

ANÁLISE *IN SILICO* DE GENES ENVOLVIDOS NO TRANSPORTE DE NITRATO, AMÔNIO E URÉIA EM CAFEIEIRO

Anderson Rotter Meda², Luiz Filipe Protasio Pereira³, Tiago Benedito dos Santos⁴, Paulo Caramori⁵, Marcos Antonio Pavan⁶, Luiz Gonzaga Esteves Vieira⁷

¹Financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D/Café e pelo CNPq - Processo 577246/2008-9

²Bolsista CBP&D/Café, Laboratório de Biotecnologia Vegetal (LBI), IAPAR, Londrina-PR, andersonmeda@iapar.br

³Pesquisador, Embrapa Café/LBI-IAPAR, lpereira@iapar.br

⁴Bolsista CBP&D/Café, LBI-IAPAR, tiagogalactinol@gmail.com

⁵Pesquisador, Área de Ecofisiologia, IAPAR, caramori@iapar.br

⁶Pesquisador, Área de Solos, IAPAR, mpavan@iapar.br

⁷Pesquisador, LBI-IAPAR, lvieira@iapar.br

RESUMO: O nitrogênio (N) é o nutriente mais requerido pelo cafeeiro, sendo adquirido principalmente pelas raízes. As formas de N mais abundantes em solos agrícolas são nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+), enquanto que a uréia [$\text{CO}(\text{NH})_2$] é a principal forma de N utilizada na adubação do cafeeiro. Devido a participação significativa da adubação nitrogenada nos custos de produção do café, é de interesse a identificação de genes envolvidos na absorção radicular e translocação de nitrogênio no cafeeiro, visando uma otimização da eficiência do uso do nitrogênio pela cultura. Neste trabalho foram encontradas etiquetas de sequências expressas (ESTs) no banco de dados do Projeto Genoma Café relacionadas ao transporte das formas mais relevantes na aquisição do N. O número de *contigs/singlets* para as diferentes famílias de transportadores decresceu na ordem: nitrato (NRT) > amônio (AMT) > uréia (DUR3). A maior expressão e diversidade de transportadores de nitrato refletem a importância desta forma de N na nutrição e fisiologia do cafeeiro, assim como na maioria das outras espécies de plantas.

Palavras-chave: genoma, nutrição mineral do cafeeiro, proteínas transportadoras

IN SILICO ANALYSIS OF GENES INVOLVED IN NITRATE, AMMONIUM OR UREA TRANSPORT IN COFFEE PLANTS

ABSTRACT: Nitrogen (N) is quantitatively the most important nutrient for coffee plants, which is mainly taken up via plant roots. The most abundant nitrogen forms in agricultural soils are nitrate and ammonium, whereas urea is the most important N form used in coffee fertilization. Due to the high costs of N fertilizers in coffee production, it is necessary to identify the genes involved in N uptake and translocation in coffee plants, ultimately aiming at a higher N use efficiency. Here we show the identification of ESTs from the Coffee Genome Project related to the transport of major N forms relevant for N acquisition. The number of contigs/singlets for each transporter family decreased by the following order: nitrate (NRT) > ammonium (AMT) > urea (DUR3). The higher expression and diversity of nitrate transporters present in the database may reflect the key importance of this nitrogen form for coffee nutrition and physiology, as in most of other plant species.

Key words: genome, coffee mineral nutrition, transport proteins

INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é quantitativamente o principal nutriente exigido pelo cafeeiro (Van Raij et al., 1996) e o mais exportado pelos grãos de café (Valarani, 2005). Portanto, a aplicação de N como fertilizante representa um manejo básico no cultivo do cafeeiro para suprir a demanda por este nutriente, sendo necessário desde a formação de mudas até a fase reprodutiva (van Raij et al., 1996; Fenilli et al., 2007). Várias são as fontes de N utilizadas como fertilizantes químicos, a base de nitrato, amônio e uréia ou resíduos orgânicos (Cervellini et al., 1995). Tanto as fontes de N utilizadas quanto a densidade de plantio do cafeeiro influenciam as formas de N dominantes na solução do solo.

