



GENES TRANSPORTADORES DE AMÔNIO EM *Phaseolus vulgaris* L.: ALGUNS INSIGHTS DE BIOINFORMÁTICA VISANDO APLICAÇÃO NA AGRICULTURA

Silviany Angelica Fernandes Silva, Tiago Benedito dos Santos

PROBLEMÁTICA

Indiscutivelmente, o nitrogênio (N) é um macronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Esforços têm sido realizados com o objetivo de caracterizar transportadores de diferentes formas de N as quais podem ser absorvidas pelas plantas: transportadores de amônio (AMT), nitrato (NRT) e de ureia (DUR3). Transportadores estes que estão intimamente envolvidos na eficiência de absorção de N pelas plantas. Graças as ferramentas disponibilizadas pela bioinformática, inúmeras famílias gênicas têm sido caracterizadas e utilizadas em programas de melhoramento. Aqui abordaremos algumas análises sobre a caracterização dos genes *AMT* em *Phaseolus vulgaris* L. Estas informações fornecem subsídios para selecionar alguns genes candidatos para futuras análises funcionais, possibilitando a compreensão sobre os determinantes genéticos relacionados principalmente à supressão de N em uma planta de grande interesse no agronegócio, o feijoeiro.

CONHECIMENTO PRÉVIO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) membro da família *Fabaceae* (leguminosa ou família do feijão) é uma cultura de leguminosas autopolinizada (diploide: $2n = 2x = 22$) com genoma de tamanho aproximado de 473 Mb (Priya e Manickavasagan, 2020). Destaca-se por ser uma cultura de ciclo curto, com retorno econômico relativamente rápido e há possibilidade de ser produzida em até três safras, tornando-a uma excelente opção para rotação e sucessão de culturas. Adicionalmente, considerado uma das leguminosas de grãos mais importantes para o consumo humano, principalmente para os países em desenvolvimento como África e das Américas Central e do Sul (Gioia et al., 2019), o feijoeiro enfrenta muitos desafios como cultura, entre as várias adversidades destaca-se a limitação de nitrogênio (N).

O N é um macronutriente essencial para as funções vitais das plantas (crescimento, desenvolvimento), pois é um importante componente dos aminoácidos, os quais são as unidades elementares das proteínas e enzimas (Tegeger e Masclaux-Daubresse, 2018; revisado por The; Snyder; Tegeger, 2021), além de ser considerado um dos elementos mais requerido pelo feijoeiro. As fontes primárias de N para a maioria das plantas superiores são via amônio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) e aminoácidos, que existem no solo como complexos e compostos orgânicos e inorgânicos. Particularmente, os transportadores de amônio (AMTs) são proteínas da membrana plasmática responsáveis pelo transporte de amônio/amônia de fora para dentro da célula. Nas plantas, uma vez que o amônio é absorvido pelas células da raiz pelos AMTs, ele é eventualmente transformado em glutamina por meio da glutamina sintase (GS) (Tegeger e Masclaux-Daubresse, 2018).



Vários genes *AMTs* foram descobertos em inúmeras espécies de plantas. Por exemplo, seis *AMTs* foram identificados em *Arabidopsis thaliana*, três dos quais (*AtAMT1; 1*, *AtAMT1; 2* e *AtAMT1; 3*) estão envolvidos na captação de aproximadamente 90% do amônio (Yuan et al., 2007). Em *Oriza sativa*, 10 genes *AMTs* foram catalogados, dos quais *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* desempenham um papel significativo na absorção de amônio pelas raízes (Li et al., 2016). Diante o exposto, a importância funcional dos transportadores de N foi caracterizada principalmente em plantas-modelo como *Arabidopsis* e arroz, mas seus papéis na absorção de N sob fornecimento limitado de N ainda são bem indefinidos em outras plantas, incluindo o feijoeiro. Com efeito, os genes transportadores *AMTs* são genes em potencial a serem estudados e explorados em culturas agrícolas exigentes em N, como o feijoeiro. Neste sentido, as ferramentas da bioinformática são indispensáveis na caracterização *in silico* de genes *AMTs* em *P. vulgaris* L., possibilitando futuramente a validação de genes candidatos que tenham potencial para a utilização em programas de melhoramento.

