



ANA PAULA RIBEIRO

**TRANSFORMAÇÃO DE *Setaria viridis* E
Saccharum spp. COM O GENE *MATE* VISANDO
TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO**

LAVRAS - MG

2016

ANA PAULA RIBEIRO

**TRANSFORMAÇÃO DE *Setaria viridis* E *Saccharum* spp. COM O GENE
MATE VISANDO TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Dr. Alan Carvalho Andrade
Orientador

Dr. Adilson Kenji Kobayashi
Dr. Hugo Bruno Correa Molinari
Dra. Polyana Kelly Martins
Coorientadores

**LAVRAS – MG
2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Ribeiro, Ana Paula.

Transformação de *Setaria viridis* e *Saccharum* spp. com o gene *MATE* visando tolerância ao alumínio / Ana Paula Ribeiro. – Lavras: UFLA, 2016.

155 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador: Alan Carvalho Andrade.

Bibliografia.

1. Alumínio. 2. *MATE*. 3. *Setaria viridis*. 4. Cana-de-açúcar. 5. Biotecnologia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

ANA PAULA RIBEIRO

**TRANSFORMAÇÃO DE *Setaria viridis* E *Saccharum* spp. COM O GENE
MATE VISANDO TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2016.

Dr. Adilson Kenji Kobayashi	EMBRAPA - CNPAE
Dr. Geraldo Magela de Almeida Caçado	EMBRAPA - CNPTIA
Dr. Hugo Bruno Correa Molinari	EMBRAPA - CNPAE
Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira	Universidade do Oeste Paulista

Dr. Alan Carvalho Andrade
Orientador

LAVRAS – MG

2016

Àqueles que sempre acreditaram neste sonho que hoje é uma conquista, e que não pouparam esforços em me ajudar: Marta, Luiz Paulo, Vinícius e Thaís.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por iluminarem meu caminho, me darem força e sabedoria para seguir em frente com muita Fé.

Aos meus pais, Marta e Luiz Paulo, ao meu irmão Vinícius e sua esposa Thaís, por acreditarem e me amparem em todos os momentos, sejam bons ou ruins, que mesmo com a distância física sempre se fizeram presentes. A minha madrinha Maria das Graças, pelas orações ao longo de toda esta jornada.

À Universidade Federal de Lavras – UFLA, e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal pela oportunidade da realização do curso de doutorado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, unidade Agroenergia, pela infraestrutura, condições técnicas de alta qualidade para a execução deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudo vinculada ao Projeto “Bioetanol de cana-de-açúcar: abordagens biotecnológicas para incremento de produtividade via etanol de primeira e segunda geração”, edital CAPES-Embrapa 001-2011.

Ao orientador Dr. Alan Carvalho Andrade pela oportunidade, apoio e confiança na realização deste trabalho.

Ao coorientador Dr. Hugo B. C. Molinari pela Orientação, por acreditar em todo potencial profissional e pessoal creditado a mim e a este trabalho. Além das oportunidades e incentivo ímpar em minha formação profissional e pessoal durante este doutoramento, sendo grande exemplo como pessoa e profissional com seu otimismo e dedicação à pesquisa.

Ao Dr. Adilson K. Kobayashi, pela sua coorientação e por acreditar que eu seria capaz de enfrentar os desafios propostos, por ensinar e incentivar o estudo e, pelas oportunidades concedidas em prol do meu avanço profissional.

Ao pesquisador Dr. Geraldo M. A. Cançado, pela disponibilidade em ter participado como membro da banca examinadora, pelas suas contribuições para este trabalho, e por ter sido inicialmente um dos precursores da minha vida acadêmica e profissional, sempre me incentivando a seguir em frente.

A Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira (Santista), pela disponibilidade em participar da banca examinadora, e por fazer contribuições realizadas neste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Jurandir Vieira Magalhães, pela sua contribuição, acompanhamento e auxílio com ensinamentos e esclarecimentos durante a execução deste trabalho de doutorado.

À Dr^a Polyana K. Martins, pela sua contribuição e participação neste trabalho de tese desde o início, por incentivar através de desafios que foram singulares para que eu conseguisse chegar ao fim do doutorado.

À MSc Bárbara Dias por toda ajuda na execução deste trabalho, pelos ensinamentos, dedicação e companheirismo nos trabalhos principalmente os de cana-de-açúcar, e até mesmo em novos desafios que foram propostos ao longo desta jornada.

Aos amigos do grupo CanaDiSetaria: Dr. Felipe Vinecky, Dr^a. Gisele Domiciano, MSc. Karoline Duarte, Dr. Marcos Basso por não pouparem esforços em ajudar, em terem disponibilidade e presteza na execução dos trabalhos de bancada parte deste trabalho de tese, além de compartilharem de momentos de descontração tornando a rotina de trabalho mais alegre e agradável.

Ao Dr. Wagner Rodrigo de Souza, por ter aceitado o desafio de contribuir cientificamente e participar na finalização deste trabalho, por corrigir e ensinar ao mesmo tempo, ser incentivador e ter se tornado um grande amigo nesta parceria.

Aos pesquisadores, analistas, estudantes e bolsistas que fazem parte do Laboratório de Genética e Biotecnologia - LGB (CNPq), em especial a: Dr. Carlos e Dr^a. Letícia pela participação e incentivo. Aos pesquisadores e analistas do Laboratório de Química de Biomassa e Biocombustíveis - LQB, em especial à Dr^a Patrícia Abrão e a MSc. Raquel pelas inúmeras vezes que se disponibilizaram em ajudar a desvendar análises para compor este trabalho. Ao Dr. Ubiraci Lana do Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo, pela ajuda e contribuição em análises realizadas.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Dr. Pierre Marraccini, Tatiana, Michelle, Fernanda, em especial à amiga Sinara pelo seu apoio e parceria nas horas mais difíceis, inúmeras ajudas nos estudos, correções e apresentações de trabalhos.

Aos colegas, funcionários, pesquisadores e professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Laboratório Central de Biologia Molecular pelos ensinamentos, amizade e incentivo.

Àqueles que me acolheram e tornou a vida em Brasília mais agradável: à amiga Gláucia; José Maria e Izabel e seus familiares; Henrique, Bárbara Paes, Carol Bittencourt, Henrique, Luiz Henrique, Talita, Ana Elisa, Hernani, Gisele.

Aos inesquecíveis amigos sempre presentes mesmo com a distância: Aline, Fernanda Renata, Fernanda Martins, Cyntia, Sheila, Kely, Lígia, João, Gabriel, Wivyan, Livinha. Aos queridos amigos caldenses em especial a: D. Isa Magalhães, Deny e Rosana, César Augusto (Duto) e Sylvia Hermínia, Maurício Nicoletti e Maria do Carmo, Leto e Adriana, Maria Rosa (Lia), Carminha, Fernando, Aurinere, Juliano, Tesfahun, Claudinéia, Dalílhia, Andressa, Sâmera, Alisson, Mariana e a todos seus familiares que fazem parte desta conquista.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

“Para cultivar a sabedoria, é preciso força interior.
Sem crescimento interno, é difícil conquistar a
autoconfiança e a coragem necessária.
Sem elas, nossa vida se complica.
O impossível torna-se possível com a força de vontade.”

Dalai Lama

RESUMO GERAL

Duas grandes limitações para a produção agrícola mundial, particularmente nas regiões tropicais, é a toxidez por alumínio (Al^{3+}) e o déficit hídrico. Regiões consideradas potenciais para a expansão agrícola canavieira no Brasil estão localizadas na região do Cerrado, caracterizado por apresentar solos ácidos e elevados níveis de Al^{3+} . Sob níveis tóxicos de Al no solo, as raízes das plantas paralisam seu desenvolvimento e tornam-se incapazes de explorar camadas mais profundas do solo, restringindo a absorção de nutrientes, aumentando a susceptibilidade à seca e reduzindo a produção. Na busca por alternativas que favoreçam a expansão agrícola e o desenvolvimento das culturas agrícolas, este trabalho objetivou estudar um dos mecanismos fisiológicos associados à tolerância ao Al^{3+} baseado no gene *MATE*. O gene *MATE* codifica uma proteína transmembrana da família *Multidrug And Toxic Compound Extrusion Family*, responsável pelo efluxo de citrato, pelo ápice radicular, ativado na presença de Al^{3+} . Devido à complexidade do genoma da cana-de-açúcar e o tempo necessário para obtenção de eventos transgênicos em cana-de-açúcar, *Setaria viridis* A10.1 foi utilizada como planta modelo para prova de conceito. *S. viridis* é uma planta de metabolismo C4, possuindo características como pequeno porte, ciclo de vida curto, produção de um grande número de sementes, genoma totalmente sequenciado, filogeneticamente próximo à cana-de-açúcar e, protocolo de transformação genética estabelecido. Deste modo, a proposta do presente trabalho envolveu a transformação genética de *S. viridis* para a superexpressão do gene *MATE* de *Brachypodium distachyon* (*BdMATE*), ortólogo do *MATE* de sorgo (*SbMATE*), visando o desenvolvimento de eventos tolerantes ao alumínio. Para tal, foram realizadas as seguintes etapas: i. transformação genética de *S. viridis* A10.1, ii. desenvolvimento de um bioensaio em hidroponia para testes com alumínio tóxico e a iii. fenotipagem dos eventos geneticamente modificados (GM) para tolerância ao alumínio. Eventos GM de *S. viridis* superexpressando o gene *BdMATE* apresentaram tolerância ao alumínio tóxico, sendo caracterizadas pelo crescimento diferencial das raízes em condições de estresse por Al^{3+} , quando comparadas às plantas não transformadas. Após a prova de conceito em *S. viridis*, foram gerados eventos GM de cana-de-açúcar, para superexpressar o gene *SbMATE*.

Palavras-chave: Alumínio. *MATE*. Cana-de-açúcar. *Setaria viridis*. Biotecnologia.

GENERAL ABSTRACT

A major limiting factor for plant growth is the aluminum (Al) toxicity displayed by acidic soils, especially in tropical regions. In Brazil, sugarcane is an economically important crop, for sugar, bioethanol and production. The expansion of the arable lands for sugarcane production in Brazil includes the Cerrado region, characterized by acidic soils and consequently high Al toxicity. Under high levels of aluminum in the soil, the root growth is restricted, and in such conditions, the roots are unable to explore deeper regions of the soil for the absorption of nutrients and water, with major yield losses. Thus, it is pivotal the development of new varieties of crops presenting aluminum tolerance. In this work, the model plant *Setaria viridis* A10.1 was transformed to generate transgenic plants with aluminum tolerance. *S. viridis* is a short, fast-growing, C4 plant with its genome sequence fully available, making it a reliable model for genetic studies. In addition, *S. viridis* is suitable for genetic transformation through *Agrobacterium tumefaciens*, with well-established transformation protocols. The idea was to use this model plant as a proof of concept for sugarcane, which has a complex genome and therefore it is less amenable for genetic transformation. The plants were transformed to overexpress a gene that belongs to the *Multidrug And Toxic Compound Extrusion Family (MATE)*, which confers aluminum tolerance in sorghum (*Sorghum bicolor*). The sorghum *MATE (SbMATE)* is a membrane transporter responsible for the efflux of citrate to the rhizosphere, chelating Al^{3+} ions, and consequently decreasing the toxicity of this metal. Here, we describe the genetic transformation of *S. viridis* with an orthologous of *SbMATE*, the *BdMATE* gene. In addition, the development of a hydroponic bioassay for Al stress and the phenotyping of the transformed plants are also described. The transgenic plants showed an Al-tolerance phenotype, characterized by sustained root growth under $20 \mu M Al^{3+}$, whereas non-transformed plants showed root growth inhibition. These promising results obtained in *S. viridis* prompted us to genetically transform sugarcane plants overexpressing *SbMATE* for Al tolerance.

Keywords: Aluminum. *MATE*. Sugarcane. *Setaria viridis*. Biotechnology.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	<i>Saccharum</i> spp.	17
2.2	Solos ácidos e alumínio	20
2.3	Melhoramento genético clássico e biotecnologia	24
2.4	Estratégias de tolerância e resistência ao alumínio em plantas (Tolerância x Toxidez)	27
2.4.1	Mecanismos de exclusão e detoxificação	31
2.4.2	Respostas moleculares de tolerância ao alumínio	34
2.4.3	<i>SbMATE</i> (<i>Sorghum bicolor</i> Multidrug and Toxic Compound Extrusion)	37
2.5	Cultura de tecidos e transformação genética de cana-de-açúcar	41
2.6	<i>Setaria viridis</i> como planta modelo	45
3	CONCLUSÃO GERAL	49
	REFERÊNCIAS	51
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	71
	ARTIGO 1 - OVEREXPRESSION OF <i>BdMATE</i> GENE CONFERS ALUMINUM TOLERANCE IN <i>Setaria viridis</i>	71
	ARTIGO 2 - TRANSFORMAÇÃO DE <i>Saccharum</i> spp. COM O GENE <i>SbMATE</i>	117
	ARTIGO 3 - A SIMPLE AND HIGHLY EFFICIENT <i>Agrobacterium</i>-MEDIATED TRANSFORMATION PROTOCOL FOR <i>Setaria viridis</i>	149

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é atualmente uma das culturas de grande importância no setor agroenergético brasileiro e no mercado internacional, principalmente pelo fato de um de seus principais produtos, o etanol, ser uma alternativa viável à substituição dos combustíveis de origem fóssil. A crescente demanda por combustíveis renováveis coloca o Brasil em destaque, pois este dispõe de áreas agrícolas para a expansão da canavicultura (TORQUATO, 2006; UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2015).

Um dos principais obstáculos ao aumento de produtividade da cana-de-açúcar nos próximos anos será o desenvolvimento de novas variedades adaptadas aos diferentes tipos de clima e solo. Áreas definidas para a expansão da cultura canavieira muitas vezes apresentam solos com características indesejadas tais quais: a presença de alumínio tóxico, deficiência de fósforo e longos períodos de escassez de chuvas, que são fatores limitantes à adaptação e ao desenvolvimento da cana-de-açúcar.

O alumínio (Al) é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais comum na crosta terrestre (KOCHIAN, 1995), compreendendo aproximadamente 7% da sua massa total (DELHAIZE; RYAN, 1995). Em solos ácidos, o alumínio tóxico é fator limitante para a produtividade das culturas (FRÁGUAS, 1999). O sintoma mais expressivo e típico da toxidez por alumínio é a inibição do crescimento radicular, sendo esta a parte mais afetada da planta (COMIN et al., 1999). Assim, o uso de genótipos adaptados às condições de solo ácido em conjunto com a adição de calcário e adubação adequada são algumas das estratégias utilizadas em solos com elevados teores de alumínio (KOCHIAN, 1995).

O desenvolvimento de genótipos tolerantes a estresses abióticos representa uma alternativa para o aumento da produtividade agrícola. Diferentes estratégias de melhoramento genético têm sido adotadas para aumentar a tolerância das plantas às condições ambientais adversas, dentre elas a superexpressão de genes e fatores de transcrição atuantes em processos metabólicos relacionados aos estresses ambientais (GUIMARÃES et al., 2011). A expressão heteróloga de genes que conferem tolerância ao alumínio mostrou-se uma alternativa viável para o melhoramento de culturas submetidas a este tipo de estresse (DELHAIZE et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2007). Assim, o desenvolvimento de uma cultivar de cana-de-açúcar tolerante ao alumínio representa uma alternativa promissora para expansão agrícola desta cultura. Porém, a complexidade do genoma de cana torna sua transformação genética um grande desafio, o que vem sendo contornado ao longo dos últimos anos (BELINTANI et al., 2012; LEIBBRANDT; SNYMAN, 2003; MOLINARI et al., 2007; REIS et al., 2014).

Devido ao grande esforço necessário para a geração de eventos transgênicos em poáceas de grande porte como a cana-de-açúcar, tem-se utilizado modelos experimentais para a transformação com genes de interesse e avaliação do fenótipo desejado, visando à prova de conceito. *Setaria viridis* é uma planta com metabolismo C4 de pequeno porte, ciclo de vida curto, prolífica produção de sementes, com genoma totalmente sequenciado (BENNETZEN et al., 2012) e filogeneticamente próxima à cana-de-açúcar. Em combinação com um protocolo de transformação genética eficiente (MARTINS et al., 2015), *S. viridis* preenche os requisitos de planta modelo para cana-de-açúcar.

Como mencionado anteriormente, a expansão da cultura canavieira no Brasil deve avançar cada vez mais para áreas contendo solos com características indesejadas, como, por exemplo, alta acidez e conseqüentemente toxicidez por alumínio.

Magalhães et al. (2007) demonstraram que plantas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene (*SbMATE*) de *Sorghum bicolor* mostraram-se mais tolerantes ao alumínio tóxico em solução nutritiva, quando comparadas às plantas não transgênicas. O gene *SbMATE* codifica uma proteína transmembrana da família *Multidrug And Toxic Compound Extrusion* (MATE), que atua na via de exsudação do citrato pelo ápice radicular. O citrato secretado tem a capacidade de quelar os íons Al^{3+} na rizosfera, impedindo sua absorção pelas raízes, conferindo assim tolerância (MAGALHÃES et al., 2007).

Tendo em vista a discussão levantada anteriormente, a proposta do presente trabalho visou a transformação genética de *S. viridis* para a superexpressão de um gene ortólogo de *SbMATE*, neste caso, o gene *MATE* de *Brachypodium distachyon* (*BdMATE*), para tolerância ao alumínio. Foram realizadas a transformação genética de *S. viridis* A10.1, o desenvolvimento de um protocolo de estresse por alumínio baseado em hidroponia nesta cultura e a fenotipagem dos eventos geneticamente modificados (GM) para tolerância ao alumínio.

Plantas de *S. viridis* superexpressando o gene *BdMATE* mostraram maior tolerância ao alumínio, que pode ser verificada pelo crescimento acentuado das raízes dos eventos transgênicos em condições de estresse por alumínio, quando comparadas às plantas não transformadas. Após a prova de conceito em *S. viridis*, foram gerados eventos de cana-de-açúcar GM, com o intuito de superexpressar o gene *SbMATE*. Neste estudo, descrevemos um protocolo eficiente de transformação genética via biobalística para variedade de cana-de-açúcar cv. RB855156, resultando em 17 eventos putativos transgênicos com superexpressão do gene *SbMATE*. Futuramente, estes eventos transgênicos serão avaliados quanto à tolerância ao alumínio, em ensaios de hidroponia, em casa de vegetação e a campo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

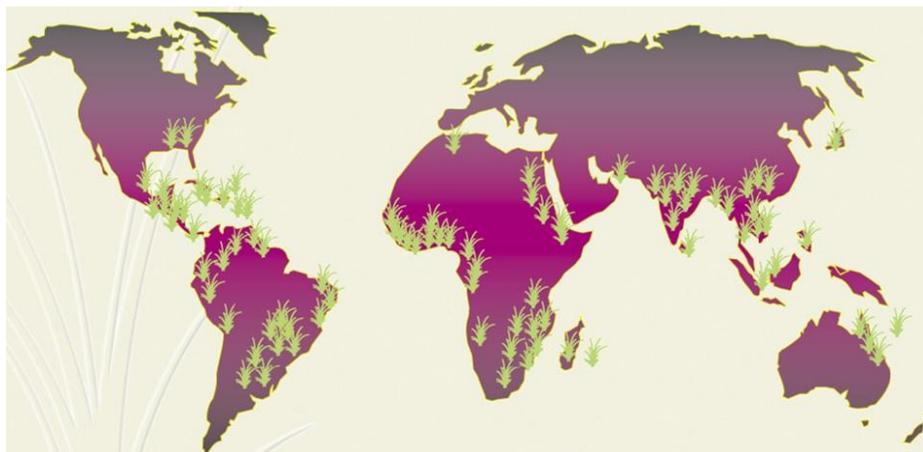
2.1 *Saccharum* spp.

Considerada umas das principais espécies cultivadas, a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), é de grande importância mundial por ser a principal fonte de energia para produção de etanol e responsável por 75% do açúcar produzido mundialmente (DIBAX et al., 2011; WU; ALTPETER, 2015). É uma monocotiledônea, semi-perene, pertencente à família Poaceae, subfamília Andropogoneae e gênero *Saccharum* (CESNIK; MIOCQUE, 2004; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; JANNOO et al., 1999). As variedades atualmente cultivadas são resultantes do cruzamento interespecífico entre *S. officinarum*, *S. barbieri*, *S. sinense* e as selvagens *S. spontaneum* e *S. robustum* (DILLON et al., 2007; KUMAR et al., 2014; MOLINARI, 2006). A reprodução é principalmente assexuada, por propagação vegetativa através de colmos, porém em programas de melhoramento genético a reprodução sexuada é utilizada para o desenvolvimento de novas variedades (DILLON et al., 2007; RESENDE; BARBOSA, 2005; SILVA; SILVA, 2012; ZHANG et al., 2013).

Originária do Sudeste da Ásia e Nova-Guiné, a cana-de-açúcar atualmente é cultivada em 121 países, estes localizados em regiões tropicais e subtropicais, figura 1 (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2012). No Brasil foi introduzida em 1502 durante o período colonial, estabelecendo-se de forma definitiva nas regiões Centro-Sul e Nordeste (DILLON et al., 2007; PROCÓPIO et al., 2003). Os cinco principais produtores de cana-de-açúcar no mundo são: Brasil, Índia, China, Tailândia e Estados Unidos. Outros países também cultivam cana-de-açúcar ao redor do mundo, com maior ou menor grau de importância como México, Cuba, República Dominicana, Guatemala, Colômbia, Argentina, Rússia, Ucrânia, África do Sul, Turquia, Egito, Austrália, Paquistão, Indonésia, Filipinas entre outros (UNITED

STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2015). Entretanto, o Brasil é o único país no cenário mundial que apresenta condições e área disponíveis para plantio e, conseqüentemente, o aumento da produção de cana-de-açúcar.

Figura 1 - Mapa mundial de países que cultivam cana-de-açúcar.



Fonte: União da Indústria de Cana-de-açúcar (2012).

O aumento na demanda de energia limpa e sustentável melhorou a perspectiva econômica para o etanol, colocando o agronegócio brasileiro em posição de destaque, pela sua cadeia produtiva, industrial e comercial de cana-de-açúcar (SALLA et al., 2009). O valor econômico agregado à cultura é baseado principalmente em três atributos: i) altamente produtiva; ii) uso eficaz de insumos agrícolas; iii) processamento local de produtos como: açúcar, melaço, etanol e eletricidade, todos passíveis de armazenamento e transporte; estes atributos contribuem para tornar a cana-de-açúcar uma mercadoria de comércio primordial nos países onde é cultivada (MOORE et al., 2013).

Além de matéria-prima para a produção de açúcar e etanol, os produtos e resíduos gerados nas usinas sucroalcooleiras são utilizados para cogeração de energia elétrica, fabricação de ração animal e fertilizante para as lavouras

(EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2012). O etanol e o bagaço de cana-de-açúcar representam aproximadamente 15,7% da matriz energética brasileira, ocupando o 2º lugar no ranking das principais fontes energéticas do país, ficando abaixo apenas do petróleo e derivados e acima da hidroeletricidade (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2015; UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2015).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar, ocupando o segundo lugar na produção de etanol mundial, atrás somente dos Estados Unidos (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2012; UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2014). De acordo com levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) realizado em agosto de 2015, o Brasil deverá colher 663,11 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2015/2016, representando um aumento de 4,5% em relação à safra de 2014/2015. Em torno de 66% da cana-de-açúcar colhida nesta safra será destinada para produção de etanol, ao todo serão produzidos 16,5 bilhões de litros de álcool hidratado, utilizados para abastecimento de veículos *flex fuel* e 12 bilhões de litros de álcool anidro para mistura com gasolina (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2015). A área cultivada no Brasil com cana-de-açúcar na safra 2015/16 é de 9.057,2 mil hectares e o maior produtor é o estado de São Paulo, que possui uma área de 4.648,2 mil hectares destinadas à atividade sucroalcooleira, seguido de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Paraná (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2015). Ao todo, estes estados são responsáveis por 92% da produção nacional. Os outros estados produtores possuem áreas menores, com representações abaixo de 1,4%, totalizando 5,2% da área total do país (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2015; UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2015). Com uma demanda cada vez mais crescente dos mercados interno e externo por combustíveis renováveis como o etanol, o Brasil coloca-se

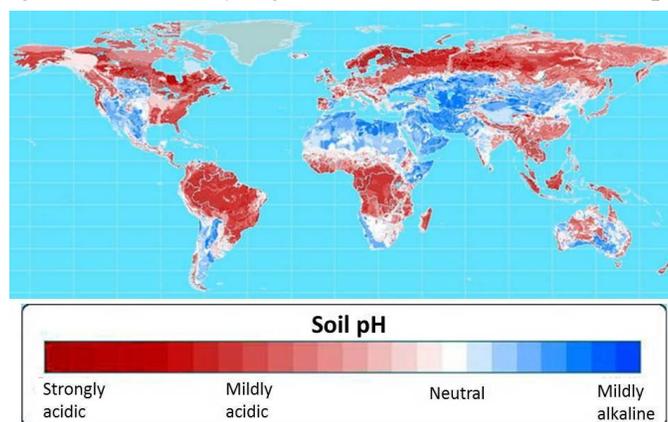
como o país com suporte para o aumento de produção, por deter tecnologias e áreas agrícolas disponíveis para a expansão canavieira (KOHLHEPP, 2010; TORQUATO, 2006).

Grandes áreas de produção de cana-de-açúcar, milho, café e soja concentram-se na região do Cerrado, que possui topografia plana e solos profundos, altamente desejáveis para atividade agrícola, porém é uma região que apresenta baixa fertilidade natural e elevada acidez, que culminam na toxidez de alumínio e na deficiência de fósforo. Apesar das limitações químicas, esses solos apresentam inúmeras vantagens agronômicas, assumindo um papel importante na agricultura nacional, ocupando em torno de 68% do território brasileiro (HARTWIG et al., 2007).

2.2 Solos ácidos e alumínio

Os solos ácidos são encontrados em toda parte territorial do planeta e em grandes proporções nas regiões tropicais e subtropicais, sendo que mais de 50% dos solos potencialmente agricultáveis no mundo são ácidos (FIGURA 2) (CANÇADO, 2006; KOCHIAN et al., 2015; VON UEXKÜLL; MUTERT, 1995).

Figura 2 - Distribuição global de solos de acordo com o pH.



Fonte: Generation Challenge Programme, 2014.

Conforme relatado por Oliveira (2012), somente no Brasil há mais de 500 milhões de hectares cobertos com solos ácidos, que compreende dois terços do território total (VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005). Atualmente as áreas potencialmente agricultáveis estão incluídas dentro do bioma Cerrado (FIGURA 3), que tem solos naturalmente ácidos (CANÇADO, 2006; GOEDERT, 1983).

Figura 3 - Mapa do bioma Cerrado no Brasil.

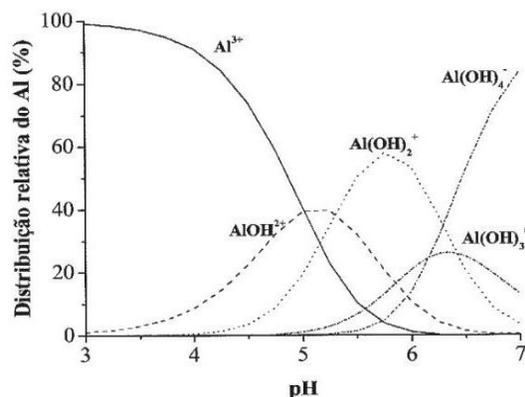


Fonte: Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras - UFLA, 2015.

O solo do Cerrado brasileiro é classificado como latossolo, distrófico e ácido, apresentando baixa concentração de nutrientes, além de saturação por alumínio. As características de solos ácidos e nutrição de plantas associados são complexas, e envolve o conhecimento em diversas áreas da pesquisa. Silva (2008) descreve as principais limitações dos solos ácidos sendo: i) os altos teores de H^+ e Al^{3+} ativos na solução do solo; ii) a baixa capacidade de troca catiônica; iii) a alta capacidade da fase sólida em absorver ânion, especialmente o íon fosfato e iv) a baixa atividade orgânica e biológica na fração do solo. Entre todas estas limitações, o alto teor de alumínio (Al^{3+}) é reconhecido como principal limitante para a produção agrícola (BOFF, 2006).

O alumínio é o elemento químico natural mais abundante da crosta terrestre, é constituinte das partículas de argila do solo, presente na forma de alumino-silicatos, óxidos e hidróxidos de alumínio (BOFF, 2006; CANÇADO, 2006; KOCHIAN et al., 2015; OLIVEIRA, 2012). Dentre os constituintes do solo, o alumínio ocupa a terceira colocação, quantitativamente superada por oxigênio e silício (FERRAZ et al., 2015). Em decorrência da acidez do solo há o aumento da solubilidade de alumínio e este adquire forma fitotóxica de $Al(H_2O)_6^{3+}$, por convenção referido como Al^{3+} (FIGURA 4) (BOFF; 2006; CANÇADO, 2006; DELHAIZE; RYAN, 1995; MA; RYAN; DELHAIZE, 2001).

Figura 4 - Distribuição relativa das espécies de alumínio na solução do solo.



Fonte: Bertsch e Parker (1995 apud FREITAS, 2011).

No solo com pH menor que cinco (<5), o hidrogênio (H^+) atua sobre os minerais de argila ocasionando a hidrólise: do hidróxido de Al; de íons silicato da superfície dos argilominerais e do alumínio complexado com a matéria orgânica do solo, que por consequência provoca a liberação do Al para a solução do solo (ASHMAN; PURI, 2002; MALAVOLTA, 1980; OLIVEIRA, 2012). Este alumínio trocável na solução do solo possui efeitos rizotóxicos limitando o desenvolvimento do sistema radicular e impedindo uma maior exploração do solo para aquisição de nutrientes e água (ECHART; CAVALLI-MOLINA, 2001). Devido à interferência do Al nos processos de absorção, transporte e uso de alguns nutrientes, tais como Ca^{+2} , Mg^{+2} , K, P, Cu^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} e Zn^{+2} , as plantas se tornam mais susceptíveis aos estresses abióticos (BARCELO; PORSCHENRIEDER, 2002; CANÇADO, 2006; FERRAZ et al., 2015).

A dificuldade para a neutralização de íons H^+ e Al^{3+} é um dos problemas encontrados nos solos ácidos, que pode ser corrigido ou minimizado por intermédio da calagem, que consiste na aplicação de calcário ($CaCO_3 + MgCO_3$) na superfície do solo para elevar o seu pH (PANDEY et al., 1994; ZEIGLER et al., 1995). Ferraz et al. (2015) relatam que em alguns trabalhos de pesquisa

realizados em solos brasileiros, foi observado a elevação do pH, de teores de Ca^{2+} e Mg^{2+} e redução do Al^{3+} após a aplicação de calcário na camada arável do solo.

A camada arável torna-se menos solúvel ao alumínio, reduzindo relativamente sua toxidez, estratégia que também pode não ser suficiente para solucionar tal problema, pois esse procedimento não atinge as camadas inferiores (PANDEY et al., 1994; ZEIGLER et al., 1995). Para atingir as camadas subsuperficiais do solo, a aplicação de gesso agrícola pode ser uma alternativa. O gesso agrícola é composto de cálcio e enxofre, aplicado na camada subsuperficial do solo, mas por ser uma fonte mais solúvel do que o calcário, o gesso agrícola não promove a neutralização da acidez do solo (ROSSETO; SANTIAGO, 2012).

Estas práticas agrícolas como a calagem e a gessagem são alternativas a curto e médio prazo, na tentativa de mitigar o problema do solo ácido. No entanto, a identificação de genótipos tolerantes e sensíveis a este solo ácido tem sido realizada para que se possam utilizar ferramentas do melhoramento genético clássico e de engenharia genética para desenvolvimento de novas variedades tolerantes ao alumínio.

