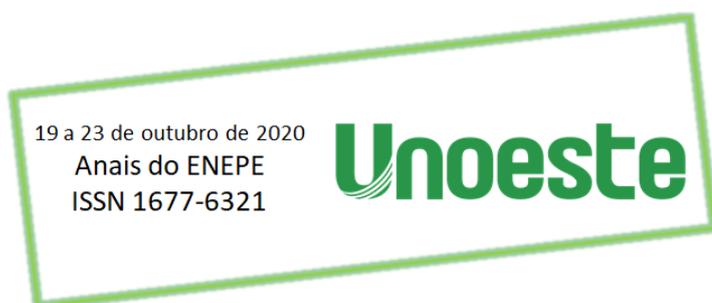




ARTIGOS COMPLETOS .....	1822
RESUMOS DE PESQUISA .....	1835



**ARTIGOS COMPLETOS**

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DO GENE TRANSPORTADOR DE AMÔNIO EM *NICOTIANA TABACUM* L.  
.....1823

## CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DO GENE TRANSPORTADOR DE AMÔNIO EM *NICOTIANA TABACUM* L.

Silviany Angelica Fernandes Silva, Alessandra Ribas, Tiago Benedito dos Santos

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE. E-mail: [silviany.fs@gmail.com](mailto:silviany.fs@gmail.com)

### RESUMO

Nas plantas, o transporte de nutrientes, água e metabólitos é muitas vezes mediado por uma série de famílias gênicas de proteínas transportadoras inseridas em membranas da célula, dentre eles destaca-se o transportador de amônio (AMT). As informações sobre os genes *AMT* em *Nicotiana tabacum* L. até o presente momento são limitadas. Objetivo desse estudo foi identificar e analisar o gene *AMT* utilizando as ferramentas de bioinformática com base nas informações do genoma de *N. tabacum* L. Mediante a análise das sequências genômicas foram identificados um total de 18 genes *AMT*. Adicionalmente, realizou-se uma análise detalhada incluindo as características físico-químicas das proteínas, estrutura gênica, predição das estruturas terciárias (3D) e transmembranares e relações filogenéticas.

**Palavras chave:** bioinformática; expressão gênica; tabaco; transportador AMT.

### *IN SILICO* CHARACTERIZATION OF THE AMMONIUM TRANSPORTER GENE IN *NICOTIANA TABACUM* L.

### ABSTRACT

In plants, the transport of nutrients, water and metabolites is often mediated by a series of gene families of transporters proteins inserted in cell membranes, among them the ammonium transporter (AMT) stands out. Information on the *AMT* genes in *Nicotiana tabacum* L. to date is limited. The objective of this study was to identify and analyze the *AMT* gene using the bioinformatics tools based on information from the genome of *N. tabacum* L. Through the analysis of the genomic sequences, a total of 18 *AMT* genes were identified. In addition, a detailed analysis was carried out including the physicochemical characteristics of proteins, gene structure, prediction of tertiary (3D) and transmembrane structures and phylogenetic relationships.

**Keywords:** bioinformatic; gene expression; tobacco; transporter AMT.

### INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é um dos macronutrientes essenciais para o desenvolvimento, crescimento e reprodução das plantas (KONISHI; YANAGISAWA, 2014), além de ser um importante constituinte primário de nucleotídeos e proteínas, os quais são compostos essenciais para a vida (CASTRO-RODRIGUES et al., 2017). Na natureza as plantas são capazes de absorver diversas formas orgânicas e inorgânicas de N do solo, entretanto, o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), a ureia e o amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) são as principais fontes de N disponíveis. Quando o  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  são oferecidos às plantas em quantidades equivalentes, o amônio é geralmente absorvido mais rapidamente do que o nitrato (HAO et al., 2020). A primeira etapa da assimilação do N envolve a redução do nitrato em amônio, seguida pela assimilação do amônio em aminoácidos (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010). Transportadores específicos na membrana plasmática funcionam de modo que capturam esses íons pelas células da raiz, dentre eles está o transportador de amônio (AMT).

Genes da família AMT já foram identificados em vários organismos procariotos e eucariotos (revisado por McDONALD; WARD, 2016). Sabe-se que nas plantas, as famílias AMT podem ser subdivididas em duas subfamílias (LOQUÉ; VON WIREN, 2004): AMT1 – alta afinidade (SALVEMINI et al., 2001) e AMT2 – baixa afinidade (SUENAGA et al., 2003). De acordo com von Wittgenstein et al. (2014) a família AMT1 é formada de 1 a 7 membros e a família AMT2 é composta por 1 a 10 membros. Os genes de ambas as famílias *AMTs* já foram caracterizados em várias espécies de plantas, tais como: *Citrus* (CAMAÑES et al.,

2007), *Puccinellia tenuiflora* (BU et al., 2013), *Medicago truncatula* (STRAUB et al., 2014), *Vigna subterrânea* (ADETUNJI et al., 2015), *Sorghum bicolor* (KOEGL et al., 2013), *Zea mays* L. (GU et al., 2013), *Oriza sativa* L. (FERREIRA et al., 2015), *Triticum aestivum* L. (LI et al., 2017), *Coffea canephora* (DOS SANTOS et al., 2017) e *C. arabica* L. (DOS SANTOS et al., 2019), *Camelia sinensis* (ZHANG et al., 2018), *Solanum lycopersicum* L. (FILIZ; AKBUDAK, 2020). Diante do exposto, este estudo teve como objetivo identificar e caracterizar os genes envolvidos no transporte amônio através das ferramentas de bioinformática, utilizando dados disponíveis no genoma de *Nicotiana tabacum* L.

## MATERIAL E MÉTODOS

Como ponto de partida foi feita uma pesquisa visando identificar *in silico* os genes codificadores correspondentes aos transportadores envolvidos em influxo de amônio (AMT – *ammonium transporter*), em *N. tabacum* L., e foram utilizadas as ferramentas ([https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_organism?org=nta](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=nta;); <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/?org=nicotiana-tabacum&group=solanales>). As sequências genômicas, de codificação (CDS - *Coding DNA Sequence*) e de proteínas dos membros AMT foram obtidas e armazenadas em arquivo FASTA para análises de bioinformática adicionais. Em seguida, cada sequência foi individualmente confrontada com outras sequências depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*/ALTSHUL et al., 1997), utilizando os algoritmos *BlastP* e *BlastX*, para a confirmação de sua identidade. Adicionalmente, foi realizado uma abrangente análise físico-química com as sequências de todas as proteínas AMT identificadas. Para as informações sobre número de aminoácidos, peso molecular (kDa) e ponto teórico isoeletrico (pI), foram preditas através da ferramenta *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>; GASTEIGER et al., 2005). O programa *GRAVY calculator* verificou o índice de propriedade hidrofílica/hidrofóbica (*hydropathy index - Grand average of hydropathy*) das proteínas. A ferramenta de previsão *Plant-mPLoc* (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) foi utilizada para analisar a localização subcelular das proteínas AMT. Todos os genes AMT tiveram sua estrutura gênica (éxon/intron) analisada utilizando o programa *Gene Structure Display Server 2.0* (GSDS; <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>; HU et al., 2015). A análise de predição das estruturas terciárias (3D) e transmembranares das proteínas AMT foram realizadas pelo servidor *Phyre2* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index/>; KELLEY; STERNBERG, 2009). Alinhamentos múltiplos foram realizados utilizando-se o algoritmo *ClustalW*. A partir desses alinhamentos, posteriormente, foi utilizado o programa MEGA v. 7 (KUMAR et al., 2016) para a geração de árvores filogenéticas. O método utilizado para a filogenia foi o de *Neighbour-Joining*, modelo de substituição *p-distance*, *pairwise deletion*. Todos os ramos das árvores filogenéticas foram devidamente testados via *bootstrap* com 1000 réplicas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os transportadores AMTs são um grupo onipresente de proteínas integrais de transporte de membrana que transportam e distribuem amônio aos cloroplastos, mitocôndrias e vacúolos para regular o metabolismo do N da planta (LUDEWIG et al., 2007) e manter a homeostase do amônio pela atividade do sistema de transporte de amônio de alta afinidade (*HATS*) e sistema de transporte de amônio de baixa afinidade (*LATS*) (GLASS et al., 2002). As proteínas AMT em plantas são codificadas pela família multigênica AMT (HAO et al., 2020). A primeira família de genes dos transportadores de amônio identificada, *AMT1*, era composta por transportadores  $\text{NH}_4^+$  de alta afinidade em *Arabidopsis* (NINNEMANN; JAUNIAUX, 1994).

Identificou-se neste estudo 18 genes *NtAMT* candidatos de tabaco. A nomenclatura para os genes *NtAMT* (*NtAMT1-1* a *NtAMT2-12*) foi baseada nos ortólogos *AtAMT* correspondentes (Tabela 1). Liu et al. (2018) relataram a identificação de nove genes AMTs através do banco de dados de *N. tabacum* L. cv. K326 (SOL Genomics Network: <http://solgenomics.net/>). Contudo, é importante reportar que o gênero *Nicotiana*, ao qual o tabaco pertence, consiste em cerca de 78 espécies nativas da América do Norte e do Sul, sudoeste da África, Austrália e Pacífico sul. Entre eles, espécies diplóides e tetraplóides são encontradas com tamanhos de genoma grandes variando de cerca de 2 a 5 Gb (revisado por Ivanov et al., 2020). *Nicotiana tabacum* L. é uma espécie alotetraplóide recente ( $2n = 4x = 48$ ) resultante da hibridização

das espécies ancestrais diplóides ( $2n = 12$ ) *N. sylvestris* e *N. tomentosiformis* há cerca de 200.000 anos (Ivanov et al., 2020). Diante do exposto, acreditamos que a classificação realizada anteriormente por Liu et al. (2018) foi erroneamente descrita e não foi baseado na espécie *N. tabacum* L., pois ao reanalisar as sequências proteicas obtidas pelos mesmos (confrontada com outras sequências depositadas no banco de dados do *NCBI* utilizando o algoritmo *BlastP*), foi observado que os genes pertencem na verdade a espécie *N. sylvestris*. Adicionalmente, Liu et al. (2018) identificaram menos genes do que o relatado no presente estudo.

Cabe mencionar que o número dos genes identificados e relatados na literatura para as diferentes espécies de planta é variável. Este transportador foi identificado por diferentes grupos de pesquisa: em *A. thaliana*, seis genes da família dos transportadores de amônio *AMT* (*AMT1.1-1.5* e *AMT2.1*) (GAZZARRINI et al., 1999; YUAN et al., 2007), 10 *AMTs* em arroz (SONODA et al., 2003), 16 em soja (KOBAE et al., 2010), oito em café (DOS SANTOS et al., 2017), três em tomate (FILIZ; AKBUDAK, 2020).

As características físico-químicas de todas as 18 proteínas *NtAMT* de tabaco foram analisadas (Tabela 1). O peso molecular e o tamanho dos aminoácidos dos 18 genes *NtAMT* variou de 40.78 (*NtAMT2-2*) a 65.42 kDa (*NtAMT1-1*); e de 376 aa (*NtAMT2-2*) a 603 aa (*NtAMT1-1*). *AMTs* são geralmente proteínas de 45-50 kDa (cerca de 400-450 aminoácidos), no entanto, o tamanho da proteína pode ser aumentado em até 600 aminoácidos devido a um C terminal estendido (NINNEMANN et al., 1994; BLAKEY et al., 2002). Essas informações corroboram com o identificado e descrito no presente estudo. Outras características físicas e químicas adicionais, como *pI* e índice de propriedade hidrofílica/hidrofóbica, estão listadas na Tabela 1.

Geralmente, os *AMTs* estão localizados nas membranas celulares, consistentemente com os resultados preditos e apresentados na Tabela 1. Em contrapartida, todas as proteínas *AMT1* de tomate foram preditas no cloroplasto (FILIZ; AKBUDAK, 2020). Dos Santos et al. (2017) por sua vez descreveram que quase todos os transportadores *AMT1* foram previstos no retículo endoplasmático (*Cc01\_g14140*, *Cc01\_g17670*, *Cc09\_g03020*), e apenas um *AMT1* (*Cc03\_g06810*) foi indicado com localização subcelular no aparelho

de

Golgi.

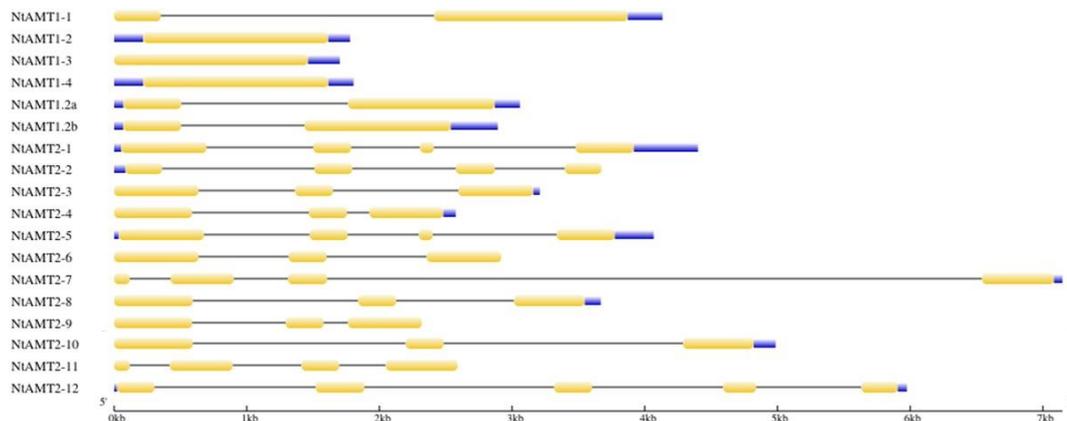
**Tabela 1.** Informações detalhadas dos 18 genes *NtAMT* identificados no genoma de *N. tabacum* L.

Gene	ID <i>Kegg Nicotiana tabacum</i> <sup>a</sup>	ID <i>NCBI Nicotiana tabacum</i> <sup>b</sup>	éxon <sup>c</sup>	(aa) <sup>d</sup>	kDa <sup>e</sup>	pI <sup>f</sup>	<i>GRAVY</i> <sup>g</sup>	Gene Ortólogo <sup>h</sup>	Localização Subcelular
<i>NtAMT1-1</i>	107776942	XP_016452382	2	603	65.42	6.56	0.355	AT4G13510.1 - <i>AtAMT1.1</i>	Membrana celular
<i>NtAMT1-2</i>	107794756	XP_016472765	1	464	50.01	5.33	0.498	AT4G13510.1 - <i>AtAMT1.1</i>	Membrana celular
<i>NtAMT1-3</i>	107824732	XP_016507020	1	490	52.67	6.66	0.395	AT4G13510.1 - <i>AtAMT1.1</i>	Membrana celular
<i>NtAMT1-4</i>	107793077	NP_001312486	1	464	50.07	5.23	0.479	AT4G13510.1 - <i>AtAMT1.1</i>	Membrana celular
<i>NtAMT1.2a</i>	107802452	XP_016481446	2	513	55.12	7.16	0.387	AT1G64780.1 - <i>AtAMT1.2</i>	Membrana celular
<i>NtAMT1.2b</i>	107783531	XP_016459996	2	512	55.08	7.14	0.405	AT1G64780.1 - <i>AtAMT1.2</i>	Membrana celular
<i>NtAMT2-1</i>	107805306	XP_016484801	4	489	52.66	8.52	0.535	AT2G38290.1 - <i>AtAMT2</i>	Membrana celular
<i>NtAMT2-2</i>	107805776	XP_016485344	4	376	40.78	6.69	0.565	AT2G38290.1 - <i>AtAMT2</i>	Membrana celular
<i>NtAMT2-3</i>	107814184	XP_016495029	3	495	54.09	6.17	0.513	AT2G38290.1 - <i>AtAMT2</i>	Membrana celular
<i>NtAMT2-4</i>	107817048	XP_016498307	3	476	52.08	5.77	0.517	AT2G38290.1 - <i>AtAMT2</i>	Membrana celular
<i>NtAMT2-5</i>	107820270	XP_016502016	4	489	52.71	8.52	0.525	AT2G38290.1 - <i>AtAMT2</i>	Membrana celular
<i>NtAMT2-6</i>	107825695	XP_016508073	3	494	54.00	6.17	0.500	AT2G38290.1 - <i>AtAMT2</i>	Membrana celular
<i>NtAMT2-7</i>	107760982	XP_016434618	4	476	52.44	6.70	0.390	AT2G38290.1 - <i>AtAMT2</i>	Membrana celular
<i>NtAMT2-8</i>	107765389	XP_016439513	3	470	51.77	7.21	0.389	AT2G38290.1 - <i>AtAMT2</i>	Membrana celular
<i>NtAMT2-9</i>	107782009	XP_016458328	3	476	51.92	5.91	0.538	AT2G38290.1 - <i>AtAMT2</i>	Membrana celular
<i>NtAMT2-10</i>	107783925	XP_016460437	3	470	51.98	7.21	0.353	AT2G38290.1 - <i>AtAMT2</i>	Membrana celular
<i>NtAMT2-11</i>	107793124	XP_016470892	4	473	51.93	7.07	0.526	AT2G38290.1 - <i>AtAMT2</i>	Membrana celular
<i>NtAMT2-12</i>	107794537	XP_016472521	5	486	52.73	6.78	0.493	AT2G38290.1 - <i>AtAMT2</i>	Membrana celular

<sup>a</sup>Número de acesso ao banco de dados *Kegg*; <sup>b</sup>Número de acesso ao banco de dados *National Center for Biotechnology Information*; <sup>c</sup>Número de éxons de cada gene; <sup>d</sup>Tamanho da proteína; <sup>e</sup>Peso molecular; <sup>f</sup>Ponto isoelétrico; <sup>g</sup>Índice de propriedade hidrofílica/hidrofóbica; <sup>h</sup>Similaridade com *A. thaliana*.

Conforme observado na Figura 1, a análise da estrutura gênica revelou uma variação com relação a presença de éxon/intron em todas as sequências de codificação dos genes *NtAMT*. A exemplo disso, a presença de éxon variou de um (*NtAMT1-2*) a cinco éxons (*NtAMT2-12*), respectivamente (Figura 1).

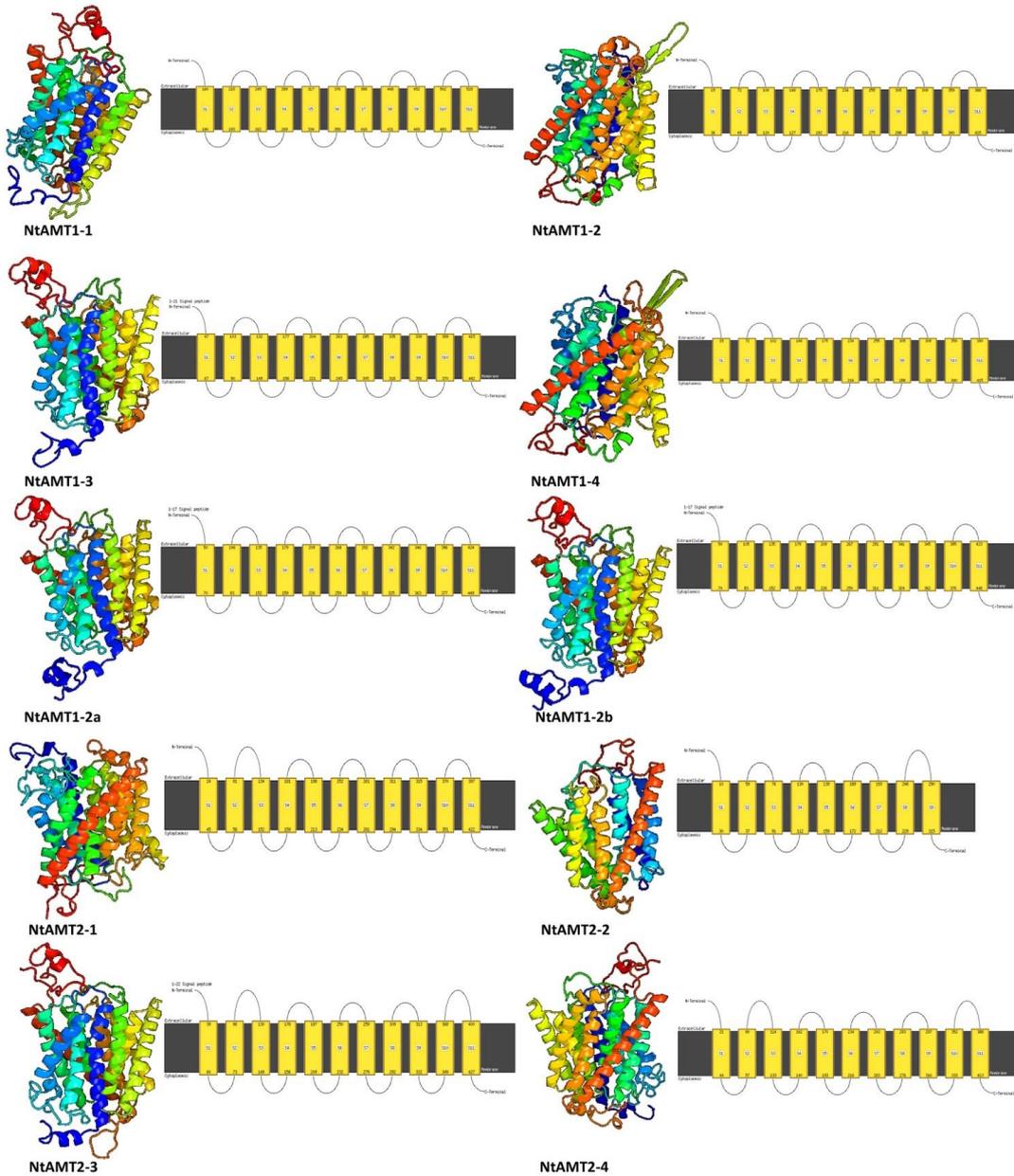
**Figura 1.** Estrutura dos genes *NtAMT* de *N. tabacum* L. As caixas amarelas indicam os éxons; linhas pretas indicam os íntrons; caixas azuis regiões *upstream/downstream*. A barra de escala representa 1.0 kb.

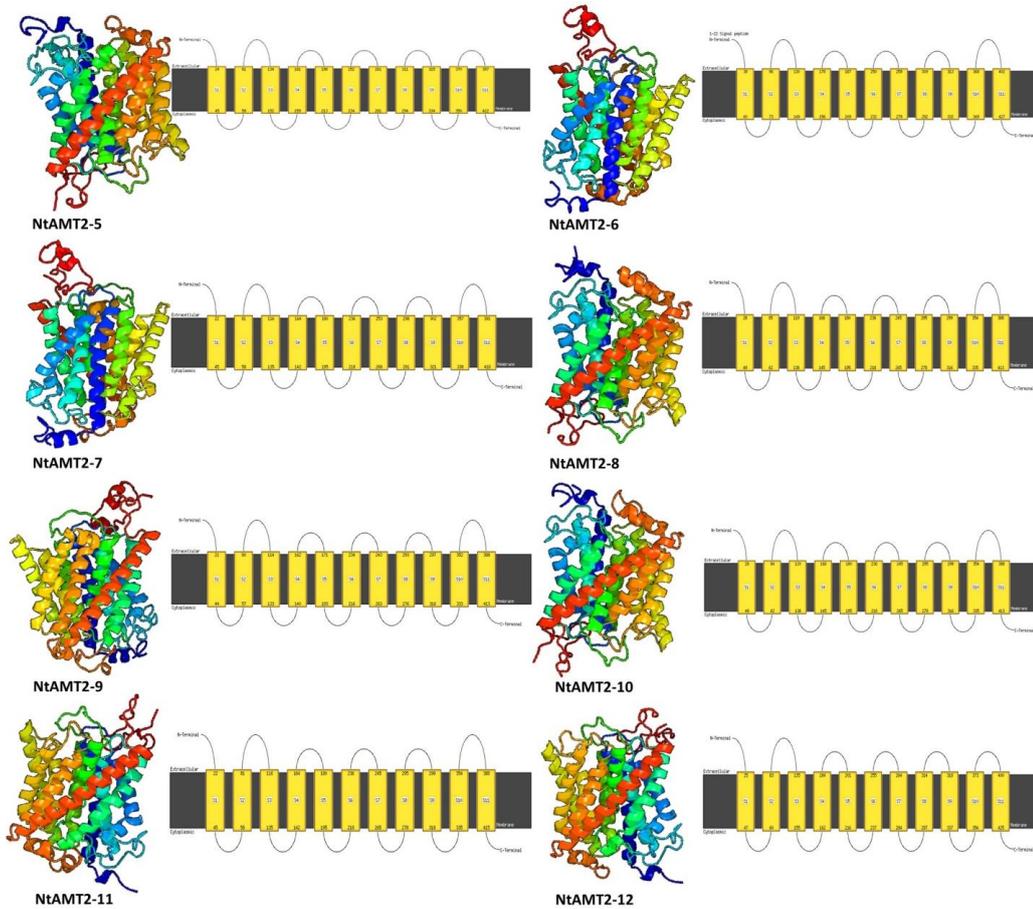


Estruturalmente, um transportador AMT consiste em 11-12 regiões transmembranares, com sequências que apresentam as seguintes características: "D (F YW S) AG (GSC) X2 (LIV) (EH) X2 (GAS) (GA) X2 (GAS) (LF)" localizadas em sua região transmembrana 5 e "DDX (LIVMFC) (EDGA) (LIV AC) X3 H (GALIV) X2 (GS) X (LIVAW) G" na região transmembrana 10 (VON WIRÉN; MERRICK, 2004; revisado por HAO et al., 2020). Notavelmente, o número de hélices transmembrana (TMHs) mostrou variações entre 9 a 11, indicando a complexidade da homeostase de amônio em tabaco (Figura 2), corroborando com outros estudos (DOS SANTOS et al., 2017; LIU et al., 2018; HAO et al., 2020).

Com a finalidade de compreender as propriedades estruturais dos genes identificados no presente estudo, as predições da estrutura 3D para os genes *NtAMT* foram geradas usando o servidor *Phyre2* (Figura 2). Os modelos de proteínas 3D foram construídos com 100% de confiança e a cobertura de resíduos entre os genes *NtAMT* variou de 73% a 93%.

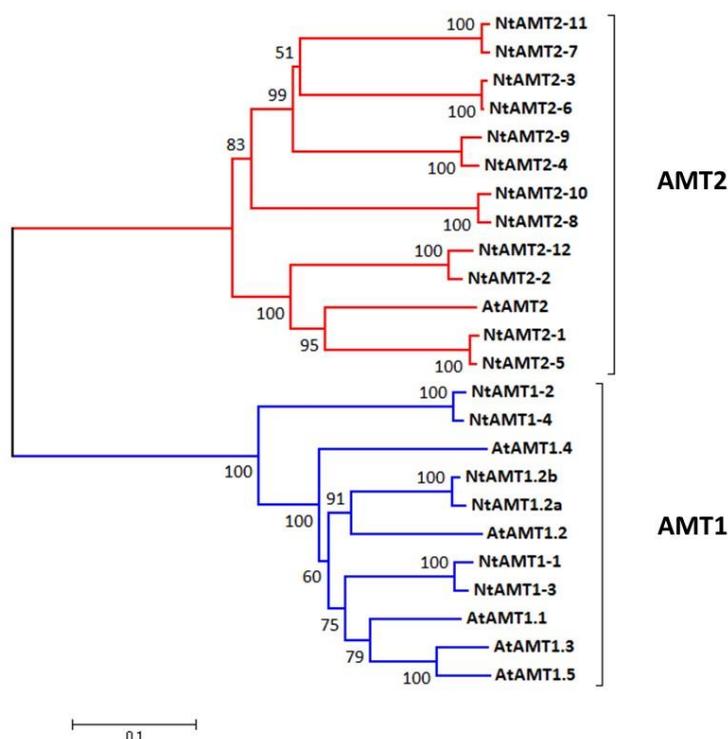
**Figura 2.** Predição das estruturas 3D e transmembranares das proteínas NtAMT de *N. tabacum* L. geradas pelo servidor *Phyre2*.





O melhor *template* (c5aexB) utilizado para a predição das estruturas 3D pertence à família transportador de amônio mep2. Em diversos organismos, o transporte de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) através de membranas é mediado por proteínas da família AMT/MEP/Rh (*ammonium transporter/methylammonium permease/rhesus*). Os membros desta família em plantas pertencem a subfamília AMT, que permeiam amônio via uniporte de  $\text{NH}_4^+$  ou co-transporte de  $\text{NH}_3/\text{H}^+$ , ou pertencem a subfamília MEP, que inclui AmtB da bactéria *Escherichia coli* (LUDEWIG et al., 2007).

**Figura 3.** Análise filogenética das proteínas AMT de *N. tabacum* L. e *Arabidopsis*. A árvore foi gerada no software MEGA 7.0 pelo método *Neighbor-Joining* com *bootstrap* de 1000 repetições.



De acordo com o resultado apresentado na Figura 3, a análise filogenética indica uma ramificação principal agrupando os transportadores da família AMT2, enquanto que o segundo ramo agrupou os membros das famílias AMT1. No genoma das plantas superiores são descritos a presença de duas famílias distintas de transportador amônio, AMT1 e AMT2, respectivamente (revisado por HAO et al., 2020). A separação em duas subfamílias previamente caracterizadas neste estudo, está em concordância com outros estudos (BAJGAIN et al., 2018; SUN et al., 2019).

### CONCLUSÃO

O presente estudo fornece novas informações sobre as sequências dos genes transportadores de amônio em uma planta modelo (tabaco). Acreditamos que os resultados deste estudo serão úteis em futuras pesquisas, destacando a necessidade de investigar molecularmente os mecanismos de modulação desses genes candidatos envolvidos no transporte e metabolismo de nutrientes minerais.

### AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela concessão da bolsa (Silviany Angelica Fernandes Silva), por meio do processo nº 2019/22642-0. Órgão de fomento financiador da pesquisa protocolo CPDI: 343.

### REFERÊNCIAS

ADETUNJI, A.T.; LEWU, F.B.; MUNDEMBE, R. *Vigna subterranea*, ammonium transporter gene (VsAMT1): some bioinformatics insights. **Biotechnology Reports**, v.8, p.88-93, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.10.003>. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.10.003>

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, n. 17, p.3389-3402, 1997. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>

BAILEY, T.L.; WILLIAMS, N.; MISLEH, C.; LI, W.W. MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. **Nucleic Acids Research**, v.34, n.2, p.369-373, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkl198>. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl198>

BAJGAIN P.; RUSSELL B.; MOHAMMADI M. Phylogenetic analyses and in-seedling expression of ammonium and nitrate transporters in wheat. **Scientific Reports**, v.8, n.7082, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25430-8>. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25430-8>

BLAKEY, D.; LEECH, A.; THOMAS, G.H.; COUTTS, G.; FINDLAY, K.; MERRICK, M. Purification of the *Escherichia coli* ammonium transporter AmtB reveals a trimeric stoichiometry. **Biochemical Journal**, v.364, n.2, p.527–535, 2002. <https://doi.org/10.1042/bj20011761>. <https://doi.org/10.1042/bj20011761>

BU, Y.; SUN, B.; ZHOU, A.; ZHANG, X.; LEE, I.; LIU, S. Identification and Characterization of a *PutAMT1*;1 Gene from *Puccinellia tenuiflora*. **PLoS ONE**, v.8, n.12, p.e83111. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083111>. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083111>

CAMAÑES, G.; CEREZO, M.; PRIMO-MILLO, E.; GOJON, A.; GARCIA-AGUSTIN, P. Ammonium transport and CitAMT1 expression are regulated by light and sucrose in Citrus plants. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.11, p.2811–2825, 2007. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm135>. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm135>

CASTRO-RODRÍGUEZ, V.; CAÑAS, R.A.; DE LA TORRE, F.N.; PASCUAL, M.B.; AVILA, C.; CÁNOVAS, F.M. Molecular fundamentals of nitrogen uptake and transport in trees. **Journal of Experimental Botany**, v.68, n.10, p.2489–2500, 2017. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx037>. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx037>

DOS SANTOS, T.B.; LIMA, J.E.; FELICIO, M.S.; SOARES, J.D.M.; DOMINGUES, D.S.; Genome-wide identification, classification and transcriptional analysis of nitrate and ammonium transporters in *Coffea*. **Genetics and Molecular Biology**, v.40, n.1, suppl 1, p.346–359, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0041>. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0041>

DOS SANTOS, T.B.; SOARES, J.D.M.; LIMA, J.E.; SILVA, J.C.; IVAMOTO, S.T.; BABA, V.Y.; SOUZA, S.G.H.; LORENZETTI, A.P.R.; PASCHOAL, A.R.; MEDA, A.R.; NISHIYAMA JÚNIOR, M.Y.; DE OLIVEIRA, Ú.C.; MOKOCHINSKI, J.B.; GUYOT, R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M.; FIGUEIRA, A.V.O.; MAZZAFERA, P.; JÚNIOR, O.R.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, L.F.P.; DOMINGUES, D.S. An integrated analysis of mRNA and sRNA transcriptional profiles in *Coffea arabica* L. roots: insights on nitrogen starvation responses. **Functional & Integrative Genomics**, v.19, n.1, p.151-169, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10142-018-0634-8>. <https://doi.org/10.1007/s10142-018-0634-8>

FERREIRA, L.M.; DE SOUZA, V.M.; TAVARES, O.C.H.; ZONTA, E.; SANTA-CATARINA, C.; DE SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S.; SANTOS, L.A. *OsAMT1.3* expression alters rice ammonium uptake kinetics and root morphology. **Plant Biotechnology Reports**, v.9, p.221–229, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11816-015-0359-2>. <https://doi.org/10.1007/s11816-015-0359-2>

- FILIZ, E.; AKBUDAK, M.A. Ammonium transporter 1 (AMT1) gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.): Bioinformatics, physiological and expression analyses under drought and salt stresses. **Genomics**, v.112, n.5, p.3773-3782, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.04.009>  
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.04.009>
- FINN, R.D.; BATEMAN, A.; CLEMENTS, J.; COGGILL, P.; EBERHARDT, R.Y.; EDDY, S.R.; HEGER, A.; HETHERINGTON, K.; HOLM, L.; MISTRY, J.; et al. Pfam: the protein families database. **Nucleic Acids Research**, v.42, n.D1, p.D222-D230, 2014. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1223>  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1223>
- GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M.R.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM, editor. The Proteomics protocols handbook. **Humana Press**, p.571-607, 2005. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>  
<https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- GAZZARRINI, S.; LEJAY, L.; GOJON, A.; NINNEMANN, O.; FROMMER, W. B.; VON, W.N. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into Arabidopsis roots. **Plant Cell**, v.11, p.937-947, 1999. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.5.937>  
<https://doi.org/10.1105/tpc.11.5.937>
- GLASS, A.D.; BRITTO, D.T.; KAISER, B.N.; KINGHORN, J.R.; KRONZUCKER, H.J.; KUMAR, A.; OKAMOTO, M.; RAWAT, S.L.; SIDDIQI, M.Y.; UNKLES, S.E.; et al. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.370, p.855-864, 2002. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.855>  
<https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.855>
- GOODSTEIN, D.M.; SHU, S.; HOWSON, R.; NEUPANE, R.; HAYES, R.D.; FAZO, J.; ROKHSAR, D.S. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acids Research**, v.40, n.D1, p.D1178-D1186, 2012.. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>
- GU, R.; DUAN, F.; AN, X.; ZHANG, F.; VON WIRÉN, N.; YUAN, L. Characterization of AMT-mediated high-affinity ammonium uptake in roots of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Cell Physiology**, v.54, n.9, p.1515-1524, 2013. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct099>  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pct099>
- HAO, D.L.; ZHOU, J.Y.; YANG, S.Y.; QI, W.; YANG, K.J.; & SU, Y.H. Function and Regulation of Ammonium Transporters in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, n.10, p.3557, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21103557>  
<https://doi.org/10.3390/ijms21103557>
- HU, B.; JIN, J.; GUO, A-Y.; ZHANG, H.; LUO, J.G. GGSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. **Bioinformatics**, v.31, n.8, p.1296-1297, 2015. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu817>  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu817>
- IVANOV, N.V.; SIERRO, N.; PEITSCH, M.C. *The Tobacco Plant Genome*. **Springer International Publishing**. 2020. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-29493-9>  
<https://doi.org/10.1007/978-3-030-29493-9>
- KELLEY, LA.; STERNBERG, M.J. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nature Protocols**. v.4, n.3, p.363-371, 2009. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.2>  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2009.2>
- KOBAE, Y.; TAMURA, Y.; TAKAI, S.; BANBA, M.; HATA, S. Localized expression of arbuscular mycorrhiza-inducible ammonium transporters in soybean. **Plant and Cell Physiology**, v.51, n.9, p.1411-1415, 2010. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq099>  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcq099>
- KOEGEL, S.; LAHMIDI, N.A.; ARNOULD, C.; CHATAGNIER, O.; WALDER, F.; INEICHEN, K.; BOLLER, T.; WIPF, D.; WIEMKEN, A.; COURTY, P. The family of ammonium transporters (AMT) in *Sorghum bicolor*: two AMT

members are induced locally, but not systemically in roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.198, n.3, p.853–865, 2013. <https://doi.org/10.1111/nph.12199>.

KONISHI M, YANAGISAWA S. Emergence of a new step towards understanding the molecular mechanisms underlying nitrate-regulated gene expression. **Journal of Experimental Botany**, v.65, n.19, p.5589–600, 2014. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru267>.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v.33, n.7, p.1870–1874, 2016. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.

KUO-CHEN, C.; HONG-BIN, S. Plant-mPLOC: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization. **PLoS ONE**, v.5, p.11335, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011335>.

LI, T.; LIAO, K.; XU, X.; GAO, Y.; WANG, Z.; ZHU, X.; JIA, B.; XUAN, Y. Wheat ammonium transporter (AMT) gene family: diversity and possible role in host-pathogen interaction with stem rust. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p.1637, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01637>.

LIU, L.; FAN, T.; SHI, D.; LI, C.; HE, M.; CHEN, Y.; ZHANG, L.; YANG, C.; CHENG, X.; CHEN, X.; et al. Coding-sequence identification and transcriptional profiling of nine *AMTs* and four *NRTs* from tobacco revealed their differential regulation by developmental stages, nitrogen nutrition, and photoperiod. **Frontiers in Plant Science**, v.9, p.210, 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00210>.

LOQUÉ, D.; VON WIRÉN, N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.401, p. 1293–1305, 2004. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh147>.

LUDEWIG, U.; NEUHÄUSER, B.; DYNOWSKI, M. Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. **FEBS Letters**, v.581, n.12, p.2301–2308, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.034>.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany**, v.105, n.7, p.1141–1157, 2010. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq028>.

MCDONALD, T.R.; WARD, J.M. Evolution of electrogenic ammonium transporters (AMTs). **Frontiers in Plant Science**, v.7, p.352, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00352>.

MOLLER, S.; CRONING, M.D.; APWEILER, R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. **Bioinformatics**, v.17, n.7, p.646–653, 2001. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.7.646>.

NINNEMANN, O.; JAUNIAUX, J.C.; FROMMER, W.B. Identification of a high affinity  $\text{NH}_4^+$  transporter from plants. **Embo Journal**, v.13, p.3464–3471, 1994. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06652.x>.

SALVEMINI, F.; MARINI, A.M.; RICCIO, A.; PATRIARCA, E.J.; CHIURAZZI, M. Functional characterization of an ammonium transporter gene from *Lotus japonicus*. **Gene**, v.270, n.1-2, p.237–243, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00470-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00470-X).

SONODA, Y.; IKEDA, A.; SAIKI, S.; YAMAYA, T.; YAMAGUCHI, J. Feedback regulation of the ammonium transporter gene family AMT1 by glutamine in rice. **Plant and Cell Physiology**, v.44, n.12, p.1396–1402, 2003. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg169>.

SUENAGA, A.; MORIYA, K.; SONODA, Y.; IKEDA, A.; VON WIRÉN, N.; HAYAKAWA, T. Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter *OsAMT2* in rice plants. **Plant and Cell Physiology**~~Plant Cell Physiol.~~, v.44, n.2, p.206–211, 2003. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg017>.

SUN, Y.; SHENG, S.; FAN, T.; LIU, L.; KE, J.; WANG, D.; HUA, J.; LIU, L.; CAO, F. Molecular identification and functional characterization of GhAMT1.3 in ammonium transport with a high affinity from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Physiologia Plantarum**~~Physiol. Plantarum~~, v.167, n.2, p.217–231, 2018. <https://doi.org/10.1111/ppl.12882>.

STRAUB, D.; LUDEWIG, U.; NEUHÄUSER, B. A nitrogen-dependent switch in the high affinity ammonium transport in *Medicago truncatula*. **Plant Molecular Biology**~~Plant Mol. Biol.~~, v.86, p.485–494, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0243-4>.

VON WITTGENSTEIN, N.J.; LE, C.H.; HAWKINS, B.J.; EHLTING, J. Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. **BMC Evolutionary Biology**, v.14, n.11, 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-11>.

YUAN, L.; LOQUE, D.; KOJIMA, S.; RAUCH, S.; ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; TAKAHASHI, H.; VON, W.N. The organization of high-affinity ammonium uptake in Arabidopsis roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. **Plant Cell**, v.19, p.2636–2652, 2007. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052134>.

ZHANG, F.; LIU, Y.; WANG, L.; BAI, P.; RUAN, L.; ZHANG, C.; WEI, K.; CHENG, H. Molecular cloning and expression analysis of ammonium transporters in different tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) cultivars under different nitrogen treatments. **Gene**, v.658, p.136–145, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.03.024>.

**Formatado:** Fonte: (Padrão) Calibri, 11 pt, Negrito

**Formatado:** Fonte: (Padrão) Calibri, 11 pt, Negrito

**Formatado:** Fonte: (Padrão) Calibri, 11 pt, Negrito

**Formatado:** Fonte: (Padrão) Calibri, 11 pt, Negrito, Português (Brasil)

**RESUMOS DE PESQUISA**

DETERMINAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MILHO POR EQUIPAMENTO DE  
INFRAVERMELHO .....1836

---

DETERMINAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MILHO POR EQUIPAMENTO DE INFRAVERMELHO

CINTHIA VIEIRA GOLF ANDRIAZZI

CECI CASTILHO CUSTÓDIO

O milho é uma cultura de grande importância para o agronegócio no Brasil, o qual ocupa a terceira posição em produção mundial. São necessários métodos de detecção rápida do potencial fisiológico de sementes recém-colhidas para conhecermos o efeito do beneficiamento em um lote de sementes. O objetivo deste estudo foi determinar a qualidade fisiológica das sementes de milho úmidas, por meio da relação com o teor de óleo ou outro espectro conhecido de infravermelho. O experimento foi realizado na Bayer do Brasil em Uberlândia. Foram utilizados dois híbridos de milho úmidos com qualidades iniciais conhecidas (A e B). As amostras foram passadas no NIR XDS, enviadas ao SENAI para a determinação do teor de óleo e processadas na planta experimental para análises de germinação e vigor. Para a fase de deterioração controlada foram montadas 230 caixas tipo Gerbox® com tela, com 3 repetições. Foram realizadas análises de germinação e vigor, peso e umidade inicial. Foram então levadas para câmaras de envelhecimento acelerado com umidade saturada e temperatura de 42°C por 96h. Foi feita análise dos principais componentes para óleo, germinação e vigor e análise de cluster hierárquica nos dados de germinação, vigor e absorvância e razão de bandas por programa estatístico Spotfire e R. Pela análise da fase de calibração 31% do modelo explicam uma forte relação entre o teor de óleo e a germinação. Outros 30% do modelo explicam uma forte relação entre a germinação e o vigor. Pela curva de deterioração controlada o híbrido A iniciou com a germinação de 90% e reduziu para 41% com 96h. Para o teste de vigor este híbrido iniciou com 95% e reduziu até 21% com 96h. A germinação para o híbrido B passou de 99% para 67% e o vigor passou de 98% para 53%. Os índices de razão de bandas do óleo variaram entre 0,5 no tempo zero e 0,31 com 96h. Houve relação entre as razões de bandas dos picos e dos vales onde se encontra o óleo e os resultados de germinação e vigor da deterioração controlada. Quando a razão de bandas foi maior, ou seja, a amplitude de absorvância do pico e do vale foram maiores, os resultados de germinação e vigor também foram maiores. Quando a razão de bandas foi menor, os resultados de germinação e vigor também foram menores. Foi possível separar os híbridos por grupos de razão de bandas, por meio da absorvância nos comprimentos de onda de óleo e por consequência por germinação e o vigor das sementes de milho do teste de deterioração controlada.