plantas de Arabidopsis ecótipo 'Col-0' foram transformadas com promotor *ScAMT3;3* fusionado ao gene repórter *GFP*, gerando plantas *proScAMT3;3*:GFP. Estas plantas foram cultivadas e submetidas aos mesmos tratamentos utilizados em plantas transgênicas *proScAMT3;3*:GUS, sendo, +N (1 mM NH4NO3), -N (sem N adicionado) e NH4⁺ (2 mM NH4Cl). A expressão do gene repórter *GFP* foi realizada por meio da intensidade do sinal GFP obtido das imagens provenientes de microscopia confocal de escaneamento a laser (Figura 22).

Cotilédones de plantas transgênicas expressando o promotor *ScAMT3;3* apresentam sinal GFP detectado em todo o limbo cotiledonar, mas com maior intensidade de sinal principalmente na região ao redor dos feixes vasculares (Figuras 22A, 22B e 22C), similar aos resultados obtidos com experimentos de localização da atividade promotora com gene repórter GUS. Experimentos adicionais serão necessários a fim de identificar a localização em nível celular do sinal GFP a partir de cortes transversais do tecido foliar e visualização em microscopia confocal, para confirmar a localização em células do floema.

A atividade do promotor *ScAMT3;3* não foi detectada nas raízes (Figuras 22D a 22L), diferente do observado em experimentos de localização por gene repórter GUS. É possível que a atividade promotora de *ScAMT3;3* ocorra, porém numa intensidade baixa, dificultando a detecção do sinal pelo gene repórter GUS.

Estudos prévios mostraram que *AMT2* de Arabidopsis é expresso de forma transiente em células da epiderme, ocorrendo na membrana plasmática e envelope nuclear na raiz primária (SOHLENKAMP et al., 2002). Além disso, a localização da atividade promotora de *AtAMT2;1* de Arabidopsis depende fortemente da fonte de N, sendo que, na ausência de N (-N), *AtAMT2;1* possui maior expressão em células da epiderme e córtex; porém, na presença de N (amônio ou nitrato), a expressão desaparece da epiderme e córtex, apresentando-se em tecidos mais internos, como as células do periciclo, principalmente sob nutrição por amônio (GIEHL et al., 2017). Resultado similar foi observado para a expressão transiente de *LjAMT2;1* de *Lotus japonicus* fusionado ao GFP (SIMON-ROSIN et al., 2003). Por ser um membro da subfamília *AMT2*, os resultados apresentados aqui demonstram que *ScAMT3;3* de cana-de-açúcar possui expressão principalmente em tecidos da parte aérea, o que possivelmente difere da função do ortólogo mais próximo de Arabidopsis.



Figura 22. Microscopia confocal de escaneamento a laser em cotilédones ($A, B \in C$), raízes primárias ($D, E \in F$), raízes laterais ($G, H \in I$) e meristema apical de raízes ($J, K \in L$) de plantas de Arabidopsis 'Col-0' expressando o gene repórter GFP regulado pelo promotor *ScAMT3;3* endógeno de cana-de-açúcar em diferentes condições de disponibilidade e fonte de N. Em A, B e C, a caixa em vermelho representa apenas o sinal GFP

5.6 Análise de expressão de ScAMT3;3 em transgênicos de Arabidopsis

Para entender o envolvimento e a funcionalidade do transportador de amônio ScAMT3;3 de cana-de-açúcar no processo da homeostase celular de N, foram conduzidos experimentos de complementação funcional do gene *ScAMT3;3* de cana-de-açúcar em mutante quádruplo de Arabidopsis (*qko*). O mutante *qko* refere-se à planta de Arabidopsis ecótipo 'Col-0' cujos transportadores de amônio AtAMT1;1, AtAMT1;2, AtAMT1;3 e AtAMT2;1 são defectivos. Sendo assim, a planta apresenta apenas 10% de capacidade de absorção de amônio devido à presença do transportador AtAMT1;5. Por este motivo, este genótipo pode ser utilizado como uma ótima ferramenta para estudos funcionais relacionados ao transporte de amônio (YUAN et al., 2007a).

Uma vez clonados, os fragmentos da região promotora (*proScAMT3;3*, 1.877 pb) e região codificante (*ScAMT3;3*, 1.452 pb) foram unidos e recombinados em vetores de expressão, os quais foram utilizados na transformação genética de Arabidopsis ecótipo 'Col-0' e mutante *qko*. Seis eventos de transformação de cada construção gênica obtidos foram conduzidos por três gerações, envolvendo seleção por antibiótico. Após a geração T4, 3 eventos de transformação foram analisados em ensaios de expressão gênica por análise quantitativa de transcritos reversos (qRT-PCR) para então serem definidas as linhas a serem utilizadas nos experimentos de análise funcional.

Como plantas de Arabidopsis não apresentam genes do grupo *AMT3*, não foi possível comparar o nível de expressão do transgene em relação ao tipo selvagem. Sendo assim, para a análise relativa de expressão de *ScAMT3;3*, foi utilizado um evento de transformação do ecótipo 'Col-0' oriundo da construção promotor fusionado à região codificante de *ScAMT3;3*. como sendo a linha de referência (Figura 23).

Os maiores níveis de expressão relativa em linhas para superexpressão de *ScAMT3;3* são evidentes quando a linha "Col-0 + *proScAMT3;3:ScAMT3;3#*1" foi usada para a normalização dos níveis de expressão relativa (Figura 23A). Por outro lado, as plantas transgênicas contendo promotor endógeno de cana-de-açúcar, apresentam níveis de *ScAMT3;3* significativamente menores em condição similar de cultivo das plantas 35S:*ScAMT3;3* (Figura 23B), comprovando que a superexpressão do transportador ScAMT3;3 de cana-de-açúcar foi efetiva em Arabidopsis. Essas linhas transgênicas foram posteriormente empregadas em estudos de caracterização da capacidade de transporte de ¹⁵N em raízes e na parte área, e em estudos complementação de crescimento.



Figura 23. Análise quantitativa do nível de expressão relativa de *ScAMT3;3* em plantas de Arabidopsis transgênicas contendo *ScAMT3;3* sob regulação do promotor constitutivo CaMV35S (**A**) e promotor endógeno e região codificante endógenos de cana-de-açúcar (**B**). Níveis de expressão relativa em **A** foram normalizados em relação ao nível de expressão da linha "Col-0 + *proScAMT3;3:ScAMT3;3#1*". Barras em cinza claro correspondem às linhas transgênicas com *background* "Col-0", enquanto que barras em cinza escuro correspondem às linhas obtidas da transgenia em mutante *qko*. Barras indicam médias ± erro padrão, n = 2. Letras minúsculas representam médias estatisticamente diferentes entre si, segundo teste de Tukey ($p \le 0,05$)

5.7 Análise fenotípica de transgênicos de Arabidopsis

5.7.1 Experimentos in vitro

Para verificar a participação do gene *ScAMT3;3* no transporte de amônio e de se entender suas funções fisiológicas específicas, plantas transgênicas de Arabidopsis selecionadas previamente (Figura 23) foram submetidas a ensaios de caracterização fenotípica. Nestes ensaios, foram utilizadas duas fontes de N, bem como sua disponibilidade,

em condições *in vitro*. Sendo assim, plantas 'Col-0' e *qko* não transgênicas foram utilizadas como controles experimentais, enquanto que 3 linhas *qko* superexpressando *ScAMT3;3* e 5 linhas contendo *ScAMT3;3* regulado pelo promotor endógeno de cana-de-açúcar (uma em 'Col-0' e três em *qko* como *background*) foram utilizadas nas avaliações. Todas as plantas foram cultivadas em meio de sais MS sem N, contendo 2 mM de KNO₃. Após 14 d, plantas foram transferidas para meios de cultivo contendo diferentes condições de disponibilidade e fonte de N.

Para os experimentos envolvendo a caracterização fenotípica de linhas 35S:ScAMT3;3, as condições de tratamento foram: baixa concentração de N (0,5 mM KNO3 ou 0,5 mM NH4Cl) e alta concentração de N (2 mM NH4Cl). Após 14 d de cultivo nessas condições, a biomassa da parte aérea das plantas foi avaliada, com intuito de relacionar o acúmulo de biomassa com a maior capacidade de transporte de N. Quando submetidas a 0,5 mM KNO3, sendo o nitrato a única fonte de N, notou-se pouca variação de acúmulo de biomassa fresca da parte aérea entre as linhas testadas e seus respectivos controles não transgênicos ('Col-0' e *qko*) (Figura 24A). Não foram observadas diferenças significativas de acúmulo de biomassa fresca da parte aérea das linhas "35S:ScAMT3;3#1 e #3" quando comparado ao *qko* sob tratamento de nitrato (Figura 24A).

Em contrapartida, quando os mesmos genótipos foram cultivados em 0,5 mM NH4Cl, sendo o amônio a única fonte de N, as diferenças entre os genótipos foram mais pronunciadas em termos de acúmulo de biomassa da parte aérea (Figura 24B). Nessa situação, linhas transgênicas acumularam mais massa fresca em pelo menos 21% a 38% em relação ao controle *qko* (Figura 24B). Por último, quando plantas foram cultivadas em 2 mM NH4Cl, o padrão de acúmulo na biomassa fresca da parte aérea de todos os genótipos foi semelhante à condição de 0,5 mM NH4Cl (Figura 24C). Neste caso, as linhas transgênicas expressando 35S:*ScAMT3;3* acumularam de 19% a 30% a mais em biomassa fresca da parte aérea em relação ao genótipo controle *qko* (Figura 24C). Estes resultados indicam que a superexpressão de *ScAMT3;3* leva à complementação de transporte de amônio em *qko*, resultando em maior acúmulo de biomassa na parte aérea. A expressão ectópica de *ScAMT3;3* foi capaz de gerar efeito aditivo de absorção de amônio em raízes e o possível transporte dessa fonte inorgânica de N quando o mutante *qko* é complementado, gerando a maior acúmulo de biomassa.



