UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

Estudo da variação genética natural em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) para o processo de absorção de nitrogênio

André Luiz Tagliaferro

Piracicaba
2015

ANDRÉ LUIZ TAGLIAFERRO

Estudo da variação genética natural em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) para o processo de absorção de nitrogênio

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

2015

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

Tagliaferro, André Luiz

Estudo da variação genética em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) para o processo de absorção de nitrogênio / André Luiz Tagliaferro; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Piracicaba, 2015.

70 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.

1. Amônio 2. Cinética de absorção 3. Genética vegetal 4. Nitratos 5. Tomate I. Título

CDU 635.64 : 575.23

Dedico este trabalho aos meus pais Mario e Edilene, minha madrinha Eliane e as minhas irmãs Andreza e Simone, por tudo que fizeram e ainda fazem por mim e pelo apoio à minha longa jornada de estudante. À essa querida família meu eterno amor e gratidão. Dedico também àquela que iluminou meus dias nublados e me permitiu chegar até aqui, à Melissa pelo amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) e a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), seu corpo docente, direção e administração, pela oportunidade de vislumbrar novos horizontes.

Ao Prof. Dr. Antonio Figueira, pela confiança, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, por todo conhecimento transmitido, pelas suas correções e incentivos.

Ao Dr. Joni Lima pela infinita disponibilidade, por todos os ensinamentos e pelo grande apoio na condução deste meu trabalho.

Aos meus grandes amigos Eduardo Bressan, Lucas Anjos, Luís Damasceno e Renato Ferreira, pelo companheirismo, pelas boas risadas e pelos ótimos momentos.

Aos meus companheiros do Laboratório de Melhoramento de Plantas: Alessandra Koltun, Daniela Bardella, Danielle Scotton, Deborah Nishimura, Fabiana Manarelli, Fernando Ferreira, Flávia Bento, Grabriela Juliano, Jamile Silva, Juliana Leles, Karina Brandão, Layanne Souza, Marielle Vitti, Roberto Camargo, Rodolfo Maniero e Thaísa Pinheiro, pela ótima convivência e pelos bolos na salinha de cima.

Aos técnicos do Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP: Raquel Orsi, Felippe Campana, Wlamir Godoy, José Alves, Paulo Cassieri e Inês Possignolo, pela atenção e ajuda dada. Sem isso, não seria possível a realização dos experimentos.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa e suporte financeiro necessário para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Mario e Edilene, pelo exemplo de amor e dedicação. Por me permitirem voar até onde minhas asas alcançassem. Às minhas irmãs Andreza e Simone, pelo apoio e carinho. À minha madrinha Eliane por todos os ensinamentos e pelo exemplo de perseverança.

À Melissa, pelo amor, carinho e companheirismo que recebo diariamente. Muito obrigado por estar sempre do meu lado.

A todos que participaram de maneira direta e indireta desta conquista...

Deixo aqui meus sinceros e imensos agradecimentos!

“Tudo o que temos de decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado. ”

J. R. R. Tolkien

RESUMO

TAGLIAFERRO, A. L. **Estudo da variação genética natural em tomateiro (Solanum lycopersicum) para o processo de absorção de nitrogênio.** 2015. 70 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

O uso excessivo de fertilizantes nitrogenados com o intuito de aumentar a produtividade de culturas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é decorrente da expansão da demanda mundial. No entanto, o acúmulo/excesso de formas orgânicas ou inorgânicas de nitrogênio no solo está associado a diversos problemas ambientais. Uma alternativa para contornar esses problemas é a identificação de variabilidade genética para aquisição de N, garantindo uma alta produtividade e uma possível melhoria na eficiência do uso de N (NUE). Para tanto, os genótipos *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara', *S. pimpinellifolium* e *S. habrochaites*, previamente identificadas com capacidade de contrastante de absorção de N, foram utilizados em ensaios de cinética de absorção e provisão utilizando traçadores com ^{15}N. Além disso, foi realizada a quantificação da expressão gênica relativa via amplificação de transcritos reversos (RT-qPCR) de genes relacionados ao transporte de amônio (*AMTs - AMMONIUM TRANSPORTER – AMT1.1, AMT1.2* e *AMT2.1*) e nitrato (*NRT*s - *NITRATE TRANSPORTERS – NRT1.1, NRT2.1, NRT2.2* e *NAR2*) para correlacionar a capacidade de absorção de N com expressão desses genes.. *Solanum pimpinellifolium* possui maior capacidade de absorção de amônio por suas raízes quando comparado aos genótipos *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. habrochaites* sob condições contrastantes de disponibilidade de N. Esse fenótipo está relacionado à maior indução da expressão do gene *SlAMT1.1* em raízes *S. pimpinellifolium*. Durante a provisão de amônio, o genótipo *S. habrochaites* apresentou menor inibição do processo de aquisição de ^{15}N-amônio quando comparado a *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. pimpinellifolium*. A correlação com os níveis de expressão dos principais transportadores de amônio sugere uma regulação alostérica diferenciada da proteína SlAMT1.1 nesse genótipo. A clonagem e sequenciamento da região codificadora do gene *SlAMT1.1* entre os genótipos indicou a existência de diferença na sequência de aminoácidos, principalmente de *S. habrochaites.* Em particular o resíduo Ser240Gly na alça citosólica, a qual é fundamental durante a regulação alostérica, o que pode estar relacionado à menor inibição do influxo de amônio sob provisão de N. A clonagem e sequenciamento da região promotora do gene *SlAMT1.1* dos três genótipos indicaram a presença de motivos regulatórios distintos na região promotora de *SlAMT1.1* de *S. pimpinellifolium* quando comparado a mesma região do genótipos *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. habrochaites*, o que implicar numa correlação com a maior capacidade de aquisição de amônio em raízes de *S. pimpinellifolium*. Os resultados de cinética de aquisição de nitrato sugerem que *S. pimpinellifolium* apresenta maior capacidade quando comparado a *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. habrochaites*, devido a maior indução dos principais genes de transportadores *SlNRT2.1* e *SlNRT2.2*. A correlação dos estudos de influxo de nitrato e expressão de genes relacionados ao transporte dessa forma de N identificaram que *SlNRT2.1* é o principal transportador a ser regulado em raízes dos três genótipos avaliados quando submetidos a condições de provisão de nitrato. Contudo, o genótipo *S. habrochaites* apresentou maior capacidade de induzir *SlNRT2.1* quando comparado a *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. pimpinellifolium* sob provisão de nitrato.

Palavras-chave: NUE. Cinética de absorção. Provisão. Amônio. *AMTs*. Nitrato. *NRT*s.

ABSTRACT

TAGLIAFERRO, A. L. **Natural genetic variation studies in tomato (*Solanum lycopersicum*) for nitrogen uptake capacity.** 2015. 70 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

High nitrogen fertilizer input is required to increase the yield of tomato (*Solanum lycopersicum*) to attend to the rising world demand. N fertilization might result in a detrimental impact on the environment, such as contributing to greenhouse gases and groundwater pollution. One approach to reducing the excessive use of N fertilizers is the evaluation of natural genetic variability for N use efficiency (NUE) of crop plants. Therefore, the genotypes *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara', and *S. habrochaites*, previously identified with contrasting capacity of N absorption, were used in kinetic and provision assays using short-term ^{15}N-labeled. Furthermore, the relative quantification of gene expression via quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) of genes related to the ammonium transport (*AMTs - AMMONIUM TRANSPORTER - AMT1.1, AMT1.2* and *AMT2.1*) and nitrate (*NRTs - NITRATE TRANSPORTERS - NRT1.1, NRT2.1, NRT2.2* and *NAR2*) was performed to correlate the N absorption capacity with the expression of these genes. *Solanum pimpinellifolium* has greater ammonium absorption in its roots when compared to genotypes *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' and *S. habrochaites* under contrasting conditions of N availability. This phenotype is associated with the greater induction of *SlAMT1.1* expression in *S. pimpinellifolium* roots. During ammonium provision, genotype *S. habrochaites* showed lower inhibition of the ^{15}N-ammonium acquisition compared to *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' and *S. pimpinellifolium*. The correlation with the expression levels of the main ammonium transporter suggests a different allosteric regulation of SlAMT1.1 protein in *S. habrochaites*. The comparison of the *SlAMT1.1* coding region in the three genotypes indicated the existence of differences in amino acid sequence, particularly in *S. habrochaites*. The change of Ser240Gly in the cytosolic loop of *S. habrochaites*, which is critical during the allosteric regulation, may be related to the inhibition of ammonium influx. The cloning and sequencing of the promoter region of the gene *SlAMT1.1* indicates the presence of different regulatory motifs in the promoter of *SlAMT1.1* in *S. pimpinellifolium* when compared to *S. lycopersicum* cv Santa Clara and *S. habrochaites*. This can be correlated with the highest ammonium acquisition capacity of *S pimpinellifolium* roots. Therefore, nitrate kinetic studies showed that *S. pimpinellifolium* has greater acquisition of nitrate in their roots when compared to *S. lycopersicum* cv Santa Clara and *S. habrochaites*, due to increased induction of *SlNRT2.1* and *SlNRT2.2* genes. The correlation among nitrate influx studies and expression of genes related to the transport of this N form suggest that *SlNRT2.1* is the main transporter regulated in roots of the three genotypes under nitrate supply. In addition, the genotype *S. habrochaites* showed greater ability to induce *SlNRT2.1* when compared to *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' and *S. pimpinellifolium* in nitrate supply.

Keywords: NUE. Uptake kinetic. Resupply. Ammonium. *AMTs*. Nitrate. *NRT*s.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
2. REVISÃO DA LITERATURA 14
2.1 Fertilizantes nitrogenados 14
2.2 Variabilidade genética natural em tomateiro 15
2.3 Eficiência no uso de nitrogênio 17
2.4 Transporte de nitrogênio 18
2.4.1 Transportadores de amônio (*AMTs - AMMONIUM TRANSPORTERS*) 20
2.4.2 Transportadores de nitrato (*NRT - NITRATE TRANSPORTERS*) 22
3. MATERIAIS E MÉTODOS 24
3.1 Material vegetal e cultivo das plantas 24
3.2 Ensaios de influxo rápido de ^{15}N 25
3.3 Estudo da cinética de absorção de N-amônio ou N-nitrato pela raiz por influxo rápido de ^{15}N de acordo com a disponibilidade de N 25
3.4 Estudo de provisão de N-amônio ou N-nitrato pela raiz 26
3.5 Desenho de iniciadores para genes associados ao processo de absorção de N 26
3.6 Extração de RNA e síntese de cDNA 27
3.7 Análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) 28
3.8 Clonagem do gene *SlAMT1;1* e sua região promotora nos três genótipos de tomateiro 29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 30
4.1 Análise da cinética de absorção de N-amônio pela raiz de tomateiro 30
4.2 Regulação do transporte de amônio em raízes de tomateiro submetidas à provisão de N 38
4.3 Análise das sequencias do gene *SlAMT1.1* nos genótipos de tomateiro 43
4.4 Análise das sequências da região promotora do gene *SlAMT1.1* nos genótipos de tomateiro 47
4.5 Estudo de cinética de absorção de N-nitrato pela raiz de tomate 48
4.6 Regulação do transporte de nitrato em raízes de tomateiro submetidas à provisão de N 55
5. CONCLUSÃO 62
REFERÊNCIAS 63

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda mundial por alimentos impulsionou na primeira metade do século XX, a intensificação da agricultura a partir da utilização de insumos químicos, como fertilizantes e agroquímicos. O desafio de maximizar a produção de alimentos levou ao uso deliberado de adubos nitrogenados, a despeito do acúmulo de nutrientes acima da capacidade de absorção destes no solo e/ou baixa capacidade de absorção pelas culturas. A fertilização nitrogenada em excesso está associada a eutrofização de corpos d'água e ecossistemas marinhos devido à lixiviação de nutrientes como o nitrato, e ainda na contaminação da atmosfera devido à emissão de gases como o óxido nitroso (N_2O) e a amônia (NH_3), que são agentes intensificadores do efeito estufa. Portanto, fica clara a necessidade de buscar novas soluções visando o aumento da produtividade e a maior eficiência na utilização desses fertilizantes.

O nitrogênio é um dos principais nutrientes requerido pelas plantas. Em tomateiro, a exigência deste elemento é maior nos primeiros estádios de crescimento e sua deficiência pode retardar o crescimento resultando em queda na produtividade. Normalmente grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados são utilizadas para que a produtividade não seja comprometida, porém, com baixo aproveitamento pela cultura e com consequente perdas de nitrogênio.

A seleção de plantas com melhor eficiência no uso de nitrogênio (NUE) pode ser uma ótima alternativa para evitar o uso excessivo de fertilizantes nitrogenados nos sistemas agrícolas. A NUE pode ser definida como a máxima produtividade econômica de uma cultura por unidade de N aplicado, absorvido ou assimilado pelas plantas. Em um sentido mais amplo, a NUE descreve a capacidade de uma cultura em converter N disponível no solo em biomassa para seu crescimento e desenvolvimento. Dessa forma, estudos envolvendo a caracterização da capacidade de culturas como o tomateiro em utilizar o N disponível de forma eficiente pode colaborar para o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas a ambientes com baixa concentrações de N (HIREL et al., 2007) ou reduzir seu requerimento.

A absorção de N presente no solo ocorre, principalmente, pelo sistema radicular (MARSCHNER, 2012). Em solos agricultáveis, as formas inorgânicas de N, amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-), são predominantes e preferencialmente absorvidas pelas raízes das plantas (MILLER et al., 2007). De acordo com a demanda de N da planta, processos regulatórios de sinalização coordenam os mecanismos de absorção/transporte de N (LOQUÉ, von WIRÉN,

2004; NACRY et al., 2013). Para um uso eficiente das fontes de N presentes no solo, as plantas precisam coordenar um sistema de transportadores a fim de absorver, realocar e assimilar o N disponível. O conhecimento das bases moleculares desse sistema é fundamental para entender como as plantas regulam cada transportador de acordo com suas necessidades metabólicas, visando a manutenção do seu crescimento em função da disponibilidade de N nos solos. O transporte de amônio e nitrato em plantas ocorre por meio de sistemas de transportadores de alta afinidade pelo substrato (*High Affinity Transporter System* ou HATS; N < 1 mM) e/ou de baixa afinidade (*Low Affinity Transporter System* ou LATS, N > 1 mM) (GLASS, 2003). Os transportadores responsáveis pela absorção de amônio pertencente à família *AMT* (*AMMONIUM TRANSPORTERS*) e membros desta família já foram descritos para diversas espécies dicotiledôneas (GAZZARRINI et al., 1999; von WIRÉN et al., 2000; D'APUZZO et al., 2004). Em tomateiro, quatro genes pertencentes a família *AMT* foram identificados: *SlAMT1.1*, *SlAMT1.2*, *SlAMT1.3* e *SlAMT2.1*, sendo que *SlAMT1;3* não apresenta expressão localizada em raízes, somente na parte aérea da planta (von WIRÉN et al., 2000; LOQUÉ; von WIRÉN, 2004). Da mesma forma, transportadores de nitrato da família *NRT* (*NITRATE TRANSPORTERS*) já foram identificados no tomateiro, com cinco genes *NRTs*: *SlNRT1.1*, *SlNRT1.2*, *SlNRT2.1*, *SlNRT2.2* e *SlNRT2.3*, os quais são regulados em raízes sob presença de nitrato; contudo, a funcionalidade destes genes ainda não foi estudada (FU et al., 2015).

Considerando a importância econômica da cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) para o Brasil e visando a obtenção de cultivares/genótipos com alta produtividade e melhor eficiência de uso de N, aliada a necessidade de compreensão das bases moleculares de NUE em diversas espécies cultivadas (XU et al., 2012; GUTIERREZ, 2012), o objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo fisiológico do transporte de N inorgânico (amônio e nitrato) nas raízes da cultivar *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e nos genótipos selvagens *S. pimpinellifolium* e *S. habrochaites*, inicialmente descritas por Oliveira (2004) como genótipos contrastantes para NUE, visando assim investigar as causas moleculares presumíveis da variabilidade no uso eficiente de N. Após a caracterização fisiológica por meio de estudos de cinética de absorção e de provisão de nitrogênio utilizando traçadores de ^{15}N, os genótipos de tomateiro contrastantes para NUE foram submetidos à quantificação relativa de expressão gênica via amplificação de transcritos reversos (RTqPCR), para caracterizar genes relacionados ao transporte de amônio (*AMTs*) e nitrato (*NRTs*) expressos nos genótipos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fertilizantes nitrogenados

No início do século XX, o aumento da produtividade na agricultura moderna foi impulsionado por meio da utilização de fertilizantes nitrogenados sintéticos produzidos pelo processo 'Haber-Bosch' (GALLOWAY; COWLING, 2002; TILMAN et al., 2001). A crescente demanda mundial por alimentos e por fontes renováveis de energia (biomassa) têm levado ao uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados na agricultura contemporânea (VITOUSEK et al., 2009).

A agricultura moderna introduz anualmente aproximadamente 120 milhões de N_2 atmosférico, através do uso de fertilizantes nitrogenados ou do cultivo de leguminosas (fixação biológica) (ROCKSTRÖM, 2009). No entanto, as perdas de nitrogênio nos sistemas de produção agrícolas são estimadas em torno de 50% e 70% (PEOPLES et al., 1995), devido, principalmente, à lixiviação de nitrato, podendo resultar na contaminação de solos, corpos de água e de ecossistemas marinhos, (TILMAN, 1999; SCHRÖDER et al., 2004; VITOUSEK et al., 2009; FOLEY et al., 2011); na contaminação da atmosfera pela emissão de gases causadores do efeito estufa, como o óxido nítrico e a amônia (TILMAN et al., 2001; GALLOWAY et al., 2008; BURNEY et al., 2010), e no constante aumento do N reativo em ecossistemas terrestres (AUSTIN et al., 2000; MARTINELLI; FILOSO, 2008). Considerando os efeitos negativos apresentados pelo uso excessivo de adubos nitrogenados, a melhoria da eficiência no uso de fertilizantes a base de N na produção agrícola moderna é essencial e torna-se um desafio para mudar este cenário (SIMMONS et al., 2008; ROCKSTRÖM, 2009; FOLEY et al., 2012).

A cultura do tomateiro se encontra em um cenário de expansão, devido ao incremento de consumo, resultando consequentemente em um aumento na utilização de fertilizantes nitrogenados, uma vez que a adubação nitrogenada apresenta grande impacto no aumento das taxas de crescimento e frutificação dessa cultura (SIDDIQI et al., 2002; FERREIRA et al. 2003). A exigência de N é maior nos primeiros estádios de crescimento do tomateiro e sua deficiência pode retardar o crescimento resultando em queda na produtividade (FERREIRA et al., 2006). Genótipos de *S. lycopersicum* apresentam reduzida biomassa e produtividade quando cultivados em solos com concentrações menores que 7-8 mM de N, confirmando que esse nutriente é um fator limitante para manter a alta produtividade do tomateiro (SIDDIQI et al., 2002; FERREIRA et al., 2006). Contudo, o uso excessivo desses fertilizantes pode

ocasionar menor desenvolvimento de plantas de tomateiro e consequentemente, menor número de frutos, resultando em baixa produtividade, sobretudo devido à toxidez causada pela aplicação de amônio (NH_4^+) (SIDDIQI et al., 2002). Desse modo, para que a produtividade não seja comprometida grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados são utilizadas, no entanto, com baixo aproveitamento pela cultura e consequente grandes perdas de nitrogênio (SIDDIQI et al., 2002).

A seleção de plantas com melhor eficiência no uso de nitrogênio (NUE) pode ser uma ótima alternativa para evitar o uso excessivo de fertilizantes nitrogenados nos sistemas agrícolas (GOOD et al., 2004). Dessa forma, estudos envolvendo a caracterização da capacidade de culturas como o tomateiro em utilizar o N disponível de forma eficiente pode colaborar para o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas a ambientes com baixa concentrações de N (HIREL et al., 2007) ou reduzir seu requerimento.

2.2 Variabilidade genética natural em tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) teve sua origem na região Andina, a qual engloba cinco países: Chile, Bolívia, Equador, Colômbia e Peru (Figura 1). Apesar do tomateiro ter atingido um estágio bastante avançado de domesticação antes de ser levado para a Europa no século XVI, a cultura passou ainda por uma domesticação intensa em toda a Europa nos séculos XVIII e XIX (SIMS, 1980).