O nitrato (NO_3^-) é geralmente a forma mais abundante de N no solo devido à rápida oxidação biológica do íon NH_4^+ para nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). Em solos agrícolas aerados, a concentração de nitrito é extremamente baixa devido a rápida oxidação para nitrato. Durante o crescimento da planta, o nitrato é absorvido da solução do solo por processo de transporte ativo através da membrana plasmática das células das raízes. Devido a alta variabilidade espacial da concentração de nitrato no solo (Miller et al., 2007), dois sistemas de absorção de nitrato existem nas raízes, de alta e baixa afinidade. São conhecidas duas famílias de genes que codificam os transportadores responsáveis pela absorção de nitrato pelas raízes ou por sua translocação na planta (Tsay et al., 2007). A família NITRATE TRANSPORTER 1 (NRT1) possui 53 membros, enquanto que a família NRT2 possui 7 membros em *Arabidopsis thaliana*. O primeiro gene isolado relacionado ao transporte de nitrato, *AtNRT1.1* codifica um transportador de afinidade dupla, que atua em baixas ou altas concentrações de nitrato na solução do solo (Liu et al., 1999). Além disso, a proteína NRT1.1 foi proposta de atuar como um sensor de NO_3^- , necessário para a adaptação morfológica de raízes e conseqüentemente para

exploração do solo visando uma maior eficiência da aquisição de N (Remans et al., 2006). Especificamente, em *Arabidopsis* NRT2.1 e NRT2.2 são responsáveis por até 80% do transporte de nitrato quando presente em concentrações a níveis micromolares (Li et al., 2007). Além da sua importância como fonte de nitrogênio para as plantas, o nitrato é uma molécula sinalizadora que modula a síntese de citocininas, que por sua vez controla processos de desenvolvimento, síntese de proteínas e aquisição de macro e micronutrientes (Hirose et al., 2008).

Para o amônio, que é a segunda forma de N mais abundante em solos, existem seis genes homólogos de transportadores do tipo AMT/MEP (AMMONIUM TRANSPORTER) em *Arabidopsis thaliana*. Quatro destes genes apresentam uma função aditiva e cooperativa, sendo que a afinidade por amônio pelas proteínas codificadas por estes genes é de acordo com a sua localização nas raízes de *Arabidopsis thaliana* (Yuan et al., 2007). Em outras espécies, ortólogos de AMTs foram caracterizados, incluindo espécies arbóreas como *Citrus* spp. (Camañes et al., 2007) e álamo (*Populus tremula x alba*; Couturier et al., 2007). Assim como nitrato, NH_4^+ é também transportada internamente nas plantas e é a forma reduzida de N a partir do nitrato e utilizado na biossíntese de aminoácidos através do ciclo GS-GOGAT. O ciclo fotorespiratório nas folhas também gera uma grande quantidade de NH_4^+ exigindo a reassimilação pela GS (glutamina sintetase). Em ambos os casos, a expressão dos genes *AMTs* pode ser importante para assegurar a reciclagem ou absorção de NH_4^+ nas folhas.

Devido ao seu alto conteúdo de nitrogênio (aproximadamente 50%) e custos de produção mais baixos, a uréia [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$] é a forma de fertilizante mais utilizada no mundo (<http://www.fertilizer.org/ifa/default.asp>) e no Brasil, incluindo na cultura do café. É também um metabólito secundário liberado em células vegetais, proveniente do ciclo da ornitina nas mitocôndrias. Como é encontrada em altas concentrações em folhas mais velhas e em sementes em germinação, este metabólito foi proposto estar envolvido na reciclagem e translocação do N na planta, necessário, por exemplo, para a formação de frutos e grãos, que são altamente exigentes em N. No solo, a uréia é rapidamente hidrolisada para NH_4^+ e CO_2 pela urease, uma enzima dependente de níquel que é sintetizada e liberada por microrganismos presentes no solo (Wang et al., 2008). Dependendo do pH do solo, o NH_4^+ pode formar NH_3 , a qual é volatilizada da superfície do solo, levando a perdas do fertilizante. Durante um longo tempo, devido ao seu baixo peso molecular, caráter neutro e alta solubilidade em água, acreditou-se que a uréia permeava a membrana celular por difusão. Porém a primeira evidência de transporte ativo *in planta* foi apresentada por Liu et al., (2003). Neste estudo foi demonstrado que a absorção de uréia por células em suspensão de *Arabidopsis* era sensível a adição de um protonóforo (CCCP), eliminando, portanto, o co-transporte de uréia com prótons e indicando transporte ativo. Através de estudos de funcionalidade utilizando-se leveduras mutantes com defeito na absorção de uréia e análises *in silico*, duas famílias de genes envolvidas no transporte de uréia foram identificadas e parcialmente caracterizadas em plantas (Kojima et al., 2006). O gene de uma destas famílias, *AtDUR3* codifica o principal transportador de uréia em *Arabidopsis* localizado na membrana plasmática de células epidérmicas da raiz. Este transportador é essencial para absorção de uréia da solução do solo, apresentando alta afinidade para esta molécula ($K_m = 4 \mu\text{M}$) (Kojima et al., 2007). Em culturas agrícolas altamente exigentes em nitrogênio, como o cafeeiro, os transportadores de uréia apresentam um grande potencial de serem explorados para otimização da absorção desta molécula diretamente da solução do solo, antes que esta sofra hidrólise e seja convertida em formas de nitrogênios voláteis.