Figura 24. Fenótipo de plantas 'Col-0', *qko* e *qko* expressando 35S:*ScAMT3;3* em diferentes fontes e disponibilidade de N. Biomassa da parte aérea (mg MF planta⁻¹) das plantas depois de 14 d em meio sólido contendo 0,5 mM KNO₃ (**A**), 0,5 mM NH₄Cl (**B**), ou 2 mM NH₄Cl (**C**). Barras indicam médias \pm erro padrão, n = 33. Letras minúsculas representam médias estatisticamente diferentes entre si, segundo teste de Tukey ($p \le 0,05$)

Para verificar se a atividade de *ScAMT3;3* dirigido pelo promotor endógeno de canade-açúcar pode complementar o mutante de Arabidopsis, a caracterização fenotípica das linhas *proScAMT3;3:ScAMT3;3* foi realizada nas condições de ausência de (-N) e presença de N (2 mM NH₄Cl ou 10 mM NH₄Cl). Após 14 d de cultivo nessas condições, a biomassa fresca da parte aérea foi avaliada em cada planta. Em condições de meio de cultivo sem a adição de N, praticamente não foram observadas diferenças de biomassa da parte aérea entre os genótipos, exceto pela linha transgênica "*qko* + *proScAMT3;3:ScAMT3;3#2*", a qual apresentou comportamento similar ao do controle 'Col-0' (Figura 25A). Quando os genótipos foram cultivados em 2 mM de amônio como a única fonte de N, as linhas transgênicas *qko* complementadas apresentaram um maior acúmulo de biomassa fresca de pelo menos 32% e máximo de 52% em relação ao seu respectivo controle *qko* (Figura 25B). Além disso, também foi verificado um aumento de 18% no acúmulo de biomassa fresca da parte aérea entre "Col-0 + *proScAMT3;3:ScAMT3;3:H*1" e seu respectivo controle 'Col-0' (Figura 25B). Em condição de 10 mM de amônio, observou-se um padrão semelhante de acúmulo de biomassa da parte aérea em relação à condição de 0,2 mM de amônio, porém as linhas transgênicas #1 e #2 de "*qko* + *proScAMT3;3*:*ScAMT3;3*" tiveram variação na redução de 5% a 12% na biomassa fresca, indicando que houve um efeito tóxico de amônio sob tratamento de 10 mM. Contudo, ainda assim as linhas "*qko* + *proScAMT3;3*:*ScAMT3;3*" #2 e #3 apresentam maior acúmulo de biomassa em relação a *qko* (32% e 37%, respectivamente), indicando que a complementação de *qko* com promotor endógeno e região codificante de *ScAMT3;3* foi eficiente para levar à maior capacidade de transporte de amônio (Figura 25C).



Figura 25. Fenótipo de plantas 'Col-0', *qko* e *qko* expressando *proScAMT3;3:ScAMT3;3* em diferentes fontes e disponibilidade de N. Biomassa da parte aérea (mg MF planta⁻¹) das plantas depois de 14 d em meio sólido deficiente em N (**A**), contendo 2 mM NH₄Cl (**B**) ou 10 mM NH₄Cl (**C**). Barras indicam médias \pm erro padrão, *n* = 108. Letras minúsculas representam médias estatisticamente diferentes entre si, segundo teste de Tukey (*p* \leq 0,05)

Em resumo, os resultados de complementação com superexpressão de *ScAMT3;3* mostraram que a aquisição de amônio em raízes ocorreu de forma aditiva tanto em plantas *qko* quanto em 'Col-0' transgênicas, resultando em maior acúmulo de biomassa da parte aérea, quando amônio é a única fonte de N, o que demonstra que *ScAMT3;3* expresso de forma heteróloga em Arabidopsis pode efetivamente atuar no transporte de amônio em planta. Já a complementação com promotor e gene endógenos de cana-de-açúcar *ScAMT3;3* revela a possível função fisiológica desse gene em cana-de-açúcar. Plantas transgênicas expressando

essa construção também apresentaram maior acúmulo de biomassa, indicando que a atividade de *ScAMT3;3* na região vascular, primordialmente em folhas, pode levar à melhor capacidade de transporte de amônio nesse órgão, sugerindo que ScAMT3;3 efetivamente regula a homeostase de amônio em cana-de-açúcar.

5.7.2 Experimentos in vivo

Para compreender a função de ScAMT3;3 quanto à capacidade de transporte de amônio em planta, as plantas *qko* complementadas por superexpressão do gene transportador de amônio de cana-de-açúcar foram submetidas a experimentos *in vivo* analisadas para o influxo rápido de ¹⁵N-amônio em raízes (LOQUÉ et al., 2006). Plantas do mutante *qko* e suas três respectivas linhas transgênicas independentes complementadas com 35S:*ScAMT3;3* foram cultivadas por 45 d em solução nutritiva contendo 4 mM KNO₃ e em seguida foram transferidas para solução sem N adicionado (-N) ou com 2 mM NH4Cl, sendo o amônio como única fonte de N (NH4⁺). Após 3 d em tratamento, plantas foram submetidas aos ensaios de influxo rápido de amônio marcado com ¹⁵N (¹⁵N-amônio) na faixa de concentração de alta afinidade (*high affinity transport system*) com 0,1 mM (¹⁵NH4)₂SO₄ externo, ou seja, 0,2 mM de ¹⁵N-amônio.

Foi observado que tanto em condição deficiência de N (-N) quanto sob nutrição exógena de amônio, qko superexpressando ScAMT3;3 de modo constitutivo apresentou diferenças significativas no influxo de ¹⁵N-amônio em raízes quando comparado a *qko* (Figura 26A e 26B), exceto para a linha transgênica #1 no tratamento sob ausência de N (Figura 26A). Em -N, plantas superexpressando ScAMT3;3 apresentaram maior influxo de ¹⁵N-amônio nas raízes, com variação entre 12% a 31% em relação ao controle qko (Figura 26A). Quando as plantas foram expostas à presenca de N exógeno, na condição de amônio como única fonte de N (NH4⁺), todos os genótipos apresentaram redução do influxo ¹⁵N-amônio em raízes relativo à condição de deficiência de N (-N); contudo, as plantas com expressão ectópica apresentaram de 36% a 38% mais absorção de ¹⁵N-amônio em suas raízes quando comparado ao genótipo qko (Figura 26B). Isto indica que quando ScAMT3;3 é expresso de modo ectópico em raízes, a proteína pode auxiliar no processo de absorção em raízes, caracterizando sua função tal como uma proteína transportadora de amônio. Estudos adicionais envolvendo ScAMT3;3 para definir as propriedades bioquímicas de capacidade de transporte precisam ser realizados para definir a cinética de absorção de amônio visando a compreensão de Km e Vmax.



Figura 26. Influxo de ¹⁵N-amônio em raízes de plantas de Arabidopsis mutante *qko* e de linhas superexpressando *ScAMT3;3* sob controle do promotor CaMV35S. Influxo de ¹⁵N-amônio foi feito a partir de 0,2 mM ¹⁵(NH₄)₂SO₄ nas raízes em condição de deficiência (**A**) e suficiência de amônio (**B**) após 3 d de tratamento. Barras indicam médias ± erro padrão, n = 4. Asterisco (*) representa diferença estatística entre médias em relação ao controle *qko*, segundo teste t de Student ($p \le 0,05$). Sigla *ns* indica ausência de diferença estatística entre médias em relação ao controle *qko*,

Com base nos resultados de expressão gênica de *ScAMT3;3* obtidos em cana-deaçúcar, a função de ScAMT3;3 estaria relacionada principalmente à homeostase de amônio em folhas (Figuras 20, 21 e 22). Nesse sentido, experimentos visando a caracterização da função de ScAMT3;3 na parte aérea foram realizados de modo a identificar o papel da proteína transportadora no processo de remobilização de N e translocação de N em plantas de Arabidopsis mutantes *qko* complementadas com *ScAMT3;3* de cana-de-açúcar.

Durante o processo de remobilização, proteínas da folha, tais como plastídios fotossintéticos, são degradados ao longo da senescência, suprindo a nutrição de órgãos em crescimento como, por exemplo, folhas jovens e sementes (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010). A remobilização de N pode ocorrer mais fortemente quando as plantas são submetidas a condições de limitação de N (VOUILLOT; DEVIENNE-BARRET, 1999; LEMAÎTRE et al., 2008). A fim de verificar se a proteína ScAMT3;3 atua no mecanismo de remobilização de N entre tecidos foliares maduros e jovens, plantas de Arabidopsis dos genótipos selvagem 'Col-0', mutante *qko* e suas linhas complementadas com construções contendo promotor e região codificante endógenos da cana-de-açúcar *ScAMT3;3* foram

cultivadas por 45 d em solução nutritiva contendo 4 mM KNO₃ como única fonte de N e então transferidas para solução sem N (-N) ou com 2 mM NH₄Cl (NH₄⁺). Após 5 d de tratamento, ¹⁵N-amônio foi aplicado em uma folha madura não senescente de cada planta e, após 24 h, folhas maduras e folhas novas foram coletadas e conduzidas às análises de enriquecimento de ¹⁵N em folhas.

