



**THIAGO BERGAMO CARDOSO**

**ESTABELECIMENTO DE UMA REDE DE CORRELAÇÃO DE  
GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NOS  
ESTRESSES DE AL E P E CARACTERIZAÇÃO DAS  
FAMÍLIAS MATE E ALMT EM *Eucalyptus grandis* E *Populus  
trichocarpa***

**LAVRAS -MG  
2018**

**THIAGO BERGAMO CARDOSO**

**ESTABELECIMENTO DE UMA REDE DE CORRELAÇÃO DE GENES  
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NOS ESTRESSES DE AL E P E  
CARACTERIZAÇÃO DAS FAMÍLIAS MATE E ALMT EM *Eucalyptus grandis* E  
*Populus trichocarpa***

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

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva  
Orientador  
Dr. Alan Carvalho Andrade  
Co-orientador

**LAVRAS-MG  
2018**

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

Cardoso, Thiago Bergamo.

Estabelecimento de uma rede de correlação de genes  
diferencialmente expressos nos estresses de Al e P e caracterização  
das famílias MATE e ALMT em *Eucalyptus grandis* e  
*Populustrichocarpa* / Thiago Bergamo Cardoso. - 2018.

163 p. : il.

Orientador(a): Luciano Vilela Paiva.

Coorientador(a): Alan Carvalho Andrade.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Solos ácidos. 2. Estresse abiótico. 3. Co-expressão. I. Paiva,  
Luciano Vilela. II. Andrade, Alan Carvalho. III. Título.

**THIAGO BERGAMO CARDOSO**

**ESTABELECIMENTO DE UMA REDE DE CORRELAÇÃO DE GENES  
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NOS ESTRESSES DE AL E P E  
CARACTERIZAÇÃO DAS FAMÍLIAS MATE E ALMT EM *Eucalyptus grandis* E  
*Populus trichocarpa***

**ESTABLISHMENT OF A NETWORK OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES  
ON THE AL AND P STRESS AND CHARACTERIZATION OF THE MATE AND  
ALMT FAMILIES IN *Eucalyptus grandis* E *Populus trichocarpa***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre

APROVADO em 01 de MARÇO de 2018.  
Dr. Alan Carvalho Andrade – EMBRAPA  
Dr. Vagner Augusto Benedito- West Virginia University

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva  
Orientador  
Dr. Alan Carvalho Andrade  
Co-orientador

**LAVRAS-MG  
2018**

## AGRADECIMENTOS

Eu queria agradecer a Universidade Federal de Lavras (UFLA), especialmente o Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM). Eu também queria agradecer aos órgãos de fomento CAPES, FAPEMIG e CNPq pela concessão da bolsa de mestrado e financiamento dos projetos.

Fazendo uma retrospectiva do meu mestrado, eu posso dizer que teve momentos em que eu achei que era uma pessoa azarada, mas em outros, eu tive certeza! Teve formiga comendo o meu experimento, hidropônicas contaminada por fungos (2 vezes), *E. dunnii* que não enraíza de jeito nenhum, entre outras coisas. Entretanto, talvez eu não seja tão azarado assim, talvez eu seja cara de sorte.

Eu sou sortudo por ter uma família que sempre me apoiou e sempre esteve ao meu lado, mesmo eles não entendendo o meu curso ou área em que eu trabalho, mas eles sempre acreditaram em mim. Se não fosse o suporte dos meus pais, Paulo Cesar e Rosa Marlene, e dos meus irmãos, Diego e Karina, eu não conseguiria chegar a onde eu cheguei. Foram diversas palavras de incentivo dos meus Pais, “você consegue” e “acreditamos em você” e dos meus irmãos, “você é adotado” e “não é possível que além de feio é burro”.

Talvez eu seja um cara de sorte por ter um orientador (Luciano) que sempre esteve a disposição para me dar conselhos e me motivando a pôr em práticas as minhas ideias, mesmo eu provando para ele com triplicatas técnicas e biológicas que tudo que eu colocava a mão dava errado. O mesmo para o meu co-orientador (Alan), que sempre esteve disposto e tirar uns minutos do seu dia para tomar um café e compartilhar o seu conhecimento, mesmo depois que eu ter quebrado o computador dele.