A identificação de genes associados a absorção e transporte de N é o primeiro passo para o desenvolvimento de plantas de café mais eficientes na utilização de fertilizantes e/ou para a otimização da adubação nitrogenada, que conseqüentemente podem diminuir os custos de produção e os impactos ambientais. Neste trabalho foram buscadas etiquetas de sequências expressas (ESTs) para os transportadores das principais formas de N encontradas em solos agrícolas e avaliado o nível de expressão nas diferentes bibliotecas de ESTs obtidas para o projeto Genoma Café.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente foi realizada a seleção de ESTs na plataforma de bioinformática cafEST (<https://alanine.cenargen.embrapa.br/cafEST>), assim como do LGE-Unicamp ([HTTP://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe](http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe)) utilizando-se *nitrate*, *ammonium* ou *urea transporter* como palavras-chave. Após seleção dos ESTs relevantes, as sequências encontradas foram inicialmente clusterizadas utilizando-se as ferramentas da própria plataforma do projeto Genoma Café (cafEST) para a formação dos *contigs*. Para a obtenção das sequências deduzidas de aminoácidos foi utilizado o programa ORF Finder (NCBI), que foram analisadas com a ferramenta BLASTP. Para o alinhamento das sequências de aminoácidos, utilizou-se o programa CLC MainWorkbench v4.1.1 com os parâmetros *gap open cost*: 10, *gap extension cost*: 1 e *end gap cost*: free. Para a criação da árvore filogenética, utilizou-se o algoritmo *neighbour-joining* realizando-se uma análise de *bootstrap* com 1000 réplicas. Para a análise de expressão nas diferentes bibliotecas, foi conduzido um northern eletrônico baseado no número válido de *reads* de cada biblioteca (Vieira et al., 2006). Os números de *reads* que compõem cada *contig* foram multiplicados por um fator de normalização de cada biblioteca. O fator de normalização foi obtido pela divisão do número total de *reads* de todas as bibliotecas com o número de *reads* de cada biblioteca. A visualização do northern eletrônico na forma de *heat map* foi obtida através do programa Genesis v.1.7.4 utilizando-se os valores normalizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca com a palavra-chave *nitrate transporter* gerou 229 *hits* e 49 *clusters*. A distribuição das sequências provenientes das diversas bibliotecas pode ser observada na Figura 1. Foi mais evidente a expressão dos possíveis

transportadores de nitrato em sementes em germinação, frutos, folhas do cafeeiro e em plantas submetidas a estresse hídrico (bibliotecas EM1, FR1, FV2, LV e SH2). Em nenhum dos *contigs* ou *singlets* foram observadas sequências provenientes de biblioteca específica de raízes. Isto se deve, provavelmente, a baixa representatividade das bibliotecas de raízes, pois somente 2871 *reads* foram obtidos deste órgão, de um total de 214.964 obtidos para o projeto Genoma Café (Vieira et al., 2006). Uma outra possível explicação seria a baixa expressão em raízes dos genes relacionados ao transporte de nitrato nas condições testadas, pois diversos transportadores da família NRT são induzidos por deficiência de N (Miller et al., 2007). Cada *contig* ou *singlet* teve sua sequência protéica analisada usando o algoritmo BlastP para identificação do domínio característico de NRT, da superfamília MFS (MAJOR FACILITATOR SUPERFAMILY). A análise filogenética (Figura 2) permitiu a separação dos *contigs* e *singlets* em duas subfamílias previamente caracterizadas em *Arabidopsis thaliana*, NRT1 e NRT2, que apresentam baixa e alta afinidade por nitrato, respectivamente.