Quando as plantas de Arabidopsis foram cultivadas por 5 dias sob ausência de N (-N), houve maior acúmulo de ¹⁵N-amônio em folhas maduras de qko em relação aos outros genótipos devido à ausência de transportadores de membrana responsáveis pela realocação dessa forma inorgânica de N (Figura 27A). No entanto, as linhas expressando a construção com promotor e região codificante de ScAMT3;3 endógenos de cana-de-açúcar não apresentaram maior acúmulo de ¹⁵N-derivado de amônio em folhas novas, indicando ausência de fluxo de ¹⁵N de folhas fonte para dreno (Figura 27A). Contrariamente, em plantas submetidas à pré-tratamento de 2 mM NH4⁺, as linhas transgênicas expressando proScAMT3;3:ScAMT3;3 apresentaram 15% a 20% menor acúmulo de ¹⁵N-amônio nas folhas velhas em relação a qko (Figura 27B), e o fluxo de 15N-derivado de amônio marcado é evidente em linhas transgênicas apresentando cerca de 74% a 86% mais acúmulo de ¹⁵N em folhas jovens do que plantas qko (Figura 27B). Estes resultados revelam que o envolvimento de ScAMT3;3 durante o processo de translocação de amônio pode ocorrer quando em condição de suficiência de amônio, mas não durante a deficiência de N, sugerindo que a função de ScAMT3;3 possivelmente não esteja relacionada ao processo de remobilização de amônio de folha fonte para dreno em condições de deficiência de N (-N). Esses resultados corroboram à ausência de regulação de ScAMT3;3 pelo status de N em folhas maduras e jovens de cana-de-açúcar mesmo após 5 dias de limitação de N (Figura 27A).



Figura 27. Acúmulo de ¹⁵N-amônio em folhas maduras e folhas novas, representando a remobilização em plantas de Arabidopsis 'Col-0', mutante *qko* e linhas transgênicas para a construção *proScAMT3;3:ScAMT3;3*. Acúmulo de ¹⁵N-amônio em folhas maduras e jovens 5 d após tratamento das plantas em deficiência de N (**A**) e em suficiência de amônio (**B**). Foram aplicados 10 µL de 50 mM ¹⁵N-amônio em folhas maduras e, após 24 h, folha madura não senescente e *pool* de folhas novas foi coletado para análise de ¹⁵N. Barras indicam médias ± erro padrão, *n* = 4. Letras minúsculas representam diferença estatística entre médias entre si, segundo teste de Tukey ($p \le 0,10$)

Considerando que *ScAMT3;3* é expresso em células do floema em folhas (Figuras 21G, 21H e 21I), os resultados do experimento de aplicação de ¹⁵N-amônio em folhas demonstram que a função de ScAMT3;3 está possivelmente relacionada ao processo de translocação de amônio entre tecidos da parte aérea. Recentemente, a função de proteína de membrana AtAMT2;1, um membro da subfamília *AMT2* de Arabidopsis, foi descrita como um transportador relacionado ao transporte longitudinal de amônio da raiz para a parte aérea realizando carregamento do xilema (GIEHL et al., 2017). Em Arabidopsis, a expressão de *AtAMT2;1* é alterada na raiz na presença de amônio, sendo expresso em células do periciclo da raiz atuando como facilitador do transporte simplástico para o carregamento do xilema, o que corrobora ao aumento das concentrações de amônio no xilema em condições de alta disponibilidade exógena de N (GIEHL et al., 2017).

Os resultados apresentados aqui, indicam que ScAMT3;3 tem função minoritária em raízes, porém sua atividade pode estar relacionada ao transporte de amônio no via floema, sendo pouco regulado pelo *status* de N. Função similar foi descrita para AtNRT1;11 e AtNRT1;12 de Arabidopsis, dois transportadores de nitrato do sistema de transporte de baixa afinidade, necessários para a transferência de nitrato proveniente do xilema da raiz e carregamento do floema em veias maduras de folhas expandidas para redistribuição do nutriente em tecidos mais jovens (HSU; TSAY, 2013). Cabe destacar que ainda permanece desconhecida a função de genes *AMT2* na parte aérea de plantas. Portanto, essas informações dão suporte ao fato de que a ação combinada de múltiplos transportadores de amônio regula a translocação dessa forma inorgânica de N em diversas partes da planta (LOQUÉ; VON WIREN, 2004). Visto que monocotiledôneas possuem maior número de membros *AMT2* quando comparado às dicotiledôneas (COUTURIER et al., 2007; KOEGEL et al., 2013), é possível especular que ScAMT3;3 tenha função fisiológica distinta de ScAMT2;1 no transporte de amônio no sistema vascular.

Visto que a função de ScAMT3;3 está associada ao transporte de amônio via floema em condições de disponibilidade exógena de amônio (Figura 27B), foram conduzidos experimentos de translocação de amônio conforme proposto por Hsu e Tsay (2013), com modificações, com a finalidade de testar o envolvimento de ScAMT3;3 na redistribuição de N entre tecidos fonte e dreno. Plantas de Arabidopsis dos genótipos *qko* e suas linhas complementadas com construções contendo promotor e região codificante endógenos da cana-de-açúcar *ScAMT3;3* foram cultivadas por 45 d em solução nutritiva contendo 4 mM KNO₃ como única fonte de N e então transferidas para 2 mM NH4Cl. Após 3 d de tratamento, plantas foram transferidas para solução nutritiva contendo ¹⁵N-amônio por 1 h e devolvidas

para solução com 2 mM NH4Cl. Foram coletadas raízes, folhas maduras e folhas jovens de plantas após 1 h e 24 h de tratamento em ¹⁵N-amônio, e amostras foram conduzidas às análises de enriquecimento de ¹⁵N.

A partir do ensaio de influxo de ¹⁵N-amônio realizado em plantas *qko* e transgênicos expressando *proScAMT3;3:ScAMT3;3*, foi calculada a taxa de influxo de ¹⁵N-amônio por hora. Os resultados demonstram que o influxo de ¹⁵N-amônio entre as linhas transgênicas e *qko* não diferem estatisticamente entre si (Figura 28). Com isso, há indicativos de que, quando expresso sob a regulação do promotor endógeno de cana-de-açúcar, *ScAMT3;3* não é capaz de causar efeito na absorção de NH₄⁺ quando em condição de suficiência de N, indicando que a principal função de ScAMT3;3 ocorre na parte aérea de cana-de-açúcar.



Figura 28. Influxo de ¹⁵N-amônio em raízes de plantas de Arabidopsis mutante *qko* e de linhas transgênicas expressando *ScAMT3;3* sob controle do promotor endógeno de cana-de-açúcar *proScAMT3;3*. Influxo de ¹⁵N-amônio foi realizado por 1 h com solução nutritiva contendo 5 mM ¹⁵(NH₄)₂SO₄. Barras indicam médias ± erro padrão, n = 6

Os resultados de translocação em parte aérea demonstram que após 1 h de influxo, folhas maduras tendem a acumular quantidade ¹⁵N-amônio (Figura 29A), sendo que a maior parte do isótopo é translocado para folhas novas (Figura 29B). O acúmulo de ¹⁵N-amônio nas folhas novas de plantas transgênicas foi de 28,8 a 71,9% maior em relação ao mutante não transgênico *qko*, indicando que a função de ScAMT3;3 pode estar auxiliando no processo de translocação de NH₄⁺ para estes tecidos. Após 24 h do influxo, foi observado que o acúmulo de ¹⁵N-amônio foi maior tanto em folhas maduras como folhas novas (Figura 29C e 29D),

com maior acúmulo em plantas transgênicas em relação ao genótipo *qko*. O maior acúmulo do isótopo observado em plantas com 24 h após influxo pode ser decorrente ou da assimilação de ¹⁵N-amônio em aminoácidos pelas diferentes isoformas de Glutamina Sintetase nas células do floema, ou até mesmo decorrente da redistribuição de NH₄⁺ via floema entre os tecidos fonte e dreno.



Figura 29. Acúmulo de ¹⁵N-amônio em folhas maduras e folhas novas com 1 h e 24 h após influxo em raízes, representando a translocação de amônio em plantas *qko* e linhas transgênicas para a construção *proScAMT3;3:ScAMT3;3*. Acúmulo de ¹⁵N-amônio em folhas maduras (**A**) e novas (**B**) 1 h após influxo. Acúmulo de ¹⁵N-amônio em folhas maduras (**C**) e novas (**D**) 24 h após influxo. Barras indicam médias ± erro padrão, n = 6. Asterisco (*) representa diferença estatística entre médias em relação ao controle *qko*, segundo teste t de Student ($p \le 0,10$)

Para melhor visualização e interpretação dos resultados obtidos para acúmulo de ¹⁵N em raízes e parte aérea apresentando anteriormente (Figuras 28 e 29), também foram calculadas as razões entre as quantidades de ¹⁵N-amônio acumulado em folhas novas e folhas maduras (FN/FM) após 1 h e 24 h de tratamento visando entender se o fluxo de N-marcado ocorre para folhas novas ou folhas maduras devido atividade de ScAMT3;3. Após 1 h de exposição ao ¹⁵N, observou-se uma razão FN/FM de 20,1 a 30,5% maior em plantas transgênicas expressando *proScAMT3;3:ScAMT3;3* em relação ao mutante *qko*, sugerindo que o isótopo ¹⁵N-amônio está sendo direcionado para folhas novas (Figura 30A). Após 24 h da realização do tratamento, a razão foi maior em *qko* e de 20,3 a 22,5% menor em plantas transgênicas, indicando que ScAMT3;3 tende a redirecionar ¹⁵N-derivado de amônio para tecidos maduros possivelmente através de translocação via floema (Figura 30B).

Com o intuito de verificar o transporte de amônio da parte aérea para as raízes, foram calculadas as razões do acúmulo de ¹⁵N-amônio entre parte aérea e raiz (PA/R) para 1 h e 24 h após tratamento com N-marcado. Após 1 h de exposição a ¹⁵N, foi observado que plantas transgênicas expressando *proScAMT3;3:ScAMT3;3* apresentaram PA/R de 20 a 84% maior que o mutante *qko* (Figura 30C), indicando uma função de ScAMT3;3 no redirecionamento de ¹⁵N-amônio para a parte aérea em detrimento a raiz destas plantas na primeira hora de exposição ao isótopo de N marcado em relação ao mutante *qko*. Após 24 h de exposição ao ¹⁵N-amônio, os valores de PA/R são maiores que os observados com 1 h para todos os genótipos avaliados, contudo as razões entre *qko* e transgênicos não diferem estatisticamente entre si (Figura 30D), sugerindo que não existe diferença de fluxo de ¹⁵N derivado de amônio significativo para a raiz devido à atividade de ScAMT3;3, o que pode indicar que a raiz possivelmente não é um forte dreno nessas condições de cultivo, ou que o fluxo de ¹⁵N medido é devido ao transporte de N metabolizado na forma de aminoácidos e não ¹⁵N na forma de amônio após 24 h do tratamento.