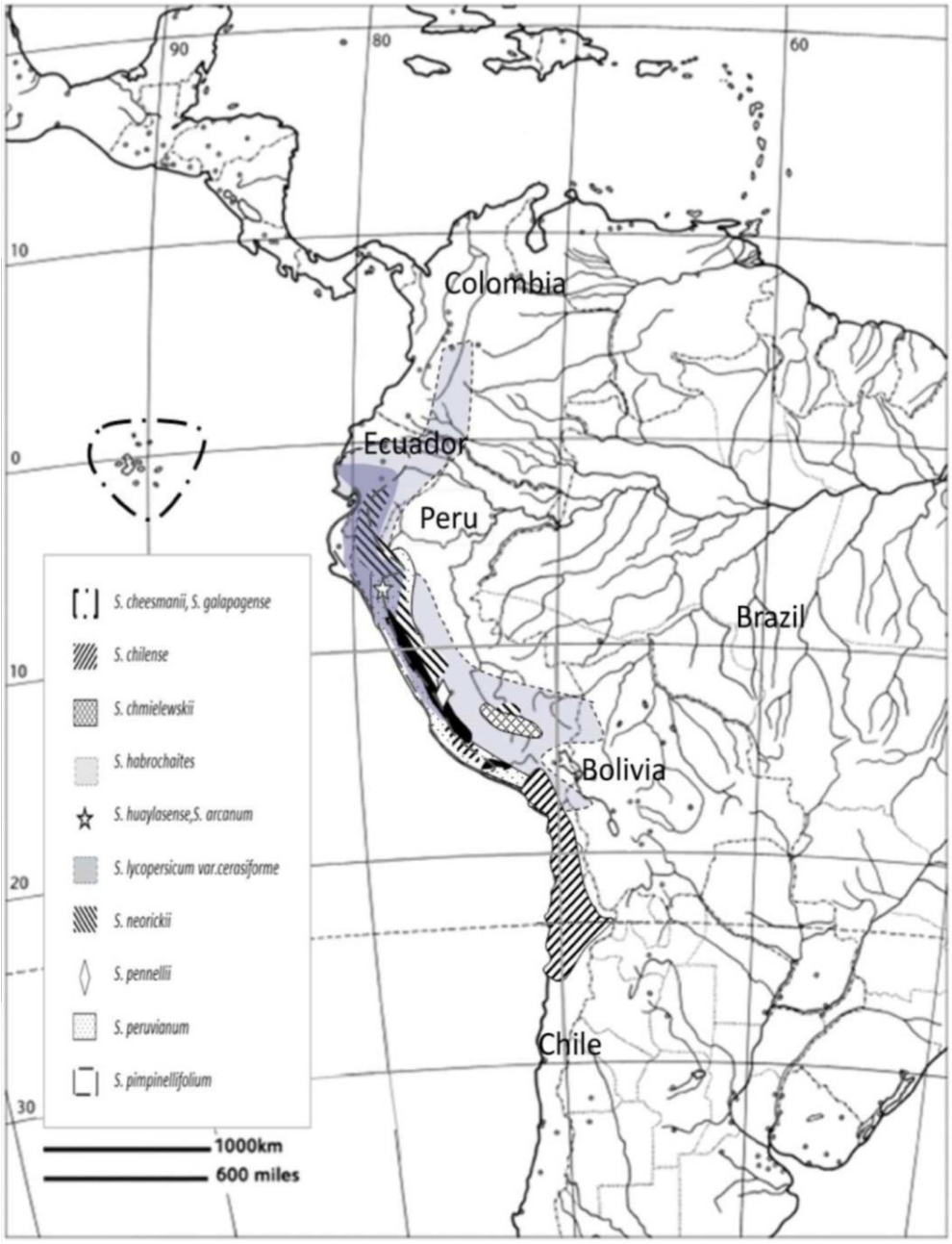


Figura 1 – Distribuição geográfica de espécies selvagens de *Solanum lycopersicum* (BAUCHET, G., CAUSSE, M. 2012)

A classificação de *Solanaceae* foi recentemente revisada, e o gênero *Lycopersicum* foi reintegrado ao gênero *Solanum* com sua nova nomenclatura. A seção *Lycopersicon* dentro do gênero *Solanum* passou a incluir o tomateiro cultivado (*S. lycopersicum*) e 13 parentes silvestres: *S. arcanum*, *S. chmielewskii*, *S. neorickii*, *S. pennellii*, *S. habrochaites*, *S. chilense*, *S. huaylasense*, *S. peruvianum*, *S. corneliomulleri*, S. *cheesmaniae*, *S. galapagense*, *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (PERALTA et al., 2007). *Solanum lycopersicum* é a única espécie domesticada (PERALTA et al., 2006).

Espécies de tomateiro selvagens apresentam uma grande diversidade genética, especialmente aquelas espécies auto-incompatíveis, como *S. chilense* e *S. peruvianum* (RICK, 1988). A variação genética presente nas espécies silvestres tem sido investigada intensivamente para identificação de características específicas a serem exploradas no melhoramento genético da cultura (RICK, 1988; PIOTTO, 2007).

Comparado com o reservatório rico de genes em espécies selvagens, o tomateiro cultivado é geneticamente restrito. Os genomas de cultivares de tomateiro contêm 5% da variação genética dos seus parentes silvestres (MILLER; TANKSLEY, 1990). A domesticação do tomateiro experimentou um gargalo genético severo quando a cultura foi introduzida a partir do Andes para a América Central e de lá para a Europa (TAM et al., 2005). Mesmo na ausência seleção, a variabilidade genética em espécies endogâmicas tendem a diminuir (MILLERTAM et al., 2005). Deste modo, processos como a deriva genética podem representar um papel importante na redução da variação genética (TAM et al., 2005).

Muito provavelmente, nenhum cruzamento entre tomateiros cultivados e o germoplasma selvagem ocorreu até 1940. Desde então, o desenvolvimento de cultivares por meio de cruzamentos interespecíficos levou a grande utilização dos atributos favoráveis em tomateiros exóticos (BAI; LINDHOUT, 2007).

2.3 Eficiência no uso de nitrogênio

A eficiência no uso de nitrogênio (NUE) por definição se baseia no rendimento de produção de biomassa ou grãos, por unidade de N disponível no solo (MOLL et al. 1982). Em um sentido mais amplo, NUE representa a habilidade metabólica da planta em converter o nitrogênio disponível no ambiente em biomassa (GOOD et al., 2004). O processo de NUE é dependente da eficiência de absorção de fontes de N do solo, assim como da eficiência na utilização de N, a qual compreende os processos de assimilação e remobilização de N durante o desenvolvimento da planta (GOOD et al., 2004; LEA; AZEVEDO, 2006; HIREL et al., 2007). Portanto, a caracterização fisiológica e genética torna-se necessária para o entendimento do uso eficiente de N (NUE) visando ao desenvolvimento de cultivares mais adaptadas a ambientes com baixas concentrações de N (HIREL et al., 2007).

A existência de redes de sinalização e regulação específicas para os transportadores de N reforçam a dificuldade em se obter plantas com maior capacidade de absorção N e, consequentemente, com maior eficiência do uso de nitrogênio (NUE) (LEA & AZEVEDO, 2006). Uma alternativa para contornar esse problema é a identificação de genótipos e

cultivares com variação genética para absorção de N (HIREL et al., 2007). Em canola (*Brassica rapa*), variações para NUE entre genótipos cultivados sob baixa fertilização de N já foram descritas. Alguns desses genótipos demonstraram ser mais responsivos à alta fertilização de N do que genótipos mais produtivos em alto N (YUA; THURLING, 1987). Na planta modelo arabidopsis foi identificada variação genética natural para o uso eficiente de nitrogênio, quando cultivadas em condições limitantes de N (CHARDON et al. 2010). Desse modo, dois genótipos, 'Bur-0' e 'Tsu-0', apresentaram maior absorção de nitrato e consequentemente, maior NUE e produção de biomassa (CHARDON et al., 2010), indicando a importância do processo de absorção e transporte para o uso eficiente de N (LEA; AZEVEDO, 2006).

Em tomateiro já foi descrita variação genética natural para NUE. Sob condições controladas, diversos genótipos de *Solanum* cultivados e selvagens foram avaliados quanto a produção de biomassa e concentração total de N na planta para determinação de NUE (OLIVEIRA, 2004). A cultivar 'Santa Clara' apresentou maior NUE em condições de alto N, enquanto que o genótipo selvagem *S. pimpinellifolium* apresentou melhor uso desse nutriente quando cultivado sob condições limitantes de N (OLIVEIRA, 2004). Ainda, o genótipo selvagem *S. habrochaites* não demonstrou alteração no NUE em ambas as condições de suplemento de N (OLIVEIRA, 2004).

2.4 Transporte de nitrogênio

A absorção de N presente no solo ocorre pelo sistema radicular (MARSCHNER, 2012). As formas de N encontradas no solo dependem do habitat em questão, mas em geral incluem N inorgânico (nitrato, amônio e N_2) e orgânico (ureia e aminoácidos) (CRAWFORD, GLASS, 1998). Em solos agricultáveis, o amônio (NH_4^+) e o nitrato (NO_3^-) são as formas de N mais representativas (MILLER et al., 2010). De acordo com a demanda de N pela planta, processos regulatórios de sinalização coordenam os mecanismos de absorção/transporte de N (LOQUÉ; von WIRÉN, 2004; NACRY et al., 2013). A homeostasia de N na planta é fundamentada no processo regulatório que o status desse próprio substrato (N) exerce nos mecanismos de absorção/transporte de N (LOQUÉ; von WIRÉN, 2004). Os fertilizantes nitrogenados utilizados na agricultura são aplicados principalmente na forma de uréia, geralmente em quantidades parceladas durante o ciclo da cultura. A uréia é rapidamente convertida em amônio ou em nitrato (WOOD et al., 2010). Grande parte do nitrato absorvido é transportada para a parte aérea, onde é reduzido a nitrito pela nitrato redutase (NR) no

citoplasma, sendo depois reduzido a amônio pela nitrito redutase (NiR) nos plastídeos e pela glutamina sintetase (GS) (LAM et al., 1996). O amônio derivado da redução do nitrato, ou resultante diretamente da absorção, é assimilado em aminoácidos via ciclo GS/GOGAT (Glutamina-2-oxoglutarato Aminotransferase) (LAM et al., 1996) (Figura 2).

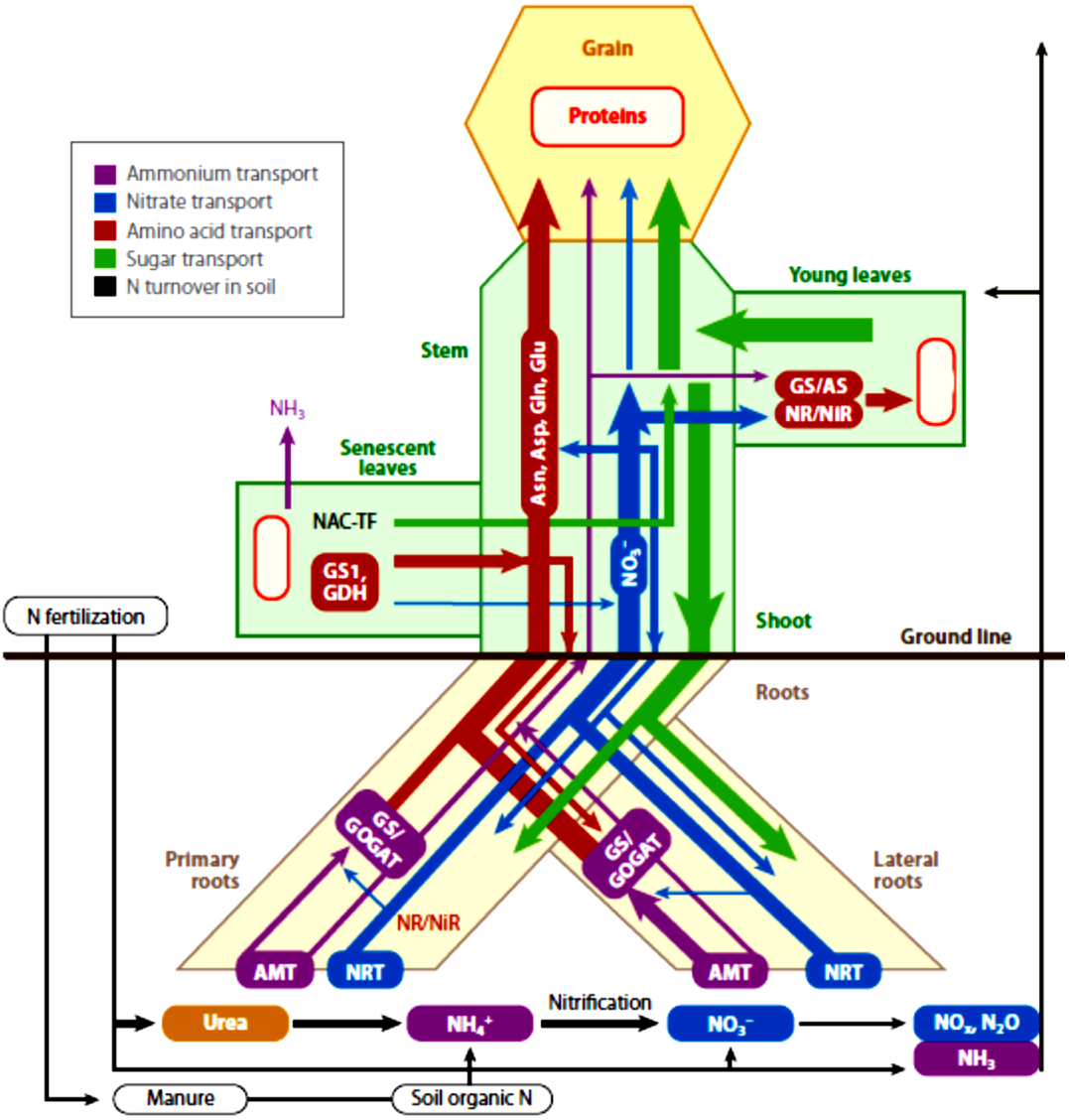


Figura 2 - Rotas esquemáticas de absorção de N da rizosfera, incluindo a fonte de fertilizante nitrogenado a ser adquirido, principalmente na forma de amônio e nitrato pelas raízes, transporte, assimilação e remobilização no interior da planta. Abreviações: AMT, ammonium transporter; AS, asparagine synthetase; Asn, asparagine; Asp, aspartate; GDH, glutamate dehydrogenase; Gln, glutamine; Glu, glutamate; GOGAT, glutamine-2-oxoglutarate aminotransferase; GS, glutamine synthetase; NAC-TF, certain transcription factors belonging to the NAC family; NiR, nitrite reductase; NR, nitrate reductase; NRT, nitrate transporter. (XU et al., 2012).

Em solos cultivados, a magnitude do N inorgânico pode variar na faixa de micromolar (μM) a millimolar (mM) (GLASS et al., 2001; MILLER et al., 2007). A aquisição de amônio e nitrato em plantas ocorre por meio de transportadores de membrana, que podem ser classificados quanto à afinidade por seu substrato. Os transportadores de alta afinidade (*High Affinity Transporter System* ou HATS) são responsáveis pela aquisição de N em concentrações menores que 1 mM, enquanto que os transportadores de baixa afinidade (*Low Affinity Transporter System* ou LATS) realizam o transporte de forma não saturável para concentrações de N superiores a 1 mM (GLASS et al., 2002). Em plantas modelo como *Arabidopsis thaliana, S. lycopersicum* e *Oryza sativa*, os principais transportadores que participam da absorção de N em alta afinidade (HATS) foram identificados (FRAISIER et al., 2000; CEREZO et al., 2001; LOQUÉ; von WIRÉN, 2004; YAN et al., 2011).

2.4.1 Transportadores de amônio (*AMTs - AMMONIUM TRANSPORTERS*)

Em plantas, os transportadores responsáveis pela absorção de amônio pertencem a família *AMT* (*AMMONIUM TRANSPORTERS*), e diversos membros já foram descritos para diversas espécies dicotiledôneas (GAZZARRINI et al., 1999; von WIRÉN et al., 2000; D'APUZZO et al., 2004) e monocotiledôneas (PLETT et al., 2010). O número de genes *AMTs* presentes nas espécies varia consideravelmente. Enquanto *A. thaliana* possui seis genes, e *L. japonicus* e *S. lycopersicum* possuem quatro genes membros, no genoma de *O. sativa* foram identificados 10 ortólogos a *AMTs* (von WIRÉN et al., 2000; SONODA et al., 2003), classificados nas subfamílias *AMT1* e *AMT2* (LOQUÉ; von WIRÉN, 2004).

O transporte de amônio via *AMTs* em raízes de arabidopsis ocorre de forma aditiva, sendo que as diversas proteínas transportadoras apresentam afinidades distintas pelo substrato (YUAN et al., 2007). Estudos de cinética de absorção com traçadores de ^{15}N-amônio em mutantes duplos de arabidopsis demonstraram que os transportadores *AMT1.1* e *AMT1.3* possuem maior capacidade para absorção de amônio, sendo responsáveis por 70% do amônio total absorvido pelas raízes (LOQUÉ et al., 2006). Além disso, ambos transportadores são regulados pelo status de N na planta. Sob condições de deficiência de N, os genes codificando os transportadores *AMTs* são induzidos na raiz, e sob condições de suficiência, os produtos da assimilação de N, como glutamina, regulam negativamente a expressão desses transportadores (LOQUÉ et al., 2006). Recentemente, a proteína de membrana AMT1.3 foi descrita como um componente essencial na sinalização para desencadear a morfologia de raiz dependente de amônio, o que não acontece com outros membros dessa família gênica (LIMA et al., 2010). Portanto, via *AMT1;3*, o amônio desencadeia uma resposta morfológica modulando o

desenvolvimento radicular de acordo com a concentração de N no ambiente (LIMA et al., 2010).

A superexpressão do transportador de amônio *AMT1.1* de arabidopsis em plantas de tabaco não aumentou a eficiência de absorção e nem o acúmulo de amônio nessas plantas quando cultivadas em solo (YUAN et al., 2007). Tais resultados indicam a existência de mecanismo de regulação pós-transcricional do gene do principal transportador de alta afinidade de amônio de acordo com o status nutricional da planta (YUAN et al., 2007). Outros estudos realizados sobre a proteína AMT1.1 demonstraram a existência de um mecanismo de regulação alostérica. Mediante a exposição ao amônio, a região C-terminal do transportador AMT1;1 interage com outras subunidades do trímero levando à inativação do complexo proteico, e consequentemente, à ausência de transporte de amônio (LOQUÉ et al., 2007). Essa resposta é dependente da concentração externa de amônio, o que sugere uma possível função do transportador AMT1.1 como um sensor externo de amônio em raízes de arabidopsis (LANQUAR et al., 2009).

Estudos funcionais identificaram os principais transportadores de membrana responsáveis pela aquisição de amônio demonstrando a localização de expressão e essencialidade da nutrição dessa forma inorgânica de N. Na planta modelo *A. thaliana*, os transportadores *AtAMT1.1* e *AtAMT1.3* são expressos principalmente em células da epiderme e córtex radicular, incluindo os pêlos radiculares. Além desses transportadores, a organização espacial e atividade conjunta de outros membros da família AMT1 são responsáveis pela homeostasia de amônio em raízes. O gene *AtAMT1.2* é expresso na endoderme e córtex das raízes, realizando a função desse carreador no transporte apoplástico dessa forma inorgânica de N (YUAN et al., 2007). O mutante quádruplo para transportadores de amônio de arabidopsis, defectivo nos genes *AMT1.1*, *AMT1.2*, *AMT1.3* e *AMT2.1*, apresenta ainda 10% de absorção de amônio em suas raízes quando comparado ao tipo selvagem. Essa capacidade de aquisição de N é devido a atividade da proteína transmembrana AMT1;5, a qual está localizada nas células da rizoderme e nos pêlos radiculares (YUAN et al., 2007).

Em outras espécies, membros da família *AMT1* atuam no transporte de amônio em diversos órgãos e tecidos. Em tomateiro, a expressão de *SlAMT1.1* também está localizada em pêlos radiculares e apresenta forte indução sob restrição de N, indicando sua importante função no processo de aquisição de amônio (LUDEWIG et al., 2002). No entanto, *SlAMT1.3* não apresenta expressão localizada em raízes, somente na parte aérea da planta (von WIRÉN et al., 2000). Contrariamente, em *L. japonicus*, *LjAMT1.1* possui maior expressão na parte

aérea (D'APUZZO et al., 2004). Esses resultados indicam que membros ortólogos da família AMT1 diferem quanto a sua localização de acordo com a espécie, atuando assim, na homeostase de amônio em diferentes processos fisiológicos (LOQUÉ, von WIRÉN, 2004).

O gene *SlAMT2*, isolado a partir de raízes de plantas de tomateiro foi funcionalmente identificado como transportador de alta afinidade de amônio (RUZICKA et al, 2010). Em estudos em hidroponia, *SlAMT2.1* foi induzido pelo aumento da concentração de NH_4^+ ao longo de 24 h, mas reprimido pelo aumento da concentração de NO_3^- após 24 h. A maior expressão de *SlAMT2.1* em resposta ao suplemento de N no solo ocorreu após 53 h da provisão, sugerindo indução de sua expressão na presença de NH_4^+ e repressão na exposição ao NO_3^-.