2.3 Melhoramento genético clássico e biotecnologia

Os programas de melhoramento genético clássico têm contribuído de maneira significativa no setor sucroalcooleiro energético, mas a introdução de uma característica desejável por retrocruzamento frequentemente permitem a inserção de outras características não desejadas que, somadas à complexidade genética da cultura, fazem com que o melhorista demande grandes esforços na eliminação desses genes (RICHARDS, 1996). Graças principalmente ao melhoramento convencional, a produtividade média dos canaviais aumentou de 43 toneladas por hectare em 1961, para aproximadamente 74 toneladas por

hectare na safra 2012/2013 (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2012). Atualmente no Brasil há três programas de melhoramento de cana-de-açúcar: a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA); o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC); e o Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

As variedades de cana-de-açúcar cultivadas atualmente são híbridos, resultantes de cruzamentos interespecíficos seguidos por várias gerações de retrocruzamentos entre as espécies *Saccharum officinarum* ($2n = 80$), espécie que contribuiu para o incremento no teor de açúcar do colmo, e *Saccharum spontaneum* ($2n = 40-128$), espécie selvagem responsável pelo vigor vegetativo e resistência a diversas doenças (D'HONT et al., 1998; MING et al., 1998). O alto grau de aneuploidia e poliploidia faz da cana-de-açúcar uma das espécies com genoma mais complexo dentre as monocotiledôneas (GRIVET; ARRUDA, 2002). O choque interespecífico de genomas, ao mesmo tempo em que cria uma enorme variabilidade genética, impõe dificuldades ao melhoramento, pois torna a obtenção de indivíduos portadores de características agronômicas desejáveis um processo demorado.

Um programa de melhoramento clássico de cana-de-açúcar, desde a realização dos cruzamentos até a liberação comercial do material, pode levar de 12 a 15 anos. No caso de características que são controladas por múltiplos genes e que sofrem influência do ambiente, o trabalho na seleção de clones torna-se ainda mais difícil (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

Nas últimas décadas, com o aumento da importância socioeconômica e agroindustrial da cultura para o país, houve um maior incentivo em áreas da biotecnologia moderna ainda pouco exploradas. O melhoramento genético da cana-de-açúcar tem incorporado novas ferramentas biotecnológicas, como a transgenia, no desenvolvimento de variedades (ARRUDA, 2012). A manipulação genética de cana-de-açúcar é realizada desde meados dos anos 90

no Brasil e diversos trabalhos já foram publicados sobre o desenvolvimento de eventos geneticamente modificados que conferem maior tolerância a: insetos-praga (BRAGA et al., 2003; FALCO; SILVA-FILHO, 2003); à seca (MOLINARI et al., 2007; REIS et al., 2014) e à baixa temperatura (BELINTANI et al., 2012). Na Comissão Técnica Nacional de Biossegurança constam aprovados mais de 40 processos, visando a condução de ensaios de campo com plantas de cana-de-açúcar geneticamente modificadas contendo genes que conferem tolerância a herbicidas, aumento no conteúdo de sacarose e resistência ao ataque de insetos (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). No entanto, nenhuma variedade foi liberada para plantio comercial, no Brasil, até o momento.

Além destes atributos, a transgenia pode ser utilizada também para obtenção de plantas com características que poderão elevar a produção de etanol de segunda geração, como por exemplo, o aumento da biomassa total da cana-de-açúcar e a expressão *in planta* de enzimas necessárias na conversão de celulose e hemicelulose em açúcares fermentáveis (ARRUDA, 2012; SAINZ, 2009).

Por meio da engenharia genética eliminam-se as barreiras de incompatibilidade de cruzamento entre espécies permitindo a introdução de novos genes. Desta maneira, a engenharia genética tem enorme potencial para o aumento da produtividade da cultura e na garantia da sustentabilidade ambiental das futuras variedades, através da maior tolerância a estresses abióticos, reduzindo a pressão pela ampliação da área cultivada (BOHNERT; JENSEN, 1996). O investimento em ações que integrem programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar e pesquisas em biotecnologia é necessário tendo em vista a identificação de genes que, quando incorporados, permitirão o desenvolvimento de variedades adaptadas a diversos tipos de clima e condições abióticas adversas.

Estudos visando à obtenção de plantas de interesse agrônomico tolerantes a estresses abióticos estão frequentemente focados na introdução, superexpressão ou *knockout/knockdown* de genes que codificam proteínas, dentre elas osmólitos, bombas de prótons, antioxidantes, HSPs (*Heat Shock Proteins*), proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant Proteins*) e vários fatores de transcrição (WANG; VINOCUR; ALTMAN, 2003). Além disso, algumas cultivares economicamente importantes como: trigo, milho, feijão e soja tem mostrado variação interespecífica quanto à tolerância ao Al^{3+} , sendo uma fonte de estudo para a investigação dos níveis de tolerância de outras linhagens também comerciais (PÔSSA, 2010; RYAN; DELHAIZE; JONES, 2001). Como mencionado anteriormente, o Al^{3+} é um importante fator de estresse em culturas vegetais. Diante disto, trabalhos recentes têm dado ênfase e destaque na busca de respostas, compreensão e investigação dos mecanismos de toxidez e tolerância ao alumínio em plantas (CANÇADO, 2006; HARTWIG et al., 2007; KOCHIAN et al., 2015; NUNES-NESEI et al., 2014).

Assim, o melhoramento genético via biotecnologia torna-se uma alternativa viável não somente para a obtenção de plantas tolerantes ao alumínio, mas também para avanços no conhecimento das estratégias de tolerância e/ou toxidez destas plantas.

2.4 Estratégias de tolerância e resistência ao alumínio em plantas

(Tolerância x Toxidez)

Nas últimas décadas grandes avanços foram obtidos no conhecimento da genética e dos mecanismos envolvidos na tolerância e toxidez do Al^{3+} em plantas, como pode ser verificado em revisões descritas por Kochian (1995), Kochian et al. (2015), Kochian, Hoekenga e Piñeros (2004), Kochian, Piñeros e Hoekenga (2005) e Liu, Piñeros e Kochian (2014). Mesmo assim, há muito a ser investigado em relação aos mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares

interferidos pela ação direta ou indireta do Al^{3+} . Há diversos estudos que buscam o entendimento de toxidez e tolerância do Al^{3+} , principalmente quanto aos processos fisiológicos afetados e o tempo de resposta das espécies (BOFF, 2006). Algumas espécies apresentam sintomas e respostas detectáveis ao Al^{3+} dentro de minutos após a exposição, outras apenas discerníveis depois de um longo tempo de exposição de horas ou dias (MA; RYAN; DELHAIZE, 2001).

Os termos resistência e tolerância ao alumínio foram e continuam sendo frequentemente usados indistintamente, conforme descrito por Kochian et al. (2015). O termo resistência ao alumínio se refere à capacidade de uma planta manter razoavelmente o crescimento e produtividade em solos ácidos. Por sua vez, o termo tolerância ao alumínio é descrito como um mecanismo de resistência onde os íons de Al^{3+} são sequestrados e detoxificados em compartimentos subcelulares e/ou translocados para longe do ápice radicular (KOCHIAN et al., 2015).

Os mecanismos envolvidos no processo de tolerância ou resistência ao alumínio ainda não estão completamente elucidados, uma vez que o Al^{3+} pode interagir com múltiplos sítios tanto no simplasto como no apoplasto das células radiculares, este Al^{3+} tem diversos alvos em diferentes rotas que podem estar associadas ao crescimento radicular (BOFF, 2006; KOCHIAN; PIÑEROS; HOEKENGA, 2005). Para algumas espécies, o Al^{3+} em contato com as raízes promove rapidamente a paralisação do crescimento das mesmas, tornando-as atrofiadas em função da morte e/ou injúria do meristema radicular, mais especificamente a parte distal da zona de transição no ápice das raízes, em que as células estão iniciando a fase de alongamento. Este efeito é descrito como o sítio de ação tóxica primária do Al (FREITAS, 2011; SIVAGURU; HORST, 1998).

A interferência e ação do alumínio nas plantas podem ocorrer das seguintes formas: i) interferência na divisão celular da raiz principal e das raízes

laterais; ii) aumento da rigidez da parede celular; iii) redução da replicação do DNA; iv) alteração das proteínas de transporte na membrana; v) alterações na atividade de muitas enzimas; vi) alterações na permeabilidade da membrana plasmática, devido à forte interação com os fosfolipídios de membrana e a peroxidação de lipídios (COPELAND; DELMA, 1992; FREITAS, 2011; KOCHIAN, 1995; MEHARG, 1993; SIVAGURU; HORST, 1998; SLASKI, 1990).

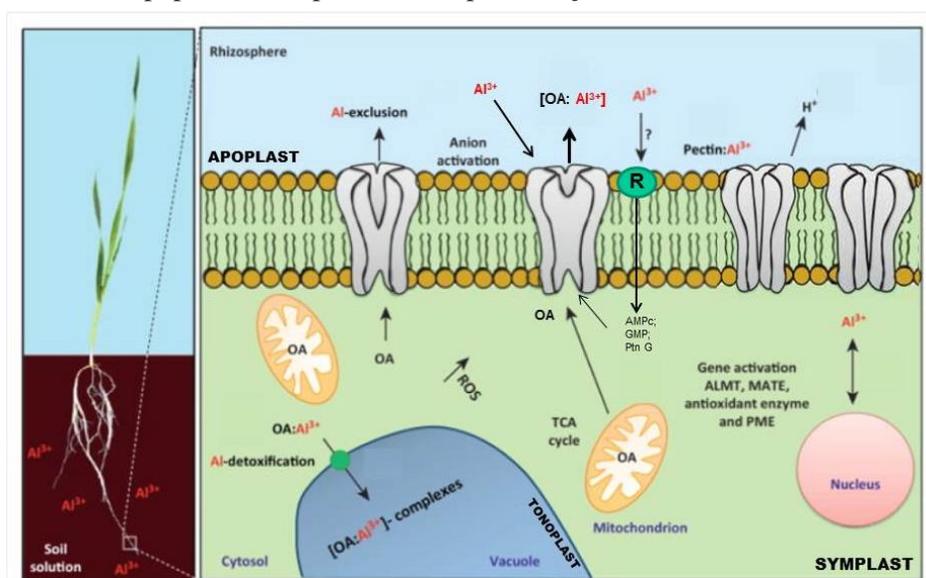
Em virtude de suas propriedades físico-químicas, o Al^{3+} pode interagir com a superfície da membrana plasmática carregada negativamente, e os seguintes danos podem ocorrer em decorrência desta interação (BOFF, 2006; KOCHIAN, 1995; KOCHIAN; PIÑEROS; HOEKENGA, 2005):

- a) Dano no empacotamento dos fosfolipídios e na fluidez da membrana, por causa da afinidade do Al^{3+} por lipídios constituintes da membrana;
- b) Dificuldade no transporte intercelular através dos plasmodesmas, uma vez que induz a síntese e o acúmulo de calose na membrana;
- c) Despolarização instantânea da membrana, devido a interações diretas e indiretas com diferentes vias de transporte de íons;
- d) Inibição da atividade de bombas H^+ -ATPase, impedindo a formação e a manutenção do gradiente de prótons transmembrana;
- e) Interação direta com diferentes bombas e canais de proteínas;
- f) Inibição da absorção de cátions como Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , NH_4^+ ;
- g) Modulação da atividade de transportadores via alterações no potencial de membrana.

A exposição ao Al^{3+} pode, ainda, gerar distúrbios no processo de absorção e de transporte de íons, afetando assim, a homeostase iônica nas células

das raízes (OLIVEIRA, 2012). Acredita-se que plantas tolerantes devem ser capazes de prevenir a absorção de Al, ou complexá-lo após sua absorção (PARENTONI et al., 2001). Houve uma especulação considerável sobre a quantidade de diferentes mecanismos de tolerância ao alumínio envolvidos com a exclusão de ácidos orgânicos e na detoxificação interna (FIGURA 5).

Figura 5 - Representação esquemática das estratégias de mecanismos via apoplasto e simplasto em resposta à ação do Al^{3+} .



Legenda: **Abreviaturas:** OA - ácido orgânico; AMP - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico; GMP - monofosfato cíclico de guanosina; Ptn G - proteína G; ROS - espécies reativas de oxigênio; TCA cycle - ciclo do ácido tricarboxílico; MATE - Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family, ALMT - Aluminum-activated Malate Transporter; PME - pectina metil esterase.

Fonte: Nunes-Nesi et al. (2014) (adaptado).

De maneira geral alguns trabalhos relatam duas estratégias na qual os mecanismos de tolerância ao alumínio são divididos: uma estratégia é nomeada de **mecanismos de exclusão ou apoplásticos**, que age impedindo o alumínio de atravessar a membrana plasmática e penetrar no simplasto, por meio da liberação

de quelantes como ácidos orgânicos tais como citrato, malato e oxalato; a outra estratégia é definida como **mecanismos de tolerância interna ou simplásticos**, quando o alumínio entra nas células e pode ser imobilizado, detoxificado e/ou compartimentalizado no citosol por meio de quelantes como os ácidos orgânicos citados acima (FIGURA 5) (DELHAIZE; RYAN, 1995; FURLAN, 2014; KOCHIAN et al., 2015; MA; RYAN, DELHAIZE, 2001; MITRE, 2014; NUNES-NESI et al., 20014).

2.4.1 Mecanismos de exclusão e detoxificação

Dentre os mecanismos já relatados de resposta ao alumínio, o mecanismo de exclusão é o mais bem caracterizado. Este mecanismo consiste na exsudação de ácidos orgânicos (AO) aniônicos na rizosfera, que agem quelando o Al^{3+} , formando compostos não tóxicos, impedindo sua entrada na raiz (BOFF, 2006; KOCHIAN et al., 2015). Há mais de 20 anos são realizadas pesquisas que buscam elucidar as várias hipóteses existentes para explicar os mecanismos e a provável ação múltipla dos mesmos que podem atuar em uma mesma espécie de planta (CANÇADO, 2006; KOCHIAN et al., 2015; KOCHIAN; HOEKENGA; PIÑEROS, 2004).

Apesar da produção e exsudação de ácidos orgânicos estarem presentes em diversas espécies, há especulações quanto aos tipos e a intensidade de ácidos orgânicos exsudados, bem como a localização espacial responsiva nas raízes dos mesmos (CASSOL, 2012; KOCHIAN; HOEKENGA; PIÑEROS, 2004). A exsudação de ácidos orgânicos é um mecanismo encontrado e descrito até o momento em pelo menos 17 espécies de plantas cultivadas (MARIANO et al., 2005), sendo que os primeiros estudos identificaram a secreção de malato em raízes de *Triticum aestivum* e citrato em *Phaseolus vulgaris* L., correlacionadas ao aumento da tolerância ao alumínio (DELHAIZE et al., 1993; DELHAIZE; RYAN; RANDALL, 1993; KITAGAWA et al., 1986; KOCHIAN et al., 2015;

MIYASAKA et al., 1991). Estes primeiros estudos desencadearam a investigação em outras espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas, que demonstraram correlações semelhantes entre a tolerância ao alumínio e a exsudação de ácidos orgânicos como o malato, o citrato ou o oxalato (TABELA 1) (CANÇADO, 2006; CASSOL, 2012; KOCHIAN; HOEKENGA; PIÑEROS, 2004).

Tabela 1 - Espécies de plantas e ácidos orgânicos exsudados pela raiz relacionados com a tolerância ao Al^{3+} .

Nome científico (Nome comum)	Ácido orgânico liberado	Referência
<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	Malato	Delhaize et al. (1993a); Delhaize et al. (1993b); Huang et al. (1996); Pellet et al. (1996); Ryan et al. (1995); Ishikawa et al. (2000); Ryan et al. (2001); Papernik et al. (2001)
<i>Zea mays</i> (milho)	Citrato	Pellet et al. (1995), Jorge; Arruda (1997); Ishikawa et al. (2000); Kidd et al. (2001); Kollmeier et al. (2001); Piñeros et al. (2002)
	Oxalato	Kidd et al. (2001)
<i>Avena sativa</i> (aveia)	Citrato, malato	Zheng et al. (1998)
<i>Secale cereale</i> (centeio)	Citrato, malato	Li et al. (2000)
<i>Sorghum bicolor</i> (sorgo)	Citrato	Magalhães et al. (2007)
<i>Triticale</i> spp.	Citrato, malato	Ma et al. (1997)
<i>Colocasia esculenta</i> (inhame)	Oxalato	Ma; Miyasaka (1998)
<i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco)	Citrato	Delhaize et al. (2003)
<i>Cassia tora</i>	Citrato	Ma et al. (1997); Ishikawa et al. (2000)
<i>Glycine max</i> (soja)	Citrato	Yang et al. (2000); Silva et al. (2001)
<i>Helianthus annuus</i> (girassol)	Citrato, malato	Saber et al. (1999)
<i>Fagopyrum esculentum</i> (trigo sarraceno)	Oxalato	Ma et al. (1997); Zheng et al. (1998)
<i>Raphanus sativus</i> (rabanete)	Citrato, malato	Zheng et al. (1998)
<i>Brassica napus</i> (canola)	Citrato, malato	Zheng et al. (1998)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Malato	Hoekenga et al. (2003)

Fonte: Kochian, Hoekenga e Piñeros (2004).

De acordo com a literatura, a exsudação de ácidos orgânicos (AO) apresenta dois padrões (MA, 2000; MA; RYAN; DELHAIZE, 2001). No Padrão I, as plantas se caracterizam por apresentar resposta quase que imediata de liberação de ácidos orgânicos pelas raízes quando expostas ao Al; a secreção ou exsudação de AO de forma rápida em plantas pode estar relacionada com a ativação de proteínas pré-existentes, já observados em espécies como *Triticum aestivum*, *Nicotiana tabacum* e *Hordeum vulgare*, que apresentam este Padrão I de resposta ao alumínio (DELHAIZE et al., 1993; DELHAIZE; HEBB; RYAN, 2001; DELHAIZE; RYAN, 1995; ZHAO et al., 2003).

No Padrão II existe uma fase “lag” entre a exposição ao Al e a liberação dos ácidos orgânicos, que ocorre somente depois de horas após a exposição ao metal. Esta resposta é estimulada pela interação do Al^{3+} com a célula, via receptores proteicos de membrana, para ativar a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas com o próprio metabolismo dos ácidos orgânicos e com os seus transportadores de membrana plasmática, conhecidos como canais aniônicos (BOOF, 2006; MA; RYAN; DELHAIZE, 2001). Em plantas que apresentam o Padrão II a exsudação do ácido orgânico é mais demorada, levando horas ou até mesmo dias, como já foi relatado em *Cassia tora* L. e *Sorghum bicolor* (MA; 2000; MA et al., 1997; MA; RYAN; DELHAIZE, 2001; MAGALHÃES et al., 2007).

Ainda que muitas espécies de plantas liberem um tipo de ácido orgânico, não é incomum encontrar espécies de plantas que exsudem mais de um tipo de ácido orgânico em resposta ao estresse por alumínio, como por exemplo, a exsudação de citrato e malato em *Arabidopsis* e *Triticum aestivum*, indicando que vários mecanismos de liberação ou transportadores funcionam em conjunto nestas espécies (LIU et al., 2008; RYAN et al. 2009).

2.4.2 Respostas moleculares de tolerância ao alumínio

A partir de estudos eletrofisiológicos na raiz, mecanismos de tolerância ao alumínio mostraram que o transporte de ácidos orgânicos pode ser mediado por mecanismos moleculares, evidenciando a existência de canais aniônicos específicos permeáveis na membrana plasmática, que são ativados pelo Al^{3+} extracelular. Estes mecanismos foram identificados inicialmente em ápices radiculares de *Triticum aestivum* e *Zea mays* (KOLLMEIER et al., 2001; PIÑEROS et al., 2002; PIÑEROS; KOCHIAN, 2001; RYAN et al., 1997; ZHANG; RYAN; TYERMAN, 2001).

Os primeiros genes relacionados a mecanismos de resposta ao Al^{3+} que foram identificados e clonados codificavam para: transportadores de malato, no caso do gene *ALMT1* - Aluminum-activated Malate Transporter de *Triticum aestivum*, que codifica uma proteína de membrana, constitutivamente expressa em ápices de raízes e que confere tolerância ao alumínio às plantas via exsudação de malato induzida por Al^{3+} (SASAKI et al., 2004); e transportadores de citrato, pelo gene *MATE* - Multidrug and Toxic Compound Extrusion de *Sorghum bicolor*, que codifica uma proteína de membrana responsável pela exsudação de citrato (MAGALHÃES et al., 2007). Plantas transgênicas de *Hordeum vulgare* expressando o gene *ALMT1* apresentaram alto nível de tolerância ao alumínio, tanto em ensaios em hidroponia como em solos ácidos, indicando que este gene é um forte candidato para conferir tolerância ao Al^{3+} em plantas (DELHAIZE et al., 2004; KOCHIAN et al., 2015). Além do *ALMT1*, plantas de *Arabidopsis*, *Hordeum vulgare*, *Secale cereale*, *Triticum* spp. e *Zea mays* expressando o gene *MATE* também demonstraram tolerância ao Al^{3+} (COLLINS et al., 2008; FURUKAWA et al., 2007; KOCHIAN et al., 2015; LIU et al., 2008; MARON et al., 2010; RYAN et al., 2009; YOKOSHO; YAMAJI; MA, 2011).

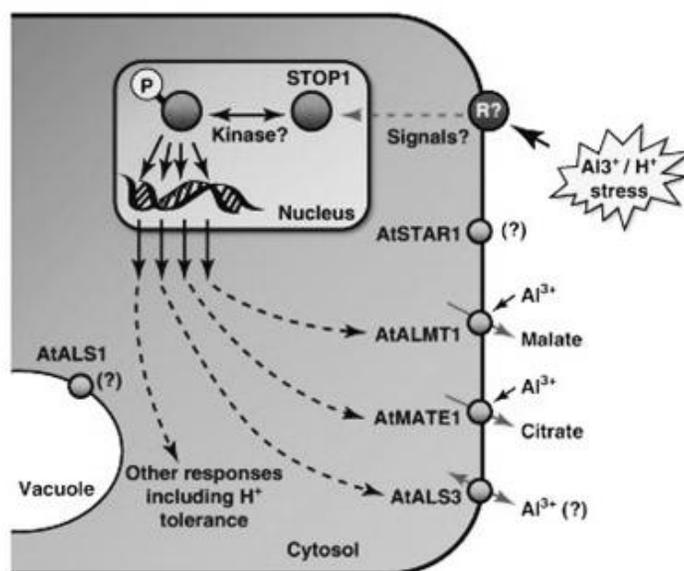
Portanto, a compreensão de outros mecanismos de tolerância ao alumínio associados a genes vem crescendo, descobrindo-se, por exemplo, que há outros transportadores de membrana que também respondem à ação do alumínio. Estes incluem transportadores Al^{3+} Nramp, transportadores ABC e aquaporinas. As famílias de transportadores de membrana e transportadores ABC estão envolvidas diretamente no efluxo de UDP-glicose para fora da célula, o que altera a composição da parede celular ou a função relacionada ao Al^{3+} no apoplasto (KOCHIAN et al., 2015; HUANG et al., 2012; HUANG; YAMAJI; MA, 2010; LARSEN et al., 2005; LARSEN et al., 2007; LI et al., 2014; NEGISHI et al., 2012; NEGISHI et al., 2013; XIA et al., 2010; XIA et al., 2014).

Estudos sobre a base molecular e bioquímica para expressão de genes induzidos por Al^{3+} identificaram *cis*-elementos e fatores de transcrição envolvidos nos padrões de resposta de tolerância ao alumínio (DENG et al., 2009; NUNES-NESI et al., 2014). Com relação a fatores de transcrição induzidos pelo Al, estão descritos até o momento o STOP1 e o ART1, que são dois membros relacionados à família de fatores de transcrição (FT) do tipo *zinc-finger*, identificados em *Arabidopsis* e *Oriza sativa*, respectivamente. Estudos realizados com estes fatores de transcrição mostraram relação positiva com a expressão de genes induzidos pelo alumínio (IUCHI et al., 2007; YAMAJI et al., 2009).

Em *Arabidopsis*, o FT *AtSTOP* é constitutivamente expresso e está envolvido diretamente na expressão de genes induzidos por Al, incluindo os genes *AtALMT1*, *AtMATE1* e *AtALS3*, estando relacionado a processos pós-traducionais (LIU et al., 2008; SAWAKI et al., 2009). Até o momento, este mecanismo ainda não está claro, mas existe a hipótese de que a fosforilação de uma quinase desconhecida inicia a ativação transcricional de *AtSTOP*, podendo desempenhar um papel na expressão de *AtALMT1* e de outros genes após

indução por Al (FIGURA 6) (MØLLER et al., 2007; NUNES-NESI et al., 2014; YAMAMOTO et al., 2002).

Figura 6 - Representação esquemática demonstrando a indução coordenada de genes envolvidos na tolerância ao Al^{3+} .



Legenda: **Abreviaturas:** STAR - Sensitive to Aluminum Rhizotoxicity; MATE - multidrug and toxic compound extrusion Family, ALMT - Aluminum-activated Malate Transporter; ALS1 – Al-sensível 1; ALS3– Al-sensível 3.

Fonte: Delhaize, James e Ryan (2012) (adaptado).

É sabido que ao integrar alterações moleculares e metabólicas que ocorrem sob estresse de Al com estudos fisiológicos, é possível demonstrar que o metabolismo respiratório está fortemente ligado à tolerância e resistência ao Al em diversos aspectos e em vários tecidos vegetais. São recentes os estudos em que evidências circunstanciais sugerem que a manipulação genética de enzimas-chave do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), como por exemplo: a citrato sintase, a malato desidrogenase e a fumarase podem estar ligadas ao desencadeamento da tolerância ao alumínio em plantas superiores, devido ao

aumento na produção dos ácidos orgânicos (NUNES-NESI et al., 2014). Estudos da ação destas enzimas na presença de Al^{3+} , em conjunto com proteínas transportadoras de ácidos orgânicos, podem constituir uma abordagem complementar na busca do aumento da tolerância ao alumínio em plantas (KOCHIAN et al., 2015; NUNES-NESI et al., 2014).

Embora o nível de elucidação dos eventos moleculares decorrentes da ação do Al tenha aumentado consideravelmente nos últimos anos, uma profunda compreensão das respostas metabólicas ao Al em plantas ainda não foi alcançada (NUNES-NESI et al., 2014). Portanto, faz-se necessário a validação experimental dos diferentes tipos de mecanismos de tolerância ao Al, utilizando-se de genes que codificam enzimas ou proteínas chaves de rotas bioquímicas. Atualmente, tais mecanismos têm sido investigados principalmente em poaceas, com a geração de plantas superexpressando genes chaves visando o aumento de tolerância ao alumínio (CANÇADO; 2006; KOCHIAN et al., 2015; NUNES-NESI, 2014).

2.4.3 *SbMATE* (*Sorghum bicolor* Multidrug and Toxic Compound Extrusion)

Em *Sorghum bicolor*, estudos identificaram um único loco com dominância parcial responsável pela tolerância ao alumínio nas linhagens SC283 e SC566-14 (MACIEL; 2009; MAGALHÃES et al., 2007). Estas análises foram realizadas a partir da condução de estudos de herança e mapeamento molecular em populações F2 e F2:3 de *Sorghum bicolor*, derivadas do cruzamento entre linhagens tolerantes e sensíveis ao alumínio. Foram obtidas distribuições de frequências bimodais para crescimento radicular, onde se observou a segregação do loco mencionado, o qual foi denominado Alt_{SB} . Através da técnica de clonagem posicional, o loco Alt_{SB} foi localizado em um fragmento de 24,6 Kpb,

incluindo um membro da família MATE, aqui referido como *SbMATE* (MACIEL; 2009; MAGALHÃES et al., 2007).

A expressão do gene *MATE* nos ápices radiculares de uma linhagem isogênica de sorgo tolerante foi consideravelmente maior que na linhagem sensível; a expressão deste gene também foi induzida por tratamento com alumínio em ambas as linhagens e ao longo do tempo de exposição foi observado um aumento na exsudação de citrato, pelos ápices radiculares, nas linhagens tolerantes. Todavia, na linhagem sensível, uma resposta drástica fenotípica frente ao tratamento com Al foi a inibição do crescimento radicular, além da diminuição da exsudação de citrato, em relação às linhagens tolerantes. Deste modo, sugeriu-se que o gene *SbMATE* pudesse codificar um transportador de citrato induzido por Al^{3+} , conferindo tolerância pelo loco *Alt_{SB}* (MACIEL; 2009; MAGALHÃES et al., 2007).

Após o mapeamento do locus *Alt_{SB}*, foi realizado um estudo de similaridade dos locus onde estão localizados os genes *SbMATE* de *Sorghum bicolor*, *At1g51340* de *Arabidopsis thaliana* e *Os01g69010* de *Oryza sativa*, verificando-se uma alta similaridade entre os mesmos. Estes genes representam uma família multigênica de transportadores de membrana *MATE*, responsáveis pelo efluxo de pequenas moléculas orgânicas (MAGALHÃES et al., 2007; PÔSSA; 2010). O gene *MATE*, de *Arabidopsis thaliana*, é homólogo ao gene *SbMATE*, apresentando a mesma resposta de exsudação de citrato induzido por alumínio (LIU et al., 2008). Através da transformação genética da epiderme de *Allium cepa* com a cassete de expressão *SbMATE::gfp*, foi possível demonstrar que *SbMATE* é uma proteína de membrana e que o mesmo é mais expresso nos centímetros iniciais do ápice radicular, após um tempo de exposição ao alumínio. Os autores do estudo também comprovaram uma relação direta do tempo de exposição ao alumínio e a exsudação de ácido orgânico (MAGALHÃES et al., 2007).

Maciel (2009) relata que o gene *Frd3* foi o primeiro da família MATE a ser identificado em plantas, mais especificamente em *Arabidopsis*. *Frd3* codifica uma proteína transportadora de citrato na forma de um complexo com ferro (Fe:citrato), além da ocorrência da expressão ectópica deste gene causar uma exsudação contínua de citrato nas raízes de *Arabidopsis*, associado a um aumento de tolerância ao alumínio (DURRETT; GASSMANN; ROGERS, 2007). Em *Hordeum vulgare*, outra proteína MATE foi encontrada (*HvAACT1*), sendo também caracterizada como um transportador de citrato ativado pelo alumínio (FURUKAWA et al., 2007).

Proteínas da família MATE estão presentes em quase todos os organismos procariotos e eucariotos, sendo primeiramente identificadas em bactérias (MACIEL, 2009). De acordo com Omote et al. (2006), a caracterização em bactérias destas proteínas foi possível devido à capacidade das mesmas em conferir resistência às drogas utilizando mecanismo de efluxo de pequenos compostos tóxicos e metabólitos secundários. Foi verificado também que estas proteínas pertenciam a cinco famílias transportadoras: i) MFS - Major Facilitator Superfamily; ii) ABC - ATP-Binding Cassete superfamily; iii) DMT - Drug Metabolite Transporter superfamily; iv) RND - Resistance/ Nodulation/ Division superfamily; v) MATE - Multidrug and Toxic Compound Extrusion. O gene *NorMATE*, foi isolado primeiramente em *Vibrio parahaemolyticus*, sendo identificado como uma proteína de efluxo de multidrogas que conferiam resistência à norfloxacin e outros agentes microbianos por canais Na^+ /antiporte de drogas (MAGALHÃES; 2010; MORITA et al., 1998, 2000).

A diversidade funcional na família MATE é ampla. Até o momento, várias proteínas da família MATE têm sido encontradas com várias funções celulares, mas sempre relacionadas com proteção às toxinas. A maioria dos MATEs identificados até o momento encontram-se em plantas, com função de transporte de citrato responsiva à ação do alumínio, sendo os principais em:

Arabidopsis (*AtFRD3*; *AtMATE*); *Sorghum bicolor* (*SbMATE*); *Hordeum vulgare* (*HvAACT1*); *Oryza sativa* (*OsFRDL1*) e *Zea mays* (*ZmMATE1*) (DURRET; GASSMANN; ROGERS, 2007; FURUKAWA et al., 2007; LIU et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2007; MARON et al., 2010, 2013; YOKOSHO et al., 2009). No entanto, tendo em conta o envolvimento de proteínas MATE no transporte de compostos tais como os flavonóides e alcalóides, é possível especular que a membrana transportadora de citrato possa ter adquirido funções de transporte duplo, permitindo também o transporte de compostos fenólicos, uma vez que até o momento não exista razões para excluir esta possibilidade em plantas (MAGALHÃES, 2010).