Figura 30. Razões entre acúmulo de ¹⁵N-amônio em folhas novas e folhas maduras com 1 h (**A**) e 24 h (**B**) após influxo em raízes e razões entre acúmulo de ¹⁵N-amônio em parte aérea e raiz com 1 h (**C**) e 24 h (**D**) após influxo em plantas *qko* e linhas transgênicas para a construção *proScAMT3;3:ScAMT3;3*. Barras indicam médias ± erro padrão, n = 6. Asterisco (*) representa diferença estatística entre médias em relação ao controle *qko*, segundo teste t de Student ($p \le 0,10$)

Em muitas espécies vegetais, todo N que é originalmente absorvido pelas raízes e translocado via xilema para a parte aérea pode ser retranslocado novamente para drenos, tais como raízes, via floema (SIMPSON, 1986). O transporte de N no floema é predominantemente na forma de N orgânico, isto é, aminoácidos como glutamina, glutamato,

aspartato e asparagina, sendo glutamina e asparagina as formas orgânicas de N predominantes presente no floema (PATE et al., 1975; MENGEL; HAEDER, 1977; ALLEN; RAVEN, 1987; SHELP, 1987; SCHOBERT; KOMOR, 1989, BERNARD; HABASH, 2009; MOISON et al., 2018; TEGEDER; MASCLAUX-DAUBRESSE, 2018). Em plantas, Glutamina Sintetase (GS) catalisa a biossíntese de glutamina realizando a assimilação de amônio tanto no floema quanto no xilema. Dentre as duas isoformas (GS1 e GS2), GS1 citossólica em Arabidopsis é induzida durante o processo de senescência das folhas, no qual amônio é gerado devido ao catabolismo de aminoácidos (HILDEBRANDT et al., 2015) e GS2 localizado em cloroplastos é reprimida (DIAZ et al., 2008; ORSEL et al., 2014; AVILA-OSPINA et al., 2015). Dentre as cinco isoformas citossólicas de GS1 (GLN1;1-GLN1;5), três genes GLN1;1, GLN1;2 e GLN1;4 são expressos no floema na região de maior ramificação, enquanto que, GLN1;3 é expresso no floema da nervura principal, realizando a síntese de glutamina para ser transportado via floema (MOISON et al., 2018). A enzima Asparagina Sintetase (AS) catalisa a transaminação de glutamina para aspartato para formar asparagina e glutamato (GAUFICHON et al., 2010). No entanto, asparagina também é sintetizada pela atividade de AS direta na condensação de amônio em aspartato (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2006). Análise de mutante únicos, duplos e triplos para genes GLN1s de Arabidopsis demonstra que apenas em mutante triplo gln1;1 gln1;2 gln1;3 não ocorre a re-assimilação de ¹⁵N-amônio de origem do catabolismo durante a senescência, demonstrando a redundância desses genes atuando no floema (MOISON et al., 2018). Nesse mutante triplo gln1;1 gln1;2 gln1;3, altos níveis de amônio são encontrados no floema quando comparado a mutantes únicos ou à planta controle. Além disso, altos níveis de expressão do gene ASN2 que codifica para isoforma AS2 atuante no floema são encontrados no mutante triplo relativo à planta controle, indicando que, na ausência de atividade de GS1, uma grande proporção do amônio no floema está sendo catalisado em asparagina pela atividade de AS2 para ser transportado durante a remobilização (MOISON et al., 2018). Esses dados confirmam que os níveis de glutamina e asparagina aumentam no floema durante o processo de remobilização de N em plantas (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2006). Com base nesse conhecimento, é possível inferir nos experimentos de translocação de N realizados com plantas transgênicas expressando proScAMT3;3:ScAMT3;3 a maior parte do ¹⁵N detectado após 24 h do tratamento é ¹⁵N assimilado em aminoácidos como glutamina e asparagina, mesmo os experimentos sendo realizados em condição de suficiência de N (Figura 29D), o que explica os similares níveis de fluxo de ¹⁵N em plantas expressando ScAMT3;3 em mutante *qko*. Contudo, em relação aos resultados de maior fluxo de ¹⁵N-amônio em plantas com atividade do transportador de canade-açúcar ScAMT3;3 após 1 h em relação ao *qko* (Figura 29C) não é possível atribuir a possível atividade de GS1 ou AS2 no floema devido ao período curto (1 h) de realização do experimento, indicando que ¹⁵N-amônio possivelmente está presente na raiz.

Além de N estar presente na forma orgânica, N inorgânico (NH4⁺ ou NO3⁻) também é encontrado na seiva do floema (JESCHKE et al., 1991; SCHOBERT; KOMOR, 1992; PEUKE et al., 1996). Em experimentos de determinação de amônio a concentração de amônio em seiva de floema foi em média de 12,8 mM em plantas de arroz (FUKUMORITA et al., 1983), 2,5 mM em trigo (HAYASHI; CHINO, 1986), 1,6 mM em Ricinus (HALL; BAKER, 1972), 2,5 mM em tabaco (HOCKING, 1980; TERCÉ-LAFORGUE et al., 2004), de 6,8 a 75,5 mM em brócolis (SHELP, 1987), 6 mM em alface (VAN HELDEN et al., 1994), 85,3 mM em milho (OHSHIMA et al., 1990), e diferentes estudos apresentam evidências de que a concentração interna de amônio na seiva do floema sofra variação pelo status de N da planta de acordo com a disponibilidade no solo. Em tabaco, a concentração de amônio em plantas cultivadas em deficiência de N reduz cerca de 16 vezes quando comparado à presença externa de amônio (TERCÉ-LAFORGUE et al., 2004). Em Arabidopsis, plantas cultivadas na presença de alto N apresentam o dobro de amônio livre no floema comparado a plantas cultivadas sob baixa disponibilidade de N (MOISON et al., 2018). De maneira similar, nitrato também é encontrado no floema, apresentando reduzidas concentrações, sendo na razão de 1:100 a 1:10 em relação a aminoácidos (KIBA et al., 2012). Logo, tanto amônio como nitrato são transportados à longa distância no floema.

Dois principais mecanismos são responsáveis pelo transporte à longa distância de N dentro das plantas, sendo o fluxo de massa através do xilema da raiz para a parte aérea em regiões fotossinteticamente ativas comandado pela transpiração, e a translocação através do floema da parte aérea para drenos onde há crescimento ou armazenamento (PATE, 1980). Em gramíneas, a distribuição preferencial de nutrientes minerais ocorre majoritariamente através dos nós, cuja região é formada por um sistema vascular complexo, muito organizado e provavelmente conservado em nestas espécies (KAWAHARA, et al., 1974; 1975; HOSHIKAWA, 1989; NELSON, et al., 2000; YAMAJI; MA, 2014). N pode ser transferido do xilema para o floema para suplemento rápido para atender a demanda de drenos de crescimento rápido (PATE et al., 1975, VAN BEL, 1984). Esse processo de transferência de N requer a recuperação de N de células do xilema do parênquima e subsequente descarregamento no apoplasto em direção ao floema, para posterior carregamento do floema (TEGEDER; MASCLAUX-DAUBRESSE, 2018). O carregamento de nitrato no floema é mediado por diferentes transportadores. NPF2;13/NRT1;7 é localizado em nervuras menores

das folhas sendo expresso em células do elemento do tubo crivado e células companheiras realizando o carregamento de folhas maduras (FAN et al., 2009). NRT2;4 e NRT2;5 são transportadores de alta-afinidade induzidos na deficiência de N e expressos no floema em nervuras principais e nervuras secundárias, respectivamente, atuando no transporte apoplástico de nitrato durante o processo de remobilização (KIBA et al., 2012; LEZHNEVA et al., 2014). NPF1;2/NRT1;11 e NPF1;1/NRT1;12 são localizados em células companheiras do floema nas nervuras principais das folhas, realizando o carregamento do nitrato derivado do xilema para o floema (HSU; TSAY, 2013). Assim como o nitrato, outros elementos minerais também podem ser distribuídos através do floema como, por exemplo, zinco e cádmio em arroz, cujo transporte é realizado por proteínas especializadas OsHMA2 e OsLCT1 localizadas na região de feixes vasculares do floema (URAGUCHI et al., 2011; YAMAJI et al., 2013). Similar à proteína OsHMA2, o transportador OsYSL16 é expresso especificamente em região nodal de arroz em floema e tecido vascular foliar, sendo responsável pela remobilização de cobre de folhas maduras para folhas novas e panícula (ZHENG et al., 2012). Apesar da caracterização de transportadores de nitrato realizando o carregamento do floema, bem como o transporte de outros elementos minerais nesse tecido vascular, não existe descrição na literatura de transportadores de amônio envolvidos nesse processo.

Com base nas informações aqui apresentadas, os resultados de expressão gênica de *ScAMT3;3* em cana-de-açúcar e a localização da atividade promotora a partir de genes repórteres, aliados a experimentos de transporte de ¹⁵N-amônio em plantas transgênicas expressando *ScAMT3;3* sob regulação do promotor endógeno de cana-de-açúcar é possível inferir que a proteína ScAMT3;3 exerça papel importante no carregamento de amônio para as células do floema em condição de suficiência de amônio (Figuras 21, 23 e 29). Apesar de *ScAMT3;3* ser expresso em folhas maduras durante a deficiência de N (Figuras 17, 20 e 21), plantas transgênicas com atividade promotora de *ScAMT3;3* não apresentam maior fluxo de amônio para tecidos dreno como folhas novas (Figura 27), sugerindo que ScAMT3;3 transloca amônio principalmente quando essa forma inorgânica de N está disponível em altas concentrações. Considerando que durante a deficiência de N a remobilização de N ocorre principalmente via aminoácidos, como glutamina e asparagina (MOISON et al., 2018), é possível especular que ScAMT3;3 também atue no carregamento de amônio no floema suplementando N inorgânico para atividade de GS1 no floema, e subsequente transporte para drenos.