2.4.2 Transportadores de nitrato (*NRT - NITRATE TRANSPORTERS*)

O transporte de nitrato ocorre principalmente pela ação dos produtos da família gênica chamada *NRTs* (*NITRATE TRANSPORTERS*) (CEREZO et al., 2001). Em *Arabidopsis thaliana*, foram identificados 53 genes na família *NRT1* e sete na *NRT2* (TSAY et al., 2007). Os genes da família NRT1 são exclusivamente LATS, sendo a única exceção o transportador *AtNRT1.1* (CHL1), que possui dupla afinidade ao nitrato, podendo apresentar alta afinidade (µM) ou baixa afinidade (mM) dependendo d a disponibilidade de N e consequentemente do estado de fosforilação da proteína (LIU, 2003). Estudos em mutantes *nrt1.1* de arabidopsis demonstraram que uma proteína-quinase (CIPK23) regula NRT1;1 para o transporte de nitrato em baixa ou alta afinidade por meio de sua fosforilação (HO et al., 2009). Também em arabidopsis, *AtNRT1.2* foi descrito como sendo um cLATS, ou seja, sua expressão é constitutiva, diferente de *NRT1.1* que tem transcrição induzível dependendo do estado N (TSAY et al., 2007). Outro contraste entre estes dois transportadores é que *NRT1.1* é expresso na epiderme, córtex e metade da endoderme, enquanto *NRT1.2* foi detectado apenas na epiderme de tecido de raiz (TSAY et al., 2007). Por outro lado, a família de genes *NRT2* são todos HATS, responsáveis assim pela absorção de NO_3^- sob baixas concentrações (LIU et al, 2003; TSAY et al, 2007). *NRT1.1* e *NRT2.1* são os principais, uma vez que estão envolvidos no processo de aquisição de NO_3^- disponível no solo (FILLEUR et al., 1999). Contudo, a compreensão de como esses genes responde a disponibilidade NO_3^- é fundamental para fazer avançar a eficiência de uso de nitrogênio de plantas, incluindo a seleção de genótipos superiores.

O transportador de alta afinidade (HATS) *NRT2.1* tem sua expressão aumentada sob condições de déficit de N, sendo o responsável pela absorção de nitrato no solo (CEREZO et

al., 2001). Em arabidopsis, o principal transportador de nitrato, NRT1.1 foi caracterizado como sendo um sensor para o status de nitrato na raiz (LIU et al., 2003). *NRT1.1* está relacionado com a regulação da expressão do gene transportador de alta afinidade *NRT2.1* (MUÑOS et al., 2004). Outra sinalização dependente de NRT1.1 é o processo de alongamento de raízes laterais na presença de nitrato, que também é dependente do fator de transcrição *ANR1* (ZHANG, FORDE, 2000). Contudo a localização na membrana plasmática e a estabilidade do transportador *NRT2.1* é dependente da proteína transmembrana NAR2 (WIRTH et al., 2007), sendo um indício do nível de regulação pós-transcricional para esse transportador. No mutante *nrt1.1* de arabidopsis, a resposta de alongamento das raízes laterais à exposição local de nitrato é perdida, o que sugere então a participação desse transportador na sinalização de respostas morfológicas dependentes de nitrato (REMANS et al., 2006).

Até o momento foram identificados em tomateiro apenas genes da família dos transportadores de nitrato: *SlNRT1.1*, *SlNRT1.2*, *SlNRT2.1*, *SlNRT2.2* e *NAR2*. Todos são expressos em raízes e induzidos na presença de nitrato, mas nenhum dos genes foram funcionalmente estudados (FU et al., 2015).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e cultivo das plantas

Foram utilizadas a cultivar ‘Santa Clara’ de tomateiro (*Solanum Lycopersicum*) e as espécies selvagens *S. pimpinellifolium* ‘WV700’ e *S. habrochaites* ‘CNPH420’. O material vegetal foi gentilmente cedido pelo Prof. Lázaro E. P. Peres do laboratório de Controle Hormonal e Desenvolvimento Vegetal do Esalq/USP, Piracicaba, SP. As sementes foram germinadas em potes contendo areia úmida e foram transferidas para sistema de hidroponia com solução nutritiva composta de 1 mM NH_4NO_3, 1 mM KH_2PO_4, 1 mM $MgSO_4$, 250 µM K_2SO_4, 250 µM$CaCl_2$, 100 µM Na-Fe-EDTA, 50 µM KCl, 50 µM H_3BO_3, 5 µM $MnSO_4$, 1 µM $ZnSO_4$, 1 µM$CuSO_4$ e 1 µM $NaMoO_4$, com pH ajustado para 6,0 com KOH (Figura 3). A solução nutritiva foi aerada por meio de compressor com a frequência de 30 min h^{-1}, e renovada semanalmente.

Figura 3. Sistema de hidroponia com plantas de tomateiro dos genótipos *S. lycopersicum* cv ‘Santa Clara’, *S. pimpinellifolium* e *S. habrochaites*.

3.2 Ensaios de influxo rápido de ^{15}N

Para os experimentos de provisão de N e de cinética de absorção de N pela raiz dos genótipos de tomateiro, foram realizados ensaios de influxo rápido de ^{15}N (*Short Term Uptake*; LOQUÉ et al., 2006). Para se estimar o influxo rápido, primeiramente, as raízes dos três genótipos de tomateiro foram lavadas em solução de 1 mM $CaSO_4$ (sulfato de cálcio) com o intuito de eliminar N apoplástico. Em seguida, as plântulas foram colocadas em 0,8 L de solução nutritiva, contendo ^{15}N-amônia ou ^{15}N-nitrato na concentração respectiva de cada experimento (cinética de absorção de N ou provisão de N) e 1 mM de MES [ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico monohidratado] pH 5,8 por um período de 10 mim, seguido por 1 min em solução de 1 mM $CaSO_4$ para a lavagem das raízes (LOQUÉ et al., 2006).

Após esses procedimentos, as raízes foram cortadas e separadas, uma parte reservada para extração de RNA e a outra submetida a processo de secagem, sendo mantidas a 50°C até peso constante para posteriores análises de ^{15}N. As amostras de raízes foram analisadas para ^{15}N no espectrômetro de massas por ionização por impacto de elétrons - IRMS (ANCA GSL 20/20 ou ANCA SL da Sercon, Inglaterra). As determinações nas amostras altamente enriquecidas foram realizadas em espectrômetro de massas ATLAS MAT CH4 (Alemanha) de fluxo molecular, realizadas pelo Prof. Dr. José Albertino Bendassolli no laboratório de Isótopos Estáveis no CENA.

3.3 Estudo da cinética de absorção de N-amônio ou N-nitrato pela raiz por influxo rápido de ^{15}N de acordo com a disponibilidade de N

Para o estudo da cinética de absorção de N pela raiz dos genótipos de tomateiro de acordo com a disponibilidade de N, as plantas dos três genótipos foram cultivadas em solução nutritiva por 30 d em condição constante de suficiência de N (1 mM NH_4NO_3), quando foram submetidas por 72 h a duas concentrações de N, sendo uma concentração limitante (-N) ou uma concentração suficiente (+N, 1 mM NH_4NO_3). Após esse período, as raízes dos genótipos de tomateiro foram submetidas ao ensaio de influxo rápido de ^{15}N.

Para o experimento de cinética de N-amônio foi utilizado solução de $(^{15}NH_4)_2SO_4$ a 40% em átomos de ^{15}N com concentrações na faixa de alta-afinidade (0,03 mM; 0,1 mM; 0,2 mM; 0,3 mM e 0,5 mM de ^{15}N). Para o experimento de cinética de N-nitrato foi utilizado solução de $K^{15}NO_3$ a 40% em átomos de ^{15}N com concentrações na faixa de alta-afinidade (0,03 mM; 0,1 mM; 0,2 mM; 0,3 mM e 0,5 mM de ^{15}N).

Após esse procedimento, as raízes foram cortadas e separadas, uma parte reservada para extração de RNA e a outra submetidas a processo de secagem, sendo mantidas a 50°C até peso constante para posteriores análises de ^{15}N.

3.4 Estudo de provisão de N-amônio ou N-nitrato pela raiz

Para os experimentos de provisão de N, plantas dos três genótipos foram cultivadas por 30 d em solução nutritiva sob condição constante de suficiência de N (1 mM NH_4NO_3), quando foram submetidas a deficiência de N por 72 h. Após esse período, foi realizada a suplementação de 2 mM de N (amônio ou nitrato) e submetidas ao ensaio de influxo rápido de ^{15}N em solução nutritiva contendo 0,2 mM de ^{15}N marcado nos tempos 0, 2, 4, 6 e 24 h.

No experimento de provisão de N-amônio, as plantas de tomateiro foram suplementadas com 2 mM de NH_4Cl após 72 h de deficiência de N e submetidas ao ensaio de influxo rápido com solução de 0,1 mM de $(^{15}NH_4)_2SO_4$ a 40% em átomos de ^{15}N nos tempos 0, 2, 4, 6 e 24 h. Para o experimento de provisão de nitrato as plantas foram suplementadas com 2 mM de KNO_3 após 72 h de deficiência de N e submetidas ao ensaio de influxo rápido com solução de 0,2 mM de $K^{15}NO_3$ a 40% em átomos de ^{15}N nos tempos 0, 2, 4, 6 e 24 h

Após esse procedimento, as raízes foram cortadas e separadas, uma parte reservada para extração de RNA e a outra submetidas a processo de secagem, sendo mantidas a 50°C até peso constante para posteriores análises de ^{15}N.

3.5 Desenho de iniciadores para genes associados ao processo de absorção de N

Os iniciadores foram desenhados com base em genes ortólogos da família de transportadores de amônio (*AMTs- AMMONIUM TRANSPORTER*) e nitrato (*NRTs-NITRATE TRANSPORTERS*) obtido a partir das sequencias de tomateiro (Tabela 1) identificados no banco de dados “Sol genomics network” (http://solgenomics.net/). Os iniciadores foram elaborados utilizando-se o programa *Primer3*, designando-se a temperatura de dissociação (T_m) entre 59 e 61ºC, e o tamanho de amplicons entre 85 a 145 pares de bases (Tabela 1). O par de iniciadores de cada gene foi testado no programa *NetPrimer* para estabilidade, T_m, conteúdo de GC (%) e interações entre iniciadores.

Tabela 1. Sequências de iniciadores (*primers*) relativos aos genes ortólogos que codificam proteínas transportadoras de amônio (*AMTs-AMMONIUM TRANSPORTER*) e nitrato (*NRTs-NITRATE TRANSPORTERS*) identificados no banco de dados "Sol genomics network" (http://solgenomics.net/), com respectivas identificações de acesso (SolGenomics ID)e o gene referência empregado (Ubiquitina3 – *SlUBQ3*), com seus respectivos tamanhos esperado de amplicons, utilizados para análise quantitativa de transcritos reversos.

Gene	**Sol GenomicsID**	**Sequência dos iniciadores**	**Tamanho do amplicon (pb)**
SlAMT1.1	Solyc09g090730.1.1	F-ATGTGGGTTCGTAGCGGCTTTAGT R- TGCTGCTTCAAGTGGATCGTCGTA	85
SlAMT1.2	Solyc04g050440.2.1	F-TCCGTTTTTGTGGCTGCTTT R-TGCTGTGTGGCAACCTTTGT	105
SlAMT2.1	Solyc04g050440.2.1	F- TTGTACCGCCGCTCTGACAACTTT R- CATGGCTCAACAACTGCACAACCT	132
SlNRT1.1	Solyc08g078950.2.1	F- TCCGTTTTTGTGGCTGCTTT R- GCTTTTTTATTTCCATCAC	104
SlNRT2.1	Solyc06g074990.1.1	F- TCCAGTCAAGGGAACGGAAGAACA R- TTGGTTCCGCACCAACCCCA	145
SlNRT2.2	Solyc06g074990.1.1	F- CACAGAGGCAGAGAGGCAAA R-CACCAAATTTGACACCAAA	120
SlNAR2	Solyc03g112100.2.1	F- CTCACGCTCAAGTGGTCCTT R- CTCCACGCACGGTCTTTTTG	116
SlUBQ3	Solyc01g056940.2.1	F-ACCAAGCCAAAGAAGATCAAGCACAA R-TGAACCTTTCCAGTGTCATCAACCTT	108

3.6 Extração de RNA e síntese de cDNA

RNA total das amostras (100 mg) de raízes mantidas em ultrafreezer -80ºC foi extraído utilizando-se o método TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA). As amostras foram maceradas em N líquido e transferidas para um microtubo de 2 mL, onde foi adicionado 1 mL do reagente TRIzol para cada 100 mg de amostra. Os tubos foram vortexados e após cinco min à temperatura ambiente foram centrifugados a 10.000 *g* por 15 min à 4ºC. Ao sobrenadante adicionou-se 200 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v)

e procedeu-se uma nova centrifugação nas mesmas condições anteriores. Houve nova retirada do sobrenadante, adição de 500 µL de isopropanol por amostra e homogeneização por inversão dos tubos. Após 10 min à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 10.000 *g* por 10 min à 4ºC e o sobrenadante foi descartado. Os precipitados (*pellets*) foram lavados com 1 mL de 75% etanol (H_2O DEPC inativa 0,01%) e centrifugados a 10.000 *g* por 5min à 4ºC. O sobrenadante foi removido e a lavagem foi repetida por mais duas vezes. Por fim, houve a secagem do *pellet* à temperatura ambiente e ressuspensão das amostras em 20 µL de H_2O 0,01% DEPC inativa. O RNA total foi quantificado em NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) e sua integridade confirmada via eletroforese. Após a quantificação, 2 µg do RNA de cada amostra foi tratado empregando 1 U de DNAse I em tampão apropriado, 2 U de *RiboLock* (Thermo Scientific) em reação incubada a 37ºC por 30 min. A reação foi parada com a adição de 5 mM EDTA, e incubada à 65ºC por 10 min. Para a síntese de cDNA, amostras de 1 µg de RNA total tratado com DNase e o oligo dT (0,5 µg μL^{-1}) foram desnaturadas a 65°C por 10 min, sendo incubadas a 4°C por 2 min, seguido da adição de 5x tampão da enzima RT, 1 mM dNTP, 20 U de *RiboLock* (Fermentas) e 200 U da enzima *RevertAid* (Thermo Scientific) em volume final de 10 µL. A reação foi então incubada a 55ºC por 1 h, seguida de 70ºC por 10 min e a 4ºC por 2 min. Finalmente, adicionou-se 5 U de RNAse H (Thermo Scientific) mantendo-se a reação a 37ºC por 20 min, resfriando por fim até 4ºC.

3.7 Análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

As reações continham 5 µL de KAPA SYBR FAST (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EUA), 0,2 µM de cada iniciador, 1 µL do cDNA 1:10 (v/v) e água Milli-Q estéril para um volume final de reação de 10 µL. A análise de RT-qPCR incluíram 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, 60/62ºC 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 (*quantification cycle*) foram utilizados para determinar a diferença da expressão gênica, de acordo com método "Delta Delta": razão $=2^{-\Delta(\Delta Cq)}$ sendo $\Delta C_Q = C_Q$ (gene alvo) – C_Q (gene referência) e o $\Delta = \Delta C_Q$ (tratamento) - ΔC_Q (controle). Para todos os experimentos o gene *UBQ3* foi utilizado como gene de referência (Tabela 1).

3.8 Clonagem do gene *SlAMT1;1* e sua região promotora nos três genótipos de tomateiro

A partir da sequência do gene *SlAMT1;1* e de sua região promotora de *S. lycopersicum* cv. 'Heinz' obtidas no banco de dado "Sol Genomics Network" (http://solgenomics.net/), foram desenhados iniciadores para amplificação da região codificadora do gene e da região promotora dos três genótipos estudados (Tabela 2). A reação de amplificação foi constituída com uma unidade da enzima *Taq* polimerase *High Fidelity* (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EUA), tampão especifico da enzima, 0,3 mM de dNTP, 0,3 µM de cada iniciador e 25 ng do DNA molde de cada genótipo em reação de 25 µL. Os ciclos foram desnaturação inicial à 95ºC por 3 min, 35 ciclos de 98ºC por 20 s, 62ºC por 15 s e 72ºC por 100 s para o gene ou 180 s para a região promotora, com extensão final de 72ºC por 4 min em ambos os casos. Em seguida os produtos de amplificação foram clonados em vetor pGEM-T*Easy (*Promega, Madison, WI, EUA*)* e depois transformada por eletroporação em *E. coli* DH5α eletrocompetente. As bactérias foram crescidas em meio LB (Meio Luria-Bertani - 10 g L^{-1} Triptona; 5 g L^{-1} Extrato de Levedura; 10 g L^{-1} NaCl) por toda a noite e plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (100 mg L^{-1}) mais X-Gal (40µg/mL) e IPTG (0,1 mM). Colônias transformadas positivamente (colônias brancas) foram coletadas e crescidas novamente em meio LB para purificação dos plasmídeos por lise alcalina. Após esse passo, as amostras de plasmídeos foram enviadas para sequenciamento no "Laboratório de Biotecnologia Animal" (ESALQ/USP). Para comparação das sequências foi utilizado o programa "Geneious" (http://www.geneious.com/) e "Matinspector" (http://www.genomatix.de/).

Tabela 2. Sequência de iniciadores para amplificação do gene *SLAMT1;1* e sua região promotora em *S. lycopersicum*, com seus respectivos tamanhos esperado do amplicons, utilizados para sequenciamento.

Gene	Sol GenomicsID	Sequência dos iniciadores	Tamanho esperado do amplicon (pb)
SlAMT1.1	Solyc09g090730.1.1	F- ATGGCTTGTTCCGTCGATAC R- AGTTGAGGTTGTTGGTTCAATTCT	1519
ProSlAMT1.1	Solyc09g009740.1.1	F- AATGGTGCACAATTAAAGTTAAGC R- AGGAACGGAGCGAGAGTATC	2231

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Evidências de variação genética natural para eficiência no uso de nitrogênio (NUE) já foram descritas para tomateiro (OLIVEIRA, 2004). Diversos genótipos de tomateiro, como as cultivares de *S. lycopersicum* 'Sol da Manhã' e 'Santa Clara', assim como os genótipos selvagens *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*; *S. pimpinellifolium*; *S. galapagense; S. neorickii; S. habrochaites* e *S. pennellii*, foram cultivados em condições de suficiência (15 mM N) ou limitantes de N (3 mM) e avaliados quanto a produção de biomassa e concentração total de N na planta para determinação de NUE (OLIVEIRA, 2004). A cultivar 'Santa Clara' apresentou alto NUE em condições de alto N, enquanto que o genótipo selvagem *S. pimpinellifolium* apresentou a melhor eficiência no uso desse nutriente entre os genótipos estudados quando cultivado em condições limitantes de N (OLIVEIRA, 2004). Ainda, o genótipo selvagem *S. habrochaites* não apresentou grande alteração do NUE sob ambas as condições de suplemento de N (OLIVEIRA, 2004). Esses resultados indicam, portanto, a existência de variação genética natural para NUE na seção *Lycopersicum* do gênero *Solanum*. Porém, os aspectos fisiológicos e moleculares dessa variação ainda permanecem por ser elucidados. Considerando que o processo de NUE reflete a eficiência de absorção de N do solo e a eficiência de utilização do N durante o desenvolvimento da planta (HIREL et al., 2007), experimentos de caracterização fisiológicas e molecular do processo de absorção de N em raízes de genótipos contrastantes para NUE foram realizados. Para tal, os genótipos *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara', *S. pimpinellifolium* e *S. habrochaites* foram investigados no presente trabalho.

4.1 Análise da cinética de absorção de N-amônio pela raiz de tomateiro

Para avaliação da cinética de absorção da fonte inorgânica de N-amônio pela raiz dos genótipos contrastantes para eficiência no uso de nitrogênio (NUE), plantas de *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara', *S. pimpinellifolium* e *S. habrochaites* foram crescidas em solução nutritiva suficientes de N (1 mM NH_4NO_3) por 30 d, quando foram submetidas a tratamento de suficiência de N (+N, 1 mM NH_4NO_3) ou ausência de N (-N) por 72 h, de modo a refletir o processo adaptativo da aquisição de N de acordo com sua disponibilidade solo (von WIRÉN et al., 2000; LOQUÉ; von WIRÉN, 2004; LOQUÉ et al., 2006). Em seguida, foram realizados ensaios de influxo rápido (LOQUÉ et al., 2006) com ^{15}N-$(NH_4)_2SO_4$, na faixa de alta-afinidade (0,03 mM; 0,1 mM; 0,2 mM; 0,3 mM e 0,5 mM de ^{15}N). As concentrações

de N na faixa de alta afinidade foram escolhidas com base na indução do transporte de alta afinidade de N quando sob deficiência (< 1 mM) previamente descritos (LOQUÉ et al., 2006).

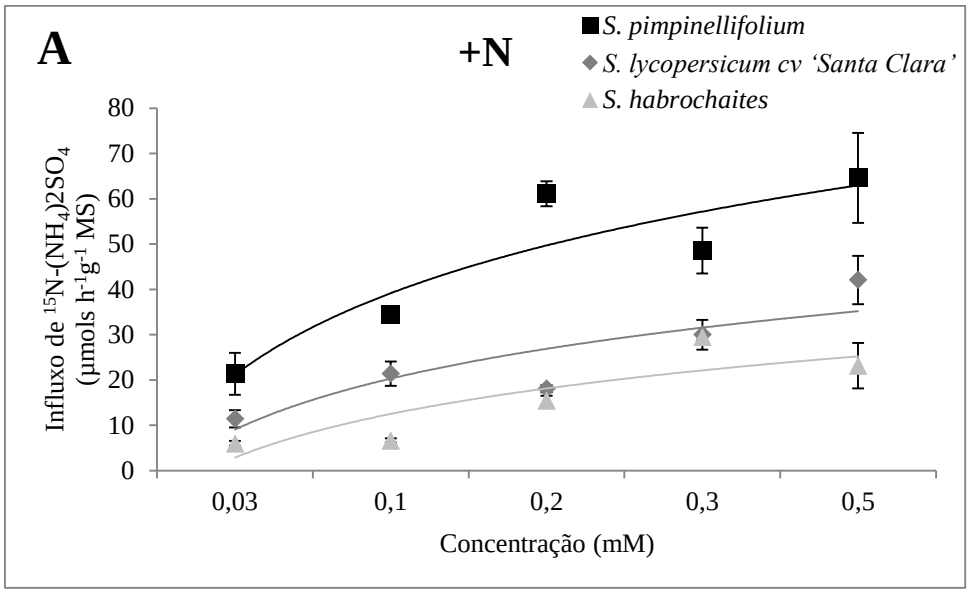
Os valores de absorção de N marcado pelas raízes dos três genótipos avaliados indicam a maior aquisição de amônio de acordo com o aumento da concentração externa de N de 0,03 a 0,5 mM de ^{15}N-amônio nas duas condições de N avaliadas (+N ou –N) (Figura 4A e B), o que reflete um processo de redução da atividade do sistema de alta afinidade dos transportadores de amônio (GAZZARRINI et al., 1999; von WIRÉN et al., 2000, LOQUÉ; von WIRÉN, 2004).