O estudo de tolerância ao alumínio em plantas conferida por proteínas MATE são escassas e relativamente recentes. Assim, há muito a se investigar sobre a diversidade funcional e dinâmica evolutiva que levou as proteínas MATE adquirirem propriedades de transporte tão favoráveis à tolerância ao alumínio (MAGALHÃES, 2010).

Como mencionado anteriormente, o desenvolvimento de uma variedade de cana-de-açúcar tolerante ao alumínio representa uma alternativa promissora para sua expansão agrícola. Devido à complexidade do genoma desta cultura, o uso da biotecnologia para o desenvolvimento de variedades mais adaptadas é uma estratégia relevante do ponto de vista do melhoramento genético. Para que isso seja possível, é necessário integrar diferentes técnicas biotecnológicas, tais como o desenvolvimento de um sistema robusto de transformação genética para cultura e o isolamento de genes candidatos e outros genes de interesse biotecnológico já utilizado em outras culturas (MARIN; NASSIF, 2013). No presente trabalho, o gene *MATE* foi o candidato escolhido para estudos de superexpressão em plantas modelo e em cana-de-açúcar.

2.5 Cultura de tecidos e transformação genética de cana-de-açúcar

O primeiro estudo com o estabelecimento de cultivo de células de cana-de-açúcar foi realizado em 1963, por Louis G. Nickell, com o propósito inicial de estudar o metabolismo de diversos compostos da espécie (MOREA; JESUS; NOGUEIRA, 2012). O cultivo de células em suspensão foi obtido por isolamento de uma cultura de calos, provenientes de células de parênquima foliar (MARETZKI; THOM; NICKELL, 1969; MOREA; JESUS; NOGUEIRA, 2012). Trabalhos subsequentes foram realizados com o objetivo de obter plantas regeneradas a partir de calos, propósito alcançado com sucesso em 1967 (HEINZ; MEE, 1969). Estes mesmos autores foram os precursores no estudo do uso de diferentes explantes como ápices caulinares, folhas e inflorescências na formação de calos; e também nos primeiros relatos de plantas regeneradas com variações morfológicas em relação a variedade parental, variações estas que foram associadas às modificações no número de cromossomos destas plantas regeneradas em relação a seu parental (MOREA; JESUS; NOGUEIRA, 2012). Outra informação levantada nesta época foi com relação ao tempo de cultivo dos calos obtidos, para propiciar a regeneração de plantas. Foi verificado que, quanto maior o tempo, menor a capacidade regenerativa do calo, sendo também observada uma relação direta entre os genótipos e o número de formação de calos, bem como a capacidade de regeneração destes calos em plantas, sendo considerada uma resposta genótipo-dependente (BARBA; NICKELL, 1969; MOREA; JESUS; NOGUEIRA, 2012).

Atualmente, os protocolos de cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar estão sendo direcionados para minimizar a ocorrência de variação somaclonal, uma vez que a utilização da cultura de tecidos já é utilizada com sucesso em diferentes propósitos, tais como conservação de germoplasma *in vitro* (TAYLOR; DUKIC, 1993), produção em massa de mudas *in vitro* (LAKSHMANAN, 2006; LORENZO et al., 1998; MORDOCCO;

BRUMBLEY; LAKSHMANAN, 2009) e transformação genética de plantas (ARENCIBIA et al., 1998; BASNAYAKE et al., 2011; BOWER; BIRCH, 1992; GALLO-MEAGHER; IRVINE, 1996; SNYMAN et al., 2006).

Em cana-de-açúcar, a transformação genética é realizada tanto por métodos diretos como indiretos, com destaque para biobalística e *Agrobacterium tumefaciens* (TABELA 2). Os métodos diretos se baseiam em processos físico-químicos, tais como: biobalística, eletroporação e polietilenoglicol; e os métodos indiretos, quando o DNA exógeno é inserido pela ação de um vetor biológico por *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes* (MOREA; JESUS; NOGUEIRA, 2012). A primeira transformação genética de cana-de-açúcar foi relatada por Chen et al. (1987), quando realizou a transferência de DNA para protoplastos mediada por PEG (polietilenoglicol), mas sem sucesso na regeneração de plantas. A primeira transformação genética de cana-de-açúcar por biobalística foi realizada por Bower e Birtch em 1992, com a obtenção de plantas que continham o gene *nptII*, codificante da enzima neomicina fosfotransferase II, que confere resistência a antibióticos como canamicina e geneticina (MOLINARI, 2006). No caso da transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, foram relatados os primeiros casos de transformação em 1998, onde foram obtidas plantas transgênicas resistentes ao herbicida comercial Basta[®], que tem o sal de fosfotricina como componente ativo (ARENCIBIA et al., 1998; ENRÍQUEZ-OBREGÓN et al., 1998).

Tabela 2 - Transformação genética de cana-de-açúcar utilizando os diferentes métodos. (Continua)

Característica	Gene	Método de transformação	Referência
Sistema Repórter e Seleção			
Neomicina fosfotransferase	<i>nptII</i>	Biobalística	Bower; Birtch (1992)
β – Glucuronidase	<i>uidA</i>	Eletroporação	Arencibia et al. (1995)
Higromicina fosfotransferase	<i>hpt</i>	<i>Agrobacterium</i>	Arencibia et al. (1998)
Proteína verde fluorescente	<i>gfp</i>	<i>Agrobacterium</i>	Elliot et al. (1998)
β – Glucuronidase e FireXy luciferase	GUSPlus e <i>luc+</i> NF	Biobalística	Mudge et al. (2009)
Resistência a Herbicida, Doenças e Pragas; Tolerância a Estresses			
Fosfinotricina	<i>bar</i>	<i>Agrobacterium</i>	Enríquez-Obregón et al. (1998)
Glufosinato de amônio	<i>pat</i>	Biobalística	Leibbrandt; Snyman (2003)
SCMV	SCMV-CP	Biobalística	Joyce et al. (1998)
SrMV	SrMV-CP	Biobalística	Ingelbrecht et al. (1999)
SCYLV	SCYLV-CP	Biobalística	Rangel et al. (2005); Gilbert et al. (2009)
FDV	FDVS9; ORF1	Biobalística	Mcqualter et al. (2004)
<i>Sugarcane leaf scald</i>	<i>albD</i>	Biobalística	Zhang et al. (1999)
Broca do caule da cana-de-açúcar	<i>crYIA; gna</i>	Eletroporação; Biobalística	Arencibia et al. (1999); Sétamou et al. (2002)
Resistência a gorgulho da cana	<i>gna</i> or <i>pinII</i>	Biobalística	Allsopp et al. (2000)
Tolerância a estresses abióticos	<i>P5CS</i>	Biobalística	Molinari et al. (2007)
Tolerância à seca	<i>DREB2A CA</i>	Biobalística	Reis et al. (2014)
Tolerância ao frio	<i>ipt</i>	Biobalística	Belintani et al. (2012)
Engenharia Metabólica, Regulação Gênica e Produtos Alternativos			
Acúmulo de sacarose	Invertase ácida solúvel	Biobalística	Botha et al. (2001)
Supressão do mecanismo de apoptose	<i>AtBI-1</i>	Biobalística	Melotto-Passarin (2009)

Tabela 2 - Transformação genética de cana-de-açúcar utilizando os diferentes métodos. (Conclusão)

Característica	Gene	Método de transformação	Referência
Engenharia Metabólica, Regulação Gênica e Produtos Alternativos			
Silenciamento de elementos de transposição	<i>Ddm1</i>	Biobalística	Picelli (2010)
Modulação do perfilhamento	<i>miRNA156</i>	Biobalística	Ortiz-Morea (2011)
Transporte de água	<i>TIP1;1</i> e <i>PIP1;4</i>	Biobalística	Jesus (2010)
Metabolismo de sacarose	<i>lsdA</i>	<i>Agrobacterium</i>	Enriquez et al. (2000)
Polifenol oxidase	<i>Ppo</i>	Biobalística	Vickers et al. (2005)
Polihidroxibutirato (produção de biopolímeros)	<i>phaA</i> , <i>phaB</i> e <i>phC</i>	Biobalística	Petrasovits et al. (2007)

Fonte: Morea, Jesus e Nogueira (2012); Reis (2014).

A técnica de biobalística, desde que foi utilizada pela primeira vez em 1992, está sendo empregada por diversos grupos de pesquisa no mundo para transformação genética de diferentes variedades de cana-de-açúcar (BOWER; BIRCH, 1992). Mesmo esta técnica sendo a preferencial para cana-de-açúcar, há problemas que foram apresentados quanto à complexidade de integração, devido às possíveis múltiplas inserções do transgene, podendo resultar em silenciamento ou instabilidade do mesmo (LESSARD et al., 2002; MOLINARI, 2006). Assim, a transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* é uma alternativa que recentemente vem sendo explorada, pois apresenta potencialidades no seu uso, considerada um sistema eficiente, de baixo custo e que produz plantas transgênicas regularmente com a inserção completa e de poucas cópias do transgene, não ocorrendo possíveis danos no genoma receptor (MOLINARI, 2006; MOREA; JESUS; NOGUEIRA, 2012; SOMERS; MAKAREVITCH, 2004). Para que ambos os métodos de transformação genética mencionados até agora sejam reprodutíveis e eficientes, ainda são

necessárias melhorias nestes métodos para otimização e uso em rotina pelo laboratório.

A complexidade do genoma de cana-de-açúcar aliada à baixa eficiência de transformação e ao tempo de obtenção de uma planta transgênica são fatores que demonstram a necessidade de se buscar alternativas para o aperfeiçoamento de estudos genômicos e fisiológicos utilizando-se a biotecnologia. Nesse contexto, plantas-modelo podem ser utilizadas para estudos de validação de genes e/ou promotores de interesse (RIBEIRO et al., 2014, 2015). No presente trabalho, *Setaria viridis* está sendo utilizada como planta-modelo para prova de conceito em estudos de tolerância ao alumínio pela superexpressão do gene *MATE*.

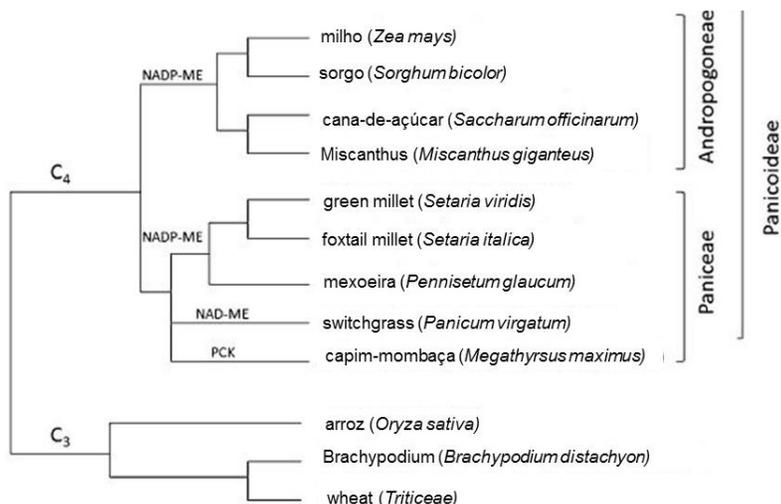
2.6 *Setaria viridis* como planta modelo

São recentes os relatos de interesse na utilização de *Setaria viridis* como planta-modelo para pesquisas básicas e aplicadas em Poaceas, uma vez que esta pertence ao mesmo grupo vegetal de culturas de importância econômica como o milho, sorgo e a cana-de-açúcar. Desta forma, vislumbra-se o potencial desta como uma planta modelo mais adequada (DIAO et al.; 2014; VAN ECK; SWARTWOOD, 2015).

Setaria viridis é uma monocotiledônea, pertencente à família Poaceae, subfamília Panicoideae, onde as gramíneas com importância agrônômica tais como sorgo, milho e cana-de-açúcar estão inseridas. Há uma série de características que tornam *S. viridis* promissora como planta modelo, entre elas estão: genoma pequeno (~515 Mb); ciclo de vida curto entre 6 a 9 semanas (dependendo das condições de fotoperíodo); é uma planta de pequeno porte com tamanho aproximado de 20 cm; requer cuidados simples para seu desenvolvimento e crescimento; tem prolífica produção de sementes, além de ser

uma espécie filogeneticamente próxima à cana-de-açúcar (FIGURA 7) (DIAO et al., 2014; MARTINS et al., 2015; VAN ECK; SWARTWOOD, 2015).

Figura 7 - Árvore filogenética de poáceas de metabolismo fotossintético C3 e C4.



Legenda: **Abreviaturas:** C3 – metabolismo fotossintético de 3 carbonos; C4 – metabolismo fotossintético de 4 carbonos; NAD-ME *Nicotinamide Adenine Malic Enzyme*; NADP-ME - *Nicotinamide Adenine Phosphate Malic Enzyme*; PCK - *Phosphoenolpyruvate Carboxykinase*.

Fonte: Li e Brutnell (2011).

S. viridis possui metabolismo fotossintético C4. Espécies com este tipo de metabolismo possuem vantagens adaptativas aos estresses abióticos, tais como: seca, calor e frio, resultando em possíveis rendimentos elevados em comparação com as plantas de metabolismo fotossintético C3, devido às diferenças anatômicas e bioquímicas, em que o dióxido de carbono concentra-se em torno da Rubisco, a enzima carboxilante (GHANNOUM, 2009; NAIDU et al., 2003; SAGE, 2004; VAN ECK; SWARTWOOD; 2015).

A adoção de *S. viridis* como planta-modelo depende da existência de um método simples e eficiente para a transformação genética (MARTINS et al.,

2015; VAN ECK; SWARTWOOD; 2015). Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um protocolo simples, rápido e eficiente para transformação genética de calos embriogênicos de *S. viridis* via *Agrobacterium tumefaciens*, onde inicialmente utilizamos os genes repórteres *gus* (β -glucuronidase) e *gfp* (proteína verde fluorescente), que resultou em uma eficiência de transformação média de 15% (MARTINS et al., 2015). Ressalta-se a dificuldade em conseguir um protocolo simples e eficaz de transformação genética para diversas espécies, mas este protocolo de transformação genética para *S. viridis* visa contribuir de forma simplificada e eficaz a adoção desta espécie como planta modelo para Poaceas de metabolismo C4. Recentes resultados se mostram promissores em diversas áreas de estudos (genômicos, fisiológicos e metabólicos), que utilizaram *S. viridis* como modelo experimental (BENNETZEN, 2012; BRUTNELL et al., 2010; DOUST et al., 2009; LATA; GUPTA; PRASAD, 2012; ZHANG et al., 2012).

Em suma, diante do exposto e considerando que *S. viridis* e cana-de-açúcar pertencem a mesma família com metabolismo fotossintético C4 (subtipo NADP-ME) (FIGURA 7), combinado com o protocolo de transformação genética simples e de alta eficiência, sugere-se que *S. viridis* poderá ser utilizada como um modelo para planta da cana-de-açúcar em estudos de tolerância ao alumínio, possivelmente conferida pela superexpressão do gene *MATE*, objetivo deste trabalho. Além disto, esforços também foram feitos para a transformação genética do gene *MATE* em cana-de-açúcar, obtendo-se resultados promissores.

3 CONCLUSÃO GERAL

De acordo com o que foi proposto neste trabalho, pode-se concluir que eventos transgênicos de *Setaria viridis* supexpressando o gene *MATE* de *Brachypodium distachion* foram obtidos com sucesso. Além disso, um bioensaio de estresse ao alumínio foi desenvolvido em *S. viridis*. Por meio deste protocolo, observou-se que o efeito principal do alumínio em plântulas é a inibição do crescimento radicular, como pode ser observado nas plantas NT (não-transgênicas). Eventos homozigóticos de plantas transgênicas de *S. viridis* superexpressando *BdMATE* demonstraram fenótipo de tolerância ao alumínio nas condições experimentais aplicadas, caracterizado pelo crescimento diferencial das raízes, quando comparados às plantas NT. A partir da observação do fenótipo em *S. viridis* procedeu-se com a transformação de *Saccharum* spp. com o gene *SbMATE*. Foram gerados 17 eventos transgênicos superexpressando *SbMATE*, que serão avaliados quanto à tolerância ao alumínio em bioensaios futuros.

REFERÊNCIAS

- ALLSOPP, P. G. et al. Transgenic sugarcane with increased resistance to canegrubs. In: SUGARCANE ENTOMOLOGY WORKSHOP INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, KHON KAEN, 4, 2000, Thailand. **Proceedings...** Thailand: International Society of Sugar Cane Technologists, 2000. p. 63-67.
- ARENCIBIA, A. D. et al. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, London, v. 7, n. 3, p. 213-222, May 1998.
- ARENCIBIA, A. D. et al. Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (*Saccharum* hybrid) plants produced by cell electroporation. **Transgenic Research**, London, v. 8, n. 5, p. 349-360, Oct. 1999.
- _____. Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by intact cell electroporation. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 14, n. 5, p. 305-309, Feb. 1995.
- ARRUDA, P. Genetically modified sugarcane for bioenergy generation. **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 315-322, June 2012.
- ASHMAN, M. R.; PURI, G. **Essential soil science**. Oxford: Blackwell Science, 2002. 208 p.
- BARBA, R.; NICKELL, L. G. Nutrition and organ differentiation in tissue cultures of sugarcane, a monocotyledon. **Planta**, Berlin, v. 89, n. 3, p. 299-302, Sept. 1969.
- BARCELO, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminum toxicity and resistance: a review. **Environmental Experimental Botany**, Elmsford, v. 48, n. 1, p. 75-92, July 2002.
- BASNAYAKE, S. V. W. et al. Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, n. 3, p. 439-448, Mar. 2011.

BELINTANI, N. et al. Improving low-temperature tolerance in sugarcane by expressing the ipt gene under a cold inducible promoter. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 56, n. 1, p. 71-77, Mar. 2012.

BENNETZEN, J. L. Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 30, n. 6, p. 555-561, June 2012.

BERTSCH, P. M.; PARKER, D. R. Aqueous polynuclear aluminum species. In: SPOSITO, G. (Coord.). **The Environmental chemistry of aluminum**. Boca Raton: CRC Press, 1995. p. 117-168.

BOFF, T. **Tolerância ao alumínio em trigo: identificação e caracterização molecular de genes**. 2006. 186 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

BOHNERT, H. J.; JENSEN, R. G. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 89-97, Mar. 1996.

BOTHA, F. C.; SAWYER, B. J. B.; BIRCH, R. G. Sucrose metabolism in the culm of transgenic sugarcane with reduced soluble acid invertase activity. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, Brisbane, 2001. **Proceedings...** Brisbane: Australia, International Society of Sugar Cane Technologists, 2001. p. 588-591.

BOWER, R.; BIRCH, R. G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **The Plant Journal**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 409-416, May 1992.

BRAGA, D. P. V. et al. Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seeds**, West Hazleton, v. 5, n. 2/3, p. 209-222, Oct. 2003.

BRUTNELL, T. P. et al. *Setaria viridis*: a model for C4 photosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 8, p. 2537-2544, Aug. 2010.

CANÇADO, G. M. A. **Caracterização e utilização de genes envolvidos na tolerância ao alumínio tóxico em milho**. 2006. 154 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

CASSOL, D. **Produção, acúmulo e exsudação de ácidos orgânicos em *Stylosanthes*, sob toxidez de alumínio.** 2012. 39 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento em cana-de-açúcar.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 121 p.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, Brasília, v. 4, n. 1, p. 62-89, mar. 2011.

CHEN, W. H. et al. Transformation of sugarcane protoplasts by direct uptake of a selectable chimaeric gene. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 6, n. 4, p. 297-301, July 1987.

COLLINS; N. C. et al. An *ALMT1* gene cluster controlling aluminum tolerance at the *Alt4* locus of rye (*Secale cereale* L.). **Genetics**, Berlin, v. 179, n. 1, p. 669-682, May 2008.

COMIN, J. et al. Differential effects of monomeric and polymeric aluminium on the root growth and on the biomass production of root and shoot of corn in solution culture. **European Journal of Agronomy**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 115-122, Aug. 1999.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira cana-de-açúcar 2015/16.** Brasília: Conab, 2015. 3 p.

COPELAND, L.; DELIMA, M. L. The effect of aluminium on enzyme activities in wheat roots. **Journal Plant Physiology**, Washington, v. 140, n. 6, p. 641-645, Nov. 1992.

DELHAIZE, E. et al. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiology**, Washington, v. 103, n. 3, p. 685-693, Nov. 1993.

_____. Effects of altered citrate synthase and isocitrate dehydrogenase expression on internal citrate concentrations and citrate efflux from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) roots. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 248, n. 1/2, p. 137-144, Jan. 2003.

_____. Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the *ALMT1* gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 101, n. 42, p. 15249-15254, Oct. 2004.

DELHAIZE, E.; HEBB, D. M.; RYAN, P. R. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. **Plant Physiology**, Washington, v. 125, n. 4, p. 2059-2067, Apr. 2001.

DELHAIZE, E.; JAMES, R. A.; RYAN, P. R. Aluminium tolerance of root hairs underlies genotypic differences in rhizosheath size of wheat (*Triticum aestivum*) grown on acid soil. **New Phytologist**, London, v. 195, n. 3, p. 609-619, Aug. 2012.

DELHAIZE, E.; RYAN, P. R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, Washington, v. 107, n. 2, p. 315-321, Feb. 1995.

DELHAIZE, E.; RYAN, P. R.; RANDALL, P. J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. **Plant Physiology**, Washington, v. 103, n. 3, p. 695-702, Nov. 1993.

DENG, W. et al. Overexpression of *Citrus junos* mitochondrial citrate synthase gene in *Nicotiana benthamiana* confers aluminum tolerance. **Planta**, Berlin, v. 230, n. 2, p. 355-365, July 2009.

D'HONT, A. et al. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, Ottawa, v. 41, n. 2, p. 221-225, Apr. 1998.

DIAO, X. et al. Initiation of *Setaria* as a model plant. **Frontiers of Agricultural Science and Engineering**, United Kingdom, v. 1, n. 1, p. 16-20, May 2014.

DIBAX, R. et al. Plant regeneration of sugarcane cv. RB931003 and RB98710 from somatic embryos and acclimatization. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 2, n. 3, p. 32-37, Aug. 2011.

DILLON, S. L. et al. Domestication to crop improvement: genetic resources for *Sorghum* and *Saccharum* (Andropogoneae). **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 5, p. 975-989, July 2007.

DOUST, A. N. et al. Foxtail millet: a sequence-driven grass model system. **Plant Physiology**, Washington, v. 149, n. 1, p. 137-141, Jan. 2009.

DURRETT, T. P.; GASSMANN, W.; ROGERS, E. E. The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. **Plant Physiology**, Washington, v. 144, n. 1, p. 197-205, May 2007.

ECHART, C. L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismos de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 531-541, maio/jun. 2001.

ELLIOTT, A. R. et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. **Australian Journal of Plant Physiology**, Washington, v. 25, n. 6, p. 739-744, July 1998.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Cana-de-açúcar**. [S.l.]: Embrapa, 2012. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/Abertura.html>> Acesso em: 5 set. 2012.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Balanco energético nacional 2015**. Rio de Janeiro: Empresa de Pesquisa Energética, 2015. 62 p.

ENRIQUEZ, G. A. et al. Sugarcane (*Saccharum hybrid*) genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Production of transgenic plants expressing proteins with agronomic and industrial value. **Plant Genetic Engineering: towards the third millennium**, Netherlands, v. 5, p. 76-81, Dec. 2000.

ENRÍQUEZ-OBREGÓN, G. A. et al. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Planta**, Berlin, v. 206, n. 1, p. 20-27, July 1998.

FALCO, M. C.; SILVA-FILHO, M. C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, p. 761-766, 2003.

FERRAZ, R. L. S. et al. Calagem em cana-de-açúcar: efeitos no solo, planta e reflexos na produção. **InterfaceEHS – Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 1-12, jun. 2015.

FRAGUAS, J. C. Tolerância de porta-enxertos de videira ao alumínio do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 7, p. 1193-1200, jul. 1999.

FREITAS, L. B. **Silício na tolerância ao alumínio por plantas de arroz**. 2011. 100 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2011.

FURLAN, F. **Tolerância diferencial ao alumínio em plantas do gênero *Brachiaria***: morfologia de raízes, sistema antioxidativo e alumínio trocável no apoplasto radicular. 2014. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Biologia na Agricultura e Meio Ambiente) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

FURUKAWA, J. et al. An aluminum-activated citrate transporter in barley. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 48, n. 8, p. 1081-1091, July 2007.

GALLO-MEAGHER, M.; IRVINE, J. E. Herbicide resistant transgenic sugarcane plants containing the bar gene. **Crop Science**, Kampala, v. 36, n. 5, p. 1367-1374, Sept. 1996.

GENERATION CHALLENGE PROGRAMME. **Science enlists nature and collaboration to ‘neutralise’ acidic soils**. [S.l.: s.n.], 2014. Disponível em: <<http://blog.generationcp.org/2014/07/23/science-enlists-nature-and-collaboration-to-neutralise-acidic-soils/>> Acesso em: 20 set. 2015.

GHANNOUM, O. C4 photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, London, v. 103, n. 4, p. 635-644, June 2009.

GILBERT, R. A. et al. Agronomic performance and genetic characterization of sugarcane transformed for resistance to sugarcane yellow leaf virus. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 39-46, Mar. 2009.

GOEDERT, W. J. Management of the Cerrado soils of Brazil: a review. **Journal of Soil Science**, Temuco, v. 34, n. 3, p. 405-408, Sept. 1983.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, n. 2, p. 122-127, Apr. 2002.

GUIMARAES, R. G. N. et al. Mapeamento de QTLs associados com tolerância ao alumínio em milho. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, EMBRAPA MILHO E SORGO, 2011, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. p. 1.

HARTWIG, R. et al. Mecanismo associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 219-228, abr./jun. 2007.

HEINZ, D. J.; MEE, G. W. P. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. **Crop Science**, Kampala, v. 9, n. 3, p. 346-348, May/June 1969.

HOEKENGA, O. A. et al. Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (*Landsberg erecta* x *Columbia*) by quantitative trait locus mapping. A physiologically simple but genetically complex trait. **Plant Physiology**, Washington, v. 132, n. 2, p. 936-948, June 2003.

HUANG, C. F. et al. A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice. **The Plant Journal**, Oxford, v. 69, n. 5, p. 857-867, Mar. 2012.

HUANG, C. F.; YAMAJI, N.; MA, J. F. Knockout of a bacterial-type ATP-binding cassette transporter gene, *AtSTAR1*, results in increased aluminum sensitivity in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Washington, v. 153, n. 4, p. 1669-1677, Aug. 2010.

HUANG, J. W. et al. Aluminum interactions with voltage-dependent calcium transport in plasma membrane vesicles isolated from roots of aluminum-sensitive and -resistant wheat cultivars. **Plant Physiology**, Washington, v. 110, n. 2, p. 561-569, Feb. 1996.

INGELBRECHT, I. L.; IRVINE, J. E.; MIRKOV, T. E. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. **Plant Physiology**, Washington, v. 119, n. 4, p. 1187-1198, Apr. 1999.

ISHIKAWA, S. et al. Comparison of the amount of citric and malic acids in Al media of seven plant species and two cultivars each in five plant species. **Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 46, p. 751-758, 2000.

IUCHI, S. et al. Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 104, n. 23, p. 9900-9905, June 2007.

JANNO, N. L. et al. Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, n. 1/2, p. 171-184, July 1999.

JESUS, F. A. **Transformação genética de cana-de-açúcar com genes da aquaporina SspTIP1;1 e SspPIP1;4**. 2010. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

JORGE, R.; ARRUDA, P. Aluminum induced organic acid exudation by roots of an aluminum-tolerant tropical maize. **Phytochemistry**, New York, v. 45, n. 4, p. 675–681, June 1997.

JOYCE, P. A. et al. Transgenic sugarcane resistant to sugarcane mosaic virus. In: AUSTRALIAN SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS. WATSON FERGUSON AND COMPANY, Brisbane, 1998. **Proceedings...** Brisbane: [s.n.], 1998. p. 204-210.

KIDD, P. S. et al. The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 359, p. 1339–1352, June 2001.

KITAGAWA, T. et al. Differential aluminum tolerance in wheat and secretion of organic acids. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 57, p. 352-358, 1986.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 237-260, June 1995.

KOCHIAN, L. V. et al. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum Resistance. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 66, p. 571-598, Apr. 2015.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, Dordrecht, v. 55, p. 459-493, June 2004.

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; HOEKENGA, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, Neherlands, v. 274, p. 175-195, Apr. 2005.

KOHLHEPP, G. Análise d situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 68, p. 223-253, 2010.

KOLLMEIER, M. et al. Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum resistant cultivar. **Plant Physiology**, Washington, v. 126, n. 126, p. 397-410, May 2001.

KUMAR, T. et al. Efficient regeneration and genetic transformation of sugarcane with *AVP1* gene. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, Dubai, v. 14, n. 2, p. 165-171, 2014.

LAKSHMANAN, P. Somatic embryogenesis in sugarcane: an addendum to the invited review sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities, in vitro cell. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 42, n. 3, p. 201-205, May 2006.

LARSEN, P. B. et al. ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 353-363, Feb. 2005.

LARSEN, P. B. et al. *Arabidopsis ALS1* encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. **Planta**, Berlin, v. 225, n. 6, p. 1447-1458, May 2007.

LATA, C.; GUPTA, S.; PRASAD, M. Foxtail millet: a model crop for genetic and genomic studies in bioenergy grasses. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 33, n. 3, p. 328-343, Sept. 2012.

LEIBBRANDT, N. B.; SNYMAN, S. J. Stability of gene expression and agronomic performance of a transgenic herbicide-resistant sugarcane line in South Africa. **Crop Science**, Kampala, v. 43, n. 2, p. 671-677, Feb. 2003.

LESSARD, P. A. et al. Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. **Metabolic Engineering**, Orlando, v. 4, n. 1, p. 67-79, Jan. 2002.

LI, J. Y. et al. Natural variation underlies alterations in Nramp aluminum transporter (*NRATI*) expression and function that play a key role in rice aluminum tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 111, p. 6503-6508, 2014.

LI, P.; BRUTNELL, T. P. *Setaria viridis* and *Setaria italica*, model genetic systems for the Panicoid grasses. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 3031-3037, Mar. 2011.

LI, X. F.; MA, J. F.; MATSUMOTO, H. Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. **Plant Physiology**, Washington, v. 123, n. 4, p. 1537-1544, Aug. 2000.

LIU, J. et al. Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. **The Plant Journal**, Oxford, v. 57, n. 17, p. 389-399, Oct. 2008.

LIU, J.; PIÑEROS, M. A.; KOCHIAN, L. V. The role of aluminum sensing and signaling in plant aluminum resistance. **Journal of Integrative Plant Biology**, Washington, v. 56, n. 3, p. 221-230, Mar. 2014.

LORENZO, J. C. et al. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 54, n. 3, p. 197-200, Sept. 1998.

MA, J. F. et al. Detoxifying aluminum with buckwheat. **Nature**, London, v. 390, n. 11, p. 569-570, Dec. 1997.

MA, J. F. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 41, p. 383-390, 2000.

MA, J. F.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, n. 6, p. 273-278, June 2001.

MA, J. F.; TAKETA, S.; YANG, Z. M. Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. **Plant Physiology**, Washington, v. 122, n. 4, p. 687-694, Jan. 2000.

MA, J. F.; ZHENG, S. J.; MATSUMOTO, H. Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 38, n. 9, p. 1019-1025, June 1997.