Já a busca com a palavra-chave “ammonium” gerou 175 *hits* e 21 *clusters*. Dentre os clusters formados apenas 8 puderam ser confirmados como pertencentes à família de transportadores de amônio, de acordo com a identificação do domínio da superfamília de transportadores de amônio usando a ferramenta BlastP. A análise filogenética indica uma ramificação principal agrupando os transportadores da família AMT1, enquanto que o segundo ramo agrupou os membros das famílias AMT2 e membros mais distantes de AMT1, como LeAMT1;3 (Ludewig et al., 2007), que apresentou maior similaridade com o contig12474 (Figura 3A). A exemplo do nitrato, não foram encontradas sequências expressas nas raízes do café (Figura 3B).

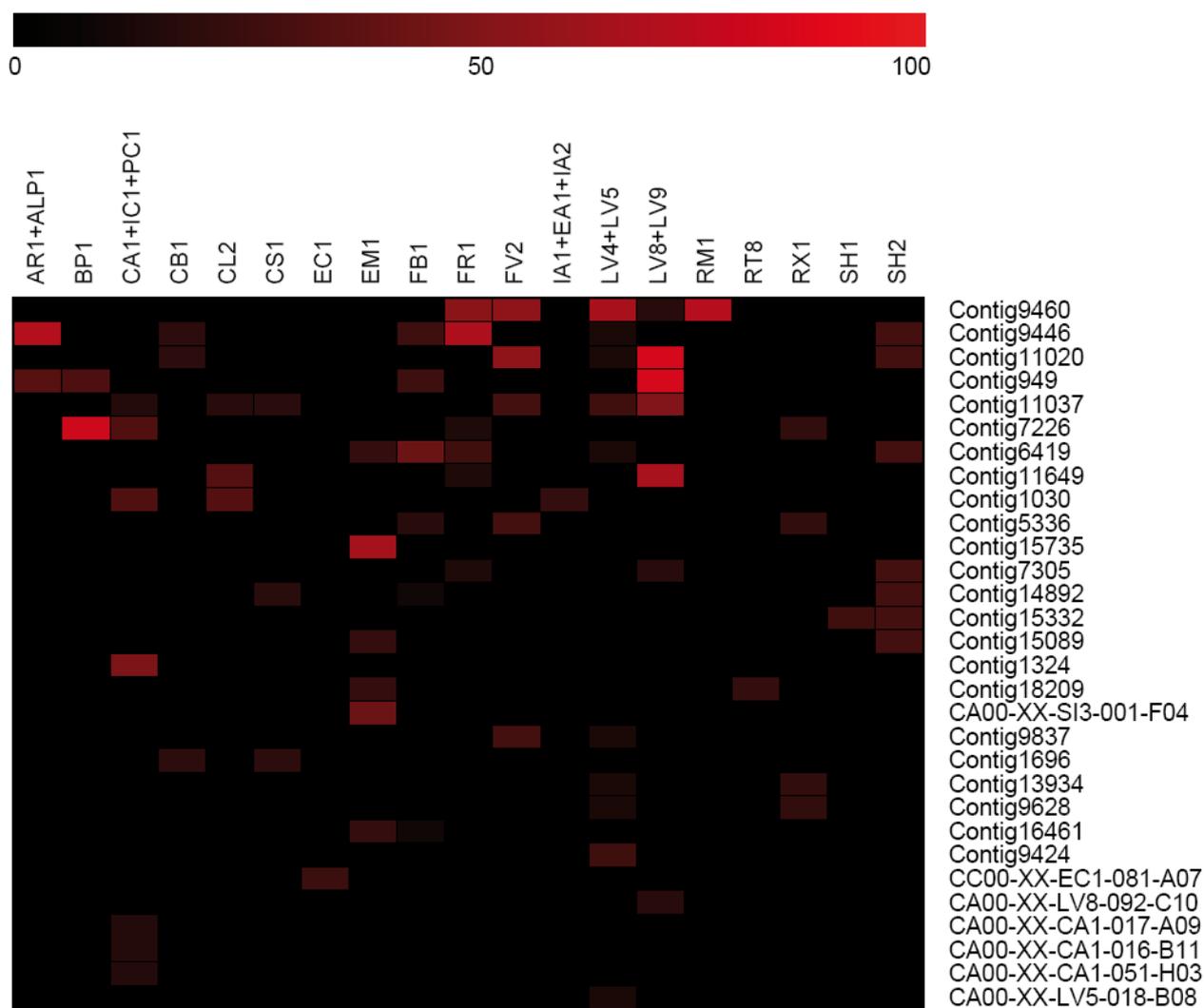


Figura 1. Northern eletrônico de *contigs* e *singlets* de possíveis transportadores de nitrato da família NRT do Genoma Café, alinhados de acordo com a média de expressão nas diferentes bibliotecas. Valores entre parênteses representam a soma dos valores normalizados de cada *contig/singlet* em cada biblioteca. AR1+LP1:plântulas e folhas tratadas com ácido araquidônico; BP1:células em suspensão com bion; CA1+IC1+PC1: calos não embriogênicos com e sem 2,4D ; CB1:células em suspensão com bion e brassinoesteróides; CL2: hipocótilo com e sem bion; CS1: células em suspensão tratadas com NaCl; EC1: calos embriogênicos de *Coffea canephora*; EM1: sementes em germinação; FB1: botão floral estágio 1 e 2; FR1: botão floral no. 6, chumbinho no.1, frutos estádios 1 e 2 longa; FV2: frutos no estágio 1, 2 e 3 em (*Coffea racemosa*); IA1+EA1+IA2: calos embriogênicos; LV4+LV5: folhas jovens de ramos ortotrópicos; LV8+LV9: folhas maduras de ramos plagiotrópicos; RM1: folha infestada com bicho mineiro e infectada com ferrugem; RT8:

Raiz e células em suspensão com alumínio; RX1: ramos infectados com *Xylella* spp.; SH1: Folhas de plantas sob estresse hídrico (*Coffea canephora*); SH2: plantas sob estresse hídrico (pool de tecidos). (Vieira et al., 2006).

Com a palavra-chave *urea transporter* foram encontrados somente dois *reads*: CA00-XX-IA2-016-H07-EC.F (de *Coffea arabica*) e CC00-XX-SH3-003-B02-EM.F (de *Coffea canephora*). A análise com a ferramenta BlastP indica que os dois *reads* pertencem a subfamília de transportadores de uréia DUR3, relacionado com a superfamília de transportadores de solutos por simporte com sódio (SSS; Kojima et al., 2006). A árvore filogenética indica maior similaridade dos ESTs de cafeeiro com AtDUR3, de *Arabidopsis*. Outros transportadores de uréia aqui não analisados podem ter uma participação significativa na distribuição de uréia na planta, como aquaporinas da família TIP (Wang et al., 2008).