Em condições de suficiência de N (+N), houve diferenças significativas no influxo de ^{15}N-amônio entre os genótipos para todas as concentrações analisadas (Figura 4A). O genótipo *S. pimpinellifolium* demonstrou absorção significativamente maior de ^{15}N-amônio em todas as concentrações analisadas, apresentando cerca de 80% a mais de influxo em relação aos outros dois genótipos. A cultivar *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' apresentou absorção significativamente maior comparada a *S. habrochaites* nas concentrações de 0,03 mM, 0,1 mM, e 0,5 mM (Figura 4A).

Na maioria das dicotiledôneas, durante a limitação de N, ocorre o processo de aquisição de fontes inorgânicas de N através da regulação dos transportadores de alta-afinidade que são induzidos de forma temporal em raízes quando comparado à condição de suficiência de N (GAZZARRINI et al., 1999; von WIRÉN et al., 2000; LOQUÉ et al., 2006). Em relação à condição de deficiência de N (-N), o influxo de ^{15}N-amônio em raízes dos três genótipos foi muito superior e apresentou indução crescente, com valores absolutos 5 vezes maior quando comparado a condição de suficiência de N (+N) (Figura 4A e B), o que demonstra que o processo de regulação pelo status de N é um mecanismo conservado entre os genótipos avaliados. No entanto, houve diferenças para a aquisição de amônio entre os genótipos quando cultivados por 72 h sob restrição de N (-N). O genótipo selvagem *S. pimpinellifolium* apresentou 35% mais absorção de N comparado aos outros genótipos nas concentrações acima de 0,1 mM (Figura 4B), e o influxo de ^{15}N-amônio ainda permaneceu alto nas concentrações superiores avaliadas. *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. habrochaites* não apresentaram diferença significativa para o influxo de amônio em nenhuma das concentrações (Figura 4B). Portanto, sob deficiência de N, *S. pimpinellifolium* apresentou maior capacidade de aquisição de amônio em suas raízes quando comparado aos outros dois genótipos.

Esses resultados demonstram que o genótipo selvagem *S. pimpinellifolium* apresenta maiores níveis de influxo de amônio quando submetido a condições contrastantes de

disponibilidade de N como suficiência (+N) ou limitação (-N), em relação a *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. Habrochaites*, indicando que o transporte de alta-afinidade de amônio é maior em *S. pimpinellifolium.*



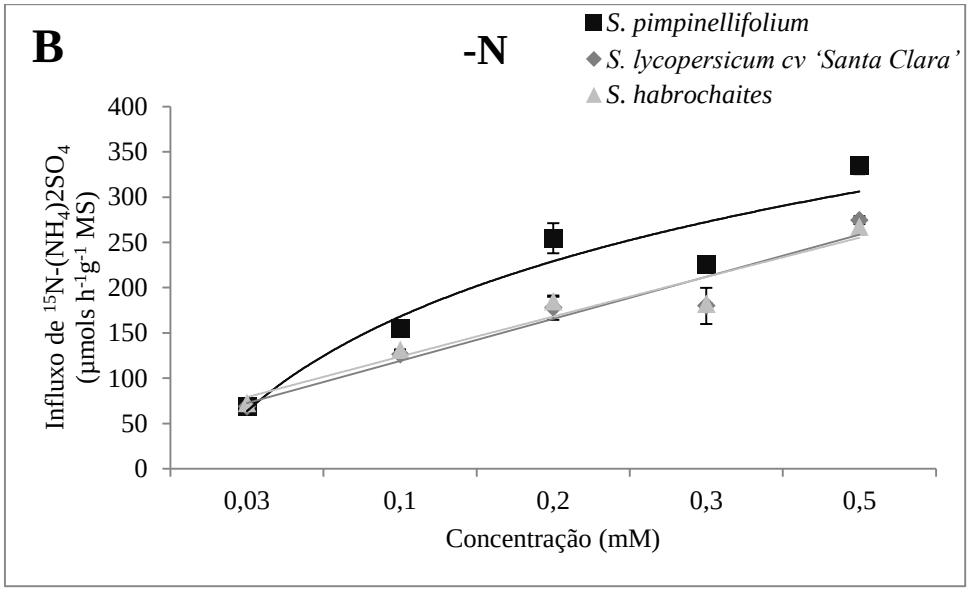


Figura 4 - Influxo de ^{15}N-$(NH_4)_2SO_4$ em raízes de tomateiro. Plantas foram cultivadas por 30 dias em condições de N suficientes (1 mM NH_4NO_3) e após esse período foram submetidas a tratamento: (A) sob suficiência de N (1 mM NH_4NO_3); ou (B) sem a adição N (-N) por 72 horas. O ensaio de cinética com $(^{15}NH_4)_2SO_4$ nas concentrações 0,03 mM; 0,1 mM; 0,2 mM; 0,3 mM e 0,5 mM de ^{15}N foram realizados por 10 min em raízes dos genótipos *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara', *Solanum pimpinellifolium* e *Solanum habrochaites*. Barras indicam ±SE, *n*=5 plantas.

A família de genes denominada *AMT*s (*AMMONIUM TRANSPORTERS*) é responsável pela absorção de amônio em diversos tecidos e órgãos (GAZZARRINI et al., 1999). Em tomateiro, arroz (*Oryza sativa*) e *Arabidopsis thaliana*, as sequências gênicas para os principais transportadores que participam da absorção de N na faixa de alta afinidade (HATS) já foram identificadas (FRAISIER et al., 2000; CEREZO et al., 2001; LOQUÉ & von WIRÉN, 2004). O transporte de amônio via *AMTs* em raízes de arabidopsis ocorre de forma aditiva, sendo que, as diversas proteínas-transportadoras apresentam afinidades distintas pelo substrato (YUAN et al., 2007). Na caracterização fisiológica de mutantes duplos e quádruplos de arabidopsis foi identificado que AMT1.1 e AMT1.3 são os principais transportadores responsáveis pela aquisição de amônio em raízes (YUAN et al., 2007). Ambos transportadores são regulados pelo status de N na planta, apresentando indução sob condições de deficiência de N, e sob condições de suficiência, os produtos da assimilação de N, como glutamina, regulam negativamente a expressão desses transportadores (LOQUÉ et al., 2006). Os ortólogos a esses transportadores de membrana foram identificados em tomateiro, sendo eles o *SlAMT1.1*, *SlAMT1.2* e *SlAMT1.3* (LOQUÉ & von WIRÉN, 2004). Porém, em tomateiro, a expressão do *SlAMT1.3* nas raízes sob deficiência de N não foi detectada, sendo preferencialmente expresso na parte aérea (von WIRÉN et al., 2000). Portanto, diferentemente de arabidopsis, *SlAMT1.1* e *SlAMT1.2* são os principais transportadores responsáveis pela aquisição de amônio em raízes de tomateiro.

Para correlacionar os níveis de expressão dos membros *AMTs* com o influxo de amônio em raízes de tomateiro sob condições contrastantes de N, foram realizadas análises do perfil transcricional dos distintos genes *AMTs* por análise quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) em raízes dos três genótipos.

Similar ao resultado de influxo de ^{15}N-amônio (Figura 4A e B), a deficiência de N levou ao acúmulo de transcritos de *SlAMT1.1* em raízes dos três genótipos quando comparado a condição de suficiência de N (Figura 5A). Diferenças significativas para acúmulo de transcritos do gene *SlAMT1.1* foram identificadas entre os genótipos. Em condições de suficiência de N (+N), o gene *SlAMT1.1* foi 2 vezes mais expresso em raízes *S. pimpinellifolium* do que em raízes *S. lycopersicum* cv ‘Santa Clara’, seguido pelos menores níveis de expressão desse gene no genótipo *S. habrochaites* (Figura 5A). Além do evidente maior acúmulo de transcritos de *SlAMT1.1* quando as plantas foram cultivadas sob deficiência de N, a expressão de *SlAMT1*.1 apresentou-se cerca de 2,5 vezes maior no genótipo selvagem *S. pimpinellifolium* quando comparado com o *S. lycopersicum* cv ‘Santa Clara’. No entanto, *S.*

lycopersicum cv ‘Santa Clara’ e *S. habrochaites* apresentaram níveis de expressão para *SlAMT1.1* não significativamente distintos na condição de limitação de N (-N) (Figura 5A). Esses resultados indicam que a regulação transcricional de *SlAMT1.1* de acordo com o status de N é similar entre os genótipos, e corrobora com a regulação descrita em estudos prévios em arabidopsis e tomateiro (GAZZARRINI et al., 1999; von WIRÉN et al., 2000). Ainda, os maiores níveis de indução de *SlAMT1.1* em *S. pimpinellifolium* quando comparados aos genótipos *S. lycopersicum* cv ‘Santa Clara’ e *S. habrochaites* em ambas condições de disponibilidade de N sugerem o envolvimento deste gene nos maiores níveis de aquisição de amônio, de acordo com o estudo de cinética de ^{15}N (Figuras 4 e 5A).

De acordo com von Wirén (2000) os transportadores *SlAMT1.1* e *SlAMT1.2* apresentam maior nível de expressão em raízes. Estudos de expressão genica desses transportadores em raízes de tomateiro indicam que o nível de transcritos do gene *SLAMT1.2* aumentam sob tratamento de provisão de N com fontes de amônio ou nitrato. Em contraste, o nível de transcritos do gene *SLAMT1.1* demonstrou-se preferencialmente induzido sob tratamento de limitação de N.

A expressão do gene codificador do transportador *SlAMT1.2* também foi diferencialmente regulada entre os genótipos de tomateiro. Sob suficiência de N, *S. pimpinellifolium* apresentou duas vezes mais acúmulo de transcritos para esse gene do que a *S. lycopersicum* cv ‘Santa Clara’, seguido pelos menores níveis de acúmulo em *S. habrochaites* (Figura 5B). Já sob deficiência de N (-N), *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* cv ‘Santa Clara’ apresentaram o mesmo nível de transcritos de *SlAMT1.2*, enquanto que *S. habrochaites* apresentou os menores níveis de transcritos quando comparado aos outros dois genótipos (Figura 5B). Esses resultados indicam que *SlAMT1.2* é predominante mais expressos em *S. pimpinellifolium* apenas sob condições de suficiência de N, mas não sob deficiência de N.

Outro transportador da família *AMT* também expresso em raízes de tomateiro é o *SlAMT2.1* (RUZICKA et al, 2010). A expressão do ortólogo do membro da subfamília *AMT2* foi avaliada nos três genótipos de tomateiro. Na análise quantitativa de transcritos reversos, não foi possível observar diferença no acúmulo de transcritos do transportador *SlAMT2.1* sob suficiência de N (+N) entre *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* cv ‘Santa Clara’ (Figura 5C), mas ambos foram superiores à *S. habrochaites*. Por sua vez, sob a deficiência (-N), o genótipo *S. lycopersicum* cv ‘Santa Clara’ obteve a maior acúmulo de transcritos de *SlAMT2.1*, 2 vezes mais do que em *S. pimpinellifolium* (Figura 5C). Comparado a esses dois genótipos, *S. habrochaites* apresentou os menores níveis de expressão para o gene *SlAMT2.1*(Figura 5C). A expressão do transportador em *S. habrochaites* não foi induzida em

nenhum dos tratamentos. Esses resultados indicam que *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' apresenta maior acúmulo de *SlAMT2.1* quando compara *S. Pimpinellifolium*, apenas quando N é limitante.

Em arroz, *OsAMT2.1* é expresso em raízes e parte aérea, porém sua expressão é constitutiva, não sendo regulado por formas inorgânica de N (SUENAGA et al., 2003). Por sua vez, *AtAMT2.1* é induzido após 3 dias de deficiência de N e seus transcritos são reprimidos após a adição de N em raízes em arabidopsis (SOHLENKAMP, 2002); o mesmo padrão de expressão pode ser observado para os genótipos tomateiro (Figura 5C). Apesar da expressão de *AMT2.1* ocorrer em raízes, sua função fisiológica ainda permanece desconhecida. Estudos de influxo de ^{15}N em mutantes triplos e quádruplos de arabidopsis para *AMTs* não identificaram atividade de absorção de amônio para *AMT2.1* em arabidopsis (YUAN et al., 2007). Portanto, a contribuição desse gene para o processo de aquisição em amônio em raízes tomateiro ainda é desconhecida.

Considerando que *SlAMT1.1* e *SlAMT1.2* são os principais genes codificadores de transportadores de amônio responsáveis pela aquisição de fonte de N inorgânico em raízes de tomateiro (von WIRÉN et al., 2000), a análise quantitativa do perfil transcricional nos três genótipos indicam que *SlAMT1.1* e *SlAMT1.2* são mais expressos em *S. pimpinellifolium* seguido por *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara', sendo que os menores níveis de expressão foram detectados em raízes de *S. habrochaites*. A expressão desses dois transportadores parece ser essencial para maior aquisição de amônio em condições de suficiência de N (+N). Esse fenômeno pode ser observado através dos dados demonstrados pelo influxo de ^{15}N (Figura 4). No entanto, em *S. pimpinellifolium*, a contribuição de *SlAMT1.1* para o influxo de N parece ser mais relevante que *SlAMT1.2* quando submetidos a condições limitantes de N (-N).

Enquanto a expressão de ambos os transportadores parecem ser fundamentais para a maior aquisição de amônio demonstrado pelo influxo de ^{15}N em condições de suficiência de N (+N) em *S. pimpinellifolium*, a contribuição de *SlAMT1.1* parece ser mais relevante do que *SlAMT1.2* em condições de deficiência de N (-N). Tal diferença pode ser explicada pela regulação desses transportadores. *SlAMT1.1* é induzido em condições de limitação de N (-N), enquanto que *SlAMT1.2* é principalmente regulado na presença de N (+N) (von WIRÉN et al., 2000). Portanto, distintos transportadores da subfamília *AMT1* regulam a maior capacidade de adquirir amônio no genótipo *S. pimpinellifolium* comparado aos genótipos com menor influxo dessa fonte de N investigados aqui, *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. habrochaites*.

Ainda, a regulação transcricional diferenciada desses *AMTs* no genótipo *S. pimpinellifolium* parece possuir um papel fundamental para a maior absorção de amônio. No entanto, ainda resta determinar se a regulação diferencial desses *AMTs* entre os genótipos de tomateiro é mantida de acordo com status de N. Para verificar essa hipótese, experimentos de provisão de amônio foram realizados nas raízes dos três genótipos.

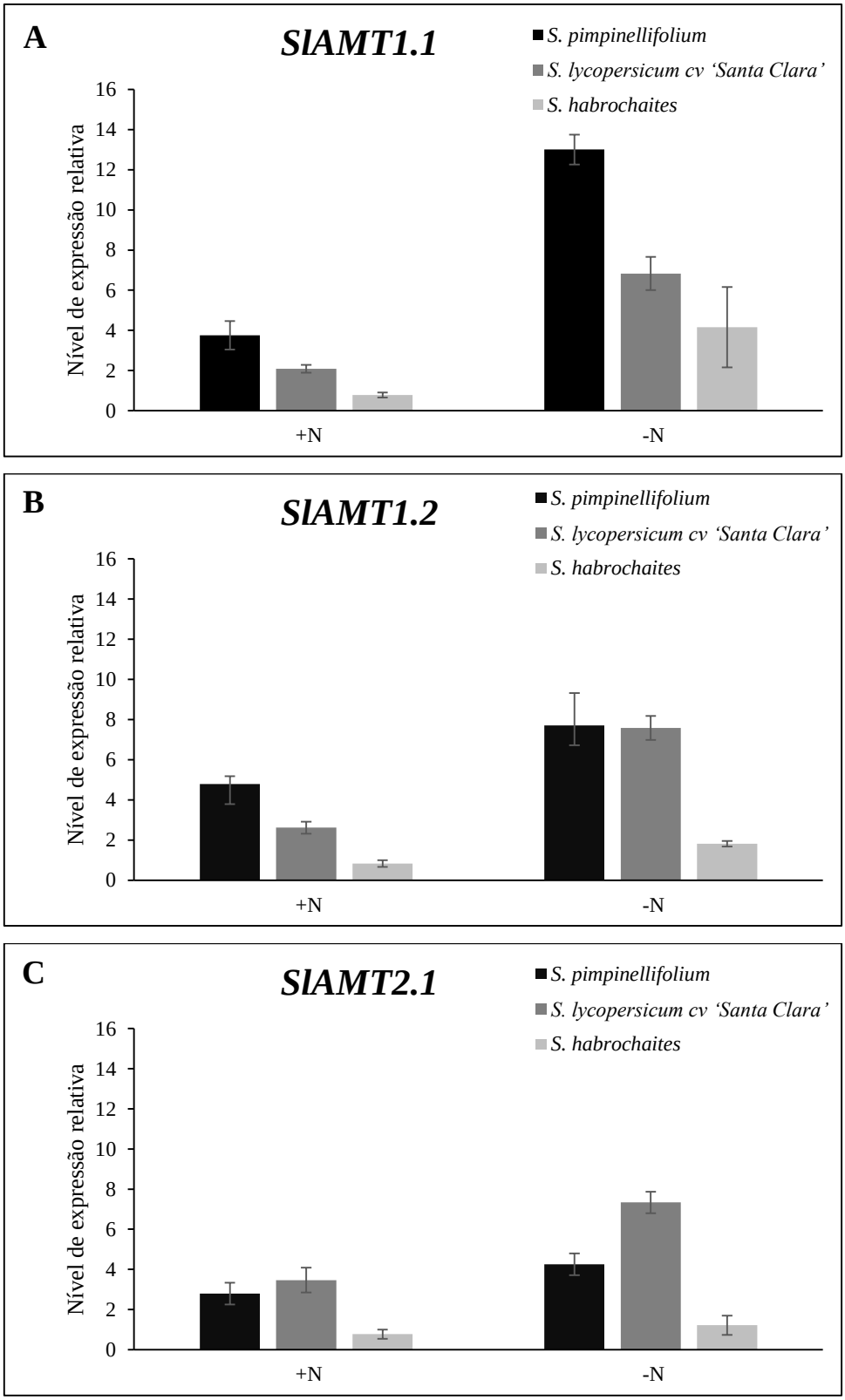


Figura 5. Análise quantitativa de transcritos por RT-qPCR de três genes *AMTs* (*AMMONIUM TRANSPORTERS*) nas raízes de tomateiro. As plantas foram cultivadas por 1 mês em condições de N suficientes (1 mM NH_4NO_3) e após esse período, foram submetidas a tratamento sob suficiência de N (1 mM NH_4NO_3, esquerda) ou limitação de N por 72 h (-N, direita). O acúmulo de transcritos foi padronizado para a amostra de *S. habrochaites* sob deficiência de N. Barras indicam ±SE, *n*= 3 réplicas biológicas.

4.2 Regulação do transporte de amônio em raízes de tomateiro submetidas à provisão de N

Na planta modelo *Arabidopsis thaliana*, foi descrito o mecanismo de alterações alostéricas em trímeros de transportadores AtAM1.1 (LOQUÉ et al., 2007). A percepção de concentrações de amônio maiores que 50 µM desencadeiam a fosforilação da Treonina 460 (T460) do C-terminal nos transportadores, o que interrompe o transporte de amônio e evita uma entrada excessiva dessa fonte de N, que poderia resultar em toxidez (LANQUAR et al., 2009). A regulação do transporte de amônio sob condições de suficiência de N poderia ocorrer por meio da percepção do aumento das concentrações externas de amônio por uma proteína quinase, que desencadearia a fosforilação da T460 dos transportadores, ou ainda, os próprios *AMTs* poderiam agir como transceptores, atuando como sensores de amônio e recrutando uma proteína quinase citosólica com a finalidade de fosforilar T460 (LANQUAR et al., 2009). Tal mecanismo de regulação alostérica foi sugerido em outras espécies devido a conservação de aminoácidos regulatórios no C-terminal da proteína *AMT1.1* (LOQUÉ et al., 2007). Apesar do influxo de amônio mediado por essa proteína diminuir de acordo com o aumento crescente de concentrações exógenas dessa fonte N, a regulação transcricional difere significantemente, apresentando a indução da expressão de *AtAMT1.1* logo após a provisão de N (LOQUÉ et al., 2007). Portanto, a regulação de influxo não acompanha a regulação transcricional devido a essa regulação alostérica de proteínas AtAMT1.1 (LOQUÉ et al., 2007).