Talvez eu seja um cara de sorte por estar cercado de amigos, que sempre estiveram ao meu lado para comemorar as minhas vitórias, mas também para me ajudar nos momentos difíceis. Eu tive sorte de conhecer o Anderson e dele ter a paciência para me ensinar sobre *network*, o que no final mostrou ser fundamental para a minha dissertação. A Natalia que me ajudou nas análises de expressão, se não fosse o conhecimento dela em qPCR eu jamais teria conseguido. E por último, mas não menos importante, eu queria agradecer o Renan, que é meu parceiro de laboratório a 5 anos e que tem uma paciência inabalável, foram muitas horas tomando um cafezinho e discutindo ideias para chegar nessa dissertação, se não fosse o prazer que ele sente em me questionar talvez eu não teria tão bem fundamentado diversos conceitos.

Eu sou sortudo demais por ter trabalhado esses 2 anos no LCBM, foram muitos xingos que ele levei da Eliete por deixar bagunçada a estufa, muitas repreensões do Ricardo e do

Fabricio por não usar jaleco ( eu quero deixar claro, que eu uso o mesmo jaleco invisível que o Leo usa), foram muitos potes que a Jussara repicou para me salvar, foram muitas as vezes que eu fui desesperado na sala da Rossilvania para tirar uma dúvida sobre o mestrado, foram muitas risadas da Claudiana e da Mariele na hora do almoço, infinitas discussões com o Farley, Wesley e Renan (sendo que nunca chagávamos a conclusão nenhuma), não tem como eu citar todas as pessoas aqui mas eu quero deixar claro que a amizade de todos foi algo fundamental para mim nesses anos.

Existe uma frase famosa de Newton que diz “Se eu consegui enxergar além foi porque eu me apoiei no ombro de gigantes”, eu não gosto muito dessa frase pois não sou muito de subir nas costas dos outros. O meu avô Alexandre tinha uma frase que era “Sempre converse com pessoas mais inteligentes que você”. Assim, se for para resumir o meu mestrado em uma frase seria: Se eu consegui enxergar além foi porque eu tive a sorte de só conversar com pessoas mais inteligentes do que eu.

**OBRIGADO A TODOS.**

*“Preguiça é o pior defeito de uma pessoa” (meu Pai)*

## RESUMO

Os solos ácidos correspondem a 50% dos solos potencialmente aráveis do mundo. Nesse tipo de solo os principais problemas encontrados são a alta concentração de Al e a baixa disponibilidade de P. Tendo isso em mente, esse trabalho teve como objetivo contribuir com estudos em plantas modelo, *Populus* spp., e plantas tolerantes, *Eucalyptus* spp., relacionados a mecanismos ao estresse de Al e P. No estresse combinado de Al e P foi observado que a maioria dos genes associados a um estresse apresenta correlação negativa com o outro, sendo apenas 8 genes influenciados por ambos os estresses de forma similar. Em *Populus* foram identificados 20 membros da família ALMT e 56 membros da família MATE, sendo que desses, 13 e 36 membros, respectivamente, apresentaram correlação entre si. Dos quais os genes *PoptrALMT10* e *PoptrMATE54*, principais membros relacionados ao estresse de Al, em estresse de fosforo não apresentaram nenhum gene em comum na folha e somente 3 na raiz, em contrapartida, sobe estresse de Al esses dois genes compartilharam 35 genes. Em *E. grandis* foram identificados 58 membros da família MATE, dos quais 43 apresentaram correlação com outros membros e 15 estavam envolvidos em rotas mais específicas. Em *E. urophylla* sobe estresse de Al foi demonstrado alterações anatômicas tanto na raiz quanto na folha, e o gene *Eucgr.A02386* respondeu rapidamente ao estresse, mas em menor intensidade enquanto que o *Eucgr.J00768* apresentou expressão tardia e mais intensa, ambos os genes codificam proteínas MATE localizadas no vacúolo.