MA, Z.; MIYASAKA, S. C. Oxalate exudation by taro in response to Al. **Plant Physiology**, Washington, v. 118, n. 118, p. 861-865, Nov. 1998.

MACIEL, B. H. **Mineração e caracterização de alelos do gene de tolerância ao alumínio *Alt_{SB}* em sorgo**. 2009. 76 p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

MAGALHÃES, J. V. et al. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, Aug. 2007.

MAGALHÃES, J. V. How a microbial drug transporter became essential for crop cultivation on acid soils: aluminium tolerance conferred by the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family. **Annals of Botany**, London, v. 115, n. 1, p. 01-5, May 2010.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 251 p.

MARETZKI, A.; THOM, M.; NICKELL, L. G. Products of arginine catabolism in growing cells of sugarcane. **Phytochemistry**, New York, v. 8, n. 5, p. 811-818, May 1969.

MARIANO, E. D. et al. Metabolism and root exudation of organic acid anions under aluminium stress. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 157-172, 2005.

MARIN, F.; NASSIF, D. S. P. Mudanças climáticas e a cana-de-açúcar no Brasil: Fisiologia, conjuntura e cenário futuro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 2, p. 232-239, Feb. 2013.

MARON, L. G. et al. Aluminum tolerance in maize is associated with higher MATE1 gene copy number. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 110, n. 13, p. 5241-5246, Feb. 2013.

_____. Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. **The Plant Journal**, Oxford, v. 61, n. 5, p. 728-740, Mar. 2010.

MARTINS, P. K. M. et al. A simple and highly efficient *Agrobacterium-mediated* transformation protocol for *Setaria viridis*. **Biotechnology Reports**, London, v. 6, p. 41-44, June 2015.

MCQUALTER, R. B. et al. Production and evaluation of transgenic sugarcane containing a Fiji disease virus (FDV) genome segment S9-derived synthetic resistance gene. **Crop and Pasture Science**, Australia, v. 55, n. 2, p. 139-145, 2004.

MEHARG, A. A. The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. **Plant Physiology**, Washington, v. 88, n. 1, p. 191-198, May 1993.

MELOTTO-PASSARIN, D. M. **Transformação genética de cana-de-açúcar por biolística e *Agrobacterium tumefaciens* visando estudar o mecanismo de morte celular programada**. 2009. 147 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MING, R. et al. Detailed alignment of saccharum and sorghum chromosomes: comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. **Genetics**, Austin, v. 150, n. 4, p. 1663-1682, Dec. 1998.

MITRE, L. K. **Caracterização genética e morfo-fisiológica de linhagens e híbridos transgênicos de milho expressando o gene *SbMATE* de sorgo**. 2014. 43 p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

MIYASAKA, S. C. et al. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans: root exudation of citric acid. **Plant Physiology**, Washington, v. 96, n. 3, p. 737-743, July 1991.

MOLINARI, H. B. C. et al. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 130, n. 2, p. 218-229, June 2007.

MOLINARI, H. B. C. **Expressão estresse-induzida do gene P5CS em plantas transgênicas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico.** 2006. 109 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MØLLER, I. M. et al. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 459–481, June 2007.

MOORE, P. H. et al. Sugarcane: the crop, the plant, and domestication. In: MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. (Ed.). **Sugarcane: physiology, biochemistry, and functional biology.** Oxford: Wiley Blackwell, 2013. Chap. 1, p. 01-17.

MORDOCCO, A. M.; BRUMBLEY, J. A.; LAKSHMANAN, P. Development of a temporary immersion system (RITA®) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 45, n. 4, p. 450-457, Aug. 2009.

MOREA, F. A. O.; JESUS, F. A.; NOGUEIRA, F. T. S. Biotecnologia em cana-de-açúcar. In: CANÇADO, G. M. A.; LONDE, L. N. (Ed.). **Biotecnologia aplicada à agropecuária.** Poços de Caldas: Sul Minas Gráfica e Editora, 2012. p. 243-292.

MORITA, Y. et al. NorM of *Vibrio parahaemolyticus* is an Na⁺-driven multidrug efflux pump. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, n. 23, p. 6694-6697, Dec. 2000.

_____. NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 42, n. 7, p. 1778-1782, July 1998.

MUDGE, S. R. et al. Efficient silencing of reporter transgenes coupled to known functional promoters in sugarcane, a highly polyploid crop species. **Planta**, Berlin, v. 229, n. 3, p. 549-558, Feb. 2009.

NAIDU, S. L. et al. Cold tolerance of C4 photosynthesis in *Miscanthus × giganteus*: adaptation in amounts and sequence of C4 photosynthetic enzymes. **Plant Physiology**, Washington, v. 132, n. 3, p. 1688-1697, July 2003.

NEGISHI, T. et al. Plasma membrane-localized Al-transporter from blue hydrangea sepals is a member of the anion permease family. **Genes to Cells**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 341-352, May 2013.

_____. Tonoplast- and plasma membranelocalized aquaporin-family transporters in blue hydrangea sepals of aluminum hyperaccumulating plant. **PlosOne**, San Francisco, v. 7, n. 8, p. e43189, 2012.

NUNES-NESI, A. et al. The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 399-407, June 2014.

OLIVEIRA, M. S. **Tolerância de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) à toxidez por alumínio em solução**. 2012. 109 p. Tese (Mestrado em Agricultura e Ambiente) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2012.

OMOTE, H. et al. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 27, n. 11, p. 587-593, Nov. 2006.

ORTIZ-MOREA, F. **Análise da via de regulação gênica do miRNA156/SPL na brotação lateral e caracterização molecular do processo de emergência da gema axilar de cana de açúcar**. 2011. 170 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

PANDEY, S. et al. Developing maize that tolerates aluminium toxic soils. In: EDMEADES, G. E.; DEUSTECH, J. A. (Ed.). **Stress tolerance breeding: maize that resist insects, drought, low nitrogen and acid soils**. México: Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo, 1994. p. 85-96.

PAPERNIK, L. A. et al. Physiological basis of reduced AL tolerance in ditelosomic lines of Chinese Spring wheat. **Planta**, Berlin, v. 212, n. 5, p. 829–834, Apr. 2001.

PARENTONI, S. N. et al. Melhoramento para tolerância ao alumínio como fator de adaptação a solos ácidos. In: NASS, L. L. et al. (Ed.). **Recursos genéticos & melhoramento**. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2001. p. 783-851.

PELLET, D. M.; GRUNES, D. L.; KOCHIAN, L.V. Organic acid exudation as an aluminum tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). **Planta**, Berlin, v. 196, n. 4, p. 788–95, Dec. 1995.

PELLET, D. M.; PAPERNIK, L.; KOCHIAN, L. Multiple aluminum-resistance mechanisms in wheat. Roles of root apical phosphate and malate exudation. **Plant Physiology**, Washington, v. 112, n. 2, p. 591–597, Oct. 1996.

PETRASOVITS, L. A. et al. Production of polyhydroxybutyrate in sugarcane. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 162-172, Jan. 2007.

PICELLI, E. **Cultura de tecidos e transformação genética com o gene Ddm1 no estudo do silenciamento de elementos de transposição em canade-açúcar**. 2010. 140 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PIÑEROS, A.; KOCHIAN, L. V. A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al^{3+} -induced anion channels. **Plant Physiology**, Washington, v. 125, n. 1, p. 292–305, Jan. 2001.

PIÑEROS, M. A. et al. The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. **Plant Physiology**, Washington, v. 129, n. 3, p. 1194–1206, July 2002.

PÔSSA, K. F. **Superexpressão em plantas transgênicas de milho do gene SbMATE, que confere tolerância ao alumínio em sorgo**. 2010. 108 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

PROCÓPIO, S. O. et al. **Manejo de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. 150 p.

RANGEL, M. P. et al. Transgenic plants of CC 84-75 resistant to the virus associated with the sugarcane yellow leaf disease. In: CONGRESS INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 2005, Guatemala. **Proceedings...** Guatemala: [s.n.], 2005.

REIS, R. R. et al. Induced over-expression of *AtDREB2A CA* improves drought tolerance in sugarcane. **Plant Science**, Limerick, v. 221, p. 59-68, May 2014.

REIS, R. R. **Plantas de cana-de-açúcar transformadas com ZmRab17::AtDREB2A CA para tolerância a seca**. 2013. 126 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

RESENDE, M. D. V. de; BARBOSA, M. H. P. **Melhoramento genético de plantas de propagação assexuada**. Colombo: Embrapa Florestas, 2005. 130 p.

RIBEIRO, A. P. et al. *MATE*: a promising gene for aluminum tolerance in sugarcane. In: GERMPLOSM AND BREEDING, 11.; MOLECULAR BIOLOGY WORKSHOPS, 8., 2015, Reunion Island. **Proceedings...** Reunion Island: [s.n.], 2015. p. 1-70.

_____. Overexpression of the MATE gene in *Setaria viridis*. In: The 1st International Setaria Genetics Conference, 2014, Beijing. In: INTERNATIONAL SETARIA GENETICS CONFERENCE, 1., 2014, Beijing. **Proceedings...** Beijing: [s.n.], 2014. p. 11.

RICHARDS, R. A. Defining selection criteria to improve yield under drought. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 20, n. 2, p. 157-166, Nov. 1996.

ROSSETO, R.; SANTIAGO, A. D. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. **Árvore do conhecimento Cana-de-Açúcar**: gessagem. [S.l.: s.n.], 2012. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_35_7112005167_17.html>. Acesso em: 20 set. 2012.

RYAN, P. R. et al. A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. **Plant Physiology**, Washington, v. 149, n. 1, p. 340–351, Jan. 2009.

_____. Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 94, n. 1, p. 6547-6552, Jan. 1997.

RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; JONES, D. L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 527-556, June 2001.

RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P. J. Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. **Planta**, Berlin, v. 196, n. 1, p. 103-110, Mar. 1995.

SABER, N.; ABDEL-MONEIM, A.; BARAKAT, S. Role of organic acids in sunflower tolerance to heavy metals. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 42, n. 1, p. 65–73, July 1999.

SAGE, R. F. The evolution of C4 photosynthesis. **New Phytologist**, London, v. 161, n. 2, p. 341-370, Feb. 2004.

SAINZ, M. B. Commercial cellulosic ethanol: the role of plant-expressed enzymes. In: TOMES, D.; LAKSHMANAN, P.; SONGSTAD, D. (Ed.). **Biofuels: global impact on renewable energy, production agriculture, and technological advancements**. New York: Springer, 2009. Chap. 13, p. 237-264.

SALLA, D. A. et al. Avaliação energética da produção de etanol utilizando como matéria-prima a cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 8, p. 2516-2520, nov. 2009.

SASAKI, T. et al. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 645-653, Mar. 2004.

SAWAKI, Y. et al. STOP1 regulates multiple genes that protect Arabidopsis from proton and aluminum toxicities. **Plant Physiology**, Washington, v. 150, n. 1, p. 281-294, May 2009.

SÉTAMOU, M. et al. Evaluation of lectin-expressing transgenic sugarcane against stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae): effects on life history parameters. **Journal of Economic Entomology**, Annapolis, v. 95, n. 2, p. 469-477, Apr. 2002.

SILVA, I. R. et al. Differential aluminum tolerance in soybean: An evaluation of the role of organic acids. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 112, n. 2, p. 200-210, June 2001.

SILVA, J. P. N. da; SILVA, M. N. da. **Noções da cultura da cana-de-açúcar**. Ihumas: IFG, 2012. 105 p.

SILVA, L. A. **Validação do efeito do gene *Alt_{SB}* que controla a tolerância ao alumínio em sorgo**. 2008. 75 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

SIVAGURU, M.; HORST, W. J. The distal part of the transition zone is the most aluminum sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiology**, Washington, v. 116, n. 1, p. 155-163, Jan. 1998.

SLASKI, J. J. Response of calmodulin-dependent and calmodulin-independent NAD kinase to aluminium in root tips from various cultivated plants. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v. 136, n. 1, p. 40-44, Apr. 1990.

SNYMAN, S. J. et al. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 10, p. 1016-1023, Oct. 2006.

SOMERS, D. A.; MAKAREVITCH, I. Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes? **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 15, n. 2, p. 126-131, Apr. 2004.

TAYLOR, P. W. J.; DUKIC, S. Development of an in vitro culture technique for conservation of *Saccharum* spp. hybrid germplasm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v. 34, n. 2, p. 217-222, Aug. 1993.

TORQUATO, S. A. Cana-de-açúcar para indústria: o quanto vai precisar crescer. **Análise e Indicadores do Agronegócio**, Brasília, v. 1, n. 10, p. 01-05, dez. 2006.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Açúcar e álcool: responsabilidade social**. [S.l.: s.n.], 2012. Disponível em: <http://portalunica.com.br/portalunica/files/referencia_publicacoes_institucionais-8-Arquivo-.pdf>. Acesso em: 20 out. 2015.

_____. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 12 maio 2014.

_____. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 15 nov. 2015.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Sugar: world markets and trade**. [S.l.: s.n.], 2015. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/sugar.pdf>>. Acesso em: 30 nov. 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Departamento Ciência do Solo. **Cerrado**. Lavras: Editora da UFLA, Disponível em: <<http://www.dcs.ufla.br/Cerrados/Portugues/CPPrincipaIP.htm/>>. Acesso em: 20 set. 2015.

VAN ECK, J.; SWARTWOOD, K. *Setaria viridis*. In: WANG, K. (Ed.). **Agrobacterium protocols: volume 1**. 3. ed. New York: Springer, 2015. p. 57-67.

VICKERS, J. E. et al. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic sugarcane results in darker juice and raw sugar. **Crop Science**, Kampala, v. 45, n. 1, p. 354-362, Sept. 2005.

VITORELLO, V. A.; CAPALDI, F. R.; STEFANUTO, V. A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 129-143, jan./mar. 2005.

VON UESKÜLL, H. R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 171, n. 1, p. 1-15, Apr. 1995.

WANG, W. X.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, Berlin, v. 218, n. 1, p. 01-14, Nov. 2003.

WU, H.; ALTPETER, F. Sugarcane (*Saccharum* Spp. Hybrids). In: WANG, K. (Ed.). **Agrobacterium protocols**. New York: Springer, 2015. p. 307-316.

XIA, J. et al. Differential expression of *Nrat1* is responsible for Al-tolerance QTL on chromosome 2 in rice. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 43, p. 4297-4304, Oct. 2014.

_____. Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 107, p. 18381-18385, 2010.

YAMAJI, N. et al. A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. **Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 10, p. 3339-3349, Oct. 2009.

YAMAMOTO, Y. et al. Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. **Plant Physiology**, Washington, v. 128, n. 1, p. 63-72, Jan. 2002.

YANG, Z. et al. Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 110, n. 1, p. 72-77, Sept. 2000.

YOKOSHO, K. et al. OsFRDL1 is a citrate transporter required for efficient translocation of iron in rice. **Plant Physiology**, Washington, v. 149, n. 1, p. 297-305, Jan. 2009.

YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; MA, J. F. An Al-inducible MATE gene in involved in external detoxification of Al in rice. **The Plant Journal**, Oxford, v. 68, p. 1061-1069, 2011.

ZEIGLER, R. S. et al. Advances the selection and breeding of acid tolerant plants: rice, maize, sorghum and tropical forages. In: DATE, R. A. et al. (Ed.). **Plant-soil interactions at low pH: principles and management**. Drodrecht: Klumer, 1995. p. 391-406.

ZHANG, G. et al. Genome sequence of foxtail millet (*Setaria italica*) provides insights into grass evolution and biofuel potential. **Nature Biotechnology**, New York, v. 30, n. 6, p. 549-554, May 2012.

_____. Sugarcane genetics and genomics. In: MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. (Ed.). **Sugarcane: physiology, biochemistry, and functional biology**. Oxford: Wiley Blackwell, 2013. Chap. 24, p. 623-643.

ZHANG, L.; XU, J.; BIRCH, R. G. Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, n. 10, p. 1021-1024, June 1999.

ZHANG, W. H.; RYAN, P. R.; TYERMAN, S. D. Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminium in the apical cells of wheat roots. **Plant Physiology**, Washington, v. 125, n. 3, p. 1459-1472, Mar. 2001.

ZHAO, Z. et al. Differential Al resistance and citrate secretion in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Planta**, Berlin, v. 217, n. 5, p. 794-800, Sept. 2003.

ZHENG, S. J.; MA, J. F.; MATSUMOTO, H. Continuous secretion of organic acids is related to aluminum resistance during relatively long-term exposure to aluminum stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 103, n. 2, p. 209–214, June 1998.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**ARTIGO 1 - OVEREXPRESSION OF *BdMATE* GENE CONFERS
ALUMINUM TOLERANCE IN *Setaria viridis***

Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003), conforme orienta o Manual de Normalização da UFLA para artigos ainda não submetidos.

RESUMO

Solos ácidos são distribuídos em todo o mundo, principalmente em áreas tropicais e subtropicais, atingindo cerca de 50% do solo arável. Este tipo de solo reduz fortemente a produção das culturas, principalmente devido ao alumínio, que tem a sua solubilidade aumentada em níveis baixos de pH. Um mecanismo biológico conhecido é utilizado pelas plantas para lidar com o estresse ao Al, que envolve a ativação de transportadores de membrana, responsáveis pela exsudação (secreção) de ácidos orgânicos através do ápice radicular para a rizosfera, que vão quelar ao Al impedindo a sua absorção pelas raízes. Em sorgo (*Sorghum bicolor*), um gene que codifica um transportador de membrana pertencente à *Multidrug And Toxic Compound Extrusion (MATE)* esta família foi identificada e caracterizada como um gene transportador de citrato ativado por alumínio e responsável pela tolerância ao Al nesta cultura. *Setaria viridis* é uma monocotiledônea emergente como planta modelo para estudos moleculares e genômica funcional. No presente trabalho, *S. viridis* foi utilizada como planta modelo para superexpressar um gene ortólogo de *SbMATE (BdMATE)* fusionado ao promotor constitutivo Ubiquitina de milho (*ZmUbi*), para ensaios de tolerância ao alumínio. Plantas transgênicas de *S. viridis* superexpressando *BdMATE* apresentaram fenótipo de tolerância ao Al, caracterizado pelo crescimento relativo das raízes e exclusão do alumínio pelo ápice radicular nas plantas transgênicas como confirmado pelo ensaio de coloração por hematoxilina. A análise de expressão de genes relacionados à tolerância ao Al e avaliação dos exsudados (secreção) de ácidos orgânicos foram realizadas e são discutidas com base nos mecanismos conhecidos de tolerância ao Al. Em conjunto, os resultados indicam que a superexpressão de *BdMATE* poderá ser utilizada para desenvolver culturas tolerantes ao alumínio, filogeneticamente relacionadas à *S. viridis* tais como cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Alumínio. *Setaria viridis*. *MATE*. Estresse abiótico.

ABSTRACT

Acidic soils are distributed worldwide, predominantly in tropical and subtropical areas, reaching around 50% of the arable soil. This type of soil strongly reduces crop production, mainly because of the presence of aluminum, which has its solubility increased at low pH levels. A well-known physiological mechanism used by plants to cope with Al stress involves the activation of membrane transporters responsible for organic acids secretion from the root apex to the rhizosphere that chelate Al preventing its absorption by the roots. In sorghum (*Sorghum bicolor*), a membrane transporter gene belonging to the *Multidrug And Toxic compound Extrusion (MATE)* family was identified and characterized as an aluminum-activated citrate transporter gene responsible for the Al-tolerance in this crop. *Setaria viridis* is an emerging monocot plant model for molecular and functional genomics studies. In the present work, *S. viridis* was used as a model plant to overexpress an ortholog of *SbMATE (BdMATE)* gene driven by maize ubiquitin constitutive promoter (*ZmUbi*) for aluminum tolerance assays. Transgenic *S. viridis* plants overexpressing a *BdMATE* presented Al-tolerance phenotype, characterized by sustained root growth and exclusion of aluminum from the root apex in transgenic plants, as confirmed by hematoxylin assay. Expression analysis of genes related to Al tolerance and evaluation of organic acids secretion were performed, and the results obtained are discussed based on the known Al-tolerance mechanisms. Altogether, our results indicate that the overexpression of *BdMATE* could be used to develop Al-tolerant crops closely related to *S. viridis* such as sugarcane.

Keywords: Aluminum. *Setaria viridis*. *MATE*. Abiotic stress.

1 INTRODUCTION

Acidic soils are widely distributed worldwide, predominantly in tropical and subtropical areas, reaching around 50% of the arable soil in the world (CANÇADO, 2006; KOCHIAN et al., 2015; VON UEXKÜLL; MUTERT, 1995). This type of soil strongly reduces crop production, mainly because of the presence of aluminum therein. Aluminum (Al) is the most abundant metal on Earth, and conjugated with oxides, silicates and hydroxides constitutes soil particles (BOFF, 2006; OLIVEIRA, 2012). In highly acidic soils (pH <5) Al is solubilized into a phytotoxic form $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, usually referred to as Al^{3+} . Aluminum is extremely rhizotoxic, affecting root growth and function and therefore limiting crop production, and its toxicity, along with drought, is a primary food security concern (MAGALHÃES et al., 2007; VON UEXKÜLL; MUTERT, 1995).

A well-known physiological mechanism used by plants to cope with Al stress involves the activation of membrane transporters responsible for organic acids secretion from the root apex to the rhizosphere. These organic acids form non-phytotoxic stable complexes with Al^{3+} , preventing its absorption by the roots (BOFF, 2006; KOCHIAN et al., 2015). In sorghum (*Sorghum bicolor*), a membrane transporter gene belonging to the multidrug and toxic compound extrusion (*MATE*) family was identified and characterized as an aluminum-activated citrate transporter gene responsible for the Al-tolerance in this crop (MAGALHÃES et al., 2007). *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing the *S. bicolor MATE* gene (*SbMATE*) demonstrated an Al-tolerant phenotype and increased root citrate exudation when compared to non-transgenic plants (MAGALHÃES et al., 2007). These results support that a member of a *MATE* family from *S. bicolor* (*SbMATE*) is an Al-activated citrate secretion transporter conferring aluminum tolerance. In addition, it was demonstrated that *MATE* homologs were root citrate transporters in other monocot species such as maize

(*ZmMATE1*) (MARON et al., 2010, 2013), and rice (*OsFRD1*) (YOKOSHO; YAMAJI; MA, 2011). Therefore, MATE, along with the anion channels ALMTs (SASAKI et al., 2004), are major root organic acids transporters involved in Al-resistance in plants and are potential targets for crop improvement under Al stress.

Setaria viridis is an emerging monocot plant model for molecular and genetic studies. It is a short, fast-growing, C4 plant with its genome sequence fully available (BENNETZEN, 2012; phytozome.jgi.doe.gov), making it a reliable model for genetic studies. In addition, *S. viridis* is amenable for genetic transformation through *Agrobacterium tumefaciens*, with well-established transformation protocol (MARTINS et al., 2015). In the present work, *S. viridis* was used as a model plant system to overexpress an ortholog of *SbMATE* (*BdMATE*) gene under the control of the maize ubiquitin constitutive promoter (*ZmUbi*) for aluminum tolerance. *S. viridis* plants overexpressing *BdMATE* showed an Al-tolerance phenotype, characterized by sustained root growth under 20 μM Al^{3+} , whereas non-transformed plants showed root growth inhibition. The expression of aluminum tolerance-related genes and organic acid secretion analyses were performed, and the results obtained are discussed based on the known Al-tolerance. Our results demonstrated that, in the future, the overexpression of *BdMATE* could be used to develop Al-tolerant crops closely related to *S. viridis* such as sugarcane.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 *In silico* analysis

Searches for the *Sorghum bicolor* *MATE* gene in the Phytozome database (phytozome.jgi.doe.gov) were performed in order to find orthologs of *SbMATE* in the genome of *Brachypodium distachyon*. Based on the different sequences found, the alignment of these sequences was generated using the software ClustalW (LI, 2003). Analysis of conserved protein domains and the prediction of the molecular and cellular functions of these domains were evaluated by the online softwares FFPred and MEMSAT-SVM (BUCHAN et al., 2010). The phylogenetic tree was generated based on amino acid sequences of major grasses that have been studied with *MATE* gene, using the Geneious software (KEARSE et al., 2012).

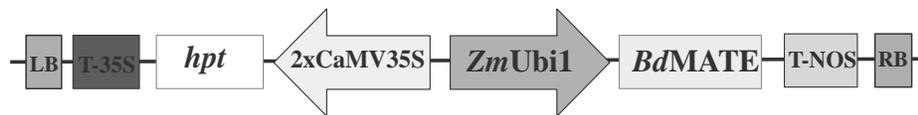
2.2 Tissue culture and plant transformation

The gene construct containing the *Brachypodium distachyon* *MATE* gene (*BdMATE*), driven by *ZmUbi1* constitutive promoter and the *hpt* gene selection marker (which confers hygromycin resistance), was synthesized by DNA Cloning Service, Germany (FIGURE 1) and introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 for plant transformation.

Mature seeds of *Setaria viridis* were selected for embryogenic calli induction in callus induction medium [CIM; consisted of MS salts (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 1 mg/L d-biotin, 0.5 mg/L pyridoxine HCl, 0.5 mg/L nicotinic acid, 100 mg/L myo-inositol, 0.1 mg/L thiamine-HCl, 0.6 mg/L CuSO₄, 30 g/L sucrose, 2 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 0.5 mg/L kinetin and 4 g/L Phytigel™, pH 5.8]. Induced calli were used for *Agrobacterium*-mediated transformation, according to Martins et al. (2015). The putative transgenic calli, resistant to 30 mg/L hygromycin, were transferred to selective regeneration medium (SRM) consisting of MS salts, 1 mg/L d-biotin,

0.5 mg/L pyridoxine HCl, 0.5 mg/L nicotinic acid, 100 mg/L myo-inositol, 0.1 mg/L thiamine HCl, 20 g/L sucrose, 2 mg/L kinetin, 150 mg/L Timentin[®], 30 mg/L hygromycin B, 2 g/L Phytigel[™], pH 5.8. The regenerated plants were submitted to PCR analysis in order to confirm the presence of the transgene.

Figure 1 - Schematic representation of T-DNA cloning of binary vectors *pbi* (DNA Cloning Service, Germany)



2.3 Molecular analysis and selection of the transgenic events

Genomic DNA from regenerated plantlets resistant to hygromycin was extracted using a modified CTAB method (DOYLE; DOYLE, 1987), according to Molinari et al. (2007). The gene insertion was confirmed by PCR using specific primers designed for *BdMATE* amplification (TABLE 1).

The putative transgenic events underwent gene expression analysis by real-time PCR of the target gene *BdMATE*, using the primers described in Table 1. The expression level was calculated using endogenous genes *SiUBC* e *SiSDH2* as reference (TABLE 1).

Segregation analysis was performed in T1 seeds to estimate the number of insertions in each event. Seeds were grown in selective medium with hygromycin 50 mg/L. After seven days, the number of resistant and sensitive plants was counted, and the proportion was analyzed statistically using the χ -Squared test. Events with single insertion determined by 3:1 Mendelian segregation ratio were selected. The T2 seeds of the selected events were placed in selective medium with hygromycin 50 mg/L, for the selection of transgenic homozygous lines, which were used for aluminum stress assays.

Table 1 - Sequence of the pair of primers used for PCR and qPCR analysis.

Oligo Name		Sequence (5' → 3')	Amplicon Size	Annealing T°C
<i>Bd</i> MATE	<i>F</i> *	GGAAGAAAACAGCAGCCAAG	450 pb	55
	<i>R</i> **	ATGTGGCAAACGAACATCAA		
<i>Zm</i> Ubi1	<i>F</i> *	CGAGTAGATAATGCCAGCCT	456 pb	58
	<i>R</i> **	GACGAGCGGCGTACCTTGAA		
<i>hpt</i>	<i>F</i> *	TGTTTATCGGCACTTTGCAT	511 pb	56
	<i>R</i> **	GATGTTGGCGACCTCGTATT		
<i>Si</i> SDHq	<i>F</i> *	TGTCGGCTCCTGTTGCAA		
	<i>R</i> **	CGGTGGGAGATCGAGAATGT		
<i>Si</i> UBCq	<i>F</i> *	TCTAGTTCGCCAGCAAAGCA		
	<i>R</i> **	CATCTGGTCTCCTTTGGCGA		
<i>Bd</i> MATEq	<i>F</i> *	TCTAGTTCGCCAGCAAAGCA		
	<i>R</i> **	CATCTGGTCTCCTTTGGCGA		
<i>Si</i> MATEq	<i>F</i> *	ACTCTGCCTACTCCATGGTTGC		
	<i>R</i> **	AAAGGTACACCAGGCACGGTATG		
<i>Si</i> EF1- α q	<i>F</i> *	TGGTATGCTTGTCACCTTTGGT		
	<i>R</i> **	CTCGTGGTGCATCTCAACTGA		
<i>Si</i> SUIq	<i>F</i> *	CCAGAGCTTGGACAGGTCATTC	80 pb	60
	<i>R</i> **	ACAATGCCAGCCTGGACAA		
<i>Si</i> CACq	<i>F</i> *	CTGCTTCTGGTCTTCGTGTT		
	<i>R</i> **	GTATGATCCTGCTCTCGTGATG		
<i>Si</i> CULq	<i>F</i> *	TTCATCACGAGGGACTACTT		
	<i>R</i> **	CTTGCCAACAACCACCAATC		
<i>Si</i> CSYq	<i>F</i> *	AGGGTCTCCTTTGGCTTCTTCT		
	<i>R</i> **	GGCCAGCAATTCCTTTGAAA		
<i>Si</i> MDHq	<i>F</i> *	CCAGGGACGACCTCTTCAAC		
	<i>R</i> **	AGCGTTTGGGCAGTGCTT		
<i>Si</i> STOPq	<i>F</i> *	CTGCAGCTCTTGCCAAACC		
	<i>R</i> **	ACCCACAAATGGGCATGAGT		

*Forward; **Reverse

2.4 Aluminum treatment assay and root growth measurement

A protocol was established in order to evaluate the phenotype of *S. viridis* submitted to aluminum treatment in hydroponic system. First, non-transgenic seven-days-old plantlets were subjected to evaluation of root growth in different nutrient solutions such as Hoagland (ARNON; HOAGLAND, 1950), Camargo (CAMARGO, 1981) and Magnavaca (MAGNAVACA; GARDNER; CLARK, 1987). The plant growth under a solution based solely on CaCl₂, at

different concentrations, was also tested, according to Sasaki et al. (2004). The normal plant growth results under 500 μM CaCl_2 solution (data not shown) prompted us to use it for our studies, in order to minimize aluminum interaction with compounds present in the other nutrient solutions. Al^{3+} activity was estimated using the software GeoChem-EZ (SHAFF et al., 2010) (TABLE 2). After the establishment of the stress protocol, a solution containing {20} μM of Al^{3+} free activity, pH 4.2, was used to submit *S. viridis* plants for 1, 3 and 5 days, and this protocol was followed throughout the work. The evaluation of the root growth was performed by scanning the roots daily for five days, and the total root length was measured by the software WinRhizo 2007a (Régent Instruments Inc). Transgenic and non-transgenic plants were evaluated for liquid root growth, and the percentage of Root Growth Inhibition (RGI) in treatments in the presence or absence of aluminum was calculated as described in Ryan et al. (2009). In order to measure Root Net Growth (RNG), the length of the roots was measured before and after each day of growth in the calcium chloride solution with (+Al) and without (-Al) aluminum. The % RGI values were calculated from root growth measured over each day in +Al solution divided by root growth measured over each day in control (-Al) solution x 100, calculated individually for each event.

Table 2 - Concentration and free activity of aluminum in 500 μM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 4.2, calculated using the software GeoChem-EZ

Concentrations of AlCl_3	Free activity of Al^{3+}
0 μM	{0} μM^*
18 μM	{10} μM
35 μM	{20} μM
53 μM	{30} μM

* Values inside brackets indicate Al^{3+} activity estimated with the speciation software, GeoChem-EZ.