Com o objetivo de identificar uma possível regulação transcricional diferenciada dos genes codificadores para os transportadores de amônio devido à provisão de N, os genótipos de *Solanum* foram submetidos a estudos de provisão de N. Plantas dos três genótipos foram cultivadas em solução nutritiva sob condições suficientes de N (1 mM NH_4NO_3), e posteriormente foram submetidas a limitação de N por 72 h, e em seguida 2 mM NH_4Cl foi suplementado à solução nutritiva. Estudos de absorção de ^{15}N-amônio na concentração de 0,2 mM foram realizados nos tempos 0, 2, 6, 12 e 24 h após a suplementação de N-amônio (LANQUAR et al., 2009).

De maneira geral, os resultados de influxo rápido de ^{15}N-amônio indicam uma inibição do processo de aquisição de N nas raízes dos genótipos avaliados. Após o ressuplemento de amônio em plantas pré-cultivadas sob deficiência de N por 72 h, o influxo de ^{15}N-amônio para os genótipos *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* cv ‘Santa Clara’ diminuiu cerca de 70% em relação ao controle (-N) logo 2 horas após, e apenas 30% em raízes de *S. habrochaites*

(Figura 6). Após 4 horas de suplementação com amônio, o influxo foi 2 vezes maior para *S. pimpinellifolium* em relação a 2 h, e 1,2 vezes para *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' na mesa comparação, enquanto que *S. habrochaites* manteve os mesmos níveis de absorção de amônio marcado (Figura 6). Após período de 6 horas de suplementação de amônio, apenas *S. pimpinellifolium* aumentou o influxo, cerca de 10% em relação ao período anterior (4 h), enquanto *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' o manteve e *S. habrochaites* diminui cerca de 50% em relação ao mesmo período (Figura 6). Com 24 horas após a provisão, todos os genótipos diminuíram o influxo.

Esses resultados indicam que a absorção de amônio difere entre os genótipos de tomateiro, sendo que logo após as primeiras horas de provisão de amônio ocorre um efeito inibitório na aquisição dessa fonte de N mais pronunciado nos genótipos *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara', em relação a *S. habrochaites* (Figura 6). Apesar disso, o genótipo *S. pimpinellifolium* manteve maiores valores de influxo de amônio relativo a *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' (Figura 6). Portanto, o processo de absorção de amônio é afetado diretamente pelo tratamento exógeno de amônio no genótipo *S. pimpinellifolium*.

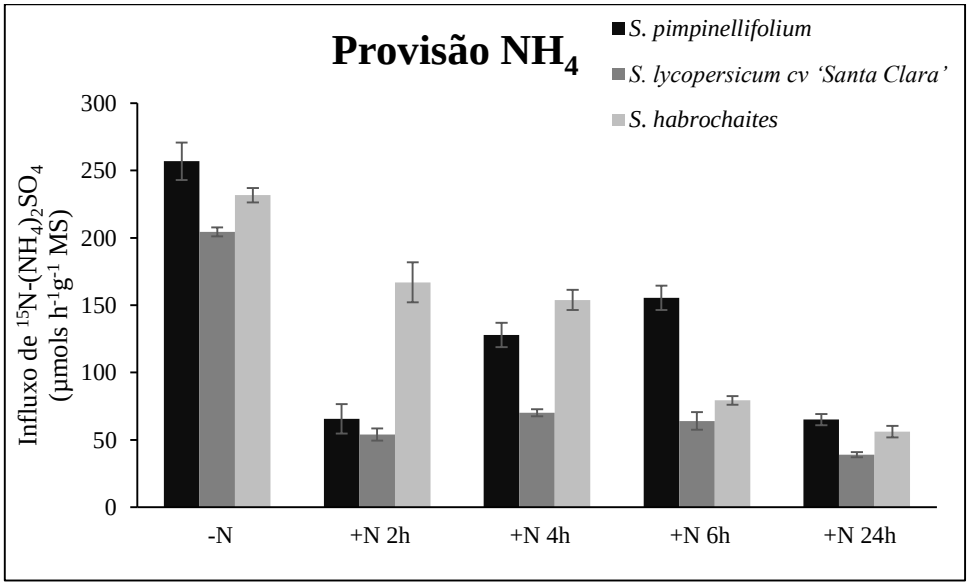


Figura 6. Influxo de ^{15}N-$(NH_4)_2SO_4$ em raízes de tomateiro. Plantas foram cultivadas por 1 mês em condições de N suficientes (1 mM NH_4NO_3) e submetidas deficiência de N por 72 h. Após esse período, foi feita a provisão N (2 mM de NH_4Cl). Estudo de absorção com ^{15}N-$(NH_4)_2SO_4$ 2, 4, 6 e 24 h após a provisão realizados a 0,2 mM de ^{15}N-amônio em raízes de tomateiro cultivar 'Santa Clara', *Solanum pimpinellifolium* e *Solanum habrochaites*. Barras indicam ±SE, *n*=5 plantas.

Para correlacionar os resultados de influxo de ^{15}N-amônio, foram conduzidas análises dos perfis transcricionais dos dois principais transportadores de amônio (*SlAMT1.1* e *SlAMT1.2*) expressos em raízes de tomateiro nesse experimento. Contrariamente aos resultados de influxo de ^{15}N-amônio, a expressão de *SlAMT1.1* foi induzida nos três genótipos após a suplementação de amônio. O acúmulo de transcritos de *SlAMT1.1* foi o mais expressivo, aumentando cerca de 1,75 vezes sua expressão para *S. pimpinellifolium* em relação ao controle (-N); 3,5 vezes para *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara'; e 2 vezes para *S. habrochaites* 2 h após a provisão de N (Figura 7A). Nos períodos seguintes, o nível de transcritos do *SlAMT1.1* tendeu a diminuir, com exceção do genótipo *S. habrochaites* que manteve o mesmo nível até 4 h após o fornecimento de amônio, antes de reduzir o seu acúmulo de transcritos (Figura 7A). Portanto, a ausência de correlação entre os níveis de expressão de *SlAMT1.1* nos três genótipos com o influxo de amônio, sugerem a existência de um mecanismo similar de regulação alostérica identificado em arabidopsis (LOQUÉ et al., 2007; LANQUAR et al., 2010) em tomateiros selvagens. No entanto, apesar dos menores níveis relativos de expressão de *SlAMT1.1*, o genótipo *S. habrochaites* manteve os níveis de expressão de *SlAMT1.1* constantes após as primeiras horas de suplemento de amônio e ainda, o influxo de ^{15}N-amônio em suas raízes foi pouco inibido em relação ao genótipo *S. pimpinellifolium* e na cultivar 'Santa Clara' (Figura 6 e 7A). Esses resultados indicam um diferente grau de regulação alostérica presumível entre os genótipos de tomateiro avaliados nesse estudo.

Considerando que a aquisição de amônio em raízes reflete a ação aditiva de *SlAMT1.1* e *SlAMT1.2*, uma regulação diferenciada do gene *SlAMT1.2* poderia estar relacionada ao maior influxo de *S. habrochaites* em condição de provisão de amônio. O gene *SlAMT1.2* apresentou maior nível de acúmulo de transcritos para o genótipo *S. pimpinellifolium* após 4 horas de provisão de amônio, com queda após este período (Figura 7B). O genótipo selvagem *S. habrochaites* apresentou aumento dos transcritos mais rápido, duas horas após provisão, e manteve o nível de expressão até 6 h após provisão, enquanto que *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' não demonstrou diferença no nível de transcritos acumulados entre os períodos analisados (Figura 7B).

Baseado nesses dados é possível levantar a hipótese que para o genótipo selvagem *S. habrochaites*, *SlAMT1.2* parece ser fundamental para manutenção dos níveis de influxo de ^{15}N-amônio durante o tratamento de provisão. No entanto, o genótipo *S. pimpinellifolium* mantém níveis similares de acúmulo de transcritos de *SlAMT1.2* após a provisão, porém os valores de influxo de amônio diminuem significantemente após 2 h de provisão (Figura 7B), o

que indica que *SlAMT1.1* é o principal componente no transporte de amônio nos genótipos de tomateiro.

Portanto, os experimentos de influxo de ^{15}N-amônio aliado a expressão dos principais transportadores de amônio em raízes de tomateiro indicam que *SlAMT1.1* é o principal transportador a ser regulado de forma alostérica mediante exposição exógena de amônio nos genótipos de tomateiro avaliados. Recentemente, em arabidopsis foi demonstrado que a proteína AtAMT1.1, mas não AtAMT1.3 sofre regulação alostérica em raízes (YUAN et al., 2013). De maneira similar, pode-se inferir que *SlAMT1.1* poderia ser o único transportador a ser regulado em tomateiro. Além disso, os resultados apresentados aqui sugerem que as diferenças de influxo de amônio entre raízes de *S. pimpinellifolium* e *S. habrochaites* indicam que diferenças nas proteínas AMT1.1 desses genótipos poderiam estar correlacionadas ao grau de inibição de amônio por regulação alostérica.

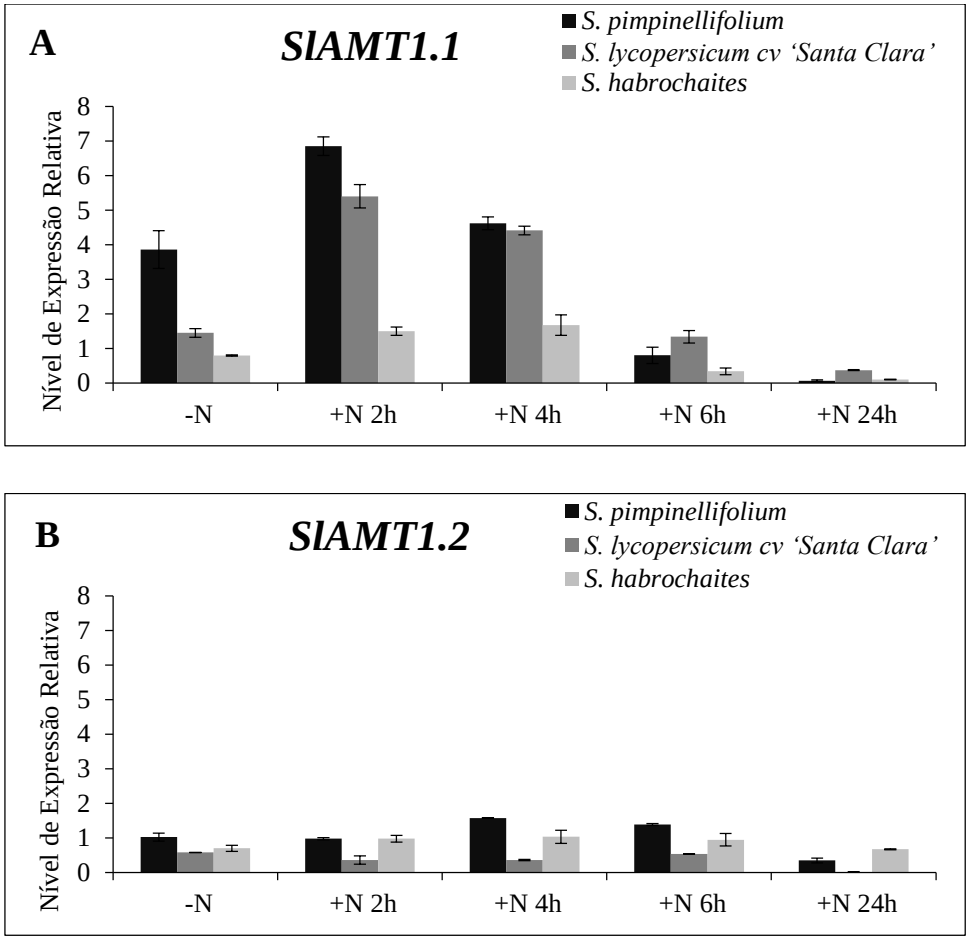


Figura 7. Análise quantitativa de transcritos (RT-qPCR) dos genes *SlAMT1.1* e *SlAMT1.2* nas raízes de tomateiro submetidas à provisão de N. Plantas foram cultivadas por 30 dias sob condições de N suficientes (1 mM NH_4NO_3) e submetidas deficiência de N por 72 h. Após esse período, foi feita a provisão N (2 mM de NH_4Cl). Amostras em triplicata de raízes foram coletadas nos tempos 0 (-N), 2, 4, 6 e 24 h após a suplementação de N. O acúmulo de transcritos foi padronizado para a amostra de *S. habrochaites* sob deficiência de N. Barras indicam ±SE, *n*= 3 réplicas biológicas.

Nesse trabalho, estudos de influxo de ^{15}N-amônio aliado à expressão dos principais transportadores da família *AMT1* em genótipos de tomateiro identificou respostas distintas de regulação entre os genótipos selvagens. Nos experimentos de cinética de absorção de amônio em condições contrastante de disponibilidade de N, *SlAMT1.1* apresentou maior acúmulo de transcritos acompanhado dos maiores valores de aquisição de amônio em raízes de *S. pimpinellifolium* quando comparado a *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. habrochaites*. Portanto, a regulação transcricional diferencial de *SlAMT1.1* parece ser fundamental para *S. pimpinellifolium*. Porém, apesar do maior acúmulo de transcritos de *SlAMT1.1* em *S. pimpinellifolium* nos experimentos de provisão de amônio, o influxo de ^{15}N-amônio foi fortemente inibido em raízes de *S. pimpinellifolium* devido a presumível regulação alostérica da proteína *AMT1.1*. No entanto, mesmo *S. pimpinellifolium* apresentando maiores níveis de transcritos de *SlAMT1.1* relativo ao genótipo *S. habrochaites* nessa mesma condição, a redução no influxo de amônio em raízes de *S. habrochaites* foi significantemente menor, o que sugere diferenças na proteína de *AMT1.1* entre esses genótipos. Portanto, diferenças na regulação transcricional ou alostérica de *AMT1.1* podem estar relacionadas as variações na aquisição de amônio entre *S. pimpinellifolium* e *S. habrochaites*.

Tais diferenças podem estar correlacionadas com as diferenças em NUE identificadas previamente. O genótipo selvagem *S. pimpinellifolium* apresentou maior uso eficiente de N quando cultivado em condições limitantes de N (OLIVEIRA, 2004), o que pode estar correlacionada a maior capacidade de indução de *SlAMT1.1* nessa condição de cultivo (Figura 7A). Ainda, o genótipo selvagem *S. habrochaites* 'CNPH420' não apresentou alteração para NUE em ambas as condições de suplemento de N (OLIVEIRA, 2004), o que pode ser devido a menor inibição durante a aquisição de amônio (Figura 7A).

4.3 Análise das sequencias do gene *SlAMT1.1* nos genótipos de tomateiro

A partir dos resultados obtidos nos experimentos de provisão de amônio, foi observada diferenças na regulação de *SlAMT1.1*, que estaria relacionado ao processo de regulação alostérica dos transportadores nos três genótipos avaliados. Portanto, diferenças na sequência de aminoácidos da proteína SlAMT1.1 entre esses genótipos poderiam estar associadas a menor inibição de aquisição de amônio em raízes de *S. habrochaites* relativo aos outros dois genótipos avaliados. Com a finalidade de elucidar se diferenças entre sequência na proteína AMT1.1 poderiam estar relacionadas a resposta diferencial destes genótipos para a provisão

de amônio, foi conduzida a clonagem e sequenciamento da região codificadora (CDS) do gene *SlAMT1.1* para os três genótipos estudados.

A partir do sequenciamento, foi realizado o alinhamento das sequencias com o gene *SlAMT1.1* de *Solanum lycopersicum* cv. 'Heinz'' cujo genoma foi sequenciado (TOMATO GENOME CONSORTIUM 2012), empregando o programa "Geneious". Os resultados mostraram que as sequências deste gene são conservadas entre o genótipo selvagem de tomateiro *S. pimpinellifolium* e a cultivar 'Santa Clara', apresentando apenas uma variação de nucleotídeo a qual levou a alteração na sequência do aminoácido Arg449 para Gly449 (R449G) (Figura 8). Além disso, a região C-terminal da proteína SlAMT1.1 nos genótipos selvagens apresentam dois aminoácidos a mais quando comparado as cultivares *Solanum lycopersicum* cv. 'Santa Clara' e 'Heinz'', Asn491 e His492 (Figura 8). Contrariamente, o genótipo selvagem *S. habrochaites* divergiu na sequência de dez aminoácidos (Phe99Tyr, Asn124Lys, Ser125Leu, Thr179Ser, Thr187Leu, Ser241Gly, Ala273Thr, Gly418Ala, Pro475Ser, Leu477Ser) quando comparado a *S. pimpinellifolium*, ao 'Santa Clara' e ao gene do genoma de referência cv. 'Heinz' (Figura 8). As diferenças nas sequências de aminoácidos na proteína de SlAMT1.1 do genótipo *S. habrochaites* podem estar correlacionadas a menor inibição por regulação alostérica identificada nos experimentos de influxo ^{15}N-amônio sob provisão nos três genótipos de tomateiro (Figura 8). Em arabidopsis, aminoácidos específicos são necessários para a regulação alostérica de AtAMT1.1. A proteína de AtAMT1.1 se organiza em trímeros na membrana plasmática (LOQUÉ et al., 2007); mediante a exposição exógena de amônio, o aminoácido Thr460 é fosforilado o que desencadeia a mudança conformacional da proteína (LOQUÉ et al., 2007; LANQUAR et al., 2009). A mudança ocorre através da interação do aminoácido Tyr467 de um monômero localizado no C-terminal da proteína com o aminoácido Ser242 da alça citossólica do monômero adjacente, o qual subsequentemente interage da mesma forma o que leva a inativação rápida de todo o complexo protéico na membrana (LOQUÉ et al., 2007). Portanto, o aminoácido Thr460 localizado no C-terminal é fundamental para o processo de inativação alostérica de AMT1.1. Na sequência de aminoácidos de SlAMT1.1, Tyr467 e Ser242 são conservados entre os três genótipos de tomateiro analisados aqui (Figura 8). Ainda, em arabidopsis, o aminoácido His239 forma uma ligação crítica no C-terminal para funcionalidade do processo de inativação do complexo protéico (LOQUÉ et al., 2007). Esse aminoácido também se apresentou conservado entre as sequencias dos três genótipos em relação a AtAMT1.1 (Figura 8). Entretanto, uma mutação levou a troca de Ser240Gly apenas no genótipo *S. habrochaites* quando comparado aos outros genótipos de tomateiro e arabidopsis (Figura 9). Tal mutação

levou a substituição de um aminoácido polar (Ser) por um apolar (Gly). Essa substituição no aminoácido está entre His239 e Ser242, na alça 5-6, o que sugere que tal mutação poderia estar afetando a regulação alostérica de SlAMT1.1 no genótipo *S. habrochaites* (Figura 9). Nesse caso, é possível sugerir que mediante a exposição exógena de amônio, Thr460 o qual é conservado em *S. habrochaites* é fosforilada, no entanto, a mudança conformacional na proteína é anormal comparada aos genótipos *S. pimpinellifolium* e cv. 'Santa Clara', o que por sua vez leva a ausência de inibição alostérica em trímeros de SlAMT1.1. Apesar de existirem mais alterações em outros 9 aminoácidos, não existe descrição na literatura na qual demonstra a funcionalidade desses aminoácidos durante a regulação alostérica de AMT1.1. Portanto, não é possível descartar a possível função de algum desses aminoácidos para o fenótipo de *S. habrochaites* sob provisão de amônio.

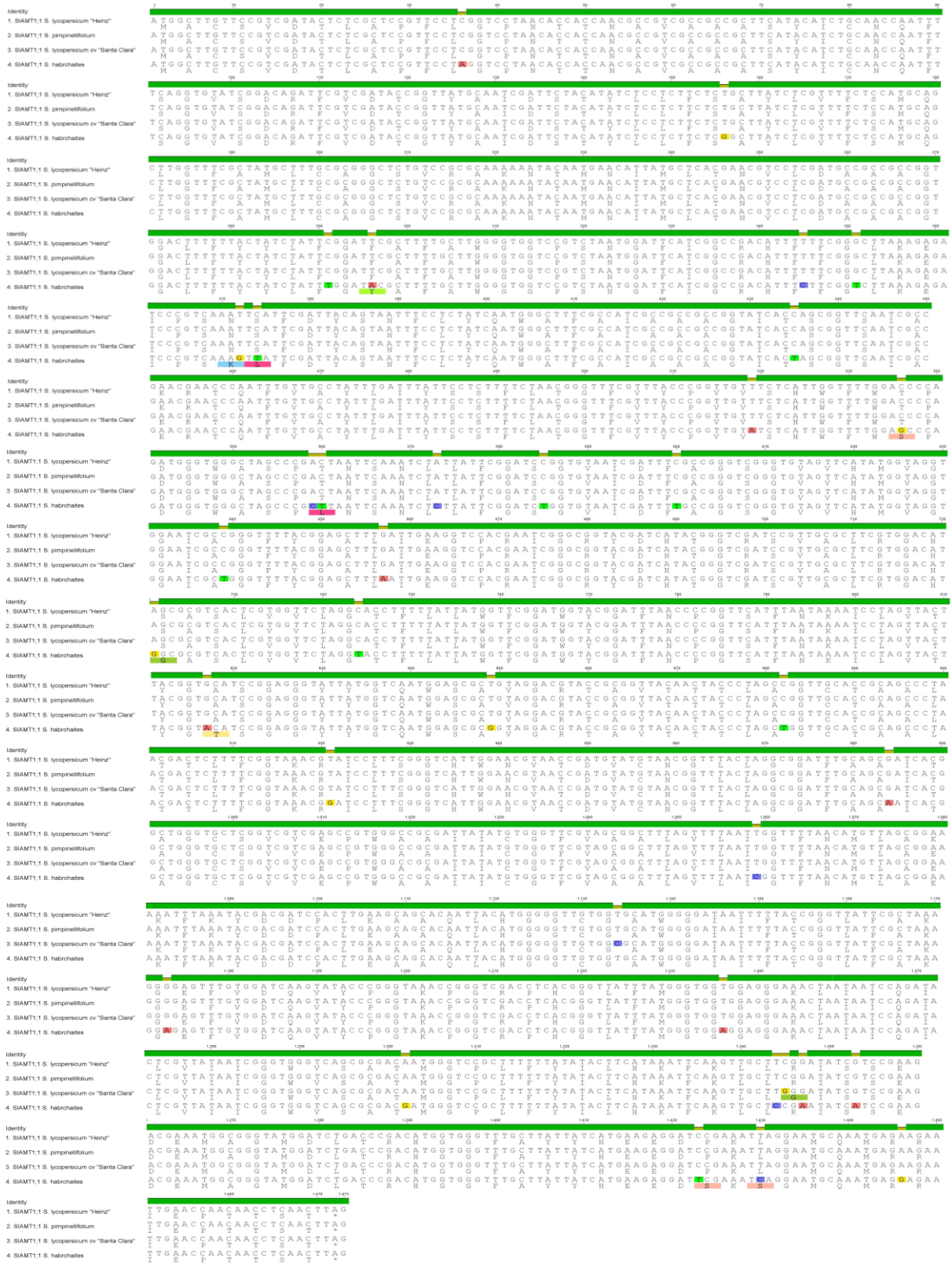


Figura 8: Alinhamento das sequencias do gene *SlAMT1.1* dos genótipos tomateiro. Sequência de nucleotídeos e aminoácidos para *S. lycopersicum* cv. 'Heinz', *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. habrochaites*. Alterações no nível de aminoácidos estão destacados por cores (verde claro – Tirosina; azul – Lisina; rosa claro – Serina; rosa escuro Leucina; verde escuro – Glicina; amarelo – Treonina; cinza – Alanina). O alinhamento foi realizado com base na sequência de nucleotídeos utilizando o programa "Geneious".