**Palavra-chave:** Solos ácidos. Estresse abiótico. Co-expressão.



## ABSTRACT

Acid soils account for 50% of the world's potentially arable soils. In this type of soil the main problems encountered are the high concentration of Al and the low availability of P. Therefore, this work aimed to contribute with studies in a model plant, *Populus* spp., and tolerant plants, *Eucalyptus* spp., related to Al and P stress mechanisms. In the combined stress of Al and P it was observed that the majority of the genes associated to a stress presents negative correlation with that from the other, being only 8 genes influenced by both stresses of similar form. In *Populus*, 20 members of the ALMT family and 56 members of the MATE family were identified, and of these, 13 and 36 members, respectively, presented a correlation with each other. Of those genes, PoptrALMT10 and PoptrMATE54, the main members related to Al stress, in phosphorus stress did not present any common genes in the leaf and only 3 in the root, in contrast, under Al stress these two genes shared 35 genes. In *E. grandis*, 58 members of the MATE family were identified, of which 43 were correlated with other members and 15 were involved in more specific routes. In *E. urophylla* on Al stress, anatomical changes were demonstrated in both root and leaf, and the Eucgr.A02386 gene responded quickly to stress, but at lower intensity while Eucgr.J00768 showed late and more intense expression, both genes encode MATE proteins located in the vacuole.

**Keyword:** Acid soils. Abiotic stress. Co-expression.

## SUMÁRIO

|     |   |    |
|-----|---|----|
|     | <b>PRIMEIRA PARTE</b> .....   | 13 |
| 1   | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 12 |
| 2   | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | 14 |
| 2.1 | <b>Solos ácidos</b> .....   | 14 |
| 2.2 | <b>ALMT</b> .....   | 16 |
| 2.3 | <b>MATE</b> .....   | 17 |
| 2.4 | <b>Eucalipto</b> .....  | 19 |
| 3   | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....   | 21 |
|     | <b>SEGUNDA PARTE</b> .....  | 26 |
|     | <b>Artigo 1:</b> Análise de redes de co-expressão entre genes de <i>Populus</i> spp. envolvidos na resposta ao déficit de fosfato e toxidez por alumínio..... | 27 |
| 1   | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 30 |
| 2   | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....  | 31 |
| 2.1 | <b>Análise dos dados provenientes de experimentos de <i>microarray</i></b> .....  | 31 |
| 2.2 | <b>Construção das redes de co-expressão gênica</b> .....  | 32 |
| 2.3 | <b>Enriquecimento das redes de co-expressão gênica</b> .....  | 33 |
| 3   | <b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....  | 34 |
| 4   | <b>CONCLUSÃO</b> .....  | 53 |
|     | <b>APÊNDICE A</b> - Descrição dos genes regulados por déficit de fosfato e <i>STOP1</i> em <i>A. thaliana</i> identificados em <i>P. trichocarpa</i> . .....  | 59 |
|     | <b>Artigo 2:</b> Análise global da família ALMT e MATE em <i>Populus trichocarpa</i> e correlação entre genes dessas famílias no estresse de Al e P.....      | 61 |
| 1   | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 64 |
| 2   | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....  | 66 |
| 2.1 | <b>Caracterização da família de transportadores ALMT e MATE em <i>Populus trichocarpa</i></b> .....   | 66 |
| 2.2 | <b>Análises filogenéticas da família ALMT e MATE</b> .....  | 66 |
| 2.3 | <b>Análises de sintenia da família ALMT</b> .....   | 67 |
| 2.4 | <b>Perfil de expressão dos membros da família ALMT e MATE em <i>P. trichocarpa</i></b> .....  | 67 |
| 2.5 | <b>Correlação genica em <i>Populus</i></b> .....  | 67 |
| 2.6 | <b>Identificação dos fatores de transcrição relacionados aos MATE em <i>E. grandis</i></b> .....  | 67 |