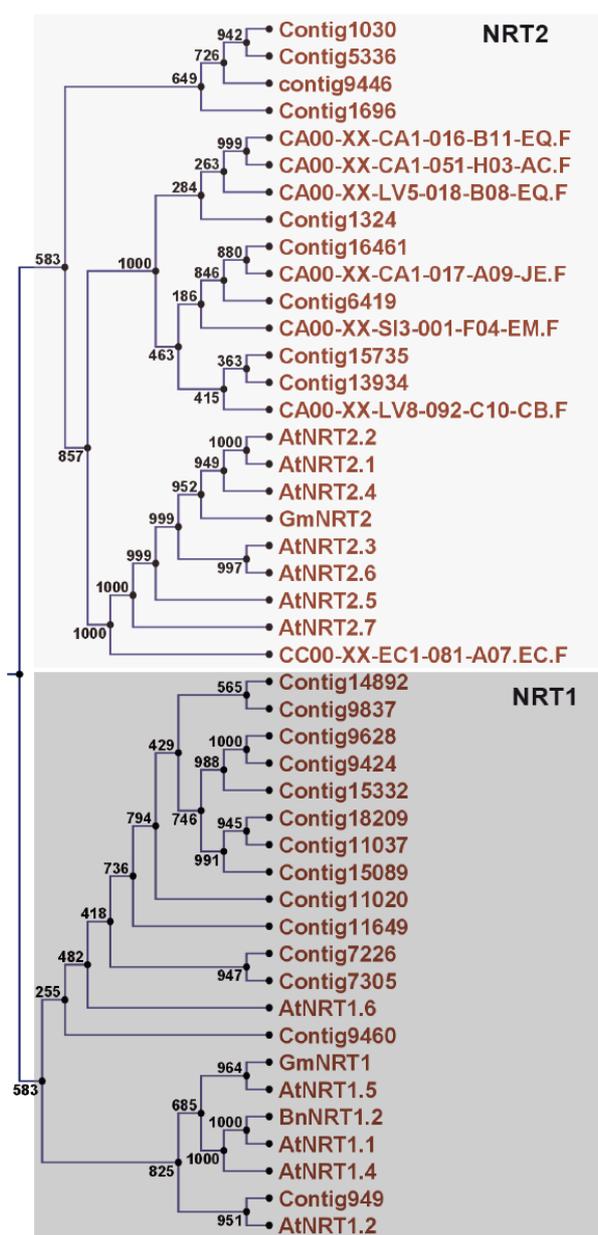


Figura 2. Árvore filogenética da família de transportadores de nitrato de *Coffea* spp. e da família NRT (*Nitrate Transporter*) de *Arabidopsis* e soja (*Glycine max*). A árvore do tipo *neighbour-joining* foi gerada através do alinhamento de 23 *contigs* e 7 *singlets* que apresentam domínio conservado da superfamília MFS (*major facilitator superfamily*) encontrados no banco de dados do CafEST juntamente com as sequências de aminoácidos deduzidas dos membros representativos de NRT de *Arabidopsis* e soja. Os valores em cada nó dos ramos indicam os números de réplicas de *bootstrap* (total = 1000). Proteínas da subfamília NRT1 são relacionados ao transporte de baixa afinidade, enquanto que os da subfamília NRT2 de alta afinidade (Miller et al., 2007). As sequências integrais de aminoácidos de *Arabidopsis* e soja foram obtidas da ferramenta ARAMEMNON (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>).