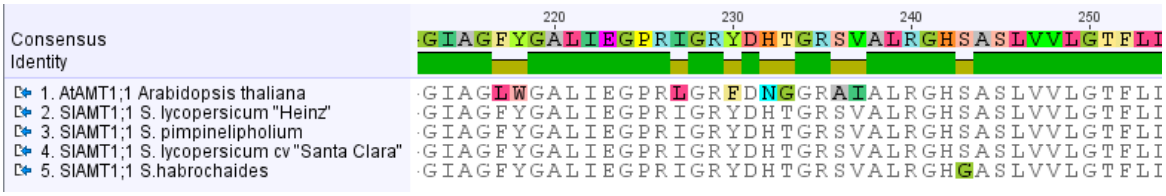


Figura 9. Comparação de região da alça 5-6 de AMT1.1 dos genótipos de tomateiro e arabidopsis. Sequência de aminoácidos de AMT1.1 de *Arabidopsis thaliana*, *S. lycopersicum* cv. 'Heinz', *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. habrochaites*. O alinhamento foi realizado com base na sequência de aminoácidos utilizando o programa "Geneious". As corem indicam diferenças de aminoácidos entre a sequência consenso e a dos genótipos analisados (rosa escuro – Leucina; rosa claro – Triptófano; amarelo – Fenilalanina; azul – Asparagina; verde claro – Glicina; cinza – Alanina; verde escuro – Isoleucina).

4.4 Análise das sequências da região promotora do gene *SlAMT1.1* nos genótipos de tomateiro

Os resultados obtidos na comparação da proteína SlAMT1.1 dos genótipos de tomateiro mostraram que as sequências deste gene são conservadas entre o genótipo selvagem *S. pimpinellifolium* e a cultivar 'Santa Clara', o que pode indicar que as diferenças observadas nos acúmulos de transcrição poderiam ocorrer devido a diferenças na região promotora do gene nestes genótipos (Figura 8).

Para amplificar a região promotora dos genótipos de tomateiro, foi utilizado DNA genômico de cada genótipo e desenhado iniciadores para amplificação desta região desde o códon de iniciação de tradução (metionina – ATG) do gene *SlAMT1.1* até -2223 bases na região 5' a montante (*upstream*) do genótipo *S. pimpinellifolium*, -2231 bases de *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e -2224 de *S. habrochaites*.

Na comparação das sequências foi possível observar que a região promotora nos genótipos estudados também é 99,99% similar, mas com diferença na sequência TATTAG, que representa o motivo FAM310 (Figura 10), e que *S. pimpinellifolium* apresenta um domínio a mais do que a região promotora da cultivar 'Santa Clara' e de *S. habrochaites*, localizado em -573pb (Figura 10A e B). A sequência foi submetida para comparação no banco de dados de elementos regulatórios de plantas "PlantCARE" e este domínio representa um TATA-box, que é um dos principais promotores eucarióticos conhecidos e encontra-se montante (*upstream*) do ponto de início da transcrição da grande maioria dos genes.

Apesar de ter sido identificado a presença de motivos regulatórios a mais na região promotora do gene *SlAMT1.1* do genótipo *S. pimpinellifolium* quando comparado a *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. habrochaites*, os estudos deverão ser aprofundados,

necessários para investigação da região promotora de *SlAMT1.1* destes genótipos, para validar se esse motivo regulatório ou outros são responsáveis pela maior indução de *SlAMT1.1* do genótipo *S. pimpinellifolium*.

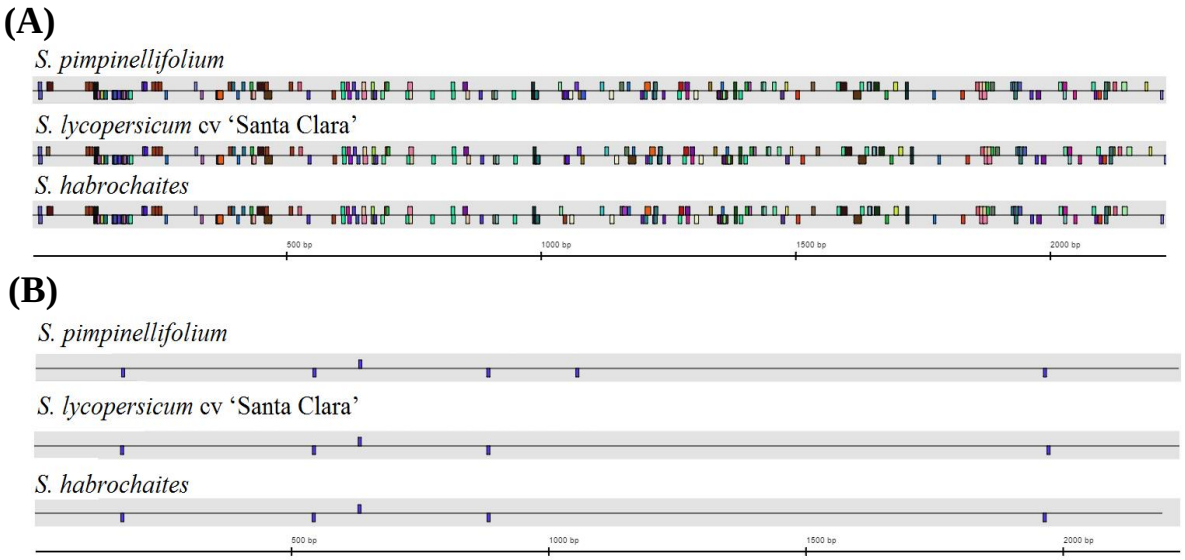


Figura 10: Alinhamento das sequências da região promotora do gene *SlAMT1.1* dos genótipos *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. habrochaites*. As barras coloridas representam os sítios de ligação de fatores de transcrição, sendo cada cor representando motivos distintos (A) e o alinhamento dos genótipos destacando a localização do sitio do fator de transcrição FAM310 (B). O alinhamento foi realizado com base na sequência de nucleotídeos utilizando o programa "Mathinspector".

4.5 Estudo de cinética de absorção de N-nitrato pela raiz de tomate

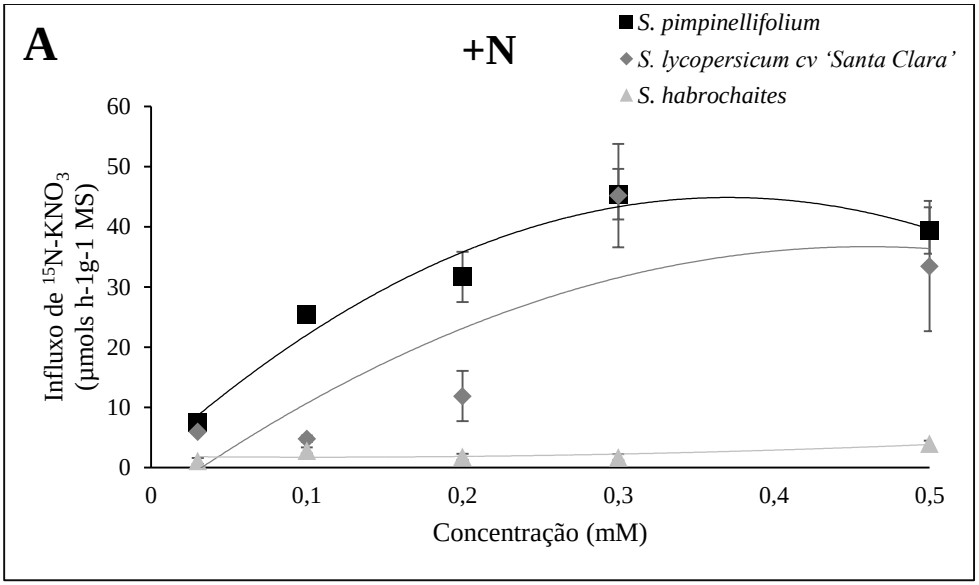
As formas de N encontradas no solo dependem do ambiente em questão, mas em geral incluem N inorgânico (nitrato, amônio e N_2) e orgânico (ureia e aminoácidos) (CRAWFORD & GLASS, 1998). Em solos agricultáveis, não só amônio (NH_4^+), mas também nitrato (NO_3^-) são as formas de N mais representativas (MILLER et al., 2007). Considerando que NUE envolve o processo de aquisicão de fontes inorgânicas de N, o nitrato também contribue para essa capacidade diferencial de eficiência na absorção entre os genótipos de *Solanum*.

Para avaliação da cinética de absorção da fonte inorgânica N-nitrato pela raiz dos genótipos contrastantes para eficiência no uso de nitrogênio (NUE), plantas de *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. habrochaites* foram crescidas em solução nutritiva contendo 1 mM NH_4NO_3 por 30 dias, quando foram submetidas a tratamento de suficiência de N (+N; 1 mM NH_4NO_3) ou deficiência de N (-N) por 72 h, sendo em

seguida, realizados estudos de influxo rápido com ^{15}N-KNO_3 nas concentrações de 0,03 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM e 0,5 mM ^{15}N).

Em condições de suficiência de N (+N), houve diferença no influxo de ^{15}N-nitrato entre os genótipos avaliados (Figura 11A). Enquanto que *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' apresentaram um aumento no influxo de nitrogênio de acordo com o aumento da concentração na solução de ^{15}N usada no ensaio rápido de aquisição, *S. habrochaites* não respondeu ao aumento da concentração externa de N, o que indica que o transporte de alta afinidade de nitrato (HATS) em raízes de *S. habrochaites* é defectivo nessas condições de cultivo. Ainda *S. pimpinellifolium* apresentou maiores níveis de aquisição de nitrato quando comparado ao *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' sob todas as concentrações testadas, exceto a 0,01 mM e 0,3 mM (Figura 11A). Portanto, estes resultados indicam que *S. pimpinellifolium* apresenta aquisição mais eficiente de nitrato na faixa de concentração de HATS quando comparado aos outros dois genótipos.

Quando cultivados sob deficiência de N por 72 h, *S. pimpinellifolium* apresentou os maiores valores de influxo de nitrato quando comparados com *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. habrochaites* (Figura 11B). Nesta condição foi possível observar indução do transporte de alta afinidade (HATS) nos três genótipos, pois foi observado aumento crescente do influxo de ^{15}N-nitrato de acordo com sua maior concentração na solução, inclusive para *S. habrochaites* (Figura 11B). Os resultados de cinética de influxo de nitrato nas raízes dos genótipos demonstram que *S. pimpinellifolium* possui maior atividade do sistema de transporte de alta afinidade em ambas as condições de N avaliadas.



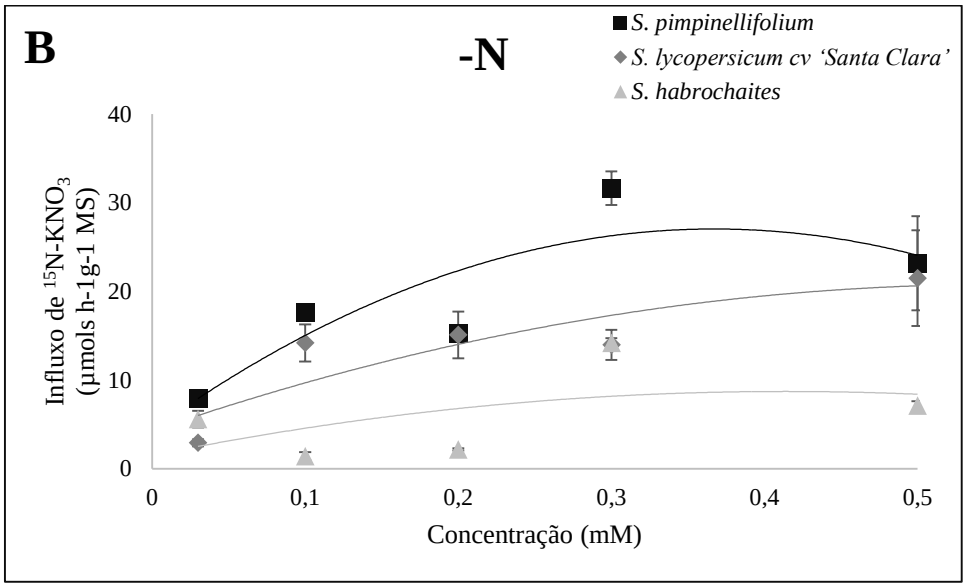


Figura 11. Influxo de ^{15}N-KNO_3 em raízes de três genótipos de tomateiro. Plantas foram cultivadas por 30 dias em condições de N suficientes (1 mM NH_4NO_3) e após esse período foram submetidas a dois tratamentos: (A) suficiência de N (1 mM NH_4NO_3); ou (B) sem a adição N (-N) por 72 h. Análise de absorção rápida com ^{15}N-KNO_3 nas concentrações 0,03 mM; 0,1 mM; 0,2 mM; 0,3 mM e 0,5 mM de ^{15}N foram realizados por 10 min em raízes dos genótipos *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara', *Solanum pimpinellifolium* e *S. habrochaites*. Barras indicam ±SE, *n*=5 plantas.

Em plantas, a aquisição de nitrato pelas raízes é mediada por transportadores de membrana da família *NITRATE TRANSPORTERS* (*NRTs*). Estes transportadores são divididos em duas subfamílias, de acordo com a afinidade ao substrato (baixa ou alta afinidade) e já foram identificados em várias espécies (SIDDIQI et al., 1990;; VIDMAR et al., 2000; PLETT et al., 2010; FENG et al., 2011; BAI et al., 2013; von WITTGENSTEIN et al., 2014). Na subfamília *NRT1*, a maioria dos transportadores é de baixa afinidade ao nitrato (faixa de mM) e são denominados de *Low Affinity Transporter System* ou LATS (TSAY et al., 1993; HATZFELD; SAITO, 1999; HUANG et al., 1999; FORDE, 2000). O membro dessa família gênica de maior destaque em arabidopsis é o *AtNRT1.1*, que possui dupla afinidade ao transporte de nitrato (DODDEMA et al., 1979). Em condições de baixa disponibilidade de nitrato, a proteína quinase CIPK23 fosforila o transportador *AtNRT1.1*, o que leva a alteração na afinidade da proteína ao substrato, ou seja de baixa para alta afinidade (HO et al., 2009); no entanto, essa afinidade dupla a nitrato ainda não foi demonstrada em outras espécies. A outra subfamília possui transportadores de alta afinidade (faixa de μM), denominada de *NRT2*. Mutantes de arabidopsis para *AtNRT2.1* e *AtNRT2.2* apresentam 80% do transporte de alta afinidade reduzido quando comparados a plantas selvagens e possuem menor acúmulo de biomassa quando N está em baixas concentrações, evidenciando a importância destes dois transportadores na absorção de nitrato pelas raízes (FILLEUR et al., 2001). No entanto, a principal contribuição para o sistema de transporte de alta afinidade a nitrato compreende a proteína de membrana *NRT2.1*. Análise do mutante *nrt2.1* em arabidopsis demonstrou redução de 72% no influxo de nitrato na faixa de concentração de HATS, enquanto que no mutante *nrt2.2* decresce a atividade de HATS em apenas 19% (LI et al., 2007). Ainda, a análise de expressão dos genes *AtNRT2.1* aliada a estudos de influxo com nitrato marcado, demonstram que a expressão desse gene em arabidopsis é coordenada perfeitamente com a absorção de nitrato na faixa HATS, sendo induzidos sob deficiência de N (FILLEUR; VEDELE, 1999; LEJAY et al., 1999; CEREZO et al., 2001; ORSEL et al., 2006), o que demonstra que esse é o principal transportador de HATS durante a aquisição de fonte inorgânica de N (FILLEUR et al., 2001).

A maioria dos transportadores de alta afinidade NRT2 é ativa na membrana plasmática quando transportadores NAR2 são coexpressos (TONG et al., 2005; OKAMOTO et al., 2006), formando o modelo de transporte de alta afinidade de dois componentes. Mutantes de arabidopsis para a proteína acessória NAR2 apresentaram diminuição drástica na atividade do transporte de alta afinidade (diminuição de 80% no influxo de nitrato), e na expressão de

transportadores *NRT2*, principalmente *AtNRT2.1*, que apresenta sua expressão diminuída em 90% (ORSEL et al., 2006). Função fisiológica similar foi identificada para o *NAR2* em arroz, visto que o sistema de transporte de alta afinidade de dois componentes também contribui para a absorção de nitrato na faixa de baixa e alta afinidade (YAN et al., 2011). Tal conclusão foi possível pela análise do mutante *Osnar2.1* que apresenta menor influxo de nitrato em suas raízes quando comparado ao selvagem, quando exposto tanto a baixas como altas concentrações de nitrato (YAN et al., 2011). Logo, o complexo proteico NAR2/NRT2.1 na membrana plasmática de células radiculares é fundamental para absorção de nitrato na faixa de HATS em diversas espécies (OKAMOTO et al., 2003; TONG et al., 2005; OKAMOTO et al., 2006; YAN et al., 2011).

Para correlacionar os níveis de expressão dos membros *NRTs* com o influxo de nitrato em raízes de tomateiro, estudos do perfil transcricional de regulação de distintos *NRTs* de tomateiro foram realizados por análise quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) nas raízes dos três genótipos cultivados em condições contrastantes de disponibilidade de N. Em condições de suficiência de N (+N), genes responsáveis pelo transporte de alta afinidade foram induzidos nos genótipos estudados (Figura 12). O gene codificador do transportador *SlNRT2.1* foi mais expresso no genótipo *S. pimpinellifolium*, com acúmulo de transcritos 3 vezes maior do que na cultivar ‘Santa Clara’ e 10 vezes maior que em *S. habrochaites* (Figura 12A). Quando sob deficiência de N (-N), o acúmulo de transcritos de *SlNRT2.1* foi menor quando comparado ao tratamento de suficiência de N (Figura 12A). Sob deficiência de N (-N), *Solanum pimpinellifolium* apresentou expressão 2 vezes maior que os outros genótipos. Estes dados quando comparados aos dados de influxo de nitrato marcado sugerem a participação deste gene no maior acumulo de ^{15}N-nitrato no estudo de cinética (Figura 11 e 12A).

O maior acumulo de transcritos de *SlNRT2.2* em suficiência de N (+N) foi observado no selvagem *S. pimpinellifolium*, sendo 4 vezes mais expresso que nos outros genótipos (Figura 12B). Sob deficiência de N (-N), a cultivar ‘Santa Clara’ apresentou a maior expressão relativa de *SlNRT2.2* apresentando 2 vezes mais transcritos em relação aos genótipos selvagens (Figura 12B).

O gene do transportador presumível de dupla afinidade *SlNRT1;1* também apresentou acúmulo de transcritos nas condições de suficiência e deficiências de N (+N e –N) (Figura 12C). Sob suficiência de N (+N), o genótipo selvagem *S. pimpinellifolium* apresentou o maior acúmulo de transcritos de *SlNRT1;1*, sendo 2 vezes maior do que na cultivar ‘Santa Clara’ e 4 vezes maior que em *S. habrochaites* (Figura 12C). No tratamento de deficiência (-N), *S.*

pimpinellifolium e *S. lycopersicum* cv ‘Santa Clara’ apresentaram o mesmo nível de expressão de *SlNRT1;1*, 50% maior do que em *S. habrochaites* (Figura 12C).