|     |   |     |
|-----|---|-----|
| 2.7 | Enriquecimento dos dados utilizando BLAST2GO .....  | 68  |
| 3   | <b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....  | 68  |
| 3.1 | Análise filogenética da família ALMT em <i>Populus trichocarpa</i> .....  | 68  |
| 3.2 | Análise sintenica e de duplicação dos genes ALMT em <i>P. trichocarpa</i> .....   | 71  |
| 3.3 | Expressão em diferentes bibliotecas dos genes ALMT em <i>P. trichocarpa</i> .....   | 74  |
| 3.4 | Expressão em diferentes bibliotecas dos genes MATE em <i>P. trichocarpa</i> .....   | 76  |
| 3.5 | Rede de correlação entre os membros da família MATE e ALMT em <i>P. trichocarpa</i> .....   | 81  |
| 3.6 | Rede de correlação entre os genes <i>PoptrALMT10</i> e <i>PoptrMATE54</i> em bibliotecas de P e Al.....   | 84  |
| 4   | <b>CONCLUSÃO</b> .....  | 86  |
|     | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 87  |
|     | <b>APÊNDICE A</b> - Lista de membros da família ALMT em <i>Populus trichocarpa</i> .....  | 92  |
|     | <b>APÊNDICE B</b> – Lista de membros da família MATE em <i>Populus trichocarpa</i> .....  | 93  |
|     | <b>APÊNDICE C</b> - Anotação dos genes correlacionados tanto ao <i>PoptrALMT10</i> quanto ao <i>PopMATE54</i> através da ferramenta BLAST2GO..... | 96  |
|     | <b>Artigo 3:</b> Análise global da família de transportadores MATE em <i>Eucalyptus grandis</i> .....   | 97  |
| 1   | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 100 |
| 2   | <b>MATÉRIAS E MÉTODOS</b> .....   | 101 |
| 2.1 | Caracterização da família MATE em <i>E. grandis</i> .....   | 101 |
| 2.2 | Análises filogenéticas e sintenicas .....   | 102 |
| 2.3 | Perfil de expressão dos genes MATE .....  | 102 |
| 2.4 | Correlação dos genes MATE .....   | 103 |
| 2.5 | Enriquecimento dos dados utilizando BLAST2GO .....  | 103 |
| 3   | <b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....  | 104 |
| 3.1 | Análise filogenética da família de transportadores MATE em <i>E. grandis</i> .....  | 104 |
| 3.2 | Estudo de sintenia e duplicação nos genes MATE em <i>E. grandis</i> .....   | 108 |
| 3.3 | Expressão de genes da família MATE em <i>E. grandis</i> em diferentes bibliotecas de RNA-seq .....  | 112 |
| 3.4 | Análise de co-expressão dos fatores de transcrição correlacionados com genes da família MATE em <i>E. grandis</i> .....                           | 115 |
| 3.5 | Análise de co-expressão e rede de interação dos processos biológicos relacionados aos genes MATE de <i>E. grandis</i> .....                       | 118 |

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 4   | <b>CONCLUSÃO</b> .....   | 122 |
|     | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 122 |
|     | <b>APÊNDICE A</b> – Códigos do banco de dados NCBI das bibliotecas utilizadas.....   | 129 |
|     | <b>APÊNDICE B</b> – Lista descritiva dos membros da família MATE em <i>E. grandis</i> .  | 132 |
|     | <b>Artigo 4:</b> Diferença temporal na expressão de genes da família <i>Multi-drug and toxic compound extrusion (MATE)</i> no vacúolo foliar de <i>Eucalyptus urophylla</i> sob estresse de alumínio ..... | 134 |
| 1   | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 137 |
| 2   | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 138 |
| 2.1 | <b>Exposição das plântulas ao alumínio</b> .....   | 138 |
| 2.2 | <b>Coloração com hematoxilina</b> .....  | 138 |
| 2.3 | <b>Análises histológicas e morfométricas</b> .....   | 139 |
| 2.4 | <b>Análises de bioinformática</b> .....  | 139 |
| 2.5 | <b>Extração de RNA e síntese de cDNA</b> .....   | 140 |
| 2.6 | <b>RT-qPCR</b> .....   | 141 |
| 3   | <b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....   | 141 |
| 3.1 | <b>Análise histoquímica e anatômicas</b> .....   | 141 |
| 3.2 | <b>Estudo da região promotora dos genes da família MATE</b> .....  | 146 |
| 3.3 | <b>Predição da sublocalização das proteínas MATE</b> .....   | 148 |
| 3.4 | <b>Análise da expressão dos genes MATE em <i>E. urophylla</i></b> .....  | 150 |
| 4   | <b>CONCLUSÃO</b> .....   | 153 |
|     | <b>REFERENCIAS</b> .....   | 154 |