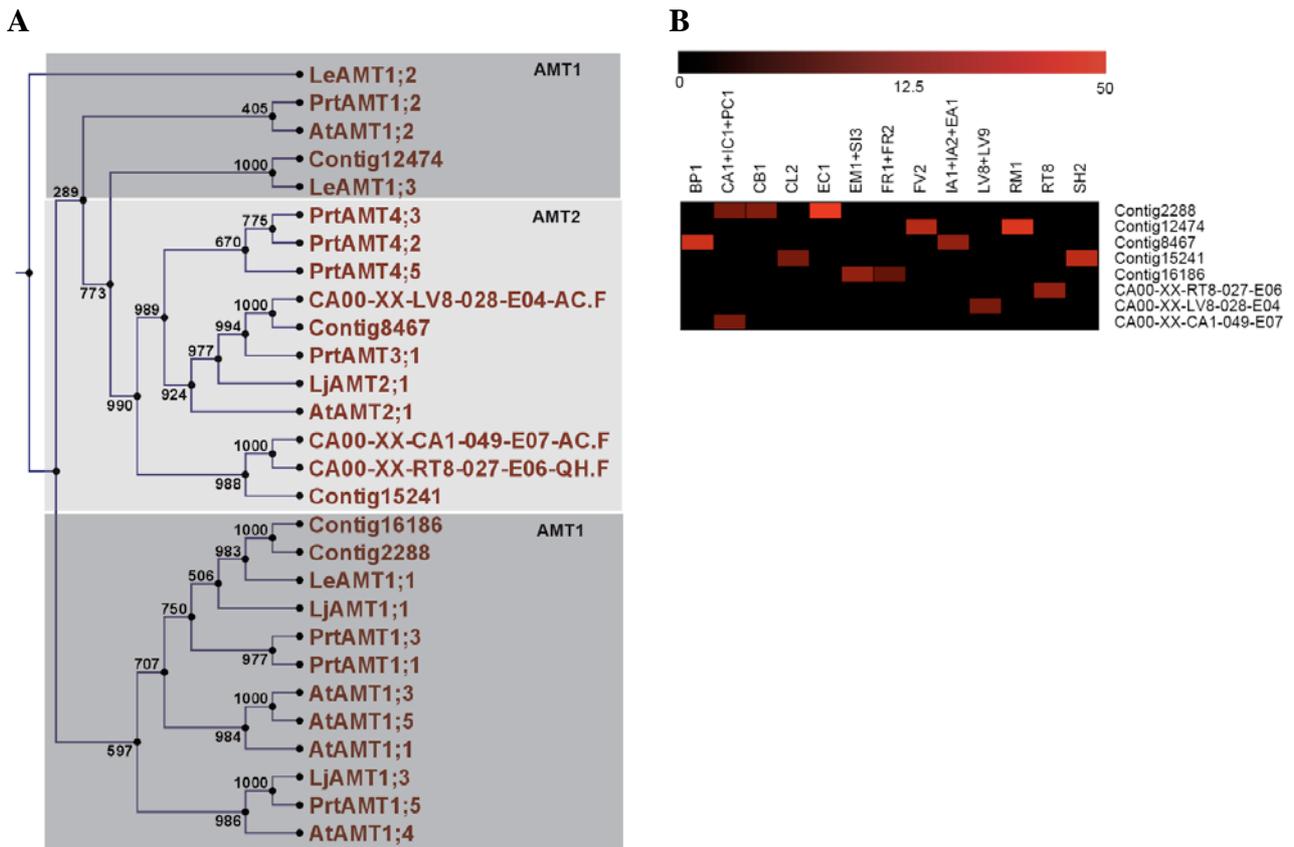


Figura 3. A. Árvore filogenética da família de transportadores de amônio de *Coffea* spp. e da família AMT (*AMmonium Transporter*) de *Arabidopsis*, *Populus trichocarpa*, *Lotus japonicus*, e tomate. A árvore do tipo *neighbour-joining* foi gerada através do alinhamento de 5 *contigs* e 3 *singlets*, que apresentam domínio conservado da família de transportadores de amônio encontrados no banco de dados do CafEST juntamente com as sequências de aminoácidos deduzidas dos membros representativos de AMT previamente caracterizados em outras espécies. Os valores em cada nó dos ramos indicam os números de réplicas de *bootstrap* (total = 1000). Os genes da subfamília *AMT1* codificam os transportadores de alta afinidade, enquanto que os da subfamília *AMT2* de alta afinidade (Yuan et al., 2007). As sequências integrais de aminoácidos foram obtidas pela ferramenta ARAMEMNON (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>) e para *P. trichocarpa* em jgi-psf.org/Poptr1/Poptr1.home.html (Couturier et al., 2007). **B.** Northern eletrônico de *contigs* e *singlets* de possíveis transportadores de nitrato da família AMT do Genoma Café, alinhados de acordo com a média de expressão nas diferentes bibliotecas. Vide figura 1 para descrição das siglas referentes às diferentes bibliotecas.

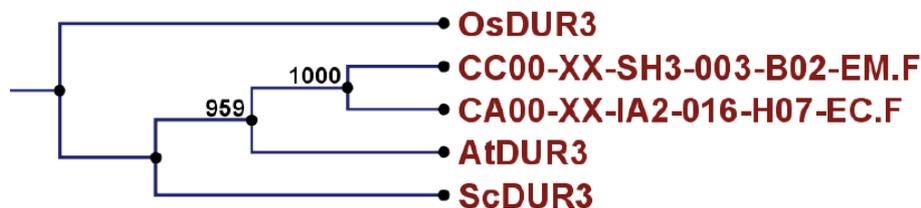