O gene *SlNAR2* apresentou grande acúmulo de transcritos nos genótipos *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* cv ‘Santa Clara’, tanto em suficiência de N (+N) como sob deficiência (-N) (Figura 12D); *S. habrochaites* não apresentou acúmulo de transcritos nas condições estudadas (Figura 12D). *S. pimpinellifolium* acumulou 2 vezes mais transcritos de *SlNAR2* que a cultivar ‘Santa Clara’ na condição de suficiência de N (+N), enquanto que não houve diferença significativa na expressão de *SlNAR2* entre estes genótipos sob deficiência de (-N) (Figura 12D).

Em arabidopsis, os transportadores *SlNRT2.1* e *SlNRT2.2* são os principais responsáveis pelo transporte de alta afinidade (FILLEUR et al., 2001). Nos genótipos de tomateiro estudados, a maior expressão destes transportadores também está associada ao maior influxo de ^{15}N -nitrato, sugerindo que ambos os genes também possuem papel importante na absorção de nitrato sob condições contrastantes de N nestas espécies (Figura 11 e 12A e B). O transportador *SlNRT1.1* apresentou acúmulo de transcritos tanto em condições de suficiência de N quanto em deficiência, o que pode indicar uma função aditiva no influxo de nitrato nas raízes dos genótipos estudados (Figura 11 e 12C). *SlNAR2* pode apresentar função aditiva no influxo de nitrato em conjunto com os transportadores de alta afinidade (Figura 11 e 12D). Em resumo, distintos transportadores da subfamília *NRT2*, assim como *SlNRT1.1* atuariam na maior capacidade de adquirir nitrato no genótipo *S. pimpinellifolium* comparado aos genótipos de menor influxo dessa fonte de N, *S. lycopersicum* cv ‘Santa Clara’ e *S. habrochaites*. No entanto, ainda resta saber se a regulação diferencial desses *NRTs* entre os genótipos de tomateiro é mantida de acordo com status de N. Para verificar essa hipótese, experimentos de provisão de nitrato foram realizados nas raízes dos três genótipos.

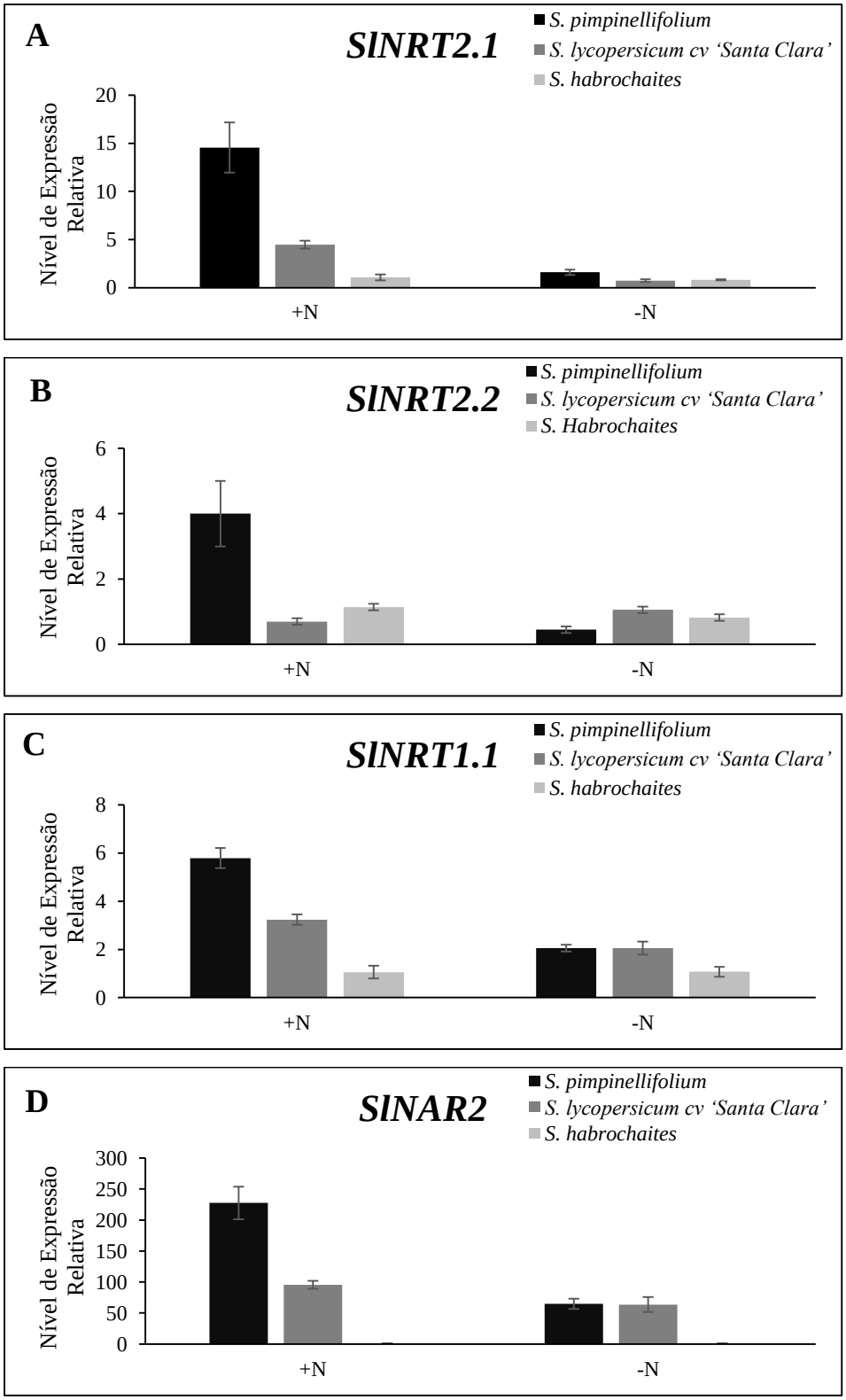


Figura 12. Análise quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) dos genes *SlNRT2.1*, *SlNRT2.2*, *SlNRT1.1* e *SlNAR2* (*NITRATE TRANSPORTERS*) nas raízes de tomateiro cultivados por 30 dias sob condições de N suficientes (1 mM NH_4NO_3), que após esse período, foram submetidas a tratamento com suficiência de N (1 mM NH_4NO_3, N+, esquerda) ou limitação de N (-N, direita) por 72 h. O acúmulo de transcritos foi padronizado para a amostra de *S. habrochaites* sob deficiência de N. Barras indicam ±SE, *n*= 3 réplicas biológicas.

4.6 Regulação do transporte de nitrato em raízes de tomateiro submetidas à provisão de N

Para verificar se existem diferenças na capacidade de absorção de nitrato entre *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara', *S. pimpinellifolium* e *S. habrochaites* (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010), foi conduzido experimento de análise temporal de influxo de ^{15}N-nitrato em raízes de tomateiro após a provisão de nitrato. Plantas dos três genótipos foram cultivadas em solução nutritiva sob condições de suficiência de N (1 mM NH_4NO_3) por 30 dias, quando foram submetidas a limitação de N por 72 h, e em seguida, 2 mM KNO_3 foi suplementado à solução nutritiva. Estudos de absorção de ^{15}N-nitrato na concentração de 0,2 mM foram realizados nos tempos 0, 2, 6, 12 e 24 h após a suplementação de nitrato.

De maneira geral, os resultados indicam que após a provisão de nitrato ocorre a indução do processo de aquisição de nitrato nas raízes dos três genótipos nas primeiras horas; porém, a aquisição de ^{15}N-nitrato é reduzida drasticamente 24 h após o suplemento de nitrato (Figura 13). Foi observada uma regulação temporal, com os genótipos *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' não apresentando indução do influxo de nitrato em suas raízes 2 h após provisão de N, enquanto que o genótipo *S. habrochaites* apresentou indução de influxo de 3 vezes superior ao controle (tempo 0 h, -N) (Figura 13). Após 4 h de provisão de nitrato, *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' induziram significantemente a absorção de ^{15}N em relação a condição controle (-N); porém, as raízes de *S. habrochaites* mantiveram os mesmos níveis de influxo de nitrato (Figura 13). Na avaliação 6 h após o tratamento, *S. habrochaites* aumentou a aquisição de nitrato em relação ao horário anterior em 3 vezes, mas *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' mantiveram os mesmos valores de influxo de ^{15}N (Figura 13). Por último, após 24 h de provisão de nitrato, houve repressão no processo de aquisição de nitrato nas raízes dos três genótipos, contudo, *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' apresentou os maiores valores de absorção de nitrato nesse período em relação aos outros genótipos (Figura 13). Esses resultados sugerem que *S. habrochaites* possui uma resposta mais rápida na regulação do processo de aquisição de nitrato em suas raízes após a provisão de nitrato quando comparado a *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara'.

A rápida indução de aquisição sob suplemento de nitrato fica evidente no genótipo selvagem *S. habrochaites*, que apresenta influxo cerca de 3 vezes maior que *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e 2 vezes maior que *S. pimpinellifolium* (Figura 13). A indução na aquisição de ^{15}N-nitrato no genótipo selvagem *S. pimpinellifolium* após 4 h levou a valores equivalentes

ao *S. habrochaites*, enquanto que, *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' apresentou os menores valores de influxo no período (Figura 13). Após 6 h de provisão exógena de nitrato, *S. habrochaites* teve maior indução do influxo de ^{15}N-nitrato do que no genótipo selvagem *S. pimpinellifolium* e a cultivar de tomateiro. Por sua vez, a repressão no processo de influxo de nitrato marcado foi menor na cultivar *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' quando comparado aos outros dois genótipos (Figura 13). Portanto, esses resultados evidenciam que ambos os genótipos selvagens, *S. habrochaites* e *S. pimpinellifolium*, possuem maior capacidade de absorção de nitrato quando comparado a cultivar *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' cultivada em condições de provisão de nitrato. Além disso, *S. habrochaites* apresenta destaque com maiores valores de influxo de ^{15}N-nitrato em suas raízes relativo aos outros dois genótipos.

Com base nos resultados de influxo de nitrato em raízes de tomateiro (Figura 13) é possível inferir que a absorção de nitrato é diferencialmente regulada mediante a provisão de N, apresentando indução do influxo de nitrato. O genótipo *S. habrochaites* apresentou maior indução do processo de aquisição dessa forma inorgânica de N e mais rápida, seguido por outro genótipo selvagem *S. pimpinellifolium* e por último a cultivar de tomateiro 'Santa Clara'.

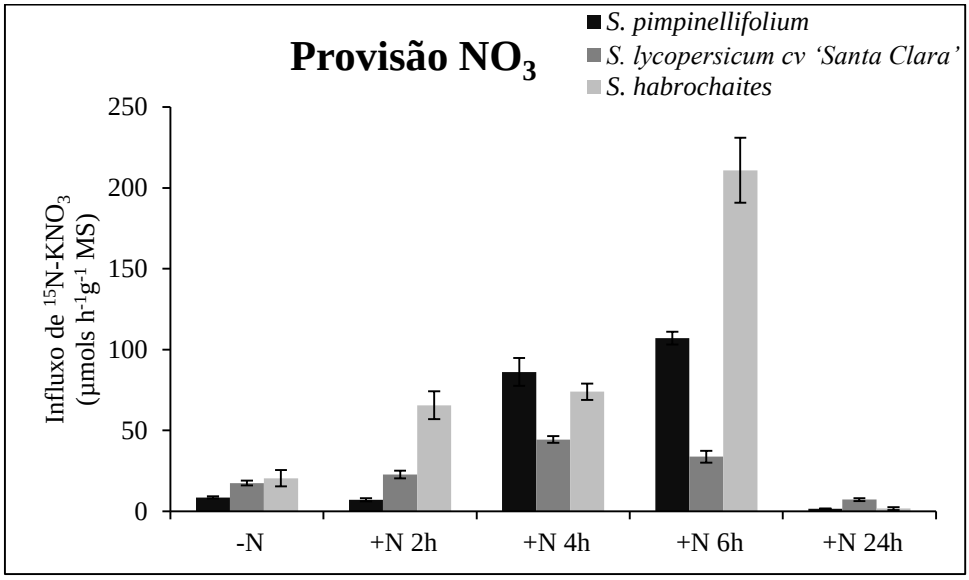


Figura 13. Influxo de ^{15}N-KNO_3 em raízes de três genótipos de tomateiro. Plantas foram cultivadas por 30 d em condições suficientes de N (1 mM NH_4NO_3) e submetidas a deficiência de N por 72 h. Após esse período, foi feita a provisão N (2 mM de KNO_3). Estudo de absorção com 0,2 mM de ^{15}N-KNO_3 após a provisão foram realizados por 10 min em *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara', *Solanum pimpinellifolium* e *Solanum habrochaites* nos tempos 0, 2, 4, 6 e 24 h após a suplementação de N. Barras indicam ±SE, *n*=5 plantas.

A análise quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) dos genes *SlNRT2.1*, *SlNRT2.2*, *SlNRT1.1* e *SlNAR2* foi realizada para os três genótipos de tomateiro em condições de provisão de nitrato. Houve acúmulo de transcritos do gene *SlNRT2;1* 2 h após a provisão de nitrato para os três genótipos, sendo que *S. habrochaites* apresentou o maior nível de acúmulo, seguido por *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. pimpinellifolium*, respectivamente, quando comparados com o controle (-N) (Figura 14A). Após 4 h da ressuplementação de nitrato, ocorreu acúmulo de transcritos deste gene para os genótipos selvagens *S. pimpinellifolium* e *S. habrochaites*, porém em *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' essa indução foi bem menos pronunciada, sendo 2,5 vezes menor quando comparadas com os outros dois genótipos (Figura 14A). Após 6 h de tratamento, novamente *S. pimpinellifolium* e *S. habrochaites* apresentaram o mesmo nível de acúmulo relativo de transcritos de *SlNRT2.1*, enquanto que *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' manteve os níveis de acúmulo de transcritos próximos ao do controle (-N) (Figura 14A). No período subsequente de análise, às 24 h após a provisão de nitrato, a expressão do gene *SLNRT2.1* foi reduzida para os três genótipos, chegando ao mesmo nível de expressão da condição de deficiência de N (-N) (Figura 14A). Esses resultados indicam uma regulação diferencial do gene do principal transportador de alta afinidade de nitrato nas raízes dos genótipos avaliados, sendo *SlNRT2.1* mais expresso durante a provisão de nitrato em raízes de *S. pimpinellifolium* e *S. habrochaites.*

A avaliação do acúmulo de transcritos de *SlNRT2.2* demonstram uma regulação diferencial também desse gene nos três genótipos. Em relação a condição de limitação de N (-N, 0 h), houve acúmulo de transcritos mais tardio, a partir de 6 e 24 h após a suplementação exógena de nitrato (Figura 14B). Dentre os genótipos avaliados, *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' apresentou os maiores níveis de acúmulo de transcritos de *SlNRT2.2*, seguido pela indução tardia no genótipo selvagem *S. pimpinellifolium* (Figura 14B). Por sua vez, *S. habrochaites* apresentou indução tardiamente, a partir de 4 h, atingindo o máximo acúmulo de transcritos desse gene 24 h após a provisão de nitrato (Figura 14B). Portanto, diferentemente da expressão de *SlNRT2.1*, a cultivar *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' apresenta maiores acúmulos de transcritos desse gene, seguido por *S. pimpinellifolium* e *S. habrochaites*, respectivamente (Figura 14B).

A função do transportador *SlNRT1;1* ainda é pouco conhecida na provisão de nitrato em tomateiro. A análise de expressão desse gene nos genótipos indica pouca variação no acúmulo de transcritos de *SlNRT1.1* de acordo com a provisão de N após limitação. De maneira geral, não houve indução de *SlNRT1.1* em nenhum pontos avaliados após suplemento de nitrato

(Figura 14C). Entre os genótipos, o acúmulo de transcritos para *SlNRT1.1* foi mais pronunciado em *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara', principalmente após 2 e 4 h de tratamento (Figura 14C). Para *S. pimpinellifolium,* os maiores níveis de *SlNRT1.1* foram encontrados sob deficiência de N (-N) (Figura 14C), enquanto que para *S. habrochaites* não houve regulação desse gene e, além disso, esse genótipo apresentou os menores valores de acúmulo relativo para *SlNRT1.1*(Figura 14C). Portanto, a regulação diferencial de *SlNRT1.1* entre os genótipos parece ser mínima em relação aos genes de transportadores de alta-afinidade *SlNRT2.1* e *SlNRT2.2,* o que indica que os estes genes são os principais alvos diferencialmente regulados que correlacionam com os valores de influxo de ^{15}N-nitrato nas raízes dos três genótipos de tomateiro (Figuras 13 e 14).

Considerando a importância do transporte de HATS, foi avaliada a expressão do gene *NAR2* de tomateiro. Em arabidopsis, o gene *AtNAR2* forma heteropolímeros na membrana plasmática com a proteína AtNRT2.1, regulando o transporte de HATS em condições especificas de disponibilidade de N (YONG et al., 2010). A expressão do ortólogo em tomateiro, *SlNAR2*, apresentou regulação pela provisão de nitrato nos genótipos avaliados, sendo que houve evidente acúmulo de transcritos aos 2, 4 e 6 h após a provisão de nitrato em relação a condição inicial de deficiência de N (Figura14D). Diferenças significativas foram observadas para regulação de *SlNAR2* entre os genótipos de tomateiro. O acúmulo de transcritos de *SlNAR2* iniciou-se 2 h após a provisão de nitrato para o genótipo *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara', atingindo seu maior nível 4 h após provisão de nitrato, quando *S. pimpinellifolium* também apresentou maior acúmulo de transcritos para esse gene (Figura 14D). Após 6 h de provisão, *S. pimpinellifolium* manteve a quantidade relativa dos transcritos do período anterior, enquanto *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' apresentou queda no acúmulo de transcritos (Figura 14D). Por outro lado, *S. habrochaites* não apresentou acúmulo de transcritos deste transportador em nenhum período de provisão nitrato avaliado (Figura 14D). Com base nesses resultados, os genótipos *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' demonstram possuir a habilidade de regular o gene SlNAR2 na presença de nitrato; porém, isso não ocorre no genótipo selvagem *S. habrochaites.*

Os resultados de expressão dos transportadores de HATS aliado aos níveis de aquisição de ^{15}N-nitrato sob provisão de nitrato demonstram a existência da correlação de indução do principal gene de transportador de alta-afinidade *SlNRT2.1* com o valores de influxo (Figura 13 e 14A), sendo que, a maior capacidade de aquisição de ^{15}N-nitrato em raízes de *S. habrochaites* seguido por *S. pimpinellifolium* foi devido aos maiores valores de expressão de *SlNRT2.1* quando comparado a *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara'. Ainda, a ausência de

indução de *SlNAR2* nas raízes de *S. habrochaites* indicam que esse gene não atua efetivamente na absorção de ^{15}N-nitrato sob provisão dessa fonte inorgânica de N (Figuras 13 e 14D), ou ainda, a existência de um mecanismo de regulação pós-transcricional pode estar presente em raízes de *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara'.

Recentemente, um mecanismo de regulação pós-transcricional envolvendo *NRT2.1* e *NAR2.1* foi identificado em raízes de arabidopsis. A superexpressão do gene *NRT2.1* por transgenia levou a maior acúmulo de transcritos desse gene quando submetido às altas concentrações de nitrato de amônio (LAUGIER et al., 2012). Comparado ao tipo selvagem na condição de 10 mM NH_4NO_3, apesar do maior acúmulo de transcritos de *AtNRT2.1*, mas não de *AtNAR2.1*, houve repressão do influxo de ^{15}N-nitrato, que foi seguido pelo menor acúmulo de proteínas *NRT2.1*, também nas raízes do transgênico (LAUGIER et al., 2012). Por outro lado, a análise do acúmulo de proteína *NAR2.1* utilizando anticorpo especifico detectou que plantas de arabidopsis cultivada sob alto N apresentam certa estabilidade dessa proteína, apesar da inibição no acúmulo de transcritos nessa condição e da diminuição do influxo de ^{15}N-nitrato (LAUGIER et al., 2012). Portanto, mesmo com a expressão constitutiva de *AtNRT2.1* não foi possível eliminar o efeito repressivo no transporte de HATS e ainda, *AtNAR2.1* não responde sempre de maneira similar a *AtNRT2.1* (LAUGIER et al., 2012). Esta evidência também foi previamente demonstrada no mutante de arabidopsis *nar2.1*, no qual o transcritos do gene *AtNRT2.1* foram detectados, mas não existe o acúmulo de proteína *NRT2.1* (WIRTH et al., 2007; YONG et al., 2010). Em resumo, estudos em arabidopsis demonstram que, apesar da interação em nível de proteínas destes dois componentes do transporte de alta afinidade (*AtNRT2.1* e *AtNAR2.1*), os padrões de expressão de ambos são independentes de acordo com o suplemento de N, visto que a variação na concentração de nitrato exógeno leva a diferentes níveis de expressão de *NRT2.1* quando comparamos mutantes *nar2.1* e plantas selvagens (ORSEL et al., 2006), acarretando assim diferença na absorção de nitrato (LAUGIER et al., 2012).