DESCRIÇÃO DA PESQUISA

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DOS GENES *AMTs*

A palavra-chave *AMT* foi utilizada como isca no genoma *P. vulgaris* L. depositado banco de dados *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), afim de identificar os possíveis genes. Em seguida, foram recuperadas e armazenadas em arquivo *FASTA* todas as sequências putativas: genômica, proteica e de sequência codificadora (*CDS*), para posteriores análises. De modo a confirmar a identidade das sequências, as mesmas foram analisadas individualmente no banco de dados *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, através das ferramentas *online BlastX* e *BlastP* (Altschul et al., 1997). Realizou-se a caracterização das propriedades físico-químicas das proteínas *AMT*, sendo elas: peso molecular (kDa), ponto isoelétrico (pI), utilizando a plataforma *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>). Verificou-se também o índice de propriedade hidrofílica/hidrofóbica das proteínas *AMTs* via programa *GRAVY calculator*. O algoritmo *Plant-mPLoc* (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) foi utilizado com a finalidade de predizer a localização subcelular. Adicionalmente os perfis de expressão tecido-específico *in silico* dos genes *AMTs* foram obtidos, através dos valores de *FPKM* (Fragmentos por Kilobase por Milhões de Leituras Mapeadas) das bibliotecas de: botão floral, flor, vagem verde madura, folhas, nódulos, raiz 10 (10 dias após o plantio), raiz 19 (19 dias após o plantio), caule 10 (10 dias após o plantio), caule 19 (19 dias após o plantio), vagem jovem e trifólio jovem, os quais estão depositados no banco de dados *Phytozome* (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Pvulgaris). O programa *CIMMiner* (<http://discover.nci.nih.gov/cimminer>) foi utilizado para gerar o perfil transcricional dos respectivos genes.

EXPERIMENTO: FEIJOEIRO CULTIVADO SOB SUPRESSÃO DE N

Foram germinadas em caixas contendo substrato vegetal na casa de vegetação climatizada no Campus II da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), sementes de duas cultivares de feijão (IPR Colibri-ciclo precoce) e (IPR Tangará-ciclo médio). Estas sementes foram obtidas no banco de germoplasma do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR – Paraná). Uma semana após a semeadura todas as plantas tiveram suas raízes lavadas com água destilada para retirada de qualquer resquício de substrato, e então foram transferidas e mantidas por uma semana em um sistema hidropônico. O sistema hidropônico foi constituído de vasos de 1,8 L com solução nutritiva e aeração constante contendo os seguintes componentes em μM : 800 K_2SO_4 , 250 MgSO_4 , 200 KH_2PO_4 , 500 CaCl_2 , 4000 NH_4NO_3 , 100 NaFeEDTA , 5 H_3BO_3 , 3 MnSO_4 , 2,5 ZnSO_4 , 0,1 CuSO_4 , 0,7 NaMoO_4 . Na figura 1 está uma breve representação do respectivo experimento. Após aclimação em solução nutritiva, transferiu-se as plantas para uma nova solução sem quaisquer fontes de N durante o período de 3, 5 dias. Foi utilizado como controle experimental plantas que não foram expostas a supressão de N. Ao final de cada tratamento foram coletadas os tecidos foliares (um trifólio expandido de cada vaso) e também as raízes laterais. Neste contexto, cada replicata biológica neste experimento foi representada por *pools* de cada tecido (folhas ou raízes) sob as mesmas condições. Com o término de cada tratamento os materiais vegetais foram imediatamente imersos em N líquido e armazenados em freezer -80°C , para futuras análises moleculares.

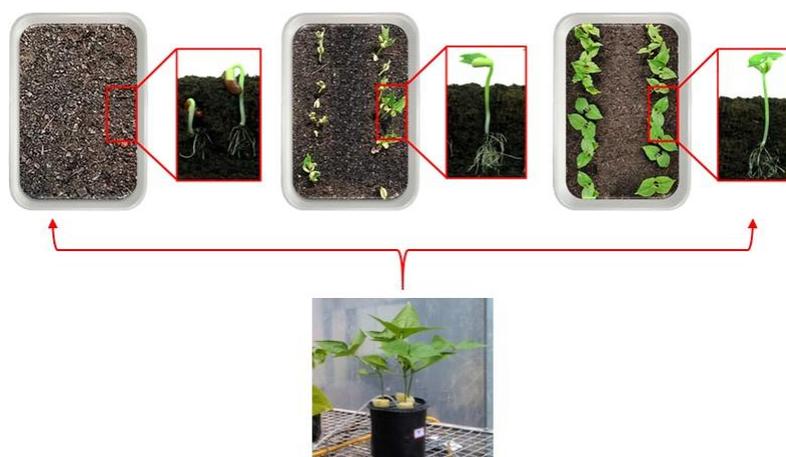


Figura 1. Experimento hidropônico do feijoeiro sob supressão de N. (Fonte próprio autor).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como elemento mineral quantitativamente mais importante e requerido pelas plantas, o N é absorvido através das raízes em formas inorgânicas (nitrato e amônio) e orgânicas (por exemplo, ureia, aminoácidos, peptídeos) (Tegeger e Masclaux-Daubresse, 2018). Na maioria dos ecossistemas agrícolas, o amônio é uma importante fonte de N inorgânico para as plantas. Os transportadores AMT facilitam a absorção de amônio e são incorporados à glutamina pela glutamina sintetase (GS; EC

6.3.1.2) (revisado por Liu; von Wirén, 2017). No presente estudo, através das ferramentas de bioinformática foram identificados 13 genes responsivos ao transporte de amônio no genoma do feijoeiro, o qual foram nomeados de acordo com a localização do cromossomo (*PvAMT1* – *PvAMT12*; Tabela 1). O gene *PvAM13* por sua vez é descrito como *scaffold*, ou seja, não foi mapeado em nenhum cromossomo.