## **PRIMEIRA PARTE**

### Introdução Geral

## 1 INTRODUÇÃO

Os solos ácidos são um dos principais fatores limitantes na produtividade das culturas (MA; RYAN; DELHAIZE, 2001). Nas regiões onde o pH do solo é inferior a 5,5, o solo passa a ser classificado como ácido. Nessas condições é possível encontrar um grande número de formas solúveis do alumínio (Al), que em contato com as raízes, inibem o crescimento e subsequentemente afetam a absorção de água e de nutrientes (KOCHIAN, 1995). Além do mais, o fósforo (P), elemento essencial para o desenvolvimento vegetal, é normalmente indisponível para a planta devido a fixação com o alumínio em solos ácidos. A formação do complexo se torna mais forte à medida que o pH do solo decresce, dificultando a absorção do nutriente (KOCHIAN; HOEKENGA; PINEROS, 2004).

A toxicidade causada pelo alumínio é o principal fator responsável pela queda na produtividade das plantas cultivadas em solos ácidos. Devido ao Al ser um elemento muito reativo, ele interage com a parede celular e membrana plasmática das células da raiz, impedindo o crescimento e desenvolvimento e, conseqüentemente, afetando a funcionalidade desses tecidos (HERMANS et al., 2006). São dois os perfis de interação do alumínio com a planta: uma resposta precoce onde o processo afeta a alongação celular e uma tardia que interfere na divisão celular (MATSUMOTO, 2000). A presença de alumínio reativo dentro do vegetal também pode afetar o aparelho fotossintético da planta (MIHAILOVIC; DRAZIC; VUCINIC, 2008; MUKHOPADYAY et al., 2012). Assim, devido a reatividade do alumínio, este elemento será prejudicial ao desenvolvimento da planta quando estiver ativo no solo, bem como, quando for absorvido pelo vegetal.

Para conseguirem se desenvolver nesses ambientes, as plantas apresentam diversos mecanismos de adaptação ao alumínio no solo, sendo o mecanismo mais bem caracterizado o de exsudação de ácidos orgânicos. Os ácidos orgânicos estão envolvidos em diferentes processos biológicos na planta, sendo uma das peças fundamentais no metabolismo primário. Sendo oriundos principalmente do ciclo de Krebs, fotossíntese de: C-3, C-4 e CAM, e, em menor quantidade, do ciclo do glioxilato em plantas (SHARMA et al., 2016). O metabolismo da planta possui um arsenal de ácidos orgânicos, podendo esses atuar em uma rota específica ou em várias. Entretanto tem alguns ácidos orgânicos que se destacam, como por exemplo, malato, oxacetato e o citrato, sendo esses importantes em diferentes rotas do metabolismo da célula como: produção de energia, formação de precursores para a biossíntese de aminoácidos e a modulação, tanto da parte aérea quanto raiz, da adaptação da planta ao ambiente (IGAMBERDIEV; EPRINTSEV, 2016).