2.5 Real-time qPCR analysis

After 7-days-old plantlets had been submitted to 500 μM CaCl_2 solution, in the absence or the presence of {20} μM Al^{3+} , pH 4.2, in hydroponic system for 1, 3 and 5 days, total RNA was extracted from shoots and roots using Trizol[®] reagent (Thermo Fischer Sci.). The samples were treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega, Madison, WI, USA), and the synthesis of first strand cDNA was accomplished using the extracted RNA as template and the RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Sci.). These steps were all performed according to the manufacturer's instructions. The qPCR was carried out using Platinum[®] SYBR[®] Green with synthesized single-stranded cDNA as template, using the protocol recommended by the Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems). The primers used in the qPCR are described in Table 1.

Relative gene expression levels were calculated using the q-Gene (MULLER et al., 2002). *SiEF1- α* ; *SiSUI*, *SiCAC* and *SiCUL* were used as reference genes and the geometrical mean of the relative quantities (RQs) was calculated using BestKeeper software (PFAFFL et al., 2004). Individual amplification efficiencies were established with LinRegPCR v.2013.0 using a window-of-linearity (RAMAKERS et al., 2003). The experiment was performed using three biological replicates, with 40 plants each.

2.6 Analysis of organic acids from root exudates

The collection of exudates and measurement of the organic acids released from the roots of *S. viridis* plants was performed after 1, 3 and 5 days of exposure to 500 μM CaCl_2 solution with or without aluminum {20} μM Al^{3+} , pH 4.2. After the exposure period, the roots were washed with 20 mL of 500 μM CaCl_2 solution for 40 minutes, under 60 rpm in an orbital shaker. This procedure

was repeated 3 times for each replicate. The wash solutions were lyophilized for HPLC analysis.

The lyophilized samples were resuspended in ultrapure water filtered through nitrocellulose filters (0.45 μm Millipore). Ten microliters of each sample was injected in a HPLC (PerkinElmer[®]) equipped with a HSS T3 C18 column (Waters) at 30 °C. The liquid phase consisted of 0.5 % H_3PO_4 solution injected at 0.4 mL/min flow rate and 10 min running time. The organic acids absorbance was monitored at 210 nm. Citrate, oxalate, malate and succinate standards (Sigma-Aldrich) were used for the identification and quantification of organic acids present in the samples. Three biologic replicates and two technical replicates for each treatment were analyzed.

In addition, a method for citrate exudate analysis was applied. The quantification of organic acid by enzymatic assay is based on the conversion of the anion citrate into oxaloacetate and acetate by the action of the enzyme citrate lyase (LANA et al., 2014). This enzymatic assay was performed with the commercial kit Citric Acid Assay Kit (Megazyme, Wicklow, Ireland), with modifications described in Lana et al. (2014). The measurements were performed in spectrophotometer UV/VIS UV-mini 1240 (Shimadzu Corporation, Columbia, MD), at 340 nm.

2.7 Hematoxylin staining

The hematoxylin method was used to evaluate Al accumulation in *S. viridis* plants under aluminum treatment. The basic protocol was based on Tang et al. (2000). The roots were excised from the plantlets and gently shaken in 2mL of distilled water for 60 minutes. The water was replaced by 2 mL of aqueous hematoxylin solution (0.2% hematoxylin and 0.02% potassium iodide, w/v) and agitated for 15 minutes. Finally, the solution was replaced one more

time by 2 mL distilled water, thereby repeating the first step. After staining, the roots were photographed under the stereomicroscopic Leica Model S8APO.

2.8 Statistical analysis

Experimental data were analyzed using randomized block design (RBD) with replications for each treatment ($\{0\}$ and $\{20\}$ $\mu\text{M Al}^{3+}$). Samples for all analysis were collected at days 1, 3 and 5. Differences among treatments per sample were analyzed using t test, considering $p < 0.05$ as significant.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 *In silico* analysis

In order to find orthologous sequences of *Sorghum bicolor* *MATE* gene, it was conducted a BLAST analysis in the Phytozome database (phytozome.jgi.doe.gov). *B. distachyon* *BdMATE* gene showed the closest similarity to the *SbMATE* gene, and therefore *BdMATE* was chosen for further studies. The results from BLASTx analysis for the *B. distachyon* genome using *SbMATE* gene sequence as query are shown in Figure 2A. The hits based on the lowest *e-values*, highest score values and larger alignment bars with the query sequence were chosen for alignment studies using the *MATE* genes present in different organisms. The selected amino acid sequences of *B. distachyon* *MATE* protein (*BdMATE*) were aligned with the different *MATE* sequences from other related organisms to generate a phylogenetic tree, using the Geneious software (FIGURE 2B). The sequence Bradi1g69770.1 was chosen for the present study due to its close similarity to the *S. bicolor* *MATE* sequence.

Figure 2 - A: BLASTX in the Phytozome database for *BdMATE* using the orthologue sequence *SbMATE* as a query. The sequences in the black box represent lowest *e*-values and highest *Scores*; B: Phylogenetic tree based on amino acid sequences.

BLAST Results

▼ BLAST Inputs A

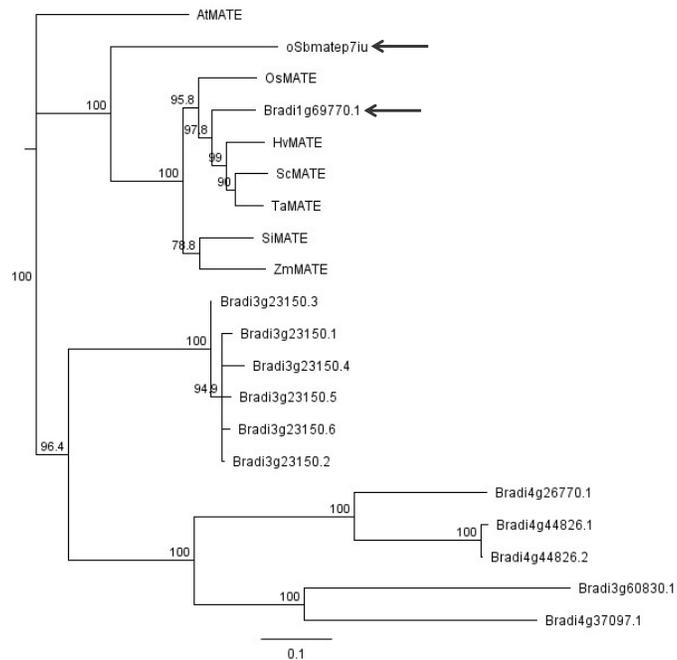
Query your.seq (1803 letters)

Target Brachypodium distachyon v2.1 proteome (42868 sequences, 18003084 total letters)

Program BLASTX 2.2.26+

Hits Found 16 Download results Select BLAST format

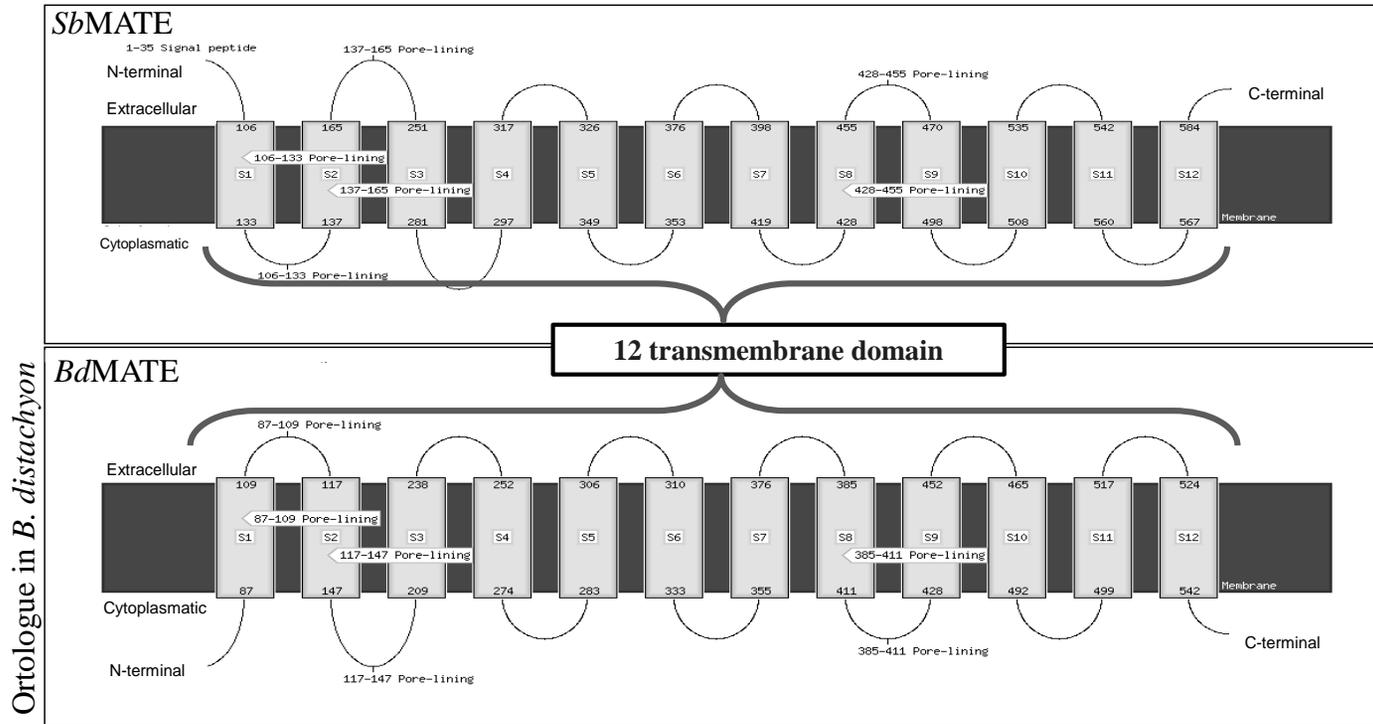
Views	Define	Score	E	Query View	query sequence	1803
▶	▶ G B	Bradi1g69770.1 antiporter activity (Blast2GO)	575.1	0.0		241-1600
▶	▶ G B	Bradi3g23150.1 antiporter activity (Blast2GO)	427.6	1.6E-142		289-1797
▶	▶ G B	Bradi3g23150.3 antiporter activity (Blast2GO)	412.9	3E-137		319-1797
▶	▶ G B	Bradi3g23150.2 antiporter activity (Blast2GO)	386.7	5.1E-127		289-1797
▶	▶ G B	Bradi3g23150.4 antiporter activity (Blast2GO)	380.6	9.2E-125		289-1797
▶	▶ G B	Bradi3g23150.5 antiporter activity (Blast2GO)	368.2	3E-120		289-1638
▶	▶ G B	Bradi3g23150.6 antiporter activity (Blast2GO)	365.9	1.7E-119		319-1797
▶	▶ G B	Bradi4g26770.1 antiporter activity (Blast2GO)	303.5	4.3E-94		289-1768
▶	▶ G B	Bradi4g44826.1	301.6	2.2E-93		292-1794
▶	▶ G B	Bradi4g44826.2	297.7	5.4E-92		292-1794
▶	▶ G B	Bradi4g37097.1	278.5	2.1E-84		313-1800
▶	▶ G B	Bradi3g60830.1	228.8	1.3E-63		304-1800
▶	▶ G B	Bradi3g60846.1	82.0	2.7E-17		895-1089
▶	▶ G B	Bradi3g02170.1	52.4	9.1E-7		754-1122
▶	▶ G B	Bradi3g02170.3	52.4	9.1E-7		754-1122
▶	▶ G B	Bradi3g02170.4	52.4	9.1E-7		754-1122



Geneious software package was used to generate the tree and the numbers on branches represent percentage, bootstrapped with 1000 repetitions using Neighbor-Joining method. The arrows indicate that the sequence for Bradi1g69770.1 is the closest to *Sorghum bicolor* MATE sequence.

In addition, *BdMATE* and *SbMATE* transmembrane domains analysis was performed, using the softwares FFPRED and MEMSAT-SVM. The results are shown in the Figure 3, where it was demonstrated that the *B. distachyon* MATE possesses the same 12 transmembrane domains presented by the *S. bicolor* MATE protein. *BdMATE* belongs to the large multifunctional transport family involved in the transport of organic solutes out of the cytoplasm. The putative molecular functions attributed to this protein are transporter activity, ion transmembrane transporter activity, receptor activity and lipid binding; all these characteristics have shown high specificity and precision for *BdMATE*, according to MMSAT (PSIPRED – UCL-CS BIOINFORMATICS, 2014).

Figure 3 - Transmembrane domains of the *BdMATE* and *SbMATE* generated by FFPRED and MEMSAT-SVM.



3.2 Plant transformation

After the similarity between *BdMATE* and *SbMATE* was confirmed by *in silico* analysis, an expression vector containing *ZmUbi1::BdMATE* was constructed in order to transform embryogenic calli of *S. viridis*. Transgenic calli were selected with 30 mg/L of hygromycin B and regenerated under selective regeneration medium. Genomic DNA was extracted from regenerated plants and used as template for PCR using primers designed for the *BdMATE* gene amplification. The 450 bp amplification product corresponding to the specific region of the *BdMATE* gene was confirmed in the transgenic plants. The calculated efficiency of the genetic transformation was 15.78% on average (TABLE 3).

Table 3 - Summary of the transformation efficiency of *S. viridis* with the construct *ZmUbi1::BdMATE*.

Experiment	Number of calli	Number of PCR positive plants	Transformation efficiency (%)*
1	94	9	9.57
2	55	16	29.09
3	69	6	8.69

The gene expression levels were analyzed by qPCR using *BdMATE* specific primers for thirty T0 transgenic events. The results showed that the relative abundance of *BdMATE* transcripts in the different events ranged from 1 to 14-fold in relation to the event 92, which showed the lowest level of gene expression. The events were classified into 7 groups based on gene expression levels (FIGURE 4). A representative event from each group was selected for Mendelian segregation analysis. All the selected events showed a 3:1 segregation ratio indicating a single gene insertion (TABLE 4).

Table 4 - Segregation ratios in the T_1 generation of plants transformed with *ZmUbi1::BdMATE*.

Event	Resistant ^{*a}	Sensitive ^{*b}	χ^2 value for 3:1 ^{*c}	Fits 3:1 ratio ^{*d}
28	27	11	0.59	Y
29	27	3	3.60	Y
35	21	8	0.10	Y
91	34	19	3.32	Y
49	29	9	0.03	Y
39	30	8	0.31	Y
48	31	14	0.86	Y

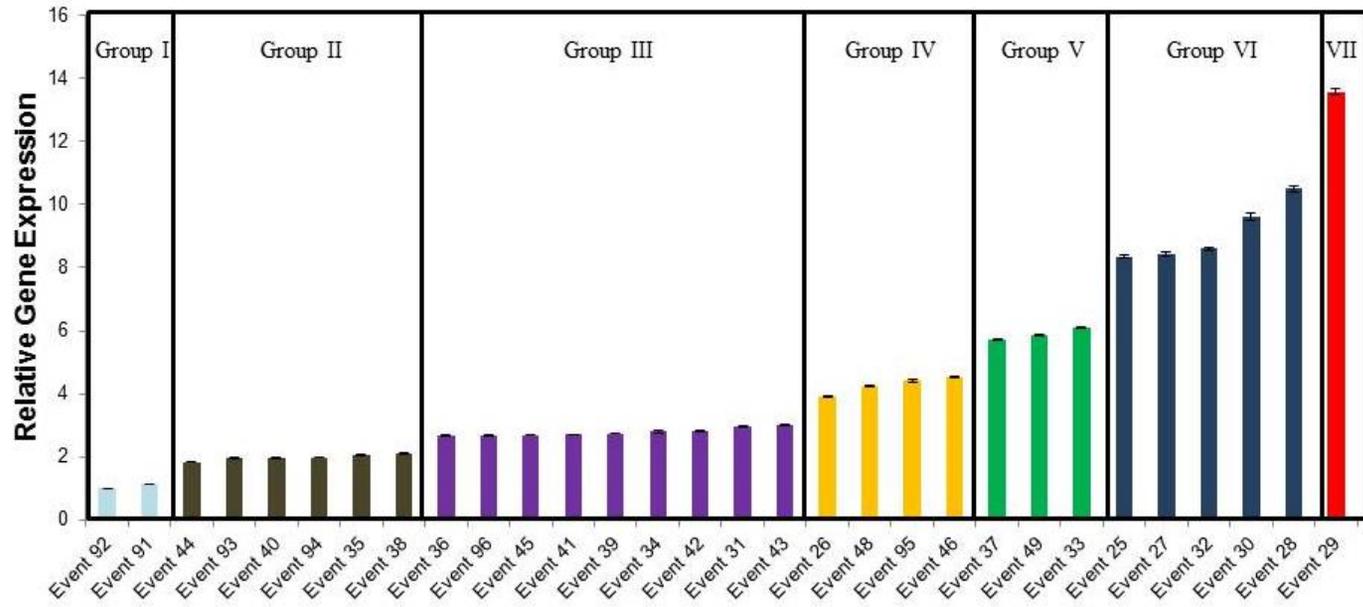
^{*a} Number of seedlings survived in the medium containing 50 mg/L hygromycin B.

^{*b} Number of seedlings sensitive in the medium containing 50 mg/L hygromycin B.

^{*c} Significantly different at $P < 0.05$

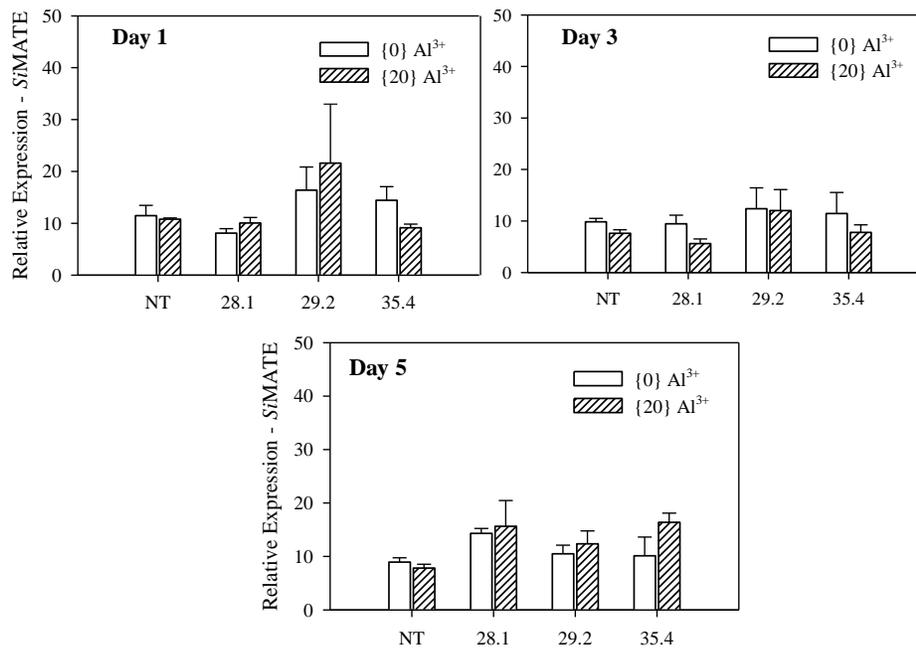
^{*d} Ratio of hygromycin resistant:sensitive seedlings.

Figure 4 - Relative gene expression of *S. viridis* transgenic plants overexpressing the *BdMATE* gene.



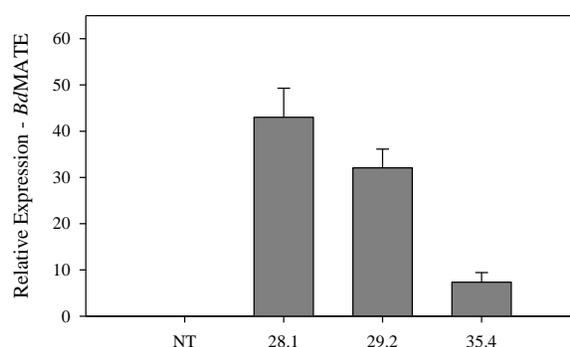
Subsequently, the events 28, 29 and 35 showing moderate, high and low expression levels of *BdMATE*, respectively, were chosen to generate homozygous lines. Three different homozygous lines were obtained, 28.1, 29.2 and 35.4. The expression of the endogenous *MATE* gene in *Setaria* (*SiMATE*) was investigated in transgenic and non-transgenic plants submitted to aluminum stress for 1, 3 and 5 days and compared to untreated plants. As observed in the figure 5 there was no significant differences between the levels of *SiMATE* expression in plants submitted to Al stress in all conditions tested, compared to control plants. These data suggest that endogenous *MATE* gene is probably not involved in Al stress responses in *Setaria*, and the tolerant phenotype observed in transgenic plants is provenient of the overexpression of the *BdMATE*.

Figure 5 - Relative gene expression of the endogenous *Setaria MATE* gene of the NT and homozygous transgenic lines submitted to {0} and {20} $\mu\text{M Al}^{3+}$ during 1, 3 and 5 days.



The expression of the *BdMATE* gene in these homozygous lines was evaluated in *S. viridis* roots using real-time quantitative PCR. Figure 6 shows the high levels of *BdMATE* expression for the homozygous events submitted under Al stress, the expression levels ranged from 10 to 45-fold in comparison to non transgenic plants. Therefore, the lines 28.1, 29.2 and 35.4 were chosen for further aluminum tolerance tests.

Figure 6 - Relative gene expression of the *BdMATE* in homozygous transgenic lines submitted to {20} $\mu\text{M Al}^{3+}$.



3.3 Aluminum tolerance evaluation in transgenic plants

The most common criterion used to measure Al toxicity is the comparison of the root length of Al-affected plants with control plants grown in the absence of Al (MA et al., 1997). In the present study, homozygous *S. viridis* transgenic plants overexpressing the *BdMATE* gene were evaluated by measuring the root growth along 5 days in a hydroponic system in the absence or presence of {20} $\mu\text{M Al}^{3+}$ free activity, in comparison to non-transgenic (NT) plants. Figures 7 and 8 show that transgenic lines presented higher relative net root growth rates (RNRG), compared with NT plants. Transgenic lines presented a sustained root growth after 5 days of Al treatment, which did not occur in NT plants. This phenotype was consistent among all transgenic lines tested

(FIGURES 7, 8A, 8B and 8C). A similar phenotype was observed in *A. thaliana* overexpressing the *SbMATE* gene grown under similar conditions used in our study (LIU et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2007; MARON et al., 2010).

Figure 7 - Homozygous transgenic lines and NT plants after 5 days of exposure to $20 \mu\text{M Al}^{3+}$.

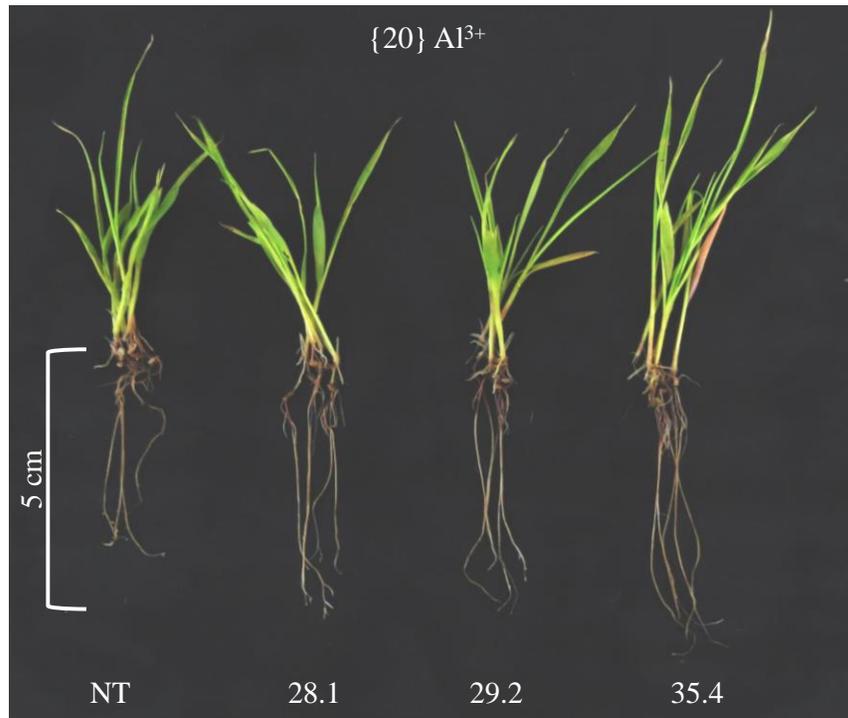
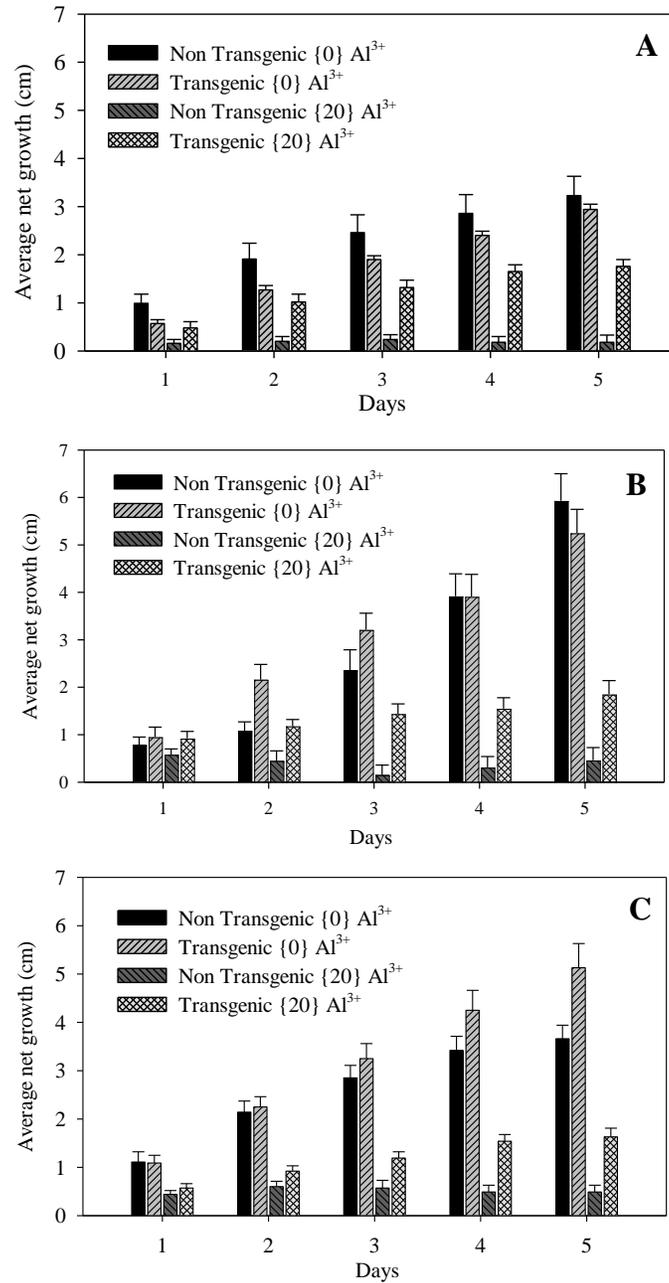


Figure 8 - Root net growth of NT and *ZmUbi1::BdMATE* plants grown under the absence {0} or presence of {20} μM Al^{3+} (n = 20 plantlets); A: Event 28.1; B: Event. 29.2; C: Event 35.4.



The main symptom of aluminum toxicity is inhibition of root growth, which is observed consistently in plants sensitive to this metal (KOCHIAN et al., 2015). A root growth inhibition (RGI) above 90% was observed in non-transgenic plants after 5 days in {20} μM Al^{3+} . Under the same conditions, transgenic plants overexpressing *BdMATE* demonstrated around 40% of RGI for the event 28.1 (FIGURE 9). The other homozygous transgenic lines tested in the present work demonstrated a similar phenotype under the same conditions (FIGURE 10A and B). According to Magalhães et al. (2007), a plant can be considered tolerant to Al when its root growth inhibition during the stress is $\leq 70\%$. Therefore, our results suggest that, under our experimental conditions, non-transgenic plantlets were sensitive to the aluminum concentration tested, while transgenic plants overexpressing *BdMATE* were tolerant.

Figure 9 - Root growth inhibition of non transgenic plantlets and Event 28.1 submitted to 0 and {20} μM Al^{3+} (n = 20).

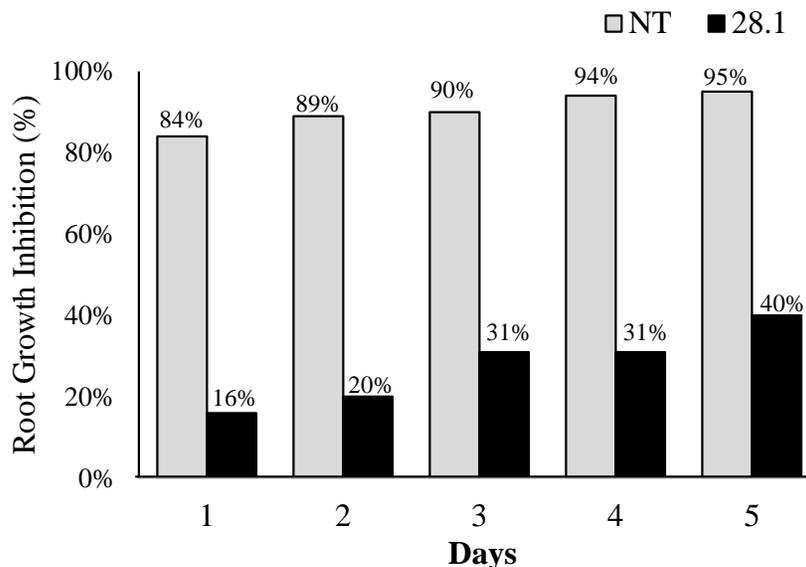
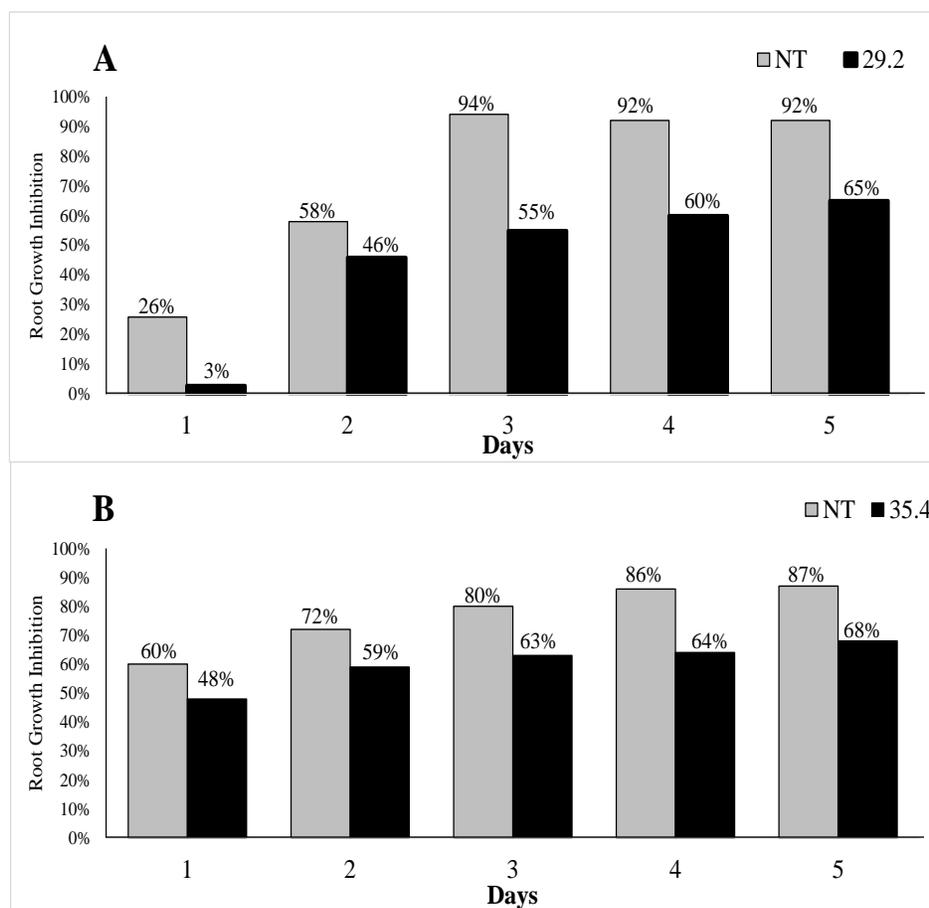


Figure 10 - Root growth inhibition of plantlets submitted to $\{20\} \mu\text{M Al}^{3+}$. Non-transgenic (NT) plantlets and events *BdMATE* A: Event 29.2; B: Event 35.4.