Figura 4. Árvore filogenética de transportadores de uréia em *Coffea* spp. e DUR3 de *Arabidopsis*, arroz e levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). A árvore do tipo *neighbour-joining* foi gerada através do alinhamento de 2 *reads* com as sequências *full length* dos transportadores DUR3 das diversas espécies. Os valores em cada nó dos ramos indicam os números de réplicas de *bootstrap* (total = 1000). As sequências integrais de aminoácidos foram obtidas pela ferramenta ARAMEMNON (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>) e para levedura em www.yeastgenome.org.

O maior número de ESTs de possíveis NRTs em cafeeiro em relação a AMTs e DUR3 provavelmente se deve ao importante papel fisiológico que o nitrato apresenta para ajuste osmótico e como molécula sinalizadora, além de sua maior abundância em solos aeróbicos em relação às outras formas de N. Durante o processo de germinação da semente,

por exemplo, o nitrato é importante osmoregulador para auxiliar na embebição, podendo também atuar como sinalizador, já que são inúmeros os genes regulados por nitrato em plantas (Vidal & Gutierrez, 2008). Condizente com estas funções, foram observados diversos *contigs* de possíveis NRTs expressos em sementes de café em germinação (biblioteca EM1, Figura 1). O gene *AtNRT2.7*, por exemplo, controla a concentração de nitrato nas sementes de *Arabidopsis*, influenciando a velocidade de germinação (Chopin et al., 2007). Este e outros estudos demonstram a importância da família NRT não somente na absorção de NO_3^- pelas raízes mas também na translocação de NO_3^- para os diversos órgãos da planta.