Quando em contato com o Al no solo, a planta libera ácidos orgânicos na rizosfera, o qual irá quelar este cátion formando compostos não tóxicos. Assim, devido ao tamanho da molécula formada, não são absorvidos pelas células da raízes (KOCHIAN; HOEKENGA; PINEROS, 2004). A proteína responsável pelo transporte de citrato da planta para a rizosfera pertence à família *Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE)*, e este efluxo é realizado mediante um gradiente de H<sup>+</sup> ou Na<sup>+</sup> (KOCHIAN et al., 2015). Os genes, já caracterizados como transportadores de citrato em *Shorgum bicolor* (MAGALHAES et al., 2007) e *Hordeum vulgare* (FURUKAWA et al., 2007), respondem tanto a presença quanto a quantidade de alumínio no solo. Outro ácido orgânico que apresenta papel de destaque na tolerância ao Al é o malato, transportado pela família *Aluminum-activated Malate Transporters (ALMT)*, um canal iônico que permite o transporte de malato através de um gradiente eletroquímico (ROBERTS; ROBERTS, 2006).

Nas últimas décadas, pesquisas tem demonstrado a importância dos ácidos orgânicos na adaptação a estresses abióticos como os solos ácidos, com altas concentrações de alumínio (Al), e baixa disponibilidade de nutrientes. Em *Brassica napus* o efluxo de citrato e malato são responsáveis pela maior absorção de fosforo (P) (HOFFLAND; FINDENEGG; NELEMANS, 1989). Em solos ácidos o *Sorghum bicolor* teve um aumento de produção de 0,6 ton.ha<sup>-1</sup> devido a maior liberação de citrato na rizosfera (CARVALHO et al., 2016).

Assim, é importante o entendimento dessas famílias de transportadores afim de obter uma maior produtividade em solos ácidos, como é o caso do Brasil que apresenta boa parte do território dominado por solos com baixo pH (LOPES; GUIMARÃES GUILHERME, 2016). No território brasileiro, o plantio de eucalipto já ocupa uma área de 5,6 milhões de hectares, o que representa 72% do total da área de árvores plantadas no Brasil (INDUSTRIA BRASILEIRA DE ARVORES, 2017). A cultura do eucalipto apresenta um papel de importância nacional, tanto no ponto de vista econômico e ambiental, quanto na geração de empregos. É utilizada principalmente como base da indústria de celulose, além de fonte de carvão vegetal para energia e aplicação na construção civil (BRACELPA, 2016). No Brasil, o preço médio de mercado do eucalipto obteve um acréscimo de 6,6% no último ano e esse aumento vem ocorrendo desde 2009 (INDUSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES 2017), demonstrando ser um mercado crescente mesmo com a crise econômica no país.

O plantio de eucalipto baseia-se na utilização de clones elite, que são espécies advindas do melhoramento genético, apresentando crescimento rápido e características agrônomicas desejáveis. Geralmente são mais susceptíveis a estresses abióticos do que as espécies naturalmente adaptadas (CORNEY; SASSE; ADES, 2003). Entre os estresses

abióticos destaca-se o cultivo em solos ácidos, sendo este um fator importante para o melhoramento de espécies florestais, principalmente, nas regiões tropicais (BRUNNER; SPERISEN, 2013).

Em vista da vasta extensão dos solos ácidos e do impacto negativo que causam na agricultura mundial. Objetivou-se estudar a nível molecular a relação entre as plantas e os solos ácidos. Utilizando de *Populus thrichocarpa*, planta modelo para lenhosa, para elucidar a rede de conexão genica envolvidas no estresse de Al e P, bem como o envolvimento das principais famílias de transportadores de ácidos orgânicos, ALMT e MATE, nesses estresses. Com o mesmo objetivo, foi descrito a família MATE em eucalipto, que apresenta crescimento significativo em solos ácidos, e o envolvimento dessa família na tolerância da espécie.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Solos ácidos**

No Mundo, considerando as áreas não congeladas, aproximadamente 30% do solo restante é classificado como ácido, sendo dividido globalmente em dois cinturões: (1) ao norte formado sobre condições frias e clima temperado úmido, com predomínio de florestas de coníferas; e (2) ao sul, formado sobre condições quentes, que é coberto basicamente por florestas tropicais (VON UEXKÜLL; MUTERT, 1995). Aproximadamente 50% das terras potencialmente aráveis no mundo apresentam características ácidas e