6 CONCLUSÕES

Para caracterização funcional do membro da subfamília AMT2 de cana-de-açúcar, dois clones de biblioteca BAC do de cana-de-açúcar contendo sequências para *ScAMT3;3* (BAC_023_013 e BAC_178_C24), foram identificadas e análises *in silico* para identificação das ORFs demonstram que a proteínas AMT1 e AMT2 de cana-de-açúcar apresentaram o motivo de assinatura conservado para a superfamília *MEP/AMT/Rh*, sendo também identificados aminoácidos conservados no N-terminal e C-terminal previamente demonstrados como essenciais para regulação no transporte de amônio e/ou estabilidade da proteína na formação de trímeros. Contudo, em ScAMT3;3, bem como outros membros da subfamília AMT2, a ausência de cisteínas conservadas na região N-terminal da proteína não parece ser essencial para formação de trímeros na membrana plasmática.

Análises filogenéticas utilizando bancos de dados genômicos de cana-de-açúcar mostraram que as sequências gênicas de *ScAMT3;3* identificadas nos clones BACs possuem alta similaridade com as da espécie selvagem. Os alinhamentos das sequências codificantes e regulatórias de *ScAMT3;3* entre clones BACs mostraram a existência de polimorfismos de nucleotídeos em clones BACs, refletindo em alterações na sequência de aminoácidos, além de alta heterogeneidade em promotores, sugerindo que os BACs identificados possam ser alelos distintos para o AMT em estudo.

Em cana-de-açúcar, a expressão gênica de *ScAMT3;3* é fracamente regulada por *status* e fonte de N. Apesar disso, o maior acúmulo de transcritos ocorre em folhas, indicando o papel da proteína no transporte de amônio neste órgão. Ensaios de localização por meio do uso de genes repórteres GUS e *GFP* expressos de forma heteróloga em Arabidopsis confirmaram a sinalização da atividade promotora de *ScAMT3;3* em tecido foliar, principalmente em células vasculares do floema.

A análise para a capacidade de transporte de amônio utilizando a complementação de levedura mutante demonstrou que proteínas de cana-de-açúcar ScAMT3;3 são funcionais no transporte de amônio. Experimentos com concentrações crescentes exógenas de amônio e metilamônio indicam possíveis diferenças na afinidade ao substrato na comparação de AtAMT1;1 com ScAMT3;3. Os resultados evidenciam distintas capacidades de transporte de amônio entre membros da subfamília AMT1 e AMT2, o que denota diferenças nas propriedades bioquímicas para recrutamento de NH4⁺ ou co-transporte de NH3/H⁺.

A expressão ectópica de *ScAMT3;3* em raízes do mutante *qko* restaurou a capacidade de transporte de ¹⁵N-amônio em raízes e o crescimento da planta em condições específicas de disponibilidade de N, indicando que ScAMT3;3 pode transportar amônio *in planta*. A expressão do gene *ScAMT3;3* regulado pelo promotor endógeno de cana-de-açúcar permitiu um aumento significativo no acúmulo de biomassa da parte aérea de Arabidopsis, confirmando a função desse gene no transporte de amônio.

Os experimentos de transporte de ¹⁵N-derivado de amônio na parte aérea de plantas transgênicas do mutante *qko* expressando o promotor endógeno de cana-de-açúcar e região codificante de *ScAMT3;3* sugerem que a função de ScAMT3;3 possivelmente não está associada à remobilização de amônio entre folha fonte e folha dreno em condições de deficiência de N; porém, possui função primordial na redistribuição/translocação de amônio no ajuste fino da homeostase dessa forma inorgânica de N por meio do carregamento de amônio em vasos de floema durante condições de alta disponibilidade exógena de amônio.

REFERÊNCIAS

ALBORESI, A. et al. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis. **Plant, Cell & Environment**, Hoboken, v. 28, n. 4, p. 500-512, 2005.

ALLEN, S.; RAVEN, J. A. Intracellular pH regulation in *Ricinus communis* grown with ammonium or nitrate as N source: the role of long-distance transport. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 38, n. 4, p. 580-596, 1987.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS - ANDA. **Principais indicadores do setor de fertilizantes** - 2015. São Paulo, 2019. Disponível em: http://anda.org.br/wp-content/uploads/2018/10/Principais_Indicadores_2015.pdf/>. Acesso em: 21 mar. 2019.

AVILA-OSPINA, L. et al. The identification of new cytosolic glutamine synthetase and asparagine synthetase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.), and their expression during leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n. 7, p. 2013-2026, 2015.

BAULCOMBE, D. et al. **Reaping the benefits**: science and the sustainable intensification of global agriculture. London: The Royal Society, 2009. 72 p.

BERNARD, S. M.; HABASH, D. Z. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. **New Phytologist**, London, v. 182, n. 3, p. 608-620, 2009.

BESSOU, C. et al. Biofuels, greenhouse gases and climate change. Agronomy for Sustainable Development, Heidelberg, v. 31, n. 1, p. 365-468, 2011.

BOSTICK, D. L.; BROOKS III, C. L. On the equivalence point for ammonium (de) protonation during its transport through the AmtB channel. **Biophysical Journal**, New York, v. 92, n. 12, p. L103-L105, 2007.

BOWMAN, W. D. et al. Negative impact of nitrogen deposition on soil buffering capacity. **Nature Geoscience**, London, v. 1, n. 11, p. 767, 2008.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). Biochemistry and molecular biology of plants. New York; John Wiley & Sons, 2015.

BURT, T. P. et al. Importance of long-term monitoring for detecting environmental change: lessons from a lowland river in south east England. **Biogeosciences**, Katlenberg-Lindau, v. 5, n. 6, p. 1529-1535, 2008.

CANTARELLA, H. RAIJ, B. van. Adubação nitrogenada no estado de São Paulo. In: SANTANA, M. B. M. (Coord.). Adubação nitrogenada no Brasil. Ilhéus: CEPLAC; SBCS, 1986. p. 47-49.

CARNAÚBA, B. A. A. O nitrogênio e a cana-de-açúcar. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 8, n. 3-4, p. 24-41, 1990.

CASSMAN, K. G. et al. Meeting cereal demand while protecting natural resources and improving environmental quality. **Annual Review of Environment and Resources**, Palo Alto, v. 28, n. 1, p. 315-358, 2003.

CASSMAN, K. G.; DOBERMANN, A.; WALTERS, D. T. Agroecosystems, nitrogen-use efficiency, and nitrogen management. **Ambio: A Journal of the Human Environment**, Stockholm, v. 31, n. 2, p. 132-140, 2002.

CHAPMAN, L. S.; HAYSOM, M. B. C.; SAFFIGNA, P. G. The recovery of ¹⁵N from labelled urea fertilizer in crop components of sugarcane and in soil profiles. **Australian Journal of Agricultural Research**, Clayton South, v. 45, n. 7, p. 1577-1585, 1994.

CHARDON, F. et al. Natural variation of nitrate uptake and nitrogen use efficiency in *Arabidopsis thaliana* cultivated with limiting and ample nitrogen supply. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 9, p. 2293-2302, 2010.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. Sugarcane (*Saccharum* X *officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 4, n. 1, p. 62-89, 2011.

CIAMPITTI, I. A.; VYN, T. J. Understanding global and historical nutrient use efficiencies for closing maize yield gaps. **Agronomy Journal**, Madison, v. 106, n. 6, p. 2107-2117, 2014.

CLUSTER, P. D. et al. Details of T-DNA structural organization from a transgenic Petunia population exhibiting co-suppression. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 32, n. 6, p. 1197-1203, 1996.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, primeiro levantamento (área plantada e produção). Brasília, DF, 2018.

CONNOR, R. The United Nations world water development report 2015: water for a sustainable world. Paris: UNESCO Publishing, 2015.

COUTURIER, J. et al. The expanded family of ammonium transporters in the perennial poplar plant. **New Phytologist**, London, v. 174, n. 1, p. 137-150, 2007.

CURTIS, M. D.; GROSSNIKLAUS, U. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. **New Phytologist**, London, v. 133, n. 2, p. 462-469, 2003.

D'HONT, A et al. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v. 250, p. 405–413, 1996.

D'HONT, A.; GLASZMANN, J. C. Sugarcane genome analysis with molecular markers, a first decade of research. **Proceedings of the International Society of Sugarcane Technology**, Brisbane, v. 24, p. 556-559, 2001.
DAL-BIANCO, M. et al. Sugarcane improvement: how far can we go?. Current Opinion in **Biotechnology**, London, v. 23, n. 2, p. 265-270, 2012.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D. J. (Ed.). **Developments in crop science**. Amsterdam: Elsevier, 1987. chap. 2, p. 7-84.

D'APUZZO, E. et al. Characterization of three functional high-affinity ammonium transporters in *Lotus japonicus* with differential transcriptional regulation and spatial expression. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 134, n. 4, p. 1763-1774, 2004.

DAVIDSON, E. A. et al. More food, low pollution (Mo Fo Lo Po): a grand challenge for the 21st century. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 44, n. 2, p. 305-311, 2015.

DAVIES, D. D. Metabolic control in higher plants. **Biosynthesis and its Control in Plants**, p. 1-20, 1973.

DE BRUIJN, F. J. Biological nitrogen fixation. In: LUGTENBERG, B. (Ed.). **Principles of plant-microbe interactions**. Cham: Springer, 2015. p. 215-224.

