




ARTIGOS COMPLETOS	1822
RESUMOS DE PESQUISA	1835

19 a 23 de outubro de 2020
Anais do ENEPE
ISSN 1677-6321



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

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 (NO_3^-), a ureia e o amônio (NH_4^+) são as principais fontes de N disponíveis. Quando o NO_3^- e 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 procaríotos 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.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 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.

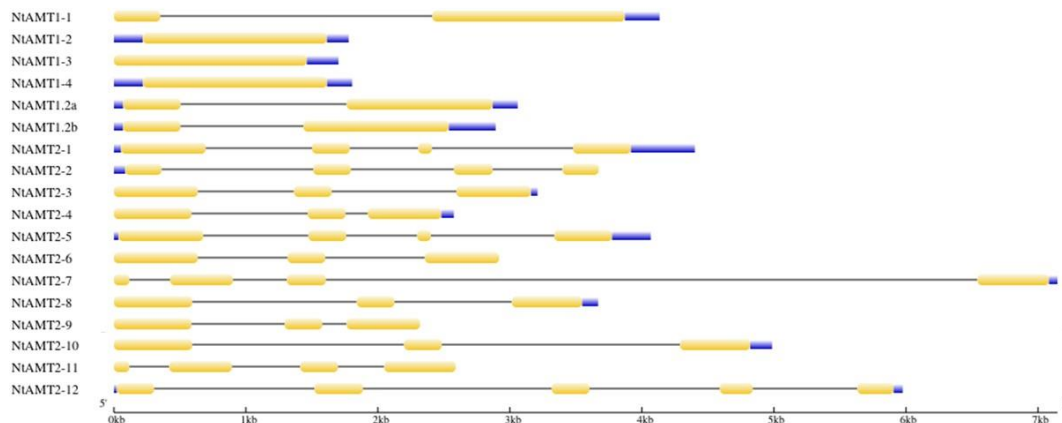
Tabela 1. Informações detalhadas dos 18 genes *NtAMT* identificados no genoma de *N. tabacum* L.

Gene	ID <i>Kegg Nicotiana tabacum</i> ^a	ID <i>NCBI Nicotiana tabacum</i> ^b	éxon ^c	(aa) ^d	kDa ^e	pI ^f	GRAVY ^g	Gene Ortólogo ^h	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

^aNúmero de acesso ao banco de dados *Kegg*; ^bNúmero de acesso ao banco de dados *National Center for Biotechnology Information*; ^cNúmero de éxons de cada gene; ^dTamanho da proteína; ^ePeso molecular; ^fPonto isoelétrico; ^gÍndice de propriedade hidrofílica/hidrofóbica; ^hSimilaridade 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).