Tabela 1. Características físico-químicas dos transportadores de amônio identificados no genoma de *P. vulgaris* L.

Gene	ID <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Localização cromossomo	Proteína (aa)	Peso Molecular (kDa)	pI	GRAVY	Localização Subcelular
<i>PvAMT1</i>	Phvul.001G166900.1	Chr01:42211002..42212468	488	52.21	6.05	0.498	Membrana celular
<i>PvAMT2</i>	Phvul.002G277000.1	Chr02:44662849..44667112	485	52.25	6.50	0.585	Membrana celular
<i>PvAMT3</i>	Phvul.003G006300.1	Chr03:755186..757942	480	52.65	7.14	0.476	Membrana celular
<i>PvAMT4</i>	Phvul.003G080400.1	Chr03:13119615..13122603	407	44.23	8.79	-0.212	Citoplasma/Mitocôndria
<i>PvAMT5</i>	Phvul.003G267400.1	Chr03:50548312..50550492	484	52.69	7.15	0.466	Membrana celular
<i>PvAMT6</i>	Phvul.006G067500.1	Chr06:17899875..17901278	460	49.44	5.41	0.65	Membrana celular
<i>PvAMT7</i>	Phvul.006G101400.1	Chr06:21152857..21154510	477	51.74	6.44	0.648	Membrana celular
<i>PvAMT8</i>	Phvul.006G148700.1	Chr06:25375394..25378478	407	44.36	8.52	-0.233	Citoplasma/Mitocôndria
<i>PvAMT9</i>	Phvul.007G175600.1	Chr07:29452900..29454578	480	52.46	6.14	0.502	Membrana celular
<i>PvAMT10</i>	Phvul.007G231700.1	Chr07:35511199..35513325	500	53.69	6.26	0.356	Membrana celular
<i>PvAMT11</i>	Phvul.008G094900.1	Chr08:9699876..9704363	486	52.54	8.18	0.514	Membrana celular
<i>PvAMT12</i>	Phvul.010G073700.1	Chr10:16053371..16060521	486	52.25	7.66	0.515	Membrana celular
<i>PvAMT13</i>	Phvul.L002132.1	scaffold_12:486028..488014	510	54.46	6.85	0.403	Membrana celular

O número de genes *AMTs* pode ser variável entre as espécies de plantas, por exemplo, em *Arabidopsis* foram identificados seis genes *AMT* (Yuan et al., 2007), enquanto que em *Coffea canephora* foram descritos oito genes (dos Santos et al., 2017). O comprimento das proteínas *PvAMTs* variou de 407 a 510 aminoácidos (Tabela 1). Peso molecular das proteínas variou de 44.23 a 54.46 kDa, enquanto o pI variou de 5.41 a 8.79 (Tabela 1). Os valores de propriedade *GRAVY* das proteínas *PvAMTs* foram para a maioria positivos (sugerindo que elas são hidrofóbicas), enquanto que as proteínas *PvAMT4* e *PvAMT8* foram preditas com propriedades hidrofílicas. A predição de localização subcelular revelou que a maioria das proteínas faz parte da membrana celular, enquanto que *PvAMT4* e *PvAMT8* estão localizadas no citoplasma e mitocôndria (Tabela 1). As proteínas *AMT* transportam e distribuem amônio aos cloroplastos, mitocôndrias e vacúolos para regular o metabolismo do N das plantas (Ludewig et al., 2007).

De acordo com o nível de expressão os resultados representados na Figura 2, nos permite selecionar alguns genes candidatos promissores para uma futura caracterização molecular, tais como, *PvAMT4*, *PvAMT7*, *PvAMT11* e *PvAMT13*.