3.4 Gene expression analysis

3.4.1 TCA cycle genes

Organic acids (OAs) are metabolically active solutes with a diverse array of functions in many organisms. These acids have a potential role in the osmotic adjustment and in the balance of cation concentration of the cells, for instance. It is also known that OAs are secreted by the root apex as an aluminum resistance mechanism in most plants. These compounds are released in order to

chelate the Al in the rhizosphere, avoiding its absorption by the roots, conferring Al tolerance. Citrate, malate and oxalate are the main OAs secreted to the rhizosphere in many plant species (KOCHIAN et al., 2015). Organic acids are produced mainly in the mitochondria, by the tricarboxylic acid (TCA) cycle and, in a lesser extent, in the glyoxysome (LÓPEZ-BUCIO et al., 2000). The accumulation of OAs produced by TCA cycle is dependent upon the plant species, age of the plant and tissue type. In addition, the exudation of OAs by roots is dependent on the route of involvement of these organic acids in specific physiological functions (REES, 1990; LÓPEZ-BUCIO et al., 2000).

Recently, Nunes-Nesi et al. (2014) discussed the involvement of enzymes of the TCA cycle in response to the stress of aluminum, since organic acids participate as key components in the mechanisms that some plants use to cope with nutritional deficiency and metal tolerance. Based on these reports and the knowledge that citrate and malate are the main OAs secreted to the rhizosphere under Al stress, we aimed to investigate the expression levels of genes related to citrate synthase (CS) and malate dehydrogenase (MD), responsible for citrate and malate production, respectively, in the transgenic plants overexpressing *BdMATE*. It could be possible that the tolerance phenotype presented by transgenic plants under Al stress was due to an increased production and secretion of citrate or malate by these plants. However, no difference of CS (FIGURE 11) and MD (FIGURE 12) gene expression levels were observed between transgenic and non-transformed plants, in the absence or presence of Al.

Figure 11 - Relative gene expression of the *SiCSY* - citrate synthase in the homozygous transgenic lines 28.1 (A), 29.2 (B), 35.4 (C) and Non-Transgenic plants (NT), submitted to {0} and {20} $\mu\text{M Al}^{3+}$.

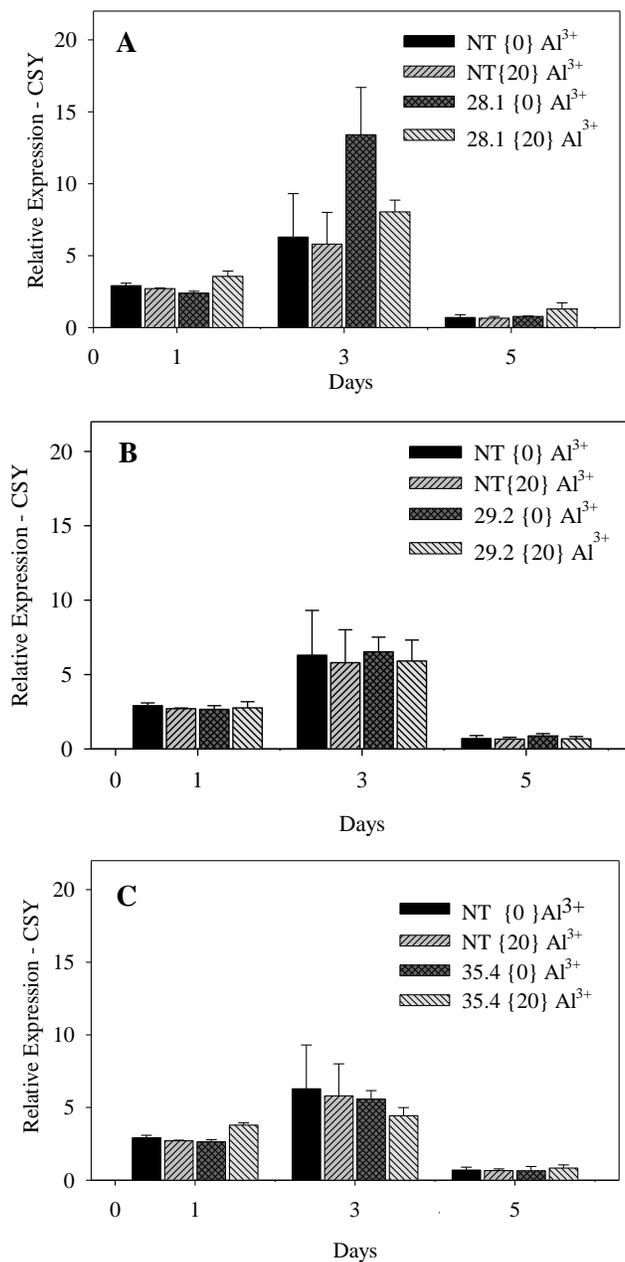
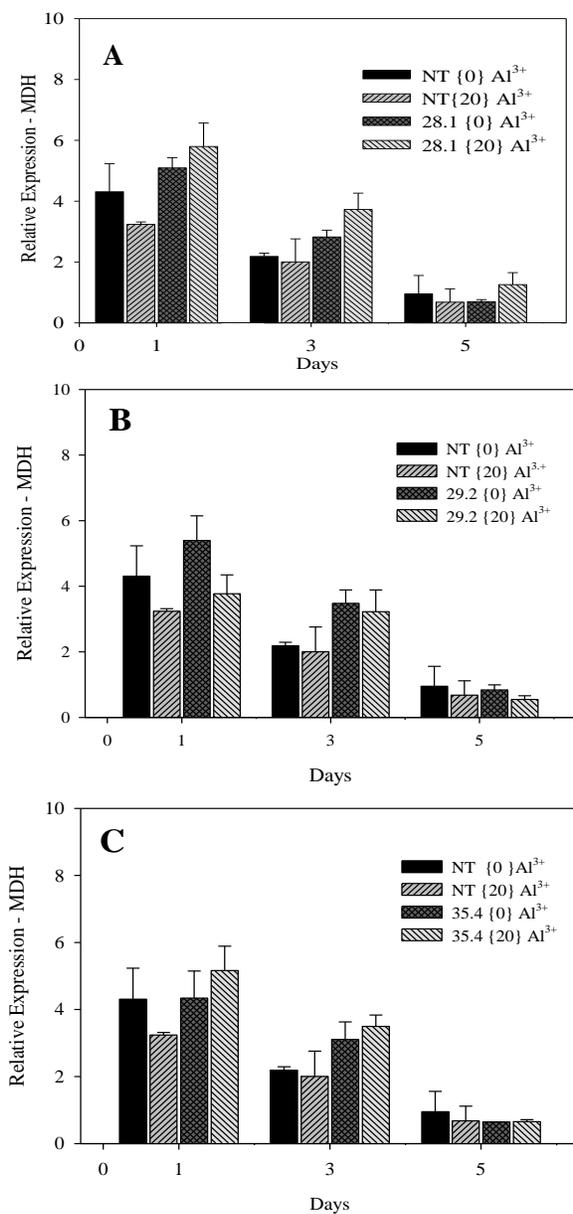


Figure 12 - Relative gene expression of the *SiMDH* – malate desidrogenase in the homozygous transgenic lines 28.1 (A), 29.2 (B), 35.4 (C) and Non-Transgenic plants (NT), submitted to {0} and {20} μM Al^{3+} .



The relationship between increased CS activity and Al tolerance is still inconclusive. In some species such as *Triticum aestivum* L. (wheat) and *Secale*

cereale L. (rye), the evaluation of citrate synthase production in aluminum stress conditions have been performed. Plantlets of cv. King of the *Secale cereale* demonstrated an increased citrate synthase activity when exposed to aluminum for more than 6 hours, while in cv. Atlas 66 of the *Triticum aestivum* L. there was no difference in enzyme activity in plantlets subjected to aluminum (LI; MA; MATSUMOTO, 2000). Our results demonstrated that *S. viridis* transgenic plants overexpressing *BdMATE* with Al-tolerance phenotype do not increase the levels of citrate synthase gene expression. As mentioned above, the organic acids that the plant uses in order to tolerate the aluminum through exudation by the root apex are metabolites originated in the TCA cycle, a key metabolic pathway to all organisms. Thus, it is plausible that the tolerance mechanism to aluminum in plants has a significant carbon cost, being highly regulated (KOCHIAN et al., 2015; RYAN; DITOMASO; KOCHIAN, 1993; SIVAGURU; HORST, 1998; SIVAGURU; LIU; KOCHIAN, 2013). It could be possible that the citrate production in *S. viridis* plants, even under Al stress, occurs at low or basal levels due to the high regulation of the metabolism process involved in these responses. Therefore, more studies are necessary in order to elucidate the relationship between the levels of citrate produced by the TCA cycle with Al tolerance in plants.

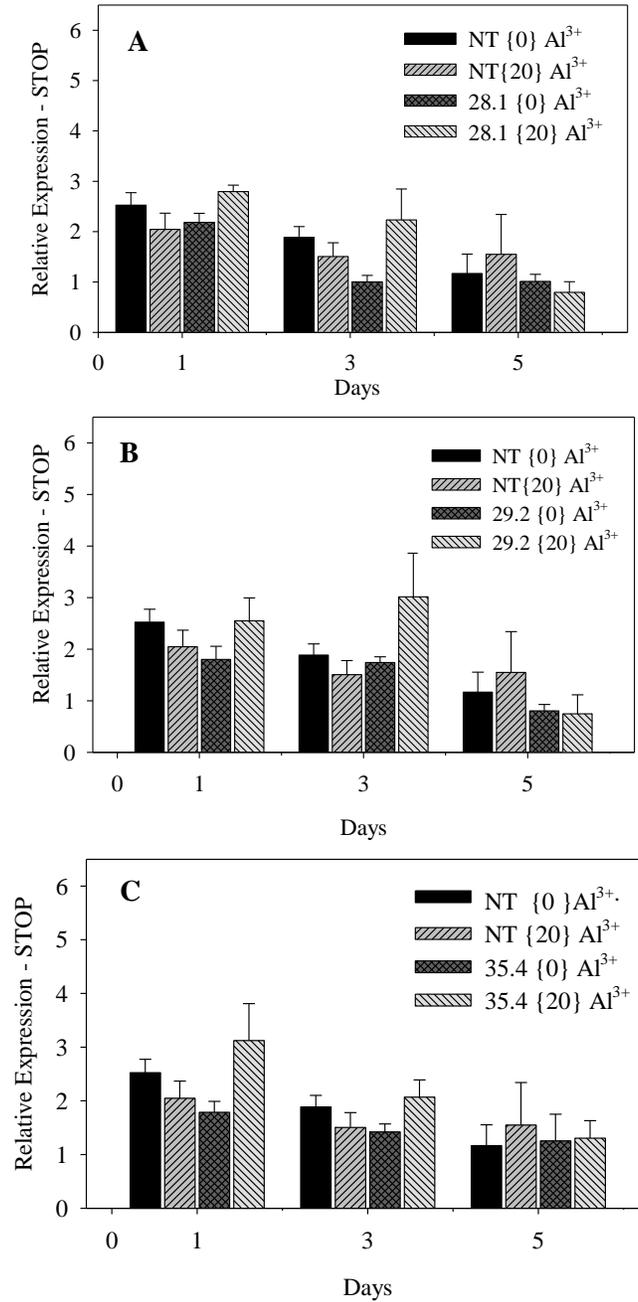
3.4.2 STOP gene expression

Iuchi et al. (2007) identified a zinc-finger transcription factor, STOP1, which regulated the expression of *AtALMT1*, a malate transporter responsible for Al tolerance in *Arabidopsis*. *AtSTOP1* was identified via positional cloning of a low-pH-sensitive *Arabidopsis* mutant that is also hypersensitive to Al toxicity but not to other toxic metals (IUCHI et al., 2007). In addition, Liu et al. (2009) demonstrated that STOP1 is also required for *AtMATE* expression and Al-activated citrate exudation. These results indicate that the *Arabidopsis STOP1*

gene is essential for Al-induced expression of both *AtMATE* and *AtALMT1*. The transcription regulation exerted by the *STOP* can be activated not only by Al, but also at low pH and in response to H^+ (SAWAKI et al., 2009). However, little is known about how such mechanism can occur in other plants and organisms (IUCHI et al., 2007).

Thus, we decided to verify if the *STOP* gene expression could be increased in *S. viridis* transgenic plants demonstrating the Al tolerance phenotype. Figure 13 shows the relative gene expression of an orthologous *AtSTOP1* gene in *S. viridis*. As demonstrated, there was no difference in the *STOP* gene expression between transgenic and non-transgenic plants under Al treatment, indicating that in *S. viridis* this transcription factor may not be involved in Al tolerance. In fact, other transcription factors could be involved in Al resistance in monocots, such as *ART1*, which is involved in Al responses in rice (YAMAJI et al., 2009). The linkage between Al^{3+} perception and the regulation of expression of the genes involves homologs of the *A. thaliana* and *Oriza sativa* transcription factors *STOP1*, *WRKY46*, *ART1* and *ASR5*, recently reported in Kochian et al. (2015). *AtSTOP1* and *OsART1* are two related members of the C_2H_2 -type zinc-finger transcription factor family, which positively regulate Al-induced expression of Al resistance genes in *A. thaliana* and *O. sativa* (KOCHIAN et al., 2015; IUCHI et al., 2007; YAMAJI et al., 2009). Thus, further analysis using different transcription factors are being performed in our laboratory, in order to investigate their involvement in *S. viridis* responses to Al.

Figure 13 - Relative gene expression of the *SiSTOP* – malate desidrogenase in the homozygous transgenic lines 28.1 (A), 29.2 (B), 35.4 (C) and Non-Transgenic plants (NT), submitted to {0} and {20} $\mu\text{M Al}^{3+}$.



3.5 Exudation of organic acids

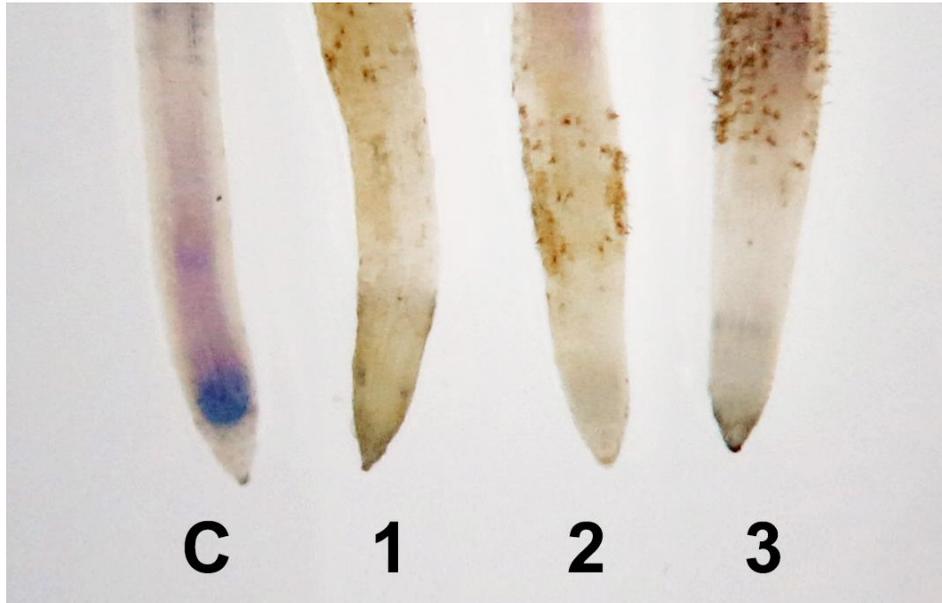
As mentioned above, the exudation of organic acids occurs in plants in response to exposure to aluminum, in a process that involves membrane transporters such as ALMT and MATE. It is known that MATE homologs are root citrate transporters and Al-resistance proteins in a diversity of plant species such as *Arabidopsis* (LIU et al., 2009), maize (MARON et al., 2010), rice bean (YANG et al., 2011) and rice (YOKOSHO; YAMAJI; MA, 2011). Based on our results demonstrating that *S. viridis* plants overexpressing *BdMATE* have Al-resistance phenotype, it is evident that the evaluation of organic acids exudation in these plants is critical. In the present work, two different methods were used to detect OA secretion in transgenic plants submitted to Al stress, namely HPLC and MAS. Liquid chromatography is a commonly used method to study the exudation of organic acids by the root apex. In the present work, we tried to measure organic acids through HPLC, according to Li, Ma e Matsumoto (2002). In addition, we aimed to evaluate citrate exudate using an enzymatic assay that relies on molecular absorption spectrophotometry (LANA et al., 2014). Even using these different methods, we have not success for the detection of organic acids in *S. viridis* transgenic plants overexpressing *BdMATE* under Al stress. However, we can not assume at this point that the studied transgenic plants are not exudating OA under Al stress. As mentioned earlier, citrate is a key metabolic intermediate in the TCA cycle and Al-tolerance mechanism via citrate exudation results in a significant carbon cost for the plant. Thus, the exudation process should be finely regulated to maintain plant homeostasis, as discussed by Kochian et al. (2015). Here, we were also not able to observe significant differences in the gene expression levels of citrate synthase in transgenic plants under Al treatment (FIGURE 11). This result, along with the fact that citrate exudation is a fine-tuning regulated process, indicates that citrate is probably produced at basal or low levels in *S. viridis* plants under our experimental

conditions, so that citrate exudation is below the detection limits of the techniques applied in this work. Further investigations using more sensitive methods are required for the detection of citrate exudation by *ZmUbi::BdMATE* plants under Al stress. For instance, Magalhães et al. (2007) applied capillary electrophoresis in order to measure nanomoles concentration of citrate secreted by Al-tolerant *Arabidopsis* plants overexpressing *AtMATE*. However, it can not be excluded that transgenic plants overexpressing *BdMATE* could be using different mechanisms for aluminum tolerance.

3.6 Hematoxylin staining

The exudation of organic acids by the root apex will act chelating aluminum in the rhizosphere, forming a neutral complex, thus preventing part of the Al. Staining is described as one of the best and fastest methods to monitor the location and aluminum distribution in plants (ILLES et al., 2006). In order to detect this response in the roots of *BdMATE* plants, hematoxylin assay was performed after 24 hours of plants exposed to $20 \mu\text{M Al}^{3+}$. This assay consists of the development of blue-purplish color in areas where aluminum is present in the root tissue. Figure 14 shows accumulation of aluminum in a larger root portion of *S. viridis* non-transgenic plants, possibly in the transition or the root elongation zone, while in the transgenic plants the blue-purplish color representing Al accumulation demonstrates lower intensity. These results suggest that non-transgenic plants are accumulating higher concentrations of Al than transgenic plants, indicating that tolerant plants are somehow avoiding the absorption of Al by the roots.

Figure 14 - Hematoxylin staining after 24 hours exposure to {20} μM Al^{3+} in roots of the homozygous transgenic lines and NT plant.



The primary site of aluminum accumulation and damage is still a matter of debate. In many species, the root apex was identified as the primary site of perception of aluminum toxicity, and consequently the expression of tolerance (HORST; WANG; ETICHA, 2010; KOLLMEIER; FELLE; HORST, 2000; MOTODA et al., 2010; SOUZA et al., 2016; YANG et al., 2008). Sivaguru, Liu e Kochian (2013) demonstrated that Al affects approximately the 1-3 mm portion of the roots in sorghum lines sensitive to the metal. Although the effects of aluminum may occur in all parts of the root growing regions, ruptures above pea (YAMAMOTO; KOBAYASHI; MATSUMOTO, 2001), maize (JONES et al., 2006) and bean roots (KOPITTKE; BLAMEY; MENZIES, 2008) occurred predominantly in regions within about 1-2 mm of the root tip, in the distal portion known by the distal transition zone (DTZ) (SIVAGURU; HORST, 1998). In order to effectively confer Al resistance via Al-activated citrate

exudation, it is logical to assume that the highest density of root citrate transporters should be specifically located in the root regions most affected by Al toxicity (SIVAGURU; LIU; KOCHIAN, 2013). Our hematoxylin staining results also showed that the portion of Al accumulation in roots of *S. viridis* non-transgenic plants occurs in the DTZ (FIGURE 13). Thus, it is worth to verify the gene expression profile of target genes related to Al tolerance in different portions of *S. viridis* roots in non-transgenic or transgenic plants submitted to Al stress, an approach that is currently being performed by our group.

4 CONCLUSIONS

This study aimed and achieved the generation of transgenic events in *S. viridis* overexpressing the gene *MATE*, in order to confer tolerance to aluminum in these plants. Transgenic homozygous lines presented a tolerance phenotype verified by increased root growth under Al treatment, when compared to non-transformed plants. Organic acid exudation through the root apex is a common tolerance mechanism to Al stress in plants, but OA could not be detected in our experimental conditions. At this point, it cannot be assumed that *S. viridis* plants overexpressing *BdMATE* are tolerant to Al due to organic acid exudation to the rhizosphere. Further investigations will be performed in order to clarify the possible mechanisms by which the *BdMATE* plants develop tolerance to aluminum. Our results demonstrated that, in the future, the overexpression of *BdMATE* could be used to develop Al-tolerant crops closely related to *S. viridis* such as sorghum, rice, wheat and sugarcane.

REFERENCES

- ARNON, D. J.; HOAGLAND, D. R. **The water culture method of growing plants without soil**. Brekeley: University of California, 1950. 31 p.
- BENNETZEN, J. L. Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 30, n. 6, p. 555-561, June 2012.
- BOFF, T. **Tolerância ao alumínio em trigo: identificação e caracterização molecular de genes**. 2006. 186 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- BUCHAN, D. W. A. et al. Protein annotation and modeling servers at University College London. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 38, p. 427, May 2010.
- CAMARGO, C. E. O. Melhoramento do trigo. I. Hereditariedade da tolerância ao alumínio tóxico. **Bragantia**, Campinas, v. 40, n. 4, p. 33-45, fev. 1981.
- CANÇADO, G. M. A. **Caracterização e utilização de genes envolvidos na tolerância ao alumínio tóxico em milho**. 2006. 154 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Washington, v. 12, p. 13-15, Nov. 1987.
- HORST, W. J.; WANG, Y.; ETICHA, D. The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review. **Annals of Botany**, London, v. 106, n. 1, p. 185-197, Jan. 2010.
- ILLES, P. et al. Aluminium toxicity in plants: internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 15, p. 4201-4213, Nov. 2006.
- IUCHI, S. et al. Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 104, n. 23, p. 9990-9905, June 2007.

JONES, D. L. et al. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 29, n. 7, p. 1309-1318, Apr. 2006.

KEARSE, M. et al. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, Apr. 2012.

KOCHIAN, L. et al. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 66, p. 231-2328, 2015.

KOLLMEIER, M.; FELLE, H. H.; HORST, W. J. Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? **Plant Physiology**, Washington, v. 122, n. 3, p. 945-956, Mar. 2000.

KOPITTKE, P. M.; BLAMEY, F. P. C.; MENZIES, N. W. Toxicities of soluble Al, Cu, and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 303, n. 1, p. 217-227, Dec. 2008.

LANA, U. G. P. et al. Metodologia alternativa para quantificação de ácido cítrico em exsudados radiculares de linhagens de milho contrastantes quanto à tolerância ao alumínio. **Circular Técnica**, Brasília, n. 206, p. 01-05, dez. 2014.

LI, K.-B. ClustaW-MPI: clustalW analysis using distributed and parallel computing. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1585-1586, Mar. 2003.

LI, X. F.; MA, J. F.; MATSUMOTO, H. Aluminum-induced secretion of both citrate and malate in rye. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 242, n. 2, p. 235-243, May 2002.

_____. Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. **Plant Physiology**, Washington, v. 123, n. 4, p. 15437-1543, Aug. 2000.

LIU, J. et al. Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. **The Plant Journal**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 389-399, Feb. 2009.

LÓPEZ-BUCIO, J. et al. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. **Plant Science**, Limerick, v. 160, n. 1, p. 01-13, Dec. 2000.

MA, J. F. et al. A rapid hydroponic screening for aluminum tolerance in barley. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 191, n. 1, p. 133-137, Dec. 1997.

MAGALHÃES, J. V. et al. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, Aug. 2007.

MAGNAVACA, R.; GARDNER, C. O.; CLARK, R. B. Evaluation of inbred maize lines for aluminum in nutrient solution. In: GABELMAN, H. W.; LOUGHMAN, B. C. (Ed.). **Genetics aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1987. p. 255-265.

MARON, L. G. et al. Aluminum tolerance in maize is associated with higher MATE1 gene copy number. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 110, n. 13, p. 5241-5246, Nov. 2013.

_____. Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. **The Plant Journal**, Oxford, v. 61, n. 5, p. 728-740, Mar. 2010.

MARTINS, P. K. M. et al. A simple and highly efficient *Agrobacterium-mediated* transformation protocol for *Setaria viridis*. **Biotechnology Reports**, London, v. 6, p. 41-44, June 2015.

MEMSAT – UCL-CS BIOINFORMATICS. **Prediction of transmembrane structure and topology**. Available in: <<http://saier-144-21.ucsd.edu/barmemsa.html>>. Access in: 09 jan. 2014.

MOLINARI, H. B. C. et al. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 130, n. 2, p. 218-229, Apr. 2007.

MOTODA, H. et al. Changes in rupture formation and zony region stained with Evans blue during the recovery process from aluminum toxicity in the pea root apex. **Plant Signaling & Behavior**, United Kingdom, v. 6, n. 1, p. 98-100, Nov. 2010.

MULLER, P. Y. et al. Processing of gene expression data regenerated by quantitative real-time Rt-PCR. **BioTecniques**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 1372-4, 1376, 1378-9, June 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

NUNES-NESI, A. et al. The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 19, n 6, p. 399-407, June 2014.

OLIVEIRA, M. S. **Tolerância de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) à toxidez por alumínio em solução.** 2012. 109 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2012.

PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: bestkeeper–excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 6, p. 509-515, Mar. 2004.

PSIPRED – UCL-CS BIOINFORMATICS. **Prediction of secondary structure.** Available in: <<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/result/bc4306b8-83dd-11e3-a4af-00163e110593>>. Access in: 09 jan. 2014.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 339, n. 1, p. 62-66, Mar. 2003.

REES, T. A. P. carbon metabolism in mitochondria. In: DENNIS, D. T.; TURPIN, D. H. (Ed.). **Plant physiology, biochemistry and molecular biology.** London: Longman, 1990. p. 106-123.

RYAN, P. R. et al. A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. **Plant Physiology**, Washington, v. 149, n. 1, p. 340–51, Jan. 2009.

RYAN, P. R.; DITOMASO, J. M.; KOCHIAN, L. V. Aluminum toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 259, p. 437-446, Feb. 1993.

SASAKI, T. et al. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 645-653, Mar. 2004.

SAWAKI, Y. et al. STOP1 regulates multiple genes that protect Arabidopsis from proton and aluminum toxicities. **Plant Physiology**, Washington, v. 150, n. 1, p. 281-294, May 2009.

SHAFF, J. E. et al. GEOCHEM-EZ: a chemical speciation program with greater power and flexibility. **Plant Soil**, The Hague, p. 330, n. 1, p. 207-214, May 2010.

SIVAGURU, M.; HORST, W. J. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiology**, Washington, v. 116, n. 1, p. 155-163, Jan. 1998.

SIVAGURU, M.; LIU, J.; KOCHIAN, L. V. Targeted expression of *SbMATE* in the root distal transition zone is responsible for sorghum aluminum resistance. **The Plant Journal**, Oxford, v. 76, n. 2, p. 297-307, Oct. 2013.

SOUZA, L. T. et al. Effects of aluminum on the elongation and external morphology of root tips in two maize genotypes. **Bragantia**, Campinas, v. 75, n. 1, p. 01-07, jan./mar. 2016.

TANG, Y. et al. Identification of RFLP markers linked to the barley aluminum tolerance gene. **Crop Science**, Kampala, v. 40, n. 3, p. 778-782, Jan. 2000.

VON UESKÜLL, H. R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 171, n. 1, p. 01-15, Apr. 1995.

YAMAJI, N. et al. A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. **Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 10, p. 3339-3349, Oct. 2009.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. **Plant Physiology**, Washington, v. 125, n. 1, p. 199-208, Jan. 2001.

YANG, J. L. Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. **Plant Physiology**, Washington, v. 146, n. 2, p. 602-611, Feb. 2008.

YANG, X. Y. et al. A *de novo* synthesis citrate transporter, *Vigna umbellata* multidrug and toxic compound extrusion, implicates in Al-activated citrate efflux in rice bean (*Vigna umbellata*) root apex. **Plant Cell & Environment**, Oxford, v. 34, n. 12, p. 2138-2148, Dec. 2011.

YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; MA, J. F. An Al-inducible MATE gene in involved in external detoxification of Al in rice. **The Plant Journal**, Oxford, v. 68, n. 6, p. 1061-1069, Dec. 2011.

**ARTIGO 2 - TRANSFORMAÇÃO DE *Saccharum* spp. COM O GENE
*SbMATE***

Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003), conforme orienta o Manual de Normalização da UFLA para artigos ainda não submetidos.

RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das principais culturas da economia brasileira. Um dos maiores obstáculos ao aumento da produtividade da cana-de-açúcar nos próximos anos será o desenvolvimento de novas variedades adaptadas aos diferentes tipos de clima e solo. Áreas definidas de expansão à cultura canavieira incluem o Cerrado, porém a presença de alumínio tóxico no solo desta região constitui um fator limitante para a produção de cana. Assim, o desenvolvimento de novas variedades de cana tolerantes ao alumínio se faz importante para sua expansão agrícola. Um dos mecanismos utilizados pelas plantas para a tolerância ao alumínio envolve a ativação de transportadores de membrana responsáveis pela exsudação de ácidos orgânicos através do ápice radicular para a rizosfera, responsáveis por quelar o Al tóxico, impedindo assim sua absorção pelas raízes. Em sorgo (*Sorghum bicolor*), um gene que codifica um transportador de membrana pertencente à família *MATE* (*Multidrug And Toxic Compound Extrusion*) foi identificado e caracterizado como um gene transportador de citrato ativado por alumínio e responsável pela tolerância ao metal nesta cultura. O presente trabalho teve por objetivo a transformação genética de cana para a superexpressão do gene *MATE* de sorgo (*SbMATE*) para o desenvolvimento de plantas tolerantes ao alumínio. O protocolo de transformação foi considerado satisfatório e diversos eventos transgênicos foram gerados e caracterizados molecularmente. O próximo passo consistirá na aplicação do estresse por Al para a verificação do fenótipo de tolerância dos eventos transgênicos em cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar. Alumínio. *MATE*. Estresse abiótico.

ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is considered one of the most important crops for the Brazilian economy. Nowadays, a great challenge concerning the improvement of the sugarcane productivity consists in the development of new varieties adapted to different types of soil and climate conditions. The Cerrado region in Brazil represents a promising area for sugarcane expansion. However, the soil present in this region contains large amounts of toxic aluminum (Al), which is a limiting factor for the sugarcane production. Therefore, the development of new sugarcane varieties tolerant to aluminum is pivotal for its agricultural expansion. A well-known physiological mechanism used by plants to cope with Al stress involves the activation of membrane transporters responsible for organic acids secretion from the root apex to the rhizosphere that chelate Al preventing its absorption by the roots. In sorghum (*Sorghum bicolor*), a membrane transporter gene belonging to the *Multidrug And Toxic Compound Extrusion (MATE)* family was identified and characterized as an aluminum-activated citrate transporter gene responsible for the Al-tolerance in this crop. The aim of the present study was the genetic transformation of sugarcane for the overexpression of the *MATE* gene from sorghum (*SbMATE*), in order to develop plants tolerant to Al. The protocol for the sugarcane genetic transformation via bombardment was successful and different transgenic events were obtained. The next step consists of the application of Al stress to verify the tolerant phenotype of these transgenic events in sugarcane.