Similar a resposta identificada para *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' (Figura 14D), a indução de *AtNAR2.1* em arabidopsis ocorre horas após a provisão de nitrato (OKAMOTO et al., 2006). No entanto, os resultados obtidos sob provisão de nitrato em raízes de *S. habrochaites* demonstram que *SlNAR2* não é essencial para indução do transporte de HATS sob a exposição exógena de nitrato (Figura 13 e 14D), o que difere de arabidopsis (OKAMOTO et al., 2006, LAUGIER et al., 2012). A validação experimental quanto a importância de *SlNAR2* nos genótipos *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara'

ainda se faz necessária, para verificar se o acúmulo de proteína SlNAR2 juntamente com SlNRT2.1 ocorre nas raízes desses genótipos sob provisão de nitrato. No entanto, o resultado de influxo de ^{15}N-nitrato em raízes de *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' indicam a atividade SlNRT2.1/SLNAR2 existe nesses genótipos.

Diferenças significativas na aquisição de nitrato foram identificadas entre os genótipos de tomateiro avaliados em condições de provisão de nitrato. O genótipo selvagem *S. habrochaites* apresentou maior capacidade de indução de HATS devido a expressão de *SlNRT2.1* quando comparado a cultivar 'Santa Clara' e ao genótipo selvagem *S. pimpinellifolium*. De acordo com os resultados de eficiência no uso de N (NUE) descritos por Oliveira (2004), *S. habrochaites* apresenta similar valores de NUE quando cultivado em baixo ou alto disponibilidade de N. A maior capacidade de aquisição de nitrato dessa espécie selvagem pode, portanto, estar relacionada ao maior acúmulo de transcritos de *SlNRT2.1*. No entanto, outros genes relacionados a metabolismo de N podem contribuir para essa característica especifica de NUE presente em *S. habrochaites*.

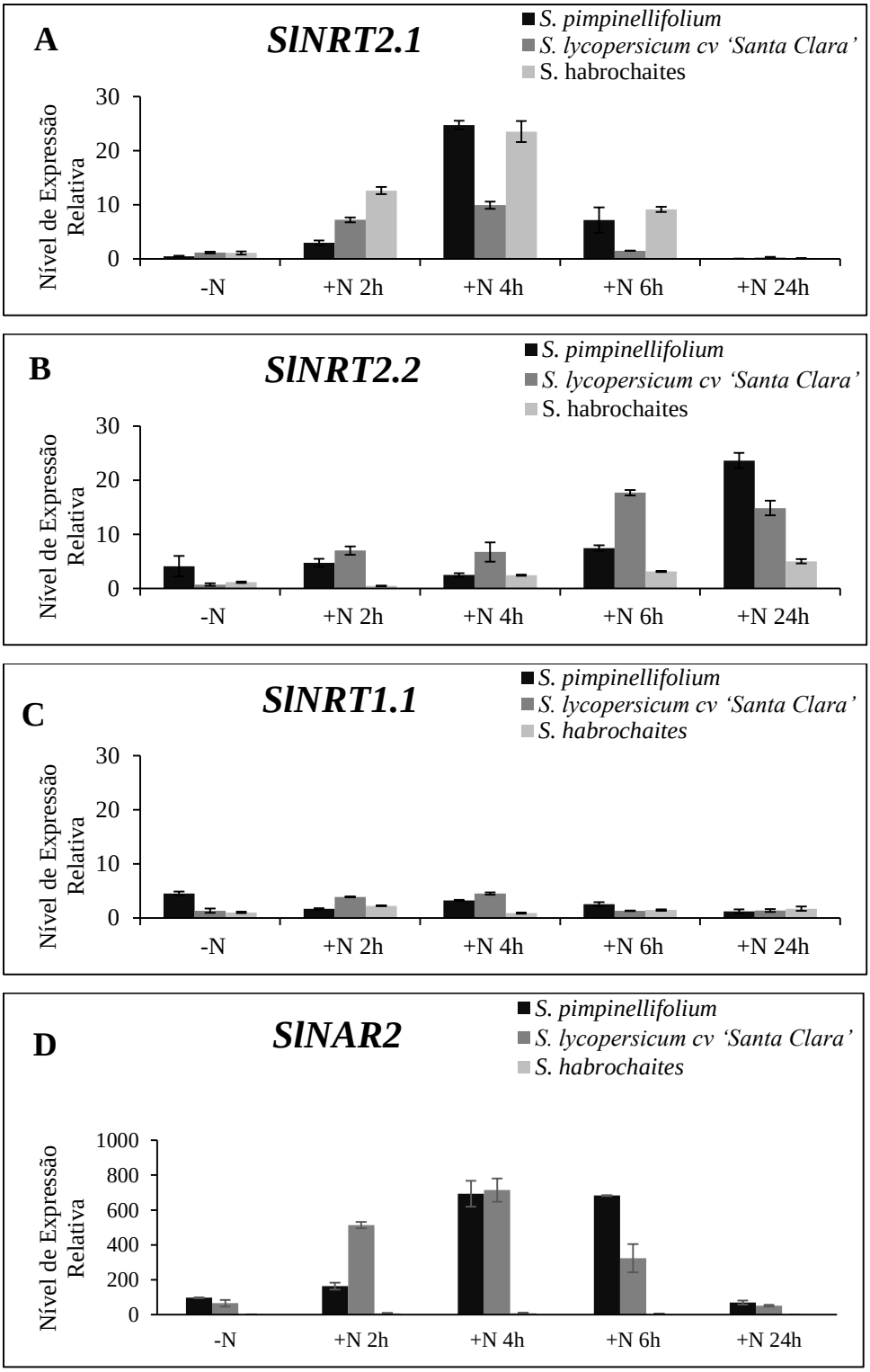


Figura 14. Análise quantitativa de transcritos (RT-qPCR) dos genes *SlNRT2.1*, *SlNRT2.2*, *SlNRT1.1* e *SlNAR2* da família *NRTs* (*NITRATE TRANSPORTERS*) nas raízes de três genótipos de tomateiro submetidas à provisão de N. Os níveis de transcritos foram determinados em raízes submetidas à provisão de N (adição de 2 mM de KNO_3) após tratamento limitante de N por 72 h. Amostras em triplicata de raízes foram coletadas nos tempos 0, 2, 4, 6 e 24 h após a suplementação de N. O acúmulo de transcritos foi padronizado para a amostra de *S. habrochaites* sob deficiência de N. Barras indicam ±SE, *n*= 3 réplicas biológicas.

5. CONCLUSÃO

- ✓ Experimentos de cinética de absorção com N-marcado em condições contrastantes de disponibilidade de N identificou que *S. pimpinellifolium* possui maior capacidade de absorção de amônio em suas raízes quando comparado aos genótipos *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. habrochaites*. Esse fenótipo está relacionado à maior indução da expressão do gene *SlAMT1.1* em raízes *S. pimpinellifolium*.
- ✓ Durante a provisão de amônio, o genótipo *S. habrochaites* apresentou menor inibição do processo de aquisição de ^{15}N-amônio quando comparado a *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. pimpinellifolium*. A correlação com os níveis de expressão dos principais transportadores de amônio sugere uma regulação alostérica diferenciada da proteína SlAMT1.1 nesse genótipo.
- ✓ A clonagem e sequenciamento da região codante do gene *SlAMT1.1* indicou a existência de diferença na sequência de aminoácidos, principalmente em *S. habrochaites.* Em particular, a alteração Ser240Gly na alça citosólica, fundamental durante a regulação alostérica, pode estar relacionada à menor inibição do influxo de amônio sob provisão de N.
- ✓ A clonagem e sequenciamento da região promotora do gene *SlAMT1.1* dos três genótipos de tomateiro indicam a presença de motivos regulatórios distintos no promotor de *SlAMT1.1* de *S. pimpinellifolium* quando comparado a *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. habrochaites*, o que pode estar correlacionado com a maior capacidade de aquisição de amônio em raízes de *S. pimpinellifolium*.
- ✓ Estudos de influxo de nitrato em raízes dos genótipos de tomateiro cultivados em condições contrastantes de disponibilidade de N demonstram que *S. pimpinellifolium* apresenta maior capacidade de aquisição de nitrato em suas raízes quando comparado a *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. habrochaites*, devido a maior indução *SlNRT2.1* e *SlNRT2.2.*
- ✓ A correlação do influxo de nitrato e a expressão de genes relacionados ao transporte dessa forma de N identificaram que *SlNRT2.1* é o principal transportador a ser regulado em raízes dos três genótipos avaliados quando submetidos a provisão de nitrato. O genótipo *S. habrochaites* apresentou maior capacidade de induzir *SlNRT2.1* quando comparado a *S. lycopersicum* cv 'Santa Clara' e *S. pimpinellifolium* em provisão de nitrato.

REFERÊNCIAS

AUSTIN, A.T. et al. Latin America's nitrogen challenge. **Science**, Washington, v. 340, n. 6129, 2013. DOI: 10.1126/science.1231679.

BAI, H. et al. The nitrate transporter (NRT) gene family in poplar. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 8, e.72126, 2013.

BAI, Y.; LINDHOUT, P. Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, p. 1085-1094, 2007.

BAUCHET, G.; CAUSSE, M. Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. **Genetic diversity in plants.** Rijeka, p. 133-162, 2012.

BURNEY, J.A.; DAVIS, S.J.; LOBELL, D.B. Greenhouse gas mitigation by agricultural intensification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 107, n. 26, p. 12052–12057, 2010.

CEREZO, M. et al. Major alterations of the regulation of root NO_3^- uptake are associated with the mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, n. 1, p. 262–271, 2001.

CRAWFORD, N.M.; GLASS, A.D. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 3, n. 10, p. 389–395, 1998.

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**, Rockville, v. 134, p. 1763–1774, 2004.

DODDEMA, H.; TELKAMP, G.P. Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 45, p. 332–338, 1979.

FENG, H. et al. Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 7, p. 2319–2332, 2011.

FERREIRA, M.M.M.; FERREIRA, G.B.; FONTES, P.C.R.; DANTAS, J.P. Qualidade do tomate em função de doses de nitrogênio e da adubação orgânica em duas estações. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 141–145, 2006.

FILLEUR, S. et al. An arabidopsis T-DNA mutant affected in Nrt2 genes is impaired in nitrate uptake. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 489, n. 2-3, p. 220–224, 2001.

FILLEUR, S. et al. An arabidopsis T-DNA mutant affected in Nrt2 genes is impaired in nitrate uptake. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 489, n. 2-3, p. 220–224, 2001.

FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, Ë. Expression analysis of a high-afinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. **Planta**, Berlin, v. 207, n. 3, p. 1999.

FOLEY, J.A. et al. Closing yield gaps through nutrient and water management. **Nature**, London, v. 490, n. 7419, p. 254–257, 2012.

FOLEY, J.A. et al. Solutions for a cultivated planet. **Nature**, London, v. 478, n. 7369, p. 337–342, 2011.

FORDE, B.G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1465, n. 1-2, p. 219–235, 2000.

FRAISIER, V. et al. Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. **Plant Journal**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 489-496, 2000.

FU, Y. et al. LeNRT2.3 functions in nitrate acquisition and long-distance transport in tomato. FEBS Letters, Bethesda, v. 589, n. 10, p. 1072–1079, 2015

GALLOWAY, J.N. et al. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. **Science**, Washington, v. 320, n. 5878, p. 889–892, 2008.

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

GAZZARRINI, S. et al. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into Arabidopsis roots. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 3, pp.937–947, 1999.

GLASS, A.D.M. et al. Ammonium fluxes into plant roots: energetics, kinetics and regulation. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Hoboken, v. 160, p. 261-268, 1997.

GLASS, A.D.M. et al. Nitrogen transport in plants, with an emphasis on the regulation of fluxes to match plant demand. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Hoboken, v. 164, p. 199–207, 2001.

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

GLASS, A.D.M. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. **Critical Reviews in Plant Sciences**, London, v. 22, n. 5, p. 453–470, 2003.

GLASS, A.D.M.; SIDDIQI, M.Y. Nitrogen absorption by plant roots. In: SRIVASTAVA, H.S.; SINGH, R.P. (Eds.). **Nitrogen nutrition in higher plants**. New Delhi: Associated Publishers, 1995. p. 21–56.

GLASS, A.D.M.; THOMPSON, R.G.; BORDELEAU, L. Regulation of NO_3^- influx in barley. Studies using 13NO3-. **Plant Physiology**, Rockville, v. 77, p. 379–381, 1985.

GOOD, A.G.; SHRAWAT, A.K.; MUENCH, D.G. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, n. 12, p. 597–605, 2004.

GUTIERREZ, R.A. Systems Biology for Enhanced Plant Nitrogen Nutrition. **Science,** Washington, v. 336, p. 1673–1675, 2012

HATZFELD, Y.; SAITO, K. Identification of two putative nitrate transporters highly homologous to CHL1 from Arabidopsis thaliana (Accession Nos. AJ011604 and AJ131464) (PGR 99–018). **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, p. 805, 1999.

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

HO, C.-H. et al. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. **Cell**, Cambridge, v. 138, n. 6, p. 1184–1194, 2009.

HUANG, N. et al. Cloning and functional characterization of an Arabidopsis nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 1381–1392, 1999.

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

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

LAUGIER, E. et al. Regulation of high-affinity nitrate uptake in roots of Arabidopsis depends predominantly on posttranscriptional control of the NRT2.1/NAR2.1 transport system. **Plant Physiology**, Rockville, v. 158, n. 2, p. 1067–1078, 2012.

LEA, P.; AZEVEDO, R. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 149, p. 243-247, 2006.

LEJAY, L. et al. Molecular and functional regulation of two NO_3^- uptake systems by N- and C-status of Arabidopsis plants. **Plant Journal**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 509–519, 1999.

LI, W. et al. Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, n. 1, p. 425–433, 2007.

LIMA, J.E. et al. Ammonium triggers lateral root branching in Arabidopsis in an *AMMONIUM TRANSPORTER*1;3-dependent manner. **Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 11, p. 3621–3633, 2010.

LIU, K.-H.; TSAY, Y.-F. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 1005–1013, 2003.

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. **Plant Journal**, Oxford, v. 48, n. 4, p. 522–534, 2006.

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. **Plant Journal**, Oxford, v. 48, n. 4, p. 522–534, 2006.

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

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

LUDEWIG, U.; WIRÉN, N. von; FROMMER, W.B. Uniport of NH by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 16, p. 13548–13555, 2002.

MARSCHNER, H.; MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. New York: Academic Press, 2012.

MARTINELLI, L.A.; FILOSO, S. Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: environmental and social challenges. **Ecological Applications**, Washington, v. 18, n. 4, p. 885–898, 2008.

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.

MILLER, A.J. et al. Nitrate transport and signaling. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 9, p. 2297–2306, 2007.

MILLER, J.C.; TANKSLEY, S.D. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus Lycopersicon. **Theoretical and Applied Genetics,** Berlin, v. 80, p. 437–448, 1990

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

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

MUÑOS, S. et al. Transcript profiling in the chl1-5 mutant of Arabidopsis reveals a role of the nitrate transporter NRT1.1 in the regulation of another nitrate transporter, NRT2.1. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 3, p. 2433–2447, 2004.

NACRY, P.; BOUGUYON, E.; GOJON, A. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 370, n. 1-2, p. 1-29, 2013.

OKAMOTO, M. et al. High-affinity nitrate transport in roots of Arabidopsis depends on expression of the NAR2-Like gene AtNRT3.1. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 1036–1046, 2006.

OKAMOTO, M.; VIDMAR, J.J.; GLASS, A.D.M. Regulation of NRT1 and NRT2 gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 44, n. 3, p. 304–317, 2003.

OLIVEIRA, L.D. Disponibilidade de nitrogênio e crescimento de genótipos selvagens e cultivados de Lycopersicon. 2004. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2004.

ORSEL, M. et al. Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in Arabidopsis. Physiology and protein-protein interaction. **Plant Physiology**, Rockville, v. 142, n. 3, p. 1304–1317, 2006.

PEOPLES, M.B. et al. Minimizing gaseous losses of nitrogen. In: BACON, P.E. (Ed.). **Nitrogen fertilizer in the environment**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 565–606.

PERALTA, I.E.; KNAPP, S.; SPOONER, D.M. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. **Tomato Genetics Cooperative Report**, Mendoza, v.56 p. 6–12, 2006.

PERALTA, I.E.; SPOONER, D.M. History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*). **Genetic improvement of solanaceous crops**, Enfield, v. 2, p. 1–27, 2007.

PIOTTO, F.A. Explorando a variação genética natural das espécies selvagens relacionadas ao tomateiro no modelo Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom. 2007. 57 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

PLETT, D.; TOUBIA, J.; GARNETT, T.; TESTER, M.; KAISER, B.N.; BAUMANN, U. Dichotomy in the NRT Gene families of dicots and grass species. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, e. 15289, 2010.

QUAGGIOTTI, S. et al. Expression of a putative high-affinity NO_3^- transporter and of an H+-ATPase in relation to whole plant nitrate transport physiology in two maize genotypes differently responsive to low nitrogen availability. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 1023–1031, 2003.

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, v. 103, n. 50, p. 19206–19211, 2006.

RICK, C.M. Tomato-like nightshades: affinities, auto-ecology, and breeders opportunities. **Economic Botany**, New York, v. 42, p.145–154, 1988.

ROCKSTRÖM, J. et al. A safe operating space for humanity. **Nature**, London, v. 461, p. 472–475, 2009.

RUZICKA, D.R. et al. Tomato root transcriptome response to a nitrogen-enriched soil patch. **BMC Plant Biol**, New. York, v. 10, p. 75, 2010.

SCHRÖDER, J.J. et al. The effects of nutrient losses from agriculture on ground and surface water quality: the position of science in developing indicators for regulation. **Environmental Science & Policy**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 15–23, 2004.

SIDDIQI, M.Y. et al. Studies of the regulation of nitrate influx by barley. **Plant Physiology**, Rockville, v. 90, n. 3, p. 806–813, 1989.

SIDDIQI, M.Y. et al. Studies of the uptake of nitrate in barley (I. Kinetics of $^{13}NO_3^-$ influx). **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, p. 1426–1432, 1990.

SIDDIQI, M.Y.; KING, B.J.; GLASS, A.D.M. Effects of nitrite, chlorate, and chlorite on nitrate uptake and nitrate reductase activity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, p. 644–650, 1992.

SIDDIQI, M.Y.; MALHOTRA, B.; MIN, X.; GLASS, A.D.M. Effects of ammonium and inorganic carbon enrichment on growth and yield of a hydroponic tomato crop. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science,** Weinheim, v. 165, n.2,p. 165-191, 2002

SIMMONS, B.A.; LOQUE, D.; BLANCH, H.W. Next-generation biomass feedstocks for biofuel production. **Genome Biology**, London, v. 9, n. 12, p. 242, 2008. doi: 10.1186/gb-2008-9-12-242.

SIMS, W.L. History of tomato production for industry around the world. **Acta Horticulturae**, Evora, v. 100, p. 25–26, 1980.

SOHLENKAMP, C.; WOOD, C. C.; ROEB, G. W.; UDVARDI, M. K. Characterization of Arabidopsis AtAMT2, a high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 1788–1796, 2002.

SONODA, Y. et al. Feedback regulation of the ammonium transporter gene family AMT1 by glutamine in rice. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v. 44, p. 1396–1402, 2003.

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

TAM, S.M., et al. Comparative analysis of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. **Theoretical And Applied Genetics**, Berlin, v. 110, p. 819–831. 2005.

TILMAN, D. et al. Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science**, Washington, v. 292, n. 5515, p. 281–284, 2001.

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

TOMATO GENOME CONSORTIUM. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature**, London, v. 485, p. 635–641, 2012.

TONG, Y. et al. A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. **Plant Journal**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 442–450, 2005.

TSAY, Y.-F. et al. Nitrate transporters and peptide transporters. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, n. 12, p. 2290–300, 2007.

TSAY, Y.F. et al. The herbicide sensitivity gene CHL1 of Arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. **Cell**, Cambridge, v. 72, n. 5, p. 705–713, 1993.

VIDMAR, J.J. et al. Regulation of HvNRT2 expression and high- affinity nitrate influx in roots of Hordeum vulgare by ammonium and amino acids. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, p. 307-318, 2000.

VITOUSEK, P.M. et al. Agriculture nutrient imbalances in agricultural development. **Science**, Washington, DC, v. 324, p. 1519-1520, 2009.

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

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

WIRTH, J. et al. Regulation of root nitrate uptake at the NRT2. 1. Protein level in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 32, p. 23541–23552, 2007.

WITTGENSTEIN, N.J.J.B. von et al. Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 14, n. 3, p. 11, 2014. doi: 10.1186/1471-2148-14-11.

WOOD, A.W.; SCHROEDER, B.L.; DWYER, R. Opportunities for improving the efficency of use of nitrogen fertiliser in the Australian sugar industry. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Mackay, v. 32, p. 221–233, 2010.

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

YAN, M. et al. Rice OsNAR2.1 interacts with OsNRT2.1, OsNRT2.2 and OsNRT2.3a nitrate transporters to provide uptake over high and low concentration ranges. **Plant, Cell & Environment**, New York, v. 34, n. 8, p. 1360–1372, 2011.

YAU, S.K.; THURLING, N. Variation in nitrogen response among spring rape (Brassica napus) cultivars and its relationship between nitrogen uptake and utilization. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 16, p. 139–155, 1987.

YONG, Z.; KOTUR, Z.; GLASS, A.D.M. Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from Arabidopsis roots. **Plant Journal**, Oxford, v. 63, n. 5, p. 739–748, 2010.

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

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

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. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 8, p. 2636–2652, 2007.

ZHANG, H.; FORDE, B.G. Regulation of Arabidopsis root development by nitrate availability. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 342, p. 51–59, 2000.