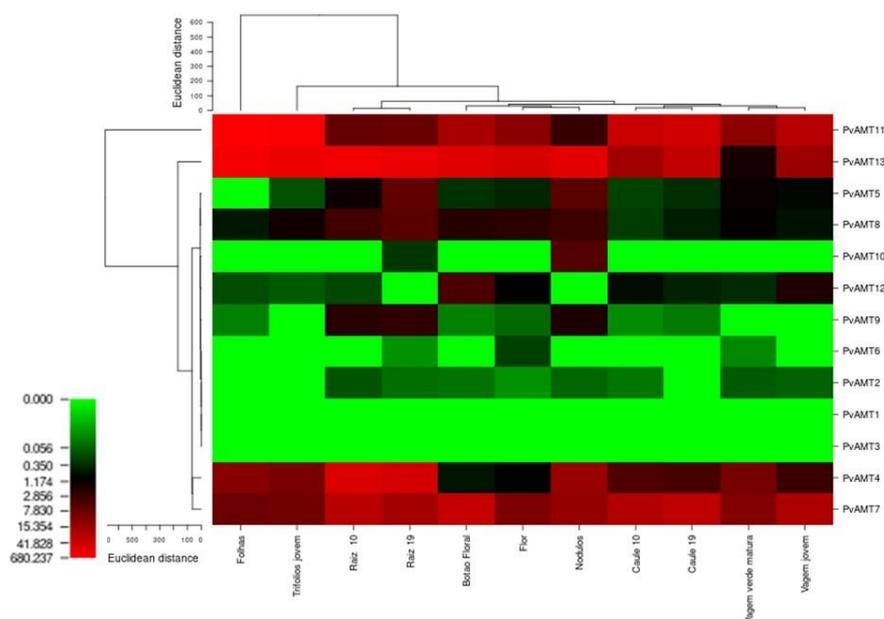


Figura 2. Padrão de expressão *in silico* dos genes *PvAMTs* em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento do feijoeiro (vagem jovem, caule 10, caule 19, botão floral, flor, raiz 10, nódulos, raiz 19, vagem verde madura, folha e trifólio jovem), a partir dos dados de RNaseq (*FPKM*). A escala de expressão está representada no esquema de cores verde-vermelho de 0–680.237. As caixas vermelhas e verdes indicam níveis de expressão alta e baixa de genes, respectivamente.

Cabe mencionar que todo material vegetal obtido através do experimento citado na metodologia deste estudo, começaram a ser analisados em alguns procedimentos de laboratório (extração de RNA total), visando caracterizar posteriormente pelas técnicas moleculares alguns dos genes aqui identificados.

APLICAÇÃO PRÁTICA

Este estudo empregando ferramentas de bioinformática, aliada a experimentos funcionais, nos permitirá selecionar genes importantes que possam ser introgrididos em programas de melhoramento do feijoeiro, almejando maior eficiência da planta quanto a absorção de nutrientes, tendo como consequência uma maior produtividade da cultura.

AGRADECIMENTO

Ao banco de germoplasma do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR – Paraná), por disponibilizar através de suas coleções, as sementes para o presente estudo. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo nº 2019/22642-0), pela concessão de bolsa.



LITERATURA CITADA

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, p. 3389–3402, 1997.

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*. **Genetic and Molecular Biology**, 40: 346–359, 2017.

Gioia, T.; Logozzo, G.; Marzario, S.; Spagnoletti Zeuli, P.; Gepts, P. Evolution of SSR diversity from wild types to U.S. advanced cultivars in the Andean and Mesoamerican domestications of common bean (*Phaseolus vulgaris*). **PLoS One**, 14:e0211342, 2019.

Li, C.; Tang, Z.; Wei, J.; Qu, H.; Xie, Y.; Xu, G. The OsAMT1.1 gene functions in ammonium uptake and ammonium-potassium homeostasis over low and high ammonium concentration ranges. **Journal of Genetics and Genomics**, 43, 639–649, 2016.

Liu, Y.; von Wirén, N. Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. **Journal of Experimental Botany**, 68: 2581–2592, 2017.

Ludewig, U.; Neuhäuser, B.; Dynowski, M. Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. **FEBS Letters**, 581, 2301–2308, 2007.

McDonald, T.R.; Ward, J.M. Evolution of electrogenic ammonium transporters (AMTs). **Frontiers in Plant Science**, 7, 352, 2016.

Priya, T.R.; Manickavasagan, A. Common bean. In A. Manickavasagan & P. Thirunathan (Eds.), *Pulses* (pp. 77–97). Cham: Springer. 2020.

Tegeder, M.; Masclaux-Daubresse, C. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. **New Phytologist**, 217: 35–53, 2018.

The, S.V.; Snyder, R.; Tegeder, M. Targeting Nitrogen Metabolism and Transport Processes to Improve Plant Nitrogen Use Efficiency. **Frontier Plant Science**, 11:628366, 2021.

Yuan, L.; Loqué, D.; Kojima, S.; Rauch, S.; Ishiyama, K.; Inoue, E.; Takahashi, H.; von Wirén, N. The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. **Plant Cell**, 19: 2636–2652, 2007.