A regulação dos transportadores de nitrato ocorre, a exemplo dos transportadores de amônio e uréia, em diversos níveis (transcrição, tradução e pós-traducional). O gene *NRT2.1*, por exemplo, é induzido por nitrato, reprimido por alto N por uma regulação feedback negativa envolvendo metabólitos de N na forma reduzida como amônio ou aminoácidos, e estimulado por luz e açúcares (como sacarose) (Miller et al., 2007). Já o gene *AtDUR3* é expresso nas raízes somente em deficiência de N, sendo que indução aumenta de maneira drástica quando as raízes entram em contato com uréia (Kojima et al., 2007). Assim, é interessante que se façam estudos de expressão gênica em dependência da disponibilidade de N como parte da análise funcional dos genes aqui descritos em cafeeiro, visando a otimização do uso do nitrogênio pelas plantas de café.

CONCLUSÃO

O número de *contigs/singlets* para as diferentes famílias de transportadores decresceu na ordem: nitrato (NRT) > amônio (AMT) > uréia (DUR3). A maior expressão e diversidade de transportadores de nitrato refletem a importância desta forma de N na nutrição e fisiologia do cafeeiro, assim como na maioria das outras espécies de plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMAÑES et al. Ammonium transport and CitAMT1 expression are regulated by light and sucrose in Citrus plants. *J Exp Bot* (2007) vol. 58 (11) pp. 2811-2825
- CERVELLINI et al. Modo de aplicação de esterco e de fertilizantes minerais no cafeeiro. *Bragantia* (1995) vol. 54 (1) pp. 169-176
- CHOPIN et al. The *Arabidopsis* ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *Plant Cell* (2007) vol. 19 (5) pp. 1590-602
- COUTURIER et al. The expanded family of ammonium transporters in the perennial poplar plant. *New Phytol* (2007) vol. 174 (1) pp. 137-50
- FENILLI et al. Growth, development, and fertilizer- ^{15}N recovery by the coffee plant. *Sci. agric.* (2007) vol. 64 (5) pp. 541-547
- HIROSE et al. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J Exp Bot* (2008) vol. 59 (1) pp. 75-83
- KOJIMA et al. AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *Plant J* (2007) vol. 52 (1) pp. 30-40
- KOJIMA et al. Molecular mechanisms of urea transport in plants. *J Membrane Biol* (2006) vol. 212 (2) pp. 83-91
- LI et al. Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 Inducible High-Affinity Nitrate Transporter Gene Cluster. *Plant Physio.* (2007) vol. 143 (1) pp. 425-433
- LIU et al. AtDUR3 Encodes a New Type of High-Affinity Urea/ H^+ Symporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* (2003) vol. 15 (3) pp. 790-800
- LIU et al. CHL1 Is a Dual-Affinity Nitrate Transporter of *Arabidopsis* Involved in Multiple Phases of Nitrate Uptake. *Plant Cell* (1999) vol. 11 (5) pp. 865
- LUDEWIG et al. Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. *FEBS Letters* (2007) vol. 581 (12) pp. 2301-2308
- MILLER et al. Nitrate transport and signalling. *J Exp Bot* (2007) vol. 58 (9) pp. 2297-306
- REMANS et al. The *Arabidopsis* NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *PNAS* (2006) vol. 103 (50) pp. 19206-11
- TSAY et al. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Letters* (2007) vol. 581 (12) pp. 2290-300
- VALARANI, V. Demanda de macronutrientes pelas folhas e frutos em cultivares de café arábica de porte baixo. Tese de Mestrado, IAC, Campinas (2005) pp. 78
- VAN RAIJ et al. Calagem e adubação nitrogenada e potássica para o cafeeiro. *Bragantia* (1996) vol. 55 (2) pp. 347-355
- VIDAL & GUTIÉRREZ. A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* (2008) vol. 11 (5) pp. 521-529
- VIEIRA et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Braz. J. Plant Physiol.* (2006) vol. 18 (1) pp. 95-108
- WANG et al. Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant Science* (2008) vol. 175 (4) pp. 467-477

YUAN 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* (2007) vol. 19 (8) pp. 2636-2652