Keywords: Aluminum. *Setaria viridis*. *MATE*. Abiotic stress.

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) foi introduzida no Brasil durante o período colonial, e transformou-se em uma das principais culturas da economia brasileira. Um dos principais obstáculos ao aumento da produção e da produtividade da cana-de-açúcar nos próximos anos será o desenvolvimento de novas variedades adaptadas aos diferentes tipos de clima e solo. Áreas definidas de expansão à cultura canavieira incluem o Cerrado, porém a presença de alumínio tóxico, deficiência de fósforo e longos períodos de escassez de chuvas nesta região são fatores limitantes a adaptação e desenvolvimento da cana-de-açúcar.

O alumínio (Al) é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais comum na crosta terrestre, compreendendo aproximadamente 7% da sua massa total (DELHAIZE; RYAN, 1995; KOCHIAN et al., 2015). Em solos ácidos, o alumínio tóxico é fator limitante para a produtividade das culturas (FRÁGUAS, 1999). O sintoma mais expressivo e típico da toxidez por alumínio é a inibição do crescimento radicular, sendo este o órgão mais afetado (COMIN et al., 1999). Assim, o uso de genótipos adaptados às condições de solo ácido conjuntamente com a adição de calcário e adubação adequada são algumas das estratégias utilizadas em solos com elevados teores de alumínio trocável (KOCHIAN et al., 2015).

O desenvolvimento de genótipos tolerantes a estresses abióticos representa uma alternativa ao aumento na produtividade agrícola. Diferentes estratégias de melhoramento genético têm sido adotadas para aumentar a tolerância das plantas às condições ambientais adversas, dentre elas a superexpressão de genes e fatores de transcrição chaves atuantes em processos metabólicos relacionados aos estresses ambientais (GUIMARÃES et al., 2011).

O gene *SbMATE*, codifica uma proteína transmembrana da família *Multidrug and Toxic Compound Extrusion* (MATE) em *Sorghum bicolor*, que

atua na via de exsudação do citrato pelo ápice radicular, sendo este ácido orgânico responsável por quelar os íons Al^{3+} na rizosfera. Deste modo, a planta adquire tolerância ao alumínio pela sua capacidade de exsudação de citrato para a neutralização dos íons de Al^{3+} na rizosfera (MAGALHÃES et al., 2007).

Devido à complexidade genética da cana-de-açúcar, o uso da engenharia genética para o desenvolvimento de variedades mais adaptadas é uma estratégia relevante do ponto de vista do melhoramento. Para que isso seja possível é necessário integrar diferentes técnicas biotecnológicas, tais como o desenvolvimento de um sistema robusto de transformação genética para cultura e o isolamento de novos genes, bem como o aproveitamento de genes de interesse biotecnológico que já são utilizados em outras culturas. Estas abordagens serão fundamentais para obtenção de novos produtos biotecnológicos, como também para a elucidação dos processos moleculares, celulares e fisiológicos que fazem as plantas geneticamente modificadas serem mais tolerantes aos estresses ambientais (MARIN; NASSIF, 2012).

O desenvolvimento de uma cultivar de cana-de-açúcar tolerante ao alumínio representa uma alternativa promissora para expansão agrícola. A presente proposta visou obter um protocolo eficiente para a transformação genética de cana-de-açúcar para a superexpressão do gene *SbMATE*, sob controle do promotor constitutivo da Ubiquitina de milho, afim de obtermos plantas com tolerância ao alumínio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O objetivo deste trabalho foi transformar cana-de-açúcar da variedade RB855156 com o gene *MATE* de *Sorghum bicolor* por biobalística, para a obtenção de plantas tolerantes ao alumínio.

2.1 Análises *in silico* e construção gênica

A sequência do gene *MATE* de *Sorghum bicolor* foi otimizada por meio da substituição de alguns nucleotídeos de seus códons, sendo utilizada como base a sequência de *Zea mays* para tal otimização, com o intuito de facilitar a síntese do gene para a etapa de clonagem, uma vez que o mesmo apresentava um alto conteúdo de GC. Posteriormente, foram realizados alinhamentos das sequências *SbMATE* e *oSbMATE* (códon otimizada) utilizando o *software* Geneious (KEARSE et al., 2012). A síntese e clonagem em vetor binário foram realizadas pela empresa DNA Cloning Service, Alemanha.

2.2 Material vegetal e obtenção de calos

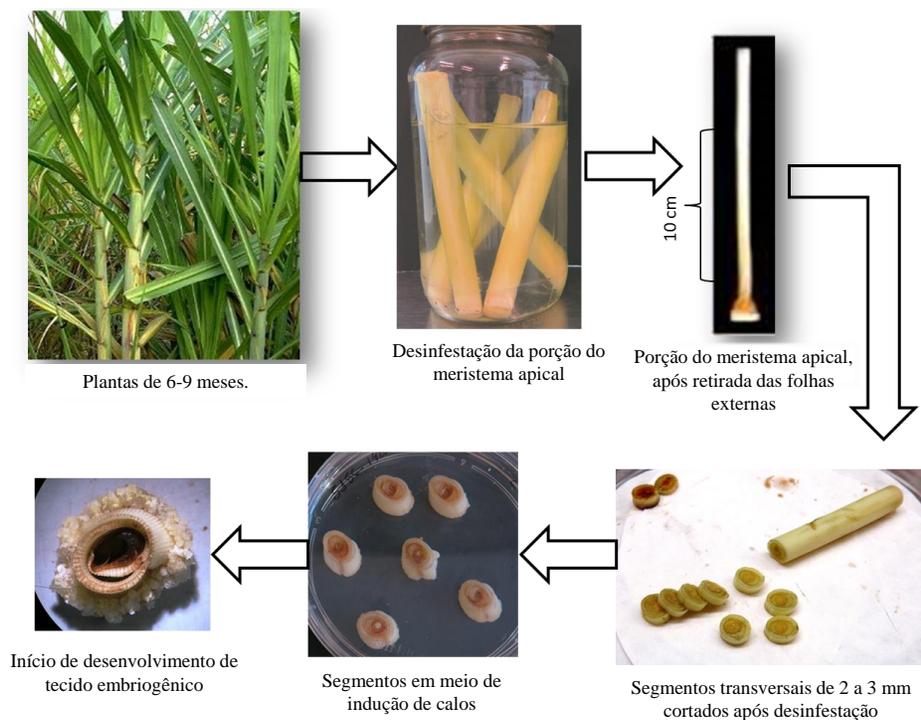
A variedade de cana-de-açúcar utilizada nos estudos foi a RB855156, proveniente do cruzamento entre RB72454 x TUC71-7. Esta variedade é caracterizada como precoce, possui alto teor de sacarose nos colmos, além de ser altamente produtiva e possuir protocolo de transformação genética estabelecido (MOLINARI et al., 2007).

A introdução do material vegetal foi realizado a partir da coleta do meristema apical de plantas com idade entre 6 e 9 meses após plantio ou corte subsequentes, apresentando de 8 a 10 entrenós visíveis. As folhas mais externas foram coletadas, cortando-se as pontas em excesso, sendo o “palmito” de aproximadamente 25 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro utilizada para os experimentos. Os palmitos coletados foram desinfestados em capela de fluxo laminar, seguindo as seguintes etapas: i) 1 minuto em etanol 70%; ii) 20 minutos sob agitação de 70 rpm em solução de hipoclorito de sódio 2% + 0,1% de Tween

20^o; iii) quatro enxáguos com água destilada estéril. Em seguida fez-se o isolamento dos discos foliares. Inicialmente, foram retiradas de 1 a 2 camadas externas de folhas e as extremidades oxidadas pelo procedimento de desinfestação. Após, foram feitos cortes transversais de 2-3 mm de espessura, da base até a extremidade meristemática, respeitando-se o limite de aproximadamente 10 cm da base ou o máximo de 14 discos foliares, procedimento demonstrado na figura 1 (BOWER et al., 1996; MOLINARI et al., 2007).

Os discos foliares foram então colocados com a orientação da base virada para o meio de cultura, em placas de Petri de borda alta contendo o meio de indução de calos (MSC3) que consiste em: sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 0,5 mg/L ácido nicotínico, 0,5 mg/L piridoxina.HCl, 0,1 mg/L tiamina.HCl, 2 mg/L glicina, 50 mg/L arginina, 0,15 mg/L ácido cítrico, 27,25 g/L sacarose, 100 mg/L inositol, 50 mg/L cisteína, 500 mg/L caseína hidrolisada, 3 mg/L ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 0,6 mg/L sulfato de cobre (CuSO₄), 50 mL/L água de coco, 4 g/L fitagel, pH 5,8, acrescido de 250 mg/L de cefatoxima sódica. Os discos foram mantidos no escuro, a 27 ± 1 °C em câmara de crescimento do tipo B.O.D., por 30-45 dias. Sub-cultivos foram realizados a cada 15 dias para eliminação dos explantes oxidados e fragmentação dos discos foliares em pedaços menores.

Figura 1 - Representação esquemática do procedimento de desinfestação e introdução de segmentos de cana-de-açúcar em meio de indução de calos.



Calos embriogênicos foram observados após 30-45 dias em meio MSC3. Estes foram então isolados e transferidos para novo meio MSC3, incubados a 27 ± 1 °C no escuro, em câmara de crescimento do tipo B.O.D. por 15 dias. Até dois dias antes de se proceder para a etapa de transformação genética via biobalística, os calos foram selecionados e transferidos para uma membrana de nylon estéril sobre o meio MSC3 (FIGURA 2), sendo mantidos nas mesmas condições já descritas anteriormente.

Figura 2 - Representação esquemática de calos embriogênicos de cana-de-açúcar em membrana de nylon.



2.3 Transformação genética via biobalística

O procedimento de transformação genética via biobalística iniciou-se com a transferência da membrana de nylon contendo os calos embriogênicos previamente selecionados, 4 horas antes do bombardeamento, para meio MSC3 acrescido de 0,2 M sorbitol e 0,2 M manitol (VAIN; MCMULLEN; FINER, 1993). A preparação da suspensão das micropartículas de tungstênio foi realizada de acordo com o protocolo adaptado de Sanford, Smith e Russel (1993). Foram utilizados por tiro: 10 μL de suspensão de partículas de tungstênio M17 marca Biorad[®], ~ 1,1 μM (60 mg/mL), 1 μL do plasmídeo de interesse (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 8,3 μL CaCl_2 (2,5 M) e 3,3 μL de espermidina (0,1 M). Após, 5 μL da suspensão de micropartículas foram pipetados em membrana carreadora e secas em suporte contendo sílica gel em câmara de fluxo laminar.

Foi utilizado equipamento de bombardeamento PDS-1000/He (Biorad[®]), com a pressão de vácuo de 26 mmHg, 10 mm de distância do disco de ruptura e de 10 mm da membrana carreadora. A pressão de ruptura de disco usada e a distância da prateleira (distância percorrida pela micropartícula até atingir os explantes) foram de 1100 psi e 90 mm, respectivamente. Quatro horas após o bombardeamento, os calos foram transferidos para meio MSC3 acrescido de 250

mg/L de cefatoxima sódica e mantidos por 7 dias no escuro à temperatura de 27 ± 1 °C em câmara de crescimento do tipo B.O.D.

Subsequentemente, os calos foram transferidos para placas contendo meio MSC3 acrescido de 250 mg/L de cefatoxima sódica e 3 mg/L do agente seletivo glufosinato de amônio (herbicida LibertyLink™, Bayer). As placas foram mantidas por 15 dias sob fotoperíodo de 16/8 horas, com intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, à 27 ± 1 °C em sala de crescimento. Após 15 dias, os calos foram subcultivados em placas com meio MSC3 acrescido de 250 mg/L de cefatoxima sódica e 3 mg/L do agente seletivo glufosinato de amônio (herbicida LibertyLink™, Bayer), mantidos sob fotoperíodo de 16/8 horas, com intensidade luminosa de $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, à 27 ± 1 °C em câmara de crescimento Conviron® Adaptis 1000TC (Conviron, Canadá), até a observação de regeneração dos explantes, em aproximadamente 15 dias.

As plântulas regeneradas foram transferidas para meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com ácido cítrico (250 mg/L), acrescido de 250 mg/L de cefatoxima sódica e 3 mg/L do agente seletivo glufosinato de amônio (herbicida LibertyLink™, Bayer) e mantidos sob fotoperíodo 16/8 horas, com intensidade luminosa de $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, à 27 ± 1 °C em câmara de crescimento Conviron® Adaptis 1000TC (Conviron, Canadá). As plantas enraizadas foram aclimatadas em vasos contendo substrato comercial (Plantmax®), terra e vermiculita, conforme descrito por Molinari et al. (2007). Estas plântulas aclimatadas permaneceram em Fitotron com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 65% e intensidade luminosa de $400 \mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$, sendo posteriormente transferidas para casa-de-vegetação onde foram multiplicadas para futura utilização nos ensaios experimentais de tolerância ao alumínio.

2.4 PCR

O DNA genômico de folhas jovens foi extraído pelo método CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987), com modificações realizadas por Molinari et al. (2007) e a análise da integração do transgene *oSbMATE* foi realizada via PCR, utilizando-se primers *forward* 5'- CATTGTGGCAGAGGAGGAC -3', e *reverse* 5'- TGGAACAGACCAAGGAGAGC -3', com posterior análise do fragmento amplificado por eletroforese em gel de agarose.

2.5 Extração de RNA, síntese de cDNA e avaliação da expressão gênica via RT-qPCR

A extração do RNA total de folhas jovens foi realizada com reagente Trizol[®] (Thermo Fischer Scientific), segundo as recomendações do fabricante. Cerca de 2 µg de RNA de cada amostra foram tratados utilizando o kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega). A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se o kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fischer Scientific). Todos os procedimentos anteriores foram realizados de acordo com as instruções contidas nos kits de cada fabricante. A reação de RT-qPCR foi realizada utilizando-se o reagente Platinum[®] SYBR[®] Green RT-PCR SuperMix-UDG w/ROX (Invitrogen[™]). O equipamento para leitura utilizado foi o Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems[®]). A quantificação da expressão gênica foi baseada na expressão do gene-alvo (*oSbMATE*) em relação a dois genes de referência previamente selecionados pelo grupo, GAPDH (*glyceraldehyde-6-phosphate dehydrogenase*) e EF1- α (*elongation factor-1 alpha*).

A especificidade dos produtos de PCR gerados para cada conjunto de primers (TABELA 1) que foram previamente desenhados pelo *software* Primer Express v. 3.0 (Applied Biosystems), foi verificada através de análise da temperatura de melting (T_m) dos produtos amplificados (Apêndice A) e a

eficiência de amplificação de cada amostra foram verificadas no *software* LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). Os níveis de expressão relativa dos genes foram calculados utilizando-se o *software* qGENE (MULLER et al., 2002) e a quantificação relativa (RQs) foi feita usando-se a média geométrica dos genes de referência, calculada com o uso do *software* BestKeeper (PFAFFL et al., 2004).

Tabela 1 - Relação das sequências dos *primers* de qPCR utilizados neste estudo e porcentagem de eficiência.

Gene alvo		Sequência (5' → 3')	Eficiência (%)
GAPDH	<i>Forward</i>	CACGGCCACTGGAAGCA	95
	<i>Reverse</i>	TCCTCAGGGTTCCTGA	
SoEF1- α	<i>Forward</i>	TTTCACACTTGGAGTGAAGCAGAT	88
	<i>Reverse</i>	GACTTCCTTCACAATCTCATCATAA	
oSbMATE	<i>Forward</i>	CTGTCCCTCGCCATGCA	87
	<i>Reverse</i>	GCGTCACCGGCGACAA	

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises *in silico*

A sequência do gene *MATE* de *Sorghum bicolor* teve seus códons otimizados utilizando-se como base nos códons preferenciais de *Zea mays*, para facilitar a síntese do gene na etapa de clonagem, uma vez que este apresenta alto conteúdo de GC originalmente.

Regiões do DNA ricas em conteúdo GC tendem a formar estruturas secundárias denominadas *hairpins*, que diminuem a especificidade dos *primers* pela molécula molde durante a reação em cadeia da polimerase (PCR) e devido às altas temperaturas necessárias para dissociação das fitas de DNA durante os ciclos da PCR. Entretanto, ao alterarmos o conteúdo GC em uma determinada sequência, é preciso garantir que os nucleotídeos inseridos formarão a trinca responsável pela codificação do aminoácido original da proteína alvo. Assim, ao substituir os nucleotídeos GC, verificou-se criteriosamente a sequência de DNA obtida para que fosse assegurada a tradução da proteína *SbMATE* original. Neste contexto, os nucleotídeos foram substituídos levando-se em consideração a utilização preferencial de códons (*codon usage*) em monocotiledôneas. A maioria dos aminoácidos são codificados por dois a seis códons sinônimos, com exceção da metionina (MET) e triptofano (TRP). O *codon usage* é o uso seletivo e não aleatório de códons sinônimos por um organismo para codificar os aminoácidos nos genes (CAMPBELL; GOWRI, 1990). Em nosso caso, a sequência de códons de milho foi utilizada como molde por ser uma espécie pertencente à mesma família de sorgo, além de ser a sequência com maior semelhança às monocotiledôneas em geral (MURRAY; LOTZER; EBERLE, 1989).

Além disso, uma sequência Kozak (CCGAA-ATG) foi adicionada a jusante da região codante para potencializar a expressão do gene *SbMATE*. A

Figura 3 - Alinhamento de nucleotídeos das sequências *MATE* de *Sorghum bicolor* otimizada e original gerado pelo *software* Geneious (Continuação)

```

Sb      CCACGCTGGACGGGGCTGCACCTTTTCGTGATGAACATCCGGAGCGTGTTC AAGCTGGAC
oSb     ccacgctggacaggattgcacctgttcgtgatgaacatccggtcggtcctttaaactcgat
***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ** ** ** **

Sb      GAGCTCGGCGCGGAGGTGCTGGGCATCGCGGTGCCGGCGTCGCTGGCGCTGACGGCCGAC
oSb     gaacttggcgccgaagtgtcgggattgcagttccggcgagctctcgccttgacggctgac
** ** ***** ** ***** ** ** ** ***** ** ** ***** **

Sb      CCGCTCGCCTCGCTGATCGACACGGCCTTCATCGGCCGGCTGGGGTCCGTGGAGATCGCG
oSb     cctctggcgtccctcatcgataccgattcatcggcagacttgtagcgtcgagattgcc
** ** ** ** ** ** ** ***** ** ** ***** ** ** ** ***** **

Sb      GCCGTGGGCGTCGCCATCGCGGTGTTC AACCAGGTCATGAAGGTGTGCATCTACCCGCTC
oSb     gctgtgggagtcgcgatcgcggtgttaaccaagtatgaaagtgtgcatttacccttg
** ***** ** ** ***** ***** ***** ** ***** ***** ***** *

Sb      GTCAGCGTCACCACGTCGTTTCGTCGCGGAGGAGACGCCGTGCTCAGCAAAGGGCGGCC
oSb     gtctctgttactacatcatttggcagaggaggacgccgtcctctcgaaggcgggggcg
*** ** ** ** ** ** ** ***** ***** ***** ***** ** ** ***** **

Sb      AAGGTCATCGACAACGGAGAAGAAGAAGAAG AATTAGAAGCGGGACAAGTTGGCCCGGAG
oSb     aaagtgatcgacaatggcgaaggaaggaggaaactggaggctggtcaagtccggaccagag
** ** ***** ** ** ***** ** ** * ** ** ** ***** ** ** **

Sb      AAGCACACTGCCGCTGCCGGCGCGGACCCG GAGAAGCAGCAGCCAGCTGATGAAGAA
oSb     aagcatacgccgcgagcagcgtgatccgaaaagcagcagcagcctgccgacgaggag
***** ** ***** ** ***** ** ***** ***** ***** ***** ** ** **

Sb      GCCGCCAAGAACGGCGCGGAGGATGCGCCCTG CCGTCGTCGCCGGCCGGAGTAGCGGC
oSb     gcgccaagaacggcggggaaggatgtgtctcccgagttgtggcggctcgttccagcggc
** ***** ***** ** ***** ** ** ** ** ** ***** ** *****

Sb      AAGAAATCAGGGAACAGGAGGTTTCGTGCCGTCCGTGACGTGGCACTGATCGTGGGCGCG
oSb     aagaagagtgggaatcgccggttcgtcccactctgtgacctcagcgtgatcgttggcgct
***** ***** * ***** ** ** ***** ** ** ***** ***** *****

Sb      CTCCTGGGGCTGTTCAGACCGTCTTCTCCTG TCGCCGCCGGGAAGCCGCTGCTGCGCCTC
oSb     ctccctggctctgttccagaccgtcttctcgtggccgcggaagccggtgctgaggctt
***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** **

Sb      ATGGGCGTCAAGCCGGTTTCGCCCATGGTGA TGCCCGCGCTGCGTACCTGACGCTGCGC
oSb     atgggagttaagcctgggagccccatggtgatgccagcactcagatatctgactctccgc
***** ** ***** ** ***** ***** ***** ** ** * ** ***** **

Sb      GCGCTTGGCGCCCCGGCGTGTGCTGCTCTC GGCATGCAAGGAGTCTTCCGTGGGTTCC
oSb     gccttgggctcctccggcgtccttctgtccctcgccatgcaaggggtgttcaggggcttc
** * ***** ***** ** ** ***** ***** ***** ***** ** ** **

Sb      AAGGACGCCAAGACGCCCTTATACGCCATCG TGGCCGGCGACGCGGCGAACATTGTGCTG
oSb     aaggatgctaaaacacctctgtacgaattgtcgcgggtgacgcggccaacatcgttttg
***** ** ** ** ** ** ** * ***** ** ** ***** ***** ***** ** **

Sb      GATCCGATCCTGATATTTGGCTGCCGCTGGG CGTGATCGGCGCAGCCATTGCCCATGTT

```

Figura 3 - Alinhamento de nucleotídeos das sequências *MATE* de *Sorghum bicolor* otimizada e original gerado pelo *software* Geneious (Conclusão)

```

oSb      gaccccatcctcatctttggatgccgtcttggcgtgattggggctgcaattggcgacgctc
          ** ** ***** ** ***** ***** ** ***** ** ** ** ***** ** **
Sb       CTTTCCAGTACCTGATAACGCTGATAATGCTGAGCAAGCTGGTGAAGGTCGATGTC
oSb      ctgtcgcagtatctcatcacgctgatcatgcttagtaagtggcgcaagttgatgctc
          ** ** ***** ** ** ***** ***** ** ** ***** * ** ** *****
Sb       GTCCCGCCAGCCTGAAATGCCTCAAATTCGGCGCTTCCTCGGATGCGGATTCCTTCTG
oSb      gtgccaccgtccctcaagtgcctgaagttcagcgggttcctcggtcgggtttttctctg
          ** ** **   *** ** ***** ** ** ***** ***** ***** ** *****
Sb       CTGGCACGGGTGGTGGCCGTGACGTTCTGCGTGACGCTGGCGGCGTCGCTGGCTGCTCGC
oSb      ttggccagagtcgtggctgttaccttctgtgtcactctcgggccagcctggcagcccg
          **** * ** ***** ** ** ***** ** ** ***** ***** ** **
Sb       CACGGCCGACCGCCATGGCCGCTTCCAGATCTGCACCCAGGTCTGGCTGGCCACGTC
oSb      catggacctacagcagtggtgccttccagatttgcacgcaagtggtgcttgaacctct
          ** ** ** ** ** ** ***** ***** ***** ** ** ***** ** ** **
Sb       CTCTCGCCGACGGGCTCGCCGTCGCCGCGCAGCCATGATCGCGAGCGCTTCGCCAAG
oSb      ctcttgccgagcggcttggctgttgcggcgagcagtgatcgcatcagcctttgctaag
          ***** ** ***** * ** ** ***** ***** ***** ***** ** **
Sb       GAGGACCGCTACAAGGTGGCCGCCACCGCCGCGCGCTCCTGCAGCTCGGCGTCGTCCTG
oSb      gaggatcgttacaagtgccgacgacctgcaagggctcctccagctggcggtgctcctt
          ***** ** ***** ***** ***** ** * ***** ***** ***** *****
Sb       GGCGCCGCCCTCACGGCGCTCCTCGGACTCGGGCTGCAGTTCGGAGCCGCGCTCTCACC
oSb      ggtgcccgcctcactgccttggactcggcctgcaattcggggctggcgttttcaca
          ** ***** ***** ** ** * ***** ***** ***** ** ***** *****
Sb       AGCGACGCCCGCTCATCAAGACCATCCGGAAGGGCGTTCGGTTCGTCGCCGGCACGCAG
oSb      tcggacgcagcggatcaagacgattcggagggtgtccccttggcgccgacccag
          ***** ** ** ***** ** ***** ***** ** ** ** ***** ***** **
Sb       ACGCTCAACACGCTAGCCTTCGCTTCGACGGCATCAACTTCGGCGCTCGGACTACGCC
oSb      actcttaatacactcgcttctggttctgatggaatcaacttggggcctccgactacgcg
          ** ** ** ** ** ** ** ***** ***** ** ***** ***** ** ** *****
Sb       TTCTTCGCTACTCCATGATCGGCGTGGCGGCTGTCAGCATCCCCTCGCTCATCTTCCTC
oSb      ttcagcgcataattctatgattggcgtcgcgctgtgagatcccatcactgatcttcttg
          ***   ** ** ** ***** ***** ** ***** ** ***** ** ** ***** *
Sb       TCGTCGCACGGCGGCTTCGTCGGCATCTGGGTAGCCCTCACCATCTACATGGGCGTCAGG
oSb      tcgtcccacggcggttttggtaattgggtcgcgcttacgatctacatggggcgtgaga
          ***** ***** ** ** ** ** ** ***** ** ** ***** ***** ***** **
Sb       GCCCTTGCCAGCACCTGGAGGATGGCAGCAGCCAGGGGCCATGGAAGTTTCTTCGGCAG
oSb      gccctcgcaagcacctggcgcatggctcgggcccaggccggtggaagtctctgaggcag
          ***** ** ***** * ***** ** ***** ***** ***** ***** *****
Sb       TGA
oSb      tga
          ***

```

Figura 4 - Alinhamento da sequência de aminoácidos das sequências MATE de *Sorghum bicolor* otimizada e original gerado pelo *software* Geneious

```

SbMATE      MEEHRSPAHAKPEAEQPPQQQVPAAMAVAVVDVAAPAALQNSTAAPAENGDVAAAGAAE
oSbMATE     MEEHRSPAHAKPEAEQPPQQQVPAAMAVAVVDVAAPAALQNSTAAPAENGDVAAAGAAE
*****

SbMATE      NGTAASAANGDGGGSELLGGPRWTGLHLFVMNIRSVFKLDELGAEVLGIAVPASLALTAD
oSbMATE     NGTAASAANGDGGGSELLGGPRWTGLHLFVMNIRSVFKLDELGAEVLGIAVPASLALTAD
*****

SbMATE      PLASLIDTAFIIGRLGSVEIAAVGVAVIAVFNQVMKVCYIPLVSVTTSFVAEEDAVLSKGGG
oSbMATE     PLASLIDTAFIIGRLGSVEIAAVGVAVIAVFNQVMKVCYIPLVSVTTSFVAEEDAVLSKGGG
*****

SbMATE      KVIDNGEEEELEAGQVGPEKHTAAAGADPEKQQQPADEEAAKNGGEGCAPAVVAGRSSG
oSbMATE     KVIDNGEEEELEAGQVGPEKHTAAAGADPEKQQQPADEEAAKNGGEGCAPAVVAGRSSG
*****

SbMATE      KKSGNRRFVPSVTSALIVGALLGLFQTVFLVAAGKPLLRLMGVKPGSPMVPALRYLTLR
oSbMATE     KKSGNRRFVPSVTSALIVGALLGLFQTVFLVAAGKPLLRLMGVKPGSPMVPALRYLTLR
*****

SbMATE      ALGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDAKTPLYAIVAGDAANIVLDPILIFGCR LGVIGAAIAHV
oSbMATE     ALGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDAKTPLYAIVAGDAANIVLDPILIFGCR LGVIGAAIAHV
*****

SbMATE      LSQYLITLIMLSKLVKVDVVPVPSLCKLKFRRFLGCGFLLLARVVAVTFCVTLAASLAAR
oSbMATE     LSQYLITLIMLSKLVKVDVVPVPSLCKLKFRRFLGCGFLLLARVVAVTFCVTLAASLAAR
*****

SbMATE      HGPTAMAAFQICTQVWLATSLADGLAVAGQAMIASAFKEDRYKVAATAARVQLQGVVL
oSbMATE     HGPTAMAAFQICTQVWLATSLADGLAVAGQAMIASAFKEDRYKVAATAARVQLQGVVL
*****

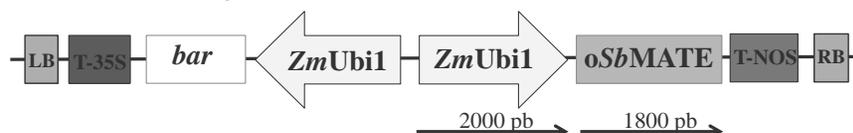
SbMATE      GAALTALLGLGLQFGAGVFTS DAAVIKTIRKGVPFVAGTQTLN TLA FVFDGINFGASDYA
oSbMATE     GAALTALLGLGLQFGAGVFTS DAAVIKTIRKGVPFVAGTQTLN TLA FVFDGINFGASDYA
*****

SbMATE      FSAYSMIGVAAVSIPSLIFLSSHGGFVGIWVALTIYMGVRLASTWRMAAQGPWKFLRQ
oSbMATE     FSAYSMIGVAAVSIPSLIFLSSHGGFVGIWVALTIYMGVRLASTWRMAAQGPWKFLRQ
*****

```

Após análise *in silico* e otimização da sequência, a mesma foi sintetizada e clonada em vetor binário comercial para monocotiledôneas da empresa DNA Cloning Service (Alemanha) (FIGURA 5).

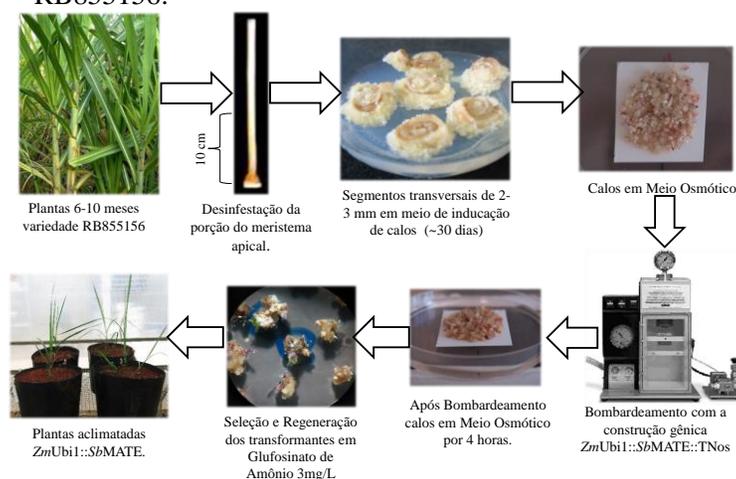
Figura 5 - Representação esquemática da construção gênica contendo o gene *SbMATE* (*Sorghum bicolor* Multidrug and Toxic Compound Extrusion) com códon otimizado (*oSbMATE*), sob o controle do promotor constitutivo Ubiquitina (*ZmUbi1*), com o gene de seleção *bar* (*fosfinotricina acetil transferase*), que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio.