DE OLIVEIRA, M. W. et al. Nutrição mineral e adubação da cana-de-açúcar. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 239, p. 30-43, 2007.

DEMATTÊ, J. L. I. Considerações a respeito da adubação nitrogenada e seu parcelamento em cana-planta. **Stab. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 15, p. 14-15, 1997.

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**, Lancaster, v. 123, n. 3, p. 895-904, 2000.

DIAZ, C. et al. Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in Arabidopsis under low nitrogen nutrition. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 147, n. 3, p. 1437-1449, 2008.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11—15., and AHD BROWN. 1990. Chloroplast DNA polymorphism and phylogeny in the B genome of *Glycine* subgenus *Glycine* (Leguminosae). **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 77, p. 772-782, 1987.

EE, S. F. et al. Effective hygromycin concentration for selection of *Agrobacterium*-mediated transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Malaysian Applied Biology**, Kuala Lumpur, v. 43, n. 1, p. 119-123, 2014.

EPSTEIN, E. **Nutrição mineral de plantas**: princípios e perspectivas. Tradução de E. Malavolta. São Paulo: EDUSP; Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1975. 341 p.

ERISMAN, J. W. et al. How a century of ammonia synthesis changed the world. **Nature Geoscience**, London, v. 1, n. 10, p. 636, 2008.

ERTL, G. The Arduous Way to the Haber–Bosch Process. **Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie**, Leipzig v. 638, n. 3-4, p. 487-489, 2012.

FAN, S.-C. et al. The *Arabidopsis* nitrate transporter *NRT1*. 7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 9, p. 2750-2761, 2009.

FARGIONE, J. et al. Land clearing and the biofuel carbon debt. **Science**, New York, v. 319, n. 5867, p. 1235-1238, 2008.

FINNEGAN, J.; MCELROY, D. Transgene inactivation: plants fight back!. Nature Biotechnology, New York, v. 12, n. 9, p. 883, 1994.

FOLLETT, J. R.; FOLLETT, R. F.; HERZ, W. C. Environmental and human impacts of reactive nitrogen. In: DELGADO, J. A.; FOLLETT, R. F. (Ed.). Advances in Nitrogen Management for Water Quality. Ankeny: Soil Water Conservation Society, 2010. p. 1-37.

FONG, R. N. et al. 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, n. 47, p. 18706-18711, 2007.

FORTES, C. et al. Recovery of Nitrogen (N-15) by Sugarcane from Previous Crop Residues and Urea Fertilisation Under a Minimum Tillage System. **Sugar Tech**, New Delhi, v. 13, n. 1, p. 42–46, 2011.

FOWLER, D. et al. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 368, n. 1621, p. 20130164, 2013.

FRANCO, H. C. J. et al. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 121, n. 1, p. 29-41, 2011.

FRANCO, J. A. M.; NETO, A. S. Produção de fertilizantes nitrogenados e suprimento de matéria-prima. In: YAMADA, T.; STIPP, S. R.; VITI, G. C. **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute, 2007. 714 p.

FUKUMORITA, T. et al. Inorganic content in rice phloem sap. Soil Science and Plant Nutrition, Tokyo, v. 29, n. 2, p. 185-192, 1983.

GALLOWAY, J. N. et al. Nitrogen cycles: past, present, and future. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 70, n. 2, p. 153-226, 2004.

GALLOWAY, J. N. et al. The nitrogen cascade. **AIBS Bulletin**, Oxford, v. 53, n. 4, p. 341-356, 2003.

GALLOWAY, J. N.; COWLING, E. B. Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. **Ambio: A Journal of the Human Environment**, Stockholm, v. 31, n. 2, p. 64-71, 2002.

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

GAUFICHON, L. et al. Biological functions of asparagine synthetase in plants. **Plant** Science, Amsterdam, v. 179, n. 3, p. 141-153, 2010.

GAUR, V. S. et al. 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, n. 3, p. 2233-2241, 2012.

GAVA, G. J. C. et al. Recuperação do nitrogênio (¹⁵N) da uréia e da palhada por soqueira de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 621–630, 2003.

GAZZARRINI, S. et al. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into Arabidopsis roots. **The Plant Cell**, Rockville v. 11, n. 5, p. 937-947, 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, n. 1-2, p. 233-246, 2010.

GIEHL, R. F. H et al. A critical role of *AMT2;1* in root-to-shoot translocation of ammonium in Arabidopsis. **Molecular Plant**, Cambridge, v. 10, n. 11, p. 1449-1460, 2017.

GLASS, A. D. M. et al. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 855-864, 2002.

GOLDMAN, M. CpG Islands. In: BRENNER, S.; MILLER, J. H. (Ed.). Encyclopedia of Genetics. Amsterdam: Elsevier, 2001.

GRAFF, L. et al. 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. et al. Characterization of AMT-mediated high-affinity ammonium uptake in roots of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 54, n. 9, p. 1515-1524, 2013.

GUIMARAES, C. T.; SILLS, G. R.; SOBRAL, B. W. S. Comparative mapping of Andropogoneae: *Saccharum* L. (sugarcane) and its relation to sorghum and maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 94, n. 26, p. 14261-14266, 1997.

GUTIÉRREZ, R. A. Systems biology for enhanced plant nitrogen nutrition. Science, New York, v. 336, n. 6089, p. 1673-1675, 2012.

HALL, S. M.; BAKER, D. A. The chemical composition of *Ricinus* phloem exudate. **Planta**, Berlin, v. 106, n. 2, p. 131-140, 1972.

HALL, T. BioEdit: an important software for molecular biology. **GERF Bull Biosciences**, Lucknow, India, v. 2, n. 1, p. 60-61, 2011.

HARTT, C. E. Effect of nitrogen deficiency upon translocation of ¹⁴C in sugarcane. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 46, n. 3, p. 419-422, 1970.

HAUB, C. World Population Data Sheet. Washington, DC: Population Reference Bureau, 2016.

HAYASHI, H.; CHINO, M. Collection of pure phloem sap from wheat and its chemical composition. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 27, n. 7, p. 1387-1393, 1986.

HAYNES, R. J. R. J. Mineral nitrogen in the plant-soil system. Amsterdam: Elsevier, 2012.

HAYNES, R. J.; GOH, K M. Ammonium and nitrate nutrition of plants. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 53, n. 4, p. 465-510, 1978.

HAYNES, R. Mineral nitrogen in the plant-soil system. Amsterdam: Elsevier, 2012.

HILDEBRANDT, T. M. et al. Amino acid catabolism in plants. **Molecular Plant**, Cambridge, v. 8, n. 11, p. 1563-1579, 2015.

HOCKING, PJs. The composition of phloem exudate and xylem sap from tree tobacco (*Nicotiana glauca* Grah.). **Annals of Botany**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 633-643, 1980.

HOSHIKAWA, K. The growing rice plant. An anatomical monograph. Tokyo: Nobunkyo, 1989. 1989. p. 199-205.

HSU, P.-K.; TSAY, Y.-F. Two phloem nitrate transporters, NRT1. 11 and NRT1. 12, are important for redistributing xylem-borne nitrate to enhance plant growth. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 163, n. 2, p. 844-856, 2013.

INSTITUTO DO AÇÚCAR E DO ÁLCOOL. **Nutrição e adubação de cana-de-açúcar no Brasil**. Piracicaba: IAA/Planalsucar, 1983, v. 2, 369 p.

ISLAM, A.; HASSAIRI, A.; REDDY, V. S. Analysis of molecular and morphological characteristics of plants transformed with antifungal gene. **Bangladesh Journal of Botany**, Dacca, v. 36, n. 1, p. 47-52, 2007.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 6, n. 13, p. 3901-3907, 1987.

JESCHKE, W. D.; PATE, J. S. Modelling of the partitioning, assimilation and storage of nitrate within root and shoot organs of castor bean (*Ricinus communis* L.). Journal of **Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 9, p. 1091-1103, 1991.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, London, 2017. doi: 10.1093/bib/bbx108.

KAWAHARA, H.; CHONAN, N.; MATSUDA, T. Studies on morphogenesis in rice plants: 7. The morphology of vascular bundles in the vegetative nodes of the culm. **Japanese Journal of Crop Science**, Tokyo, v. 43, n. 3, p. 389-401, 1974.

KAWAHARA, H.; CHONAN, N.; MATSUDA, T. Studies on morphogenesis in rice plants: 8. The morphology of vascular bundles in the dwarf part of stem. **Japanese Journal of Crop Science**, Tokyo, v. 44, n. 1, p. 61-67, 1975.

KIBA, T. et al. The Arabidopsis nitrate transporter NRT2. 4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. **The Plant Cell**, Rockville v. 24, n. 1, p. 245-258, 2012.

KINGSTON, G.; ANINK, M. C.; ALLEN, D. Acquisition of nitrogen by ratoon crops of sugarcane as influenced by waterlogging and split applications. **Soil Health and Nutrient Management**, Amherst, n. 92, 2008.

KOBAE, Y. et al. Localized expression of arbuscular mycorrhiza-inducible ammonium transporters in soybean. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 51, n. 9, p. 1411-1415, 2010.

KOEGEL, S. et al. The family of ammonium transporters (AMT) in *Sorghum bicolor*: two AMT members are induced locally, but not systemically in roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, London, v. 198, n. 3, p. 853-865, 2013.

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 em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2016.

KUMAR, S. et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.

KURIHARA, D. et al. ClearSee: a rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging. **Development**, Cambridge, v. 142, n. 23, p. 4168-4179, 2015.

LADHA, J. K.; REDDY, P. M. Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. **Plant and Soil**, The Hague, v. 252, n. 1, p. 151-167, 2003.

LAM, H.-M. et al. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 47, n. 1, p. 569-593, 1996.

LANQUAR, V. et al. Feedback inhibition of ammonium uptake by a phospho-dependent allosteric mechanism in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville v. 21, n. 11, p. 3610-3622, 2009.