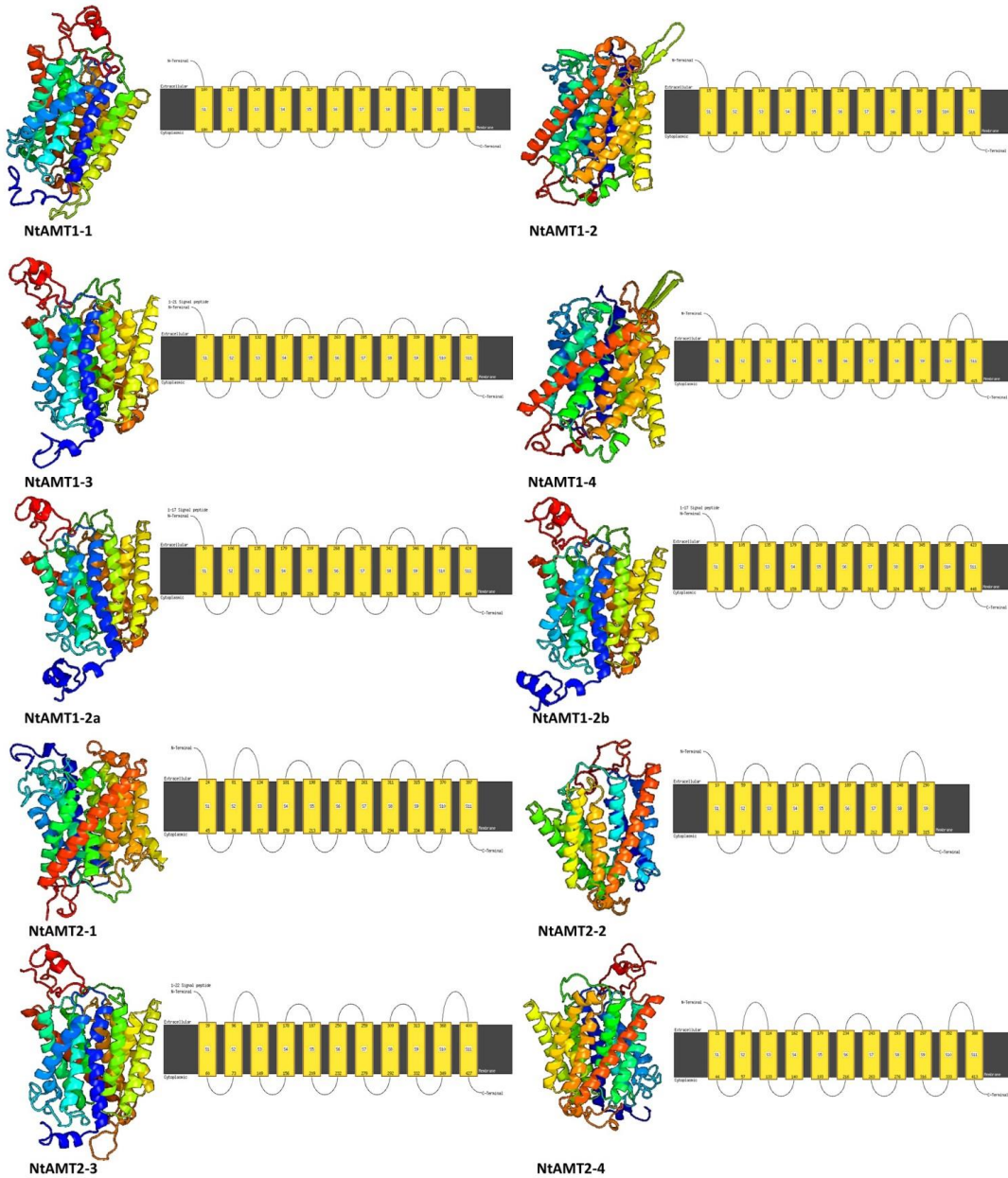
Figura 1. Estrutura dos genes *NtAMT* de *N. tabacum* L. As caixas amarelas indicam os éxons; linhas pretas indicam os íntrons; caixas azuis regiões *upstream/downstream*. A barra de escala representa 1.0 kb.

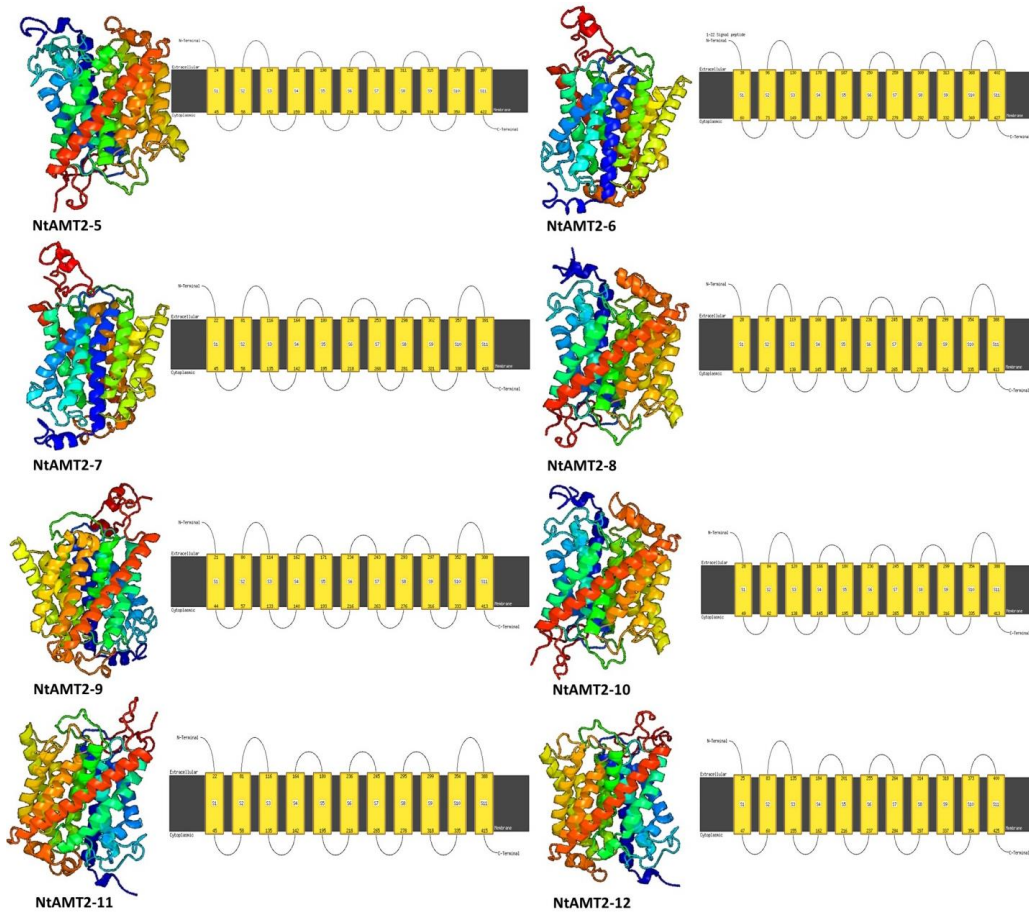


Estruturalmente, um transportador AMT consiste em 11-12 regiões transmembranares, com sequências que apresentam as seguintes características: "D (F YW S) AG (GSC) X2 (LIV) (EH) X2 (GAS) (GA) X2 (GAS) (LF)" localizadas em sua região transmembrana 5 e "DDX (LIVMFC) (EDGA) (LIV AC) X3 H (GALIV) X2 (GS) 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%.

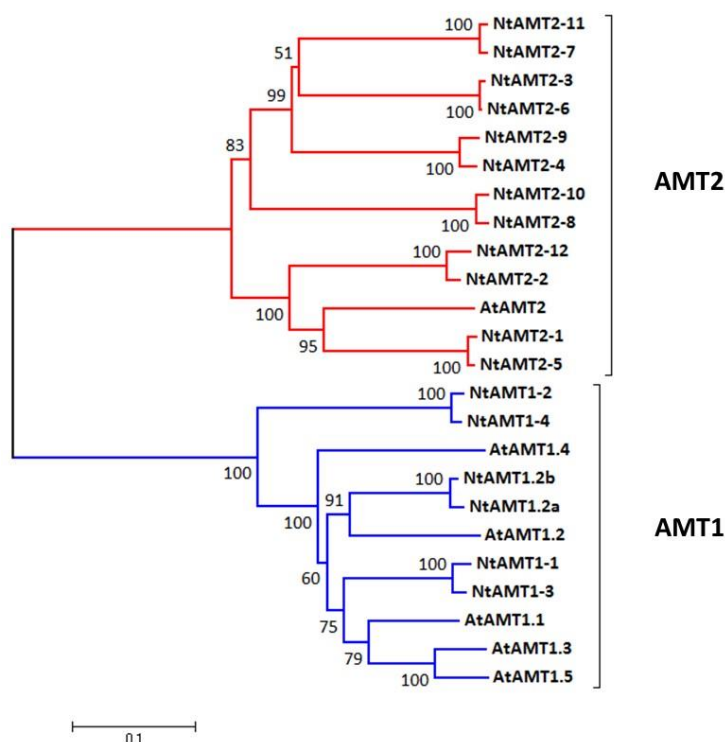
Figura 2. Predição das estruturas 3D e transmembranares das proteínas NtAMT de *N. tabacum* L. geradas pelo servidor *Phyre2*.





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 (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 NH_4^+ ou co-transporte de NH_3/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 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
INFRAVERMELHO1836

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.