3.2 Obtenção de calos embriogênicos transformação genética de *Saccharum spp.* via biobalística

Calos embriogênicos da variedade RB855156 foram obtidos com sucesso, de acordo com o protocolo descrito na seção 2.2. A regeneração dos calos transformados com a construção *ZmUbi:oSbMATE* foi eficiente, como pode ser verificado na Figura 6. Assim, o protocolo de transformação de cana-de-açúcar adaptado em nosso laboratório mostrou-se satisfatório para obtenção dos eventos transgênicos putativos.

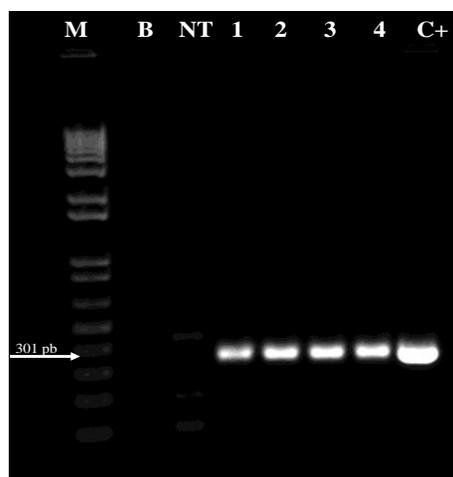
Figura 6 - Representação esquemática do procedimento de transformação genética via biobalística realizado para cana-de-açúcar variedade RB855156.



3.3 Análise da integração do transgene

A confirmação das plantas transgênicas de cana-de-açúcar por PCR pode ser observada na Figura 7, que mostra os produtos de amplificação com o tamanho esperado de 301 pb para o gene *oSbMATE*, de acordo com os primers específicos utilizados. No total, foram obtidas 17 plantas PCR-positivas provenientes de três *clusters* de calos regenerados de um dos experimentos de transformação genética realizados. A eficiência de transformação foi calculada, baseada no total de plantas PCR-positivas, dividindo-se pelo número total de calos embriogênicos que foram bombardeados. Assim, 374 calos foram bombardeados, obtendo-se uma eficiência de transformação de 4,54%. Utilizando-se de um protocolo de transformação similar, Molinari (2006) e Reis et al. (2014) obtiveram eficiências em torno de 1,7% e 3,3%, respectivamente, indicando que o procedimento de transformação genética em cana-de-açúcar para esta variedade aplicado em nosso laboratório foi satisfatório.

Figura 7 - Análise do produto de PCR de plantas *ZmUbi1::SbMATE*. **M**: Marcador 100 pb (Invitrogen™); **B**: Branco; **NT**: planta não transformada; **1, 2, 3 e 4** plantas 1.2; 2.2; 3.1 e 3.2 respectivamente; **C+**: controle positivo (DNA plasmidial contendo a construção gênica p7U-*ZmUbi1::oSbMATE*).



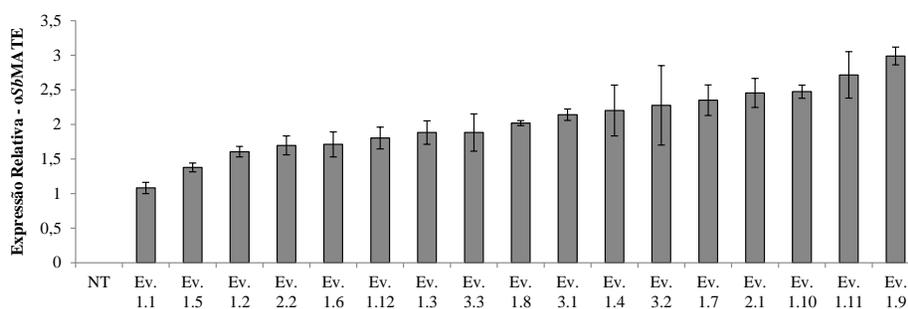
3.4 Análise da expressão do gene *SbMATE* em plantas transgênicas

Antes de proceder com as análises de PCR quantitativa para verificação dos níveis de expressão do gene *oSbMATE* em plantas de cana transformadas, as curvas de dissociação dos pares de *primers* GAPDH, EF1- α (endógenos) e *oSbMATE* (gene alvo) foram feitas para verificar a especificidade destes *primers*. O agente intercalante fluorescente utilizado em nossas reações de qPCR (SYBR-Green) emite fluorescência apenas quando está ligado à dupla-fita de DNA (dsDNA). Este agente não emite fluorescência quando está livre em solução ou na presença de fita simples de DNA (ssDNA). O equipamento utilizado para as reações de qPCR é programado para produzir as curvas de dissociação após os ciclos de amplificação terminarem e, ao fim destes ciclos, inicia-se a medida da fluorescência em temperaturas crescentes que se iniciam acima da T_m (temperatura de fusão) dos *primers* (usualmente 65 °C). O aumento da temperatura desnatura as fitas duplas de DNA, causando a dissociação do agente intercalante diminuindo, assim, a fluorescência detectada. Uma curva de fluorescência é então plotada em função da temperatura (curva de dissociação). Se os amplicons resultantes pertencerem a um gene específico, um único pico de fluorescência é esperado na curva de dissociação, como pode ser verificado para os *primers* testados no presente trabalho (Apêndice A).

Após a confirmação da especificidade dos *primers* para *oSbMATE*, seus níveis de expressão foram analisados em 17 eventos transgênicos putativos e em plantas controle (não-transformadas). Como pode ser verificado na figura 8, *oSbMATE* apresentou níveis de expressão que variaram de 1-3 vezes em relação ao evento de menor expressão (Ev. 1.1). Os próximos passos para caracterização das plantas transgênicas consistirão da realização de *Southern Blot* para verificar o número de cópias de *oSbMATE* inseridos no genoma da cana, bem como no desenvolvimento de um protocolo para fenotipagem dos eventos de cana-de-açúcar geneticamente modificados durante o estresse por alumínio, tanto por

hidroponia quanto em vasos em casa-de-vegetação. A avaliação do número de cópias inseridas é importante porque já foi reportado que um alto número de inserções do transgene no genoma pode ocasionar o silenciamento do mesmo (DAI et al., 2001; FAGARD; VAUCHERET, 2000; PÔSSA, 2010; VAUCHERET et al., 1998). Após confirmação do número de cópias, as plantas transgênicas serão submetidas ao estresse por alumínio em solo de extrema acidez e elevada concentração deste metal para a prova de conceito de tolerância ao alumínio. Assim, baseando-se nos resultados obtidos em *S. viridis* superexpressando o gene *MATE*, espera-se que os eventos transgênicos de cana-de-açúcar apresentem tolerância ao alumínio, aumentando assim o potencial de expansão desta cultura na região do Cerrado, que naturalmente apresenta solo ácido com altas concentrações de alumínio.

Figura 8 - Análise da expressão gênica relativa dos eventos de cana-de-açúcar *ZmUbi1::oSbMATE* comparados com plantas não-transformadas (NT).



4 CONCLUSÕES

O protocolo de indução de calos embriogênicos de cana-de-açúcar RB855156 foi considerado satisfatório. A transformação genética via biobalística realizada neste trabalho com calos embriogênicos foi satisfatória na obtenção de eventos transgênicos *ZmUbi1::SbMATE*. Os eventos gerados neste trabalho serão submetidos à avaliação de tolerância ao alumínio, através de um protocolo de estresse ao alumínio e avaliação fenotípica dos eventos gerados em nosso laboratório.

Existe grande potencial de que variedades de cana-de-açúcar superexpressando o gene *SbMATE* possam apresentar fenótipo de tolerância ao Al, uma vez que plantas de *Setaria viridis* superexpressando um ortólogo de *SbMATE* apresentaram fenótipo característico de tolerância (Capítulo 2 desta Tese). *S. viridis* é uma planta de metabolismo C4 filogeneticamente próxima à cana-de-açúcar, servindo assim como modelo para prova de conceito para a mesma.

REFERÊNCIAS

BOWER, R. et al. High-efficiency, microprojectile-mediated co-transformation of sugarcane, using visible or selectable markers. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 2, n. 2, p. 239-249, Sept. 1996.

CAMPBELL, W. H.; GOWRI, G. Codon usage in higher plants, green algae, and cyanobacteria. **Plant Physiology**, Washington, v. 92, n. 1, p. 01-11, Jan. 1990.

COMIN, J. et al. Differential effects of monomeric and polymeric aluminium on the root growth and on the biomass production of root and shoot of corn in solution culture. **European Journal of Agronomy**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 115-122, Aug. 1999.

DAI, S. et al. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 7, n. 1, p. 25-33, Jan. 2001.

DELHAIZE, E.; RYAN, P. R. Aluminum toxicity and tolerance plants. **Plant Physiology**, Washington, v. 107, n. 2, p. 315-321, Feb. 1995.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Washington, v. 12, p. 13-15, Nov. 1987.

FAGARD, M.; VAUCHERET, H. (Trans) gene silencing in plants: how many mechanisms? **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 51, n. 1, p. 167-194, June 2000.

FRAGUAS, J. C. Tolerância de porta-enxertos de videira ao alumínio do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 7, p. 1193-1200, 1999.

GUIMARÃES, R. G. N. et al. Mapeamento de QTLs associados com tolerância ao alumínio em milho. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, EMBRAPA MILHO E SORGO, 2011, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011.

KEARSE, M. et al. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, Apr. 2012.

KOCHIAN, L. V. et al. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum Resistance. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 66, p. 571-598, Apr. 2015.

KOZAK, M. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position+ 4 but is not generally affected by the nucleotides in positions+ 5 and+ 6. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 16, n. 9, p. 2482-2492, May 1997.

MAGALHÃES, J. V. et al. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, Aug. 2007.

MARIN, F.; NASSIF, D. S. P. Mudanças climáticas e a cana-de-açúcar no Brasil: Fisiologia, conjuntura e cenário futuro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 2, p. 232-239, fev. 2012.

MOLINARI, H. B. C. et al. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 130, n. 2, p. 218-229, Apr. 2007.

MOLINARI, H. B. C. **Expressão estresse-induzida do gene P5CS em plantas transgênicas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico**. 2006. 109 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MULLER, P.Y. et al. Processing of gene expression data regenerated by quantitative real-time Rt-PCR. **BioTecniques**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 1372-1374, June, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

MURRAY, E. E.; LOTZER, J.; EBERLE, M. Codon usage in plant genes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 17, n. 2, p. 477-498, Jan. 1989.

PFÄFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 6, p. 509-515, Mar. 2004.

PÔSSA, K. F. **Superexpressão em plantas transgênicas de milho do gene *SbMATE*, que confere tolerância ao alumínio em sorgo.** 2010. 108 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 339, n. 1, p. 62-66, Mar. 2003.

REIS, R. R. et al. Induced over-expression of *AtDREB2A* CA improves drought tolerance in sugarcane. **Plant Science**, Limerick, v. 221, p. 59-68, May 2014.

SANFORD, J. C.; SMITH, F. D.; RUSSEL, J. A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. **Methods in Enzimology**, New York, v. 217, p. 483-510, Jan. 1993.

VAIN, P.; MCMULLEN, M. D.; FINER, J. J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 12, n. 2, p. 84-88, Jan. 1993.

VAUCHERET, H. et al. Transgene-induced gene silencing in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 651-659, Oct. 1998.

APÊNDICE A – CURVAS DE DISSOCIAÇÃO

Figura 1 Curva de dissociação (“*Melt Curve*”) para o gene EF1- α (*elongation factor-1 alpha*)

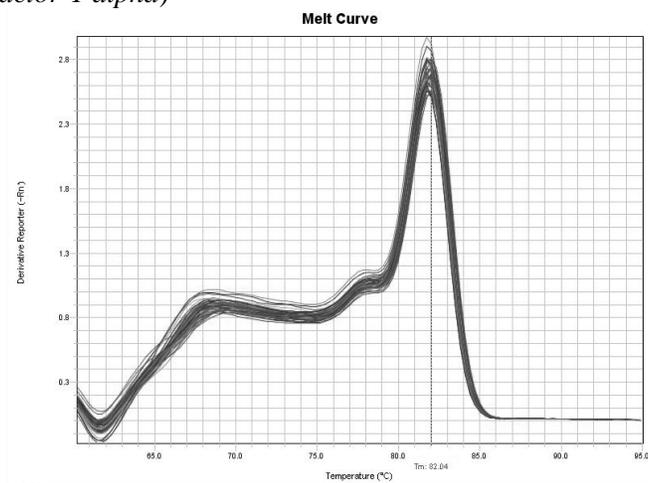


Figura 2 Curva de dissociação (“*Melt Curve*”) para o gene GAPDH (*glyceraldehyde-6-phosphate dehydrogenase*)

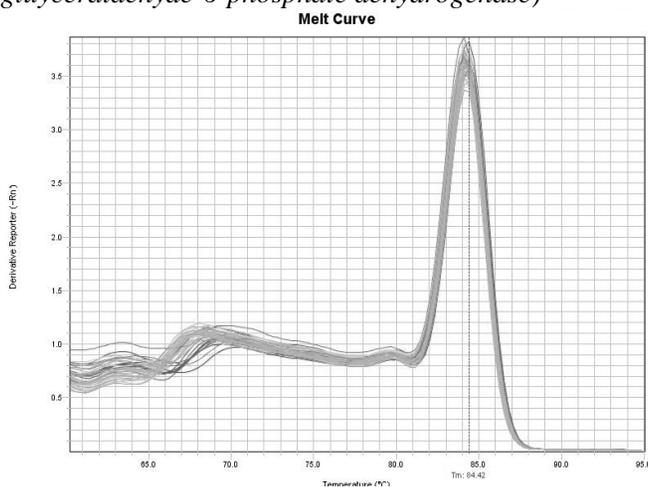
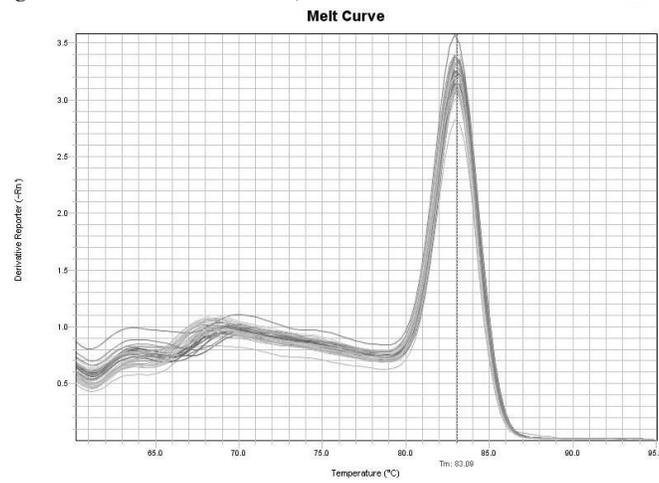


Figura 3 Curva de dissociação (“*Melt Curve*”) para o gene *oSbMATE* (*MATE* de *Sorghum bicolor* otimizado)



**ARTIGO 3 - A SIMPLE AND HIGHLY EFFICIENT *Agrobacterium*-
MEDIATED TRANSFORMATION PROTOCOL FOR *Setaria viridis***

**Artigo publicado no periódico *Biotechnology Reports*, adaptado a
formatação na versão final da UFLA.**

Polyana Kelly Martins¹, Ana Paula Ribeiro^{1,2}, Bárbara Andrade Dias Brito da Cunha¹,
Adilson Kenji Kobayashi¹, Hugo Bruno Correa Molinari^{1*}

¹Genetics and Biotechnology Laboratory, Embrapa Agroenergy, Brasília, DF, Brazil

²Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brazil

*Correspondence (Tel +55-61 3448 2307; Fax +55-61 3448 1589; e-mail:
hugo.molinari@embrapa.br)

Keywords Model system; C4 metabolism; Bioenergy; Sugarcane; Green millet

Abstract The production and use of sugarcane in Brazil is a very important for bioenergy production and is recognized as one of the most efficient in the world. In our laboratory, *Setaria viridis* is being tested as a model plant for sugarcane. *S. viridis* has biological attributes (rapid life cycle, small genome, diploid, short stature and simple growth requirements) that make it suitable for use as a model system. We report a highly efficient protocol for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *S. viridis*. The optimization of several steps in tissue culture allowed the rapid regeneration of plants and increased the rate of transformation up to 29%. This protocol could become a powerful tool for functional genomics in sugarcane.

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is an important biofuel feedstock because of its ability to accumulate high quantities of biomass and sucrose and is one of the most photosynthetically efficient C4 plants [1]. Breeding programs has been the main approach towards sugarcane improvement. However, the time required for a new variety (13 years) and the complexity of the genome of modern sugarcane varieties are major constraints [2]. Since the early 1990s, much progress was achieved in the biotechnological manipulation of sugarcane [3]. Nevertheless, stable transformation and plant regeneration for genomics studies is a time consuming for this crop. Model plants for genetic transformation like *Arabidopsis thaliana* are used in the proof of concept for many traits in various important crops. Therefore, there is still a need for additional model plants to decode and translate traits that are absent in these species [4]. In order to assist this endeavor, *Setaria viridis* was recently describe as a new monocotyledonous model species for C4 photosynthesis research and genetic transformation [5]. *S. viridis* belongs to the Poaceae family, subfamily Panicoideae that is one of the most agronomically important grass, including sugarcane. *S. viridis* has a number of characteristics that makes it interesting as a model plant (Diao et al., 2014). Therefore, there is a need for a simple and highly efficient protocol for *S. viridis* genetic transformation. Here we report a simple protocol using *Agrobacterium*-mediated transformation with reporter genes *gus* (β -glucuronidase) and *gfp* (green fluorescent protein).

Seeds of *S. viridis* (accession A10.1) were planted in soil and grown in phytotron chambers under 16 h photoperiod, 26 ± 2 °C, 65% relative humidity and light intensity of $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Mature seeds were harvested 30-35 days after planting and used for embryogenic callus induction. Seeds were disinfested after removal the lemmas and paleas with a solution of 10% sodium hypochlorite and 0.1% Tween 20[®] for 3 min followed by 5 rinses in sterile distilled water. After blotted on sterile filter paper the dehulled mature seeds were placed on callus induction medium (CIM) that consisted of MS salts [6], 1 mg/L d-biotin, 0.5 mg/L pyridoxine HCl, 0.5 mg/L nicotinic acid, 100 mg/L myo-inositol, 0.1 mg/L thiamine-HCl, 0.6 mg/L CuSO₄, 30 g/L sucrose, 2 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 0.5 mg/L kinetin and 4 g/L Phytigel[™]. The pH of the medium was adjusted to 5.8. After 3 to 5 weeks of incubation in the dark at 25 ± 2 °C, the callus were divided into small explants and subcultured onto fresh CIM. After 4-5 days these explants are ready to transformation step.

The expression vectors used for transformation of *S. viridis* are listed in Table 1. These vectors contain the reporter genes *gus* and *gfp* both with intron (DNA Cloning

Service, Germany). A primary culture of each *Agrobacterium* was prepared by inoculating a single colony from a freshly streaked YEB agar plate in 5 mL of autoclaved YEB containing 100 mg/L spectinomycin and 50 mg/L rifampicin. The bacterial culture was incubated for 16 h in an orbital shaker at 180 rpm in dark at 28 °C. Secondary culture was initiated by inoculating 50 µL of primary culture into 25 mL YEB supplemented with 200 µM of acetosyringone with the same antibiotics and grown under the same conditions. Bacterial suspension was centrifuged and the pellet was resuspended in a liquid CIM medium without CuSO₄ to OD₆₀₀=0.6. Approximately 50 calli were incubated for 5 min in *Agrobacterium* suspensions that contained 200 µM of acetosyringone and 10 µL of a 10% Synperonic® PE/F68 (Sigma-Aldrich) solution per 1 mL of the suspension. The calli were blotted on sterile filter paper and co-cultivated on a fresh CIM medium supplemented with 200 µM of acetosyringone for 3 days in the dark at 22 °C. Following co-cultivation, the calli were subcultured in CIM medium supplemented with 150 mg/L Timetin® for one week in the dark at 25±2 °C and then transferred to CIM selective medium containing 30 mg/l hygromycin B or 3 mg/L glufosinate ammonium (Table 1) and 150 mg/L Timetin® following the same cultivation conditions. One week later, the explants were transferred to a selective regeneration medium (SRM) consisting of MS salts, 1 mg/L d-biotin, 0.5 mg/L pyridoxine HCl, 0.5 mg/L nicotinic acid, 100 mg/L myo-inositol, 0.1 mg/L thiamine HCl, 20 g/L sucrose, 2 mg/L kinetin, 150 mg/L Timetin®, 30 mg/L hygromycin B or 3 mg/L glufosinate ammonium, 2 g/L Phytigel™ with pH 5.8 adjusted before autoclaving. The cultures were incubated in growth chamber at 25±2 °C, 16 h photoperiod using cool white fluorescent light (75 µmol m⁻² s⁻¹). In order to promote shoot and root elongation, the surviving seedlings were placed into Magenta™ box containing MS basal medium with the same selective agents and 150 mg/L Timetin®. Regenerated shoots ≥ 50 mm long were transplanted into pots for acclimatization. For each construct, the transformation efficiency (%) was calculated as the total number of PCR positive plants/total number of inoculated callus x 100. The PCR reaction with *gus*-specific primers sequences 5'-TTTGTTGATGTGCAGGTGGT-3' and 5'-CTGCCCAATCCAACATCTCT-3' and *gfp*-specific primers sequences 5'-ACCCTCGTCACCACTTTTCAC-3' and 5'-CATGTGGTCCCTCTTCTCGT-3' were used to generate 424 bp and 669 bp PCR product, respectively (Fig. 1c). Transgenic plants were histochemically assayed for GUS activity (Fig. 1d), as described by Jefferson et al. [7]. GFP-specific fluorescence in transgenic seeds of *S. viridis* was visualized using a Zeiss Axio Imager Z2 Upright microscope assembled with a FITC/Alexa Fluor 488 filter (Chroma Technology Corp.). The GFP-fluorescence in seedlings was visualized using the Typhoon FLA 9000 laser scanner (GE Healthcare) using LPB filter (Fig. 1e). Segregation analysis was performed in T1 seeds. In order to overcome the dormancy, seeds were treated with concentrated sulphuric acid for 15 min and washed thoroughly in water and then disinfested with a solution of 2% sodium hypochlorite and 0.1% Tween 20® for 5 min followed by 5 rinses in sterile distilled water.

Plant transformation has become a core research tool for crop improvement as well as studies on gene function in plants. Various methodologies of plant transformation have been developed to increase the efficiency of transformation and to achieve stable expression of transgenes in plants [8]. Therefore, this substantially simplified and improved new protocol for *S. viridis* transformation will significantly

contribute to its adoption as a model plant. Callus quality is considered as one of the most important parameters for an efficient tissue culture and *in vitro* transformation system [9]. In our study, callus formation was induced on CIM from dehulled mature seeds. After 5 weeks of culture, approximately 90% of them became white/yellow embryogenic calli. This callus (Fig. 1a) was divided into small pieces and transferred to fresh CIM. After 4-5 days, a formation of a translucent embryogenic callus was observed (Fig. 1b). Such callus were highly regenerable and very competent for transformation. The regenerated plants were transferred to soil after 3-4 weeks. Seeds were harvested after 6-7 weeks. The whole protocol from seed to seed was around 15 weeks. In addition, the protocol showed high efficiency independently of the vector backbone or selective marker used (Table 1). We also observed that the number of subcultures is critical for transformation and plant regeneration. After two subcultures, a 50% decrease in the transformation efficiency was observed. Moreover, after three or more subcultures no transformed plants could be obtained. Therefore, after transformation, we maintained the calli just for one week in CIM plus Timentin[®] and then one more week in CIM containing the selective agents. After these two weeks the calli were transferred to regeneration media containing the appropriated selection agent and Timentin[®]. At this phase, the calli may contain non-transgenic sectors, hence, it is important to keep the selection pressure. After 1-2 weeks in regeneration media the surviving plantlets were transferred to MS medium keeping the selective agents at respective concentration (Fig. 1f). Analysis of gene expression (RT-qPCR) was performed for events of two out of six constructs and showed high levels of transcripts abundance ranging from 45 to 2050-fold in comparison with non-transgenic plants (Data not shown). Segregation studies performed on progenies indicated that more than 80% of the transgenic events contained a single-site insertion. Table 2 illustrates a Chi-square test ($p < 0.05$) of five events from one vector (p6mD) confirming that the segregation followed Mendelian rules. The transformation method described here, with up to 29% transformation frequency, with an average of approximately 15%, can provide a valuable tool for genomics and physiological studies. Such transformation efficiency is three times higher than previously reported [10]. Considering that *S. viridis* and sugarcane belongs to the same family with C4 metabolism (NADP-ME subtype) and similar cell wall composition, the high efficiency of our genetic transformation protocol indicate that *S. viridis* might be effectively used as a model plant for sugarcane applied research, including those related to abiotic stress tolerance and improved biomass for second generation (2G) ethanol production.

Acknowledgments

We thank Dr. Frank G. Harmon (USDA-ARS Plant Gene Expression Center) for providing the *S. viridis* seeds. Dr. Polyana K. Martins was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) fellowship. The authors also thank Embrapa (Brazilian Agriculture Research Corporation) for research grant (MP2-02.12.01.008.00.00).

References

- [1] Y. Taparia, W.M. Fouad, M. Gallo, F. Altpeter, Rapid production of transgenic sugarcane with the introduction of simple loci following biolistic transfer of a minimal expression cassette and direct embryogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 48 (2011) 15-22.
- [2] M.L.A. Lima, A.A.F. Garcia, K.M. Oliveira, S. Matsuoka, H. Arizono, Jr C.L. de Souza, A.P. de Souza, Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp.). *Theor. Appl. Genet.* 104 (2002) 30-38.
- [3] R. Bower, R.G. Birch, Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *Plant J.* 2 (1992) 409-416.
- [4] X. Diao, J. Schnable, J. Bennetzen, J. Li, Initiation of *Setaria* as a model plant. *Front. Agr. Sci. Eng.* 1 (2014) 16-20.
- [5] C. Petti, A. Shearer, M. Tateno, M. Ruwaya, S. Nokes, T. Brutnell, S. Debolt, Comparative feedstock analysis in *Setaria viridis* L. as a model for C4 bioenergy grasses and Panicoid crop species. *Front Plant Sci.* 4 (2013) 181.
- [6] T. Murashige, F. Skoog, A revised for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 (1962) 473-479.
- [7] R.A. Jefferson, Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol.* 5 (1987) 387-405.
- [8] S.N.E. Anami, G. Coussens, S. Aesaert, M. Van Lijsebettens, Higher plant transformation: principles and molecular tools. *Int. J. Dev. Biol.* 57 (2013) 483-494.
- [9] D.I. Păcurar, H. Thordal-Christensen, K.K. Nielsen, I. Lenk, A high-throughput *Agrobacterium*-mediated transformation system for the grass model species *Brachypodium distachyon* L. *Transgenic Res.* 5 (2008) 965-975.
- [10] J. Van Eck, K. Swartwood, *Setaria viridis*, in: Wang, K., (Ed.), *Agrobacterium* Protocols (3rd Edition). Springer Science+Business Media, New York, 1 (2015) 57-67.

Figure Legend

Figure 1. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Setaria viridis*. (a) embryogenic callus after 5 weeks in CIM medium (bar = 2 mm). (b) translucent embryogenic callus most suitable for transformation (arrow heads, bar = 0.5 mm). (c) PCR analysis of the transgenic plants with *gfp* specific primer (NT: non-transgenic plant, lanes 1-11 transgenic plants, M: molecular weight marker - 100 bp DNA Ladder). (d) Transgenic plant expressing GUS (right) and non-transgenic (left). (e) Transgenic T1 seeds expressing GFP (top) and T1 seedlings expressing GFP (bottom). (f) Regenerated transgenic plantlet in hygromycin-containing selective MS medium (arrow head).

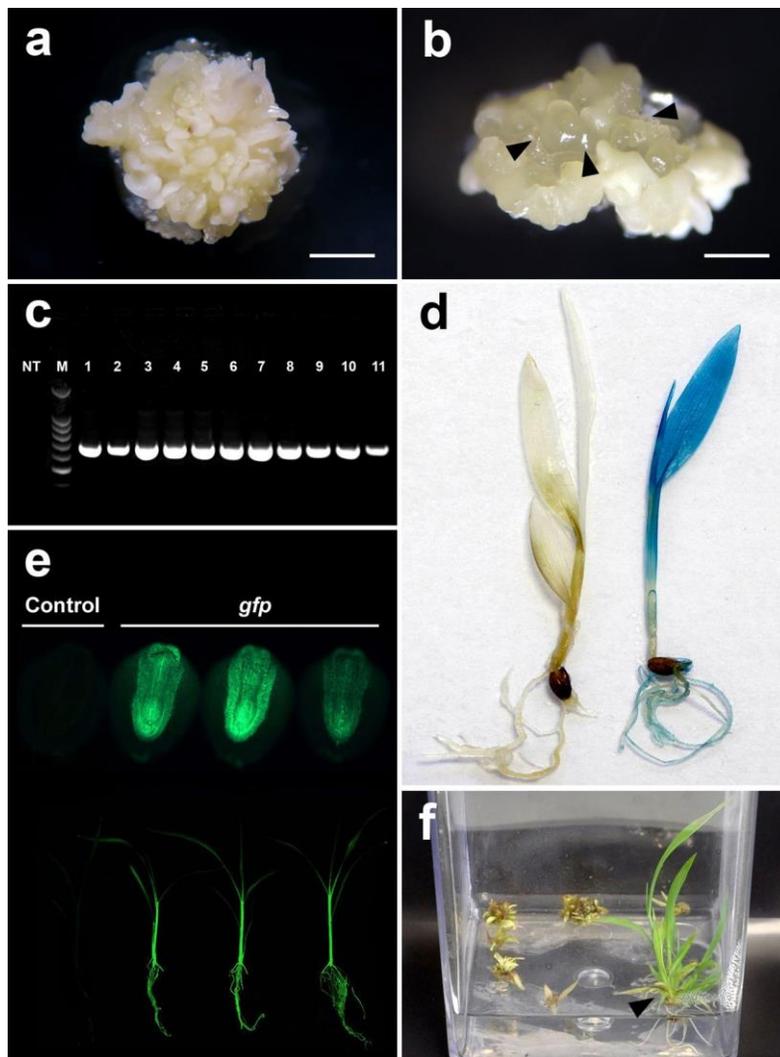


Table 1

Summary of transgenic plants production by embryogenic calli.

Vectors ^a	Number of explants	Selectable marker	Number of PCR positive plantas	Transformation efficiency (%) ^b
p6i	225	<i>hpt</i>	32	14.22
p6mD#1	218	<i>hpt</i>	30	13.76
p6mD#2	55	<i>hpt</i>	16	29.09
p6	77	<i>hpt</i>	6	7.79
p7U	50	<i>hpt</i>	3	6.0
p6mD#3	83	<i>hpt</i>	11	13.25
p6mD#4	33	<i>hpt</i>	4	12.12

hpt – hygromycin phosphotransferase gene with an intron, *bar* – phosphinothricin acetyl transferase gene with an intron.

^a Vectors were purchased from DNA Cloning Service (www.dna-cloning.com). p6mD vector contains different genes if interest.

^b For each construct, the transformation efficiency was calculated as the total number pf PCR positive plants/total number of inoculated callus x 100.

Table 2Segregation ratios in the T_1 generation of plants transformed with p6mD#2.

Event	Resistant ^a	Sensitive ^b	χ^2 value for 3:1 ^c	Fits 3:1 ratio ^d
28	27	11	0.59	Y
29	27	3	3.60	Y
35	21	8	0.10	Y
49	29	9	0.03	Y
91	34	19	3.32	Y

^a Number of seedlings survived on the medium containing 50 mg/L hygromycin.

^b Number os seedlings sensitive on the medium containing 50 mg/L hygromycin.

^c Significantly different at $P > 0.05$.

^d Ratio of resistant versus sensitive seedlings on hygromycin.