LANQUAR, V.; FROMMER, W. B. Adjusting ammonium uptake via phosphorylation. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 5, n. 6, p. 736-738, 2010.

LARSSON, C. M.; INGEMARSSON, B. Molecular aspects of nitrate uptake in higher plants. In: WRAY, J. L.; KINGHORN, J. R. **Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation**. Hoboken: Wiley Online Library, 1989.

LEA, P. J.; FORDE, B. G. The use of mutants and transgenic plants to study amino acid metabolism. **Plant, Cell & Environment**, Hoboken, v. 17, n. 5, p. 541-556, 1994.

LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. **Nature**, London, v. 251, n. 5476, p. 614, 1974.

LEAL JUNIOR, 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.

LEMAÎTRE, T. et al. Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassileskija accession. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 49, n. 7, p. 1056-1065, 2008.

LEZHNEVA, L. et al. The Arabidopsis nitrate transporter NRT 2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 80, n. 2, p. 230-241, 2014.

LI, B.-Z. et al. Molecular basis and regulation of ammonium transporter in rice. **Rice Science**, Hangzhou, China, v. 16, n. 4, p. 314-322, 2009.

LI, C. Q.; ZHU, Z. L.; YU, T. R. Fertilizer questions in sustainable development of agriculture in China. Nanchang, Jiangxi Province, China: Jiangxi Science and Technology Press, 1998.

LI, H. et al. Molecular cloning and identification of an ammonium transporter gene from pear. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 120, n. 2, p. 441-451, 2015.

LI, Y. et al. Analysis of T-DNA insertion site distribution patterns in *Arabidopsis thaliana* reveals special features of genes without insertions. **Genomics**, San Diego, v. 87, n. 5, p. 645-652, 2006.

LIMA, J. E. et al. Ammonium triggers lateral root branching in *Arabidopsis* in an *AMMONIUM TRANSPORTER1; 3*-dependent manner. **The Plant Cell**, Rockville v. 22, n. 11, p. 3621-3633, 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta CT$ method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOQUÉ, D. et al. A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. **Nature**, London, v. 446, n. 7132, p. 195-198, 2007.

LOQUÉ, D. et al. Additive contribution of AMT1; 1 and AMT1; 3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. **The Plant Journal**, Oxford, v. 48, n. 4, p. 522-534, 2006.

LOQUÉ, D.; VON WIRÉN, N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 401, p. 1293-1305, 2004.

LUDEWIG, U. et al. Homo-and hetero-oligomerization of ammonium transporter-1 uniporters. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 46, p. 45603-45610, 2003.

LUDEWIG, U. et al. Rhesus factors and ammonium: a function in efflux?. **Genome Biology**, London, v. 2, n. 3, p. reviews1010.1–reviews1010.5, 2001.

LUDEWIG, U.; NEUHÄUSER, B.; DYNOWSKI, M. Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, n. 12, p. 2301-2308, 2007.

LYND, L. R. Energy biotechnology. **Current opinion in Biotechnology**, London, v. 3, n. 19, p. 199-201, 2008.

LYND, L. R. et al. How biotech can transform biofuels. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 2, p. 169, 2008.

MACEDO, I. C. et al. Situação atual e perspectivas do etanol. Estudos Avançados, São Paulo, v. 21, n. 59, p. 157-165, 2007.

MAE, T.; MAKINO, A.; OHIRA, K. Changes in the amounts of ribulose bisphosphate carboxylase synthesized and degraded during the life span of rice leaf (*Oryza sativa* L.). **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 24, n. 6, p. 1079-1086, 1983.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Princípios e aplicações de fosfato. Piracicaba: Potafos, 1989.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional de plantas. 2 ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 319 p.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: NCBI's conserved domain database. Nucleic Acids Research, London, v. 43, n. D1, p. D222-D226, 2014.

MARINI, A.-M. et al. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 17, n. 8, p. 4282-4293, 1997.

MARINI, A.-M. et al. Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 13, n. 15, p. 3456-3463, 1994.

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

MASCLAUX-DAUBRESSE, C. et al. Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 140, n. 2, p. 444-456, 2006.

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

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; CHARDON, F. Exploring nitrogen remobilization for seed filling using natural variation in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany, Oxford, v. 62, n. 6, p. 2131-2142, 2011.

MAYER, M.; LUDEWIG, U. Role of AMT1; 1 in NH4⁺ acquisition in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 8, n. 4, p. 522-528, 2006.

MCISAAC, G. F. et al. Eutrophication: nitrate flux in the Mississippi River. **Nature**, London, v. 414, n. 6860, p. 166, 2001.

MENGEL, K.; HAEDER, H.-E. Effect of potassium supply on the rate of phloem sap exudation and the composition of phloem sap of *Ricinus communis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 59, n. 2, p. 282-284, 1977.

MOISON, M. et al. Three Cytosolic Glutamine Synthetase Isoforms Located in Different Order Veins Work Together for N Remobilization and Seed Filling in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 69, n. 18, p. 4379-4393, 2018.

MOLL, R. H.; KAMPRATH, E. J.; JACKSON, W. A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization 1. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, n. 3, p. 562-564, 1982.

MOLL, R. H.; KAMPRATH, E. J.; JACKSON, W. A. Development of Nitrogen-Efficient Prolific Hybrids of Maize 1. **Crop Science**, Madison, v. 27, n. 2, p. 181-186, 1987.

MUCHOW, R. C. et al. Effect of nitrogen on the time-course of sucrose accumulation in sugarcane. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 47, n. 2, p. 143-153, 1996.

MUELLER, N. D. et al. Declining spatial efficiency of global cropland nitrogen allocation. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, DC, v. 31, n. 2, p. 245-257, 2017.

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

NARUSAKA, M. et al. The floral inoculating protocol: a simplified *Arabidopsis thaliana* transformation method modified from floral dipping. **Plant Biotechnology**, Tokyo, v. 27, n. 4, p. 349-351, 2010.

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

NELSON, C. J. et al. Shoot morphological plasticity of grasses: leaf growth vs. tillering. In: LEMAIRE, G. et al. **Grassland ecophysiology and grazing ecology**. Wallingford: CABI, 2000. p. 101-126.

NEUHÄUSER, B. et al. Regulation of NH4⁺ transport by essential cross talk between AMT monomers through the carboxyl tails. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 143, n. 4, p. 1651-1659, 2007.

NEUHÄUSER, B.; DYNOWSKI, M.; LUDEWIG, U. Switching substrate specificity of AMT/MEP/Rh proteins. **Channels**, Austin, v. 8, n. 6, p. 496-502, 2014.

OHSHIMA, T.; HAYASHI, H.; CHINO, M. Collection and chemical composition of pure phloem sap from Zea mays L. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 31, n. 5, p. 735-737, 1990.

ONODA, Y. et al. Physiological and structural tradeoffs underlying the leaf economics spectrum. **New Phytologist**, London, v. 214, n. 4, p. 1447-1463, 2017.

ORSEL, M. et al. Sixteen cytosolic glutamine synthetase genes identified in the *Brassica napus* L. genome are differentially regulated depending on nitrogen regimes and leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 14, p. 3927-3947, 2014.

OTTO, R. et al. Nitrogen use efficiency for sugarcane-biofuel production: what is next?. **BioEnergy Research**, New York, v. 9, n. 4, p. 1272-1289, 2016.

PATE, J. S. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, v. 31, n. 1, p. 313-340, 1980.

PATE, J. S.; SHARKEY, P. J.; LEWIS, O. A. M. Xylem to phloem transfer of solutes in fruiting shoots of legumes, studied by a phloem bleeding technique. **Planta**, Berlin, v. 122, n. 1, p. 11-26, 1975.

PAUNGFOO-LONHIENNE, C. et al. Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 105, n. 11, p. 4524-4529, 2008.

PÉREZ-TIENDA, J. et al. GintAMT2, a new member of the ammonium transporter family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Fungal Genetics and Biology**, Amsterdam, v. 48, n. 11, p. 1044-1055, 2011.

PEUKE, A. D.; KAISER, W. M. Nitrate or ammonium uptake and transport, and rapid regulation of nitrate reduction in higher plants. In: BEHNKE, H. D. et al. (Ed.). **Progress in Botany**. Berlin: Springer, 1996. p. 93-113.

PFAU, T. et al. The intertwined metabolism during symbiotic nitrogen fixation elucidated by metabolic modelling. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 12504, 2018.

POSTGATE, J. Nitrogen fixation. 3. ed. Sussex: Cambridge University Press, 1998. 124 p.

RANDO, O. J.; VERSTREPEN, K. J. Timescales of genetic and epigenetic inheritance. Cell, Cambridge, v. 128, n. 4, p. 655-668, 2007.

RAVEN, J. A.; SMITH, F. A. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. **New Phytologist**, London, v. 76, n. 3, p. 415-431, 1976.

REMANS, T. et al. The Arabidopsis NRT1. 1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 103, n. 50, p. 19206-19211, 2006.

RESENDE, A. S. de et al. Effect of pre-harvest burning and applications of nitrogen fertilizer and vinasse on sugarcane industrial characteristics. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 6, p. 937-941, 2006.

RIAÑO-PACHÓN, D. M.; MATTIELLO, L. Draft genome sequencing of the sugarcane hybrid SP80-3280. **F1000Research**, London, v. 6, p. 681, 2017.

ROBINSON, D.; RORISON, I. H. Relationships between root morphology and nitrogen availability in a recent theoretical model describing nitrogen uptake from soil. **Plant, Cell & Environment**, Hoboken, v. 6, n. 8, p. 641-647, 1983.

ROBINSON, N. et al. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **PloS One**, San Francisco, v. 6, n. 4, p. e19045, 2011.

ROCKSTRÖM, J. et al. Planetary boundaries: exploring the safe operating space for humanity. **Ecology and Society**, Stockholm, v. 14, n.2, art. 32, 2009.

ROON, R. J. et al. Methylamine and ammonia transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology, Washington, DC, v. 122, n. 2, p. 502-509, 1975.

RUTHERFORD, K. et al. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, Oxford, v. 16, n. 10, p. 944-945, 2000.

SAGE, R. F.; PEARCY, R. W.; SEEMANN, J. R. The nitrogen use efficiency of C3 and C4 plants: III. Leaf nitrogen effects on the activity of carboxylating enzymes in *Chenopodium album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.). **Plant Physiology**, Lancaster, v. 85, n. 2, p. 355-359, 1987.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 111, n. 5, p. 743-767, 2013.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SCHARLEMANN, J. P. W. et al. How green are biofuels?. Science, New York, v. 319, n. 5859, p. 43, 2008.

SCHOBERT, C.; KOMOR, E. The differential transport of amino acids into the phloem of *Ricinus communis* L. seedlings as shown by the analysis of sieve-tube sap. **Planta**, Berlin, v. 177, n. 3, p. 342-349, 1989.

SCHOBERT, C.; KOMOR, E. Transport of nitrate and ammonium into the phloem and the xylem of *Ricinus communis* seedlings. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 140, n. 3, p. 306-309, 1992.

SEREZINO, L. H. D. **Caracterização fisiológica e transcricional dos processos de aquisição e remobilização de nitrato em cana-de-açúcar** (*Saccharum spp.*). 2015. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2015.

SHELP, B. J. The Composition of Phloem Exudate and Xylem Sap from Broccoli (*Brassica oleracea* var. italica) Supplied with NH4⁺, NO3⁻ or NH4NO3. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 38, n. 10, p. 1619-1636, 1987.

SHIBATA, H. et al. Nitrogen footprints: Regional realities and options to reduce nitrogen loss to the environment. **Ambio: A Journal of the Human Environment**, Stockholm, v. 46, n.2, p. 129-142, 2017.

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, n. 1, p. 99-108, 2003.

SMIL, V. Global population and the nitrogen cycle. Scientific American, Basingstoke, v. 277, n. 1, p. 76-81, 1997.

SMIL, V. Nitrogen in crop production: An account of global flows. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, DC, v. 13, n. 2, p. 647-662, 1999.

SOHLENKAMP, C. et al. Characterization of Arabidopsis AtAMT2, a high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 130, n. 4, p. 1788-1796, 2002.

SOHLENKAMP, C. et al. Characterization of Arabidopsis AtAMT2, a novel ammonium transporter in plants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 467, n. 2-3, p. 273-278, 2000.

SONODA, Y. et al. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1; 1–1; 3*) in rice. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 44, n. 7, p. 726-734, 2003a.

SONODA, Y. et al. Feedback regulation of the ammonium transporter gene family *AMT1* by glutamine in rice. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 44, n. 12, p. 1396-1402, 2003b.

SOUZA, G. M. et al. The sugarcane genome challenge: strategies for sequencing a highly complex genome. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 4, n. 3-4, p. 145-156, 2011.

STITT, M. et al. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 959-970, 2002.

SUENAGA, A. et al. Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter *OsAMT2* in rice plants. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 44, n. 2, p. 206-211, 2003.

TA, T. C.; JOY, K. W.; IRELAND, R. J. Amino acid metabolism in pea leaves: utilization of nitrogen from amide and amino groups of [¹⁵N] asparagine. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 74, n. 4, p. 822-826, 1984.

TEGEDER, M.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. **New Phytologist**, London, v. 217, n. 1, p. 35-53, 2018.

TERCÉ-LAFORGUE, T. et al. Glutamate dehydrogenase of tobacco is mainly induced in the cytosol of phloem companion cells when ammonia is provided either externally or released during photorespiration. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 136, n. 4, p. 4308-4317, 2004.

TILMAN, D. et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, London, v. 418, n. 6898, p. 671, 2002.

TILMAN, D. et al. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 108, n. 50, p. 20260-20264, 2011.

TRIVELIN, P. C. O. et al. Utilização de nitrogênio e produtividade da cana-de-açúcar (canaplanta) em solo arenoso com incorporação de resíduos da cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, p. 637–646, 2002.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR – ÚNICA. **Detalhamento das exportações mensais de etanol pelo Brasil**. São Paulo, 2019. Disponível em: <u>http://www.unicadata.com.br/listagem.php</u>. Acesso em: 28 fev. 2019

URAGUCHI, S. et al. Low-affinity cation transporter (OsLCT1) regulates cadmium transport into rice grains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 108, n. 52, p. 20959-20964, 2011.

VAN BEL, A. J. E. Quantification of the xylem-to-phloem transfer of amino acids by use of inulin [¹⁴C] carboxylic acid as xylem transport marker. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 81-85, 1984.

VAN DER MERWE, M. J. et al. Downregulation of pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase activity in sugarcane culms enhances sucrose accumulation due to elevated hexose-phosphate levels. **Planta**, Berlin, v. 231, n. 3, p. 595-608, 2010.

VAN HEERDEN, P. D. R. et al. Biomass accumulation in sugarcane: unravelling the factors underpinning reduced growth phenomena. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 11, p. 2877-2887, 2010.

VAN HELDEN, M.; TJALLINGH, W. F.; VAN BEEK, T. A. Phloem sap collection from lettuce (*Lactuca sativa* L.): chemical comparison among collection methods. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, n. 12, p. 3191-3206, 1994.

VINCES, M. D. et al. Unstable tandem repeats in promoters confer transcriptional evolvability. **Science**, New York, v. 324, n. 5931, p. 1213-1216, 2009.

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

VITTI, A. C.; TRIVELIN, P. C. O. Adubação nitrogenada melhora vigor das soqueiras de cana-de-açúcar refletindo em produtividade nos ciclos agrícolas subsequentes. **Pesquisa & Tecnologia**, Brasília, DF, v. 8, n. 95, p. 1–8, 2011.

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

VON WIRÉN, N. et al. Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 167-175, 2000.

VON WIRÉN, N.; GAZZARRINI, S.; FROMMER, W. B. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 196, n. 2, p. 191-199, 1997.

VON WIRÉN, N.; MERRICK, M. Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi, and plants. In: BOLES, E.; KRÄMER, R. (Ed.). **Molecular mechanisms controlling transmembrane transport**. Berlin: Springer, 2004. p. 95-120.

VON WITTGENSTEIN, N. J. J. B. et al. Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 14, n. 1, p. 11, 2014.

VOORHEES, E. B. Fertilizers. New York: MacMillan, 1910.

VOUILLOT, M. O.; DEVIENNE-BARRET, F. Accumulation and remobilization of nitrogen in a vegetative winter wheat crop during or following nitrogen deficiency. **Annals of Botany**, Oxford, v. 83, n. 5, p. 569-575, 1999.

WALCH-LIU, P.; NEUMANN, G.; BANGERTH, F. C. E. Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 343, p. 227-237, 2000.

WANG, J. et al. Carbon partitioning in sugarcane (*Saccharum* species). Frontiers in Plant Science, Lausanne, v. 4, p. 201, 2013.

WATERHOUSE, A. M. et al. Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 9, p. 1189-1191, 2009.

WILSON, C.; BELLEN, H. J.; GEHRING, W. J. Position effects on eukaryotic gene expression. **Annual Review of Cell Biology**, Palo Alto, v. 6, n. 1, p. 679-714, 1990.

WORLD BANK. **World development report 2008:** Agriculture for development. Washington, DC: World Bank, 2007.

XIANG, Y. A. N. et al. Recent advances on the technologies to increase fertilizer use efficiency. Agricultural Sciences in China, Beijing, v. 7, n. 4, p. 469-479, 2008.

XU, Q. F.; TSAI, C. L.; TSAI, C. Y. Interaction of potassium with the form and amount of nitrogen nutrition on growth and nitrogen uptake of maize. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 15, n. 1, p. 23-33, 1992.

YAMAJI, N. et al. Preferential delivery of zinc to developing tissues in rice is mediated by Ptype heavy metal ATPase OsHMA2. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 162, n. 2, p. 927-939, 2013.

YAMAJI, N.; MA, J. F. The node, a hub for mineral nutrient distribution in graminaceous plants. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 19, n. 9, p. 556-563, 2014.

YUAN, L. et al. Allosteric regulation of transport activity by heterotrimerization of Arabidopsis ammonium transporter complexes *in vivo*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 25, n. 3, p. 974-984, 2013.

YUAN, L. et al. AtAMT1; 4, a pollen-specific high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 50, n. 1, p. 13-25, 2008.

YUAN, L. et al. Nitrogen-dependent posttranscriptional regulation of the ammonium transporter AtAMT1; 1. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 143, n. 2, p. 732-744, 2007b.

YUAN, L. et al. 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, n. 8, p. 2636-2652, 2007a.

ZAMBELLO JUNIOR, E.; ORLANDO FILHO, J. A. Adubação da cana-de-açúcar na região Centro-Sul do Brasil. **Boletim Técnico Planalsucar**, Piracicaba, v. 3, n. 3, p. 526, 1981.

ZHANG, H.; FORDE, B. G. An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. **Science**, New York, v. 279, n. 5349, p. 407-409, 1998.

ZHANG, J. et al. Allele-defined genome of the autopolyploid sugarcane *Saccharum spontaneum* L. **Nature Genetics**, London, v. 50, n. 11, p. 1565, 2018.

ZHANG, J. et al. Sugarcane genetics and genomics. In: MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. (Ed.). **Sugarcane**: physiology, biochemistry, and functional biology. Hoboken: Wiley-Blackwell Publishing, 2014. p. 623-643.

ZHANG, X. et al. Managing nitrogen for sustainable development. **Nature**, London, v. 528, n. 7580, p. 51, 2015.

ZHENG, L. et al. YSL16 is a phloem-localized transporter of the copper-nicotianamine complex that is responsible for copper distribution in rice. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, n. 9, p. 3767-3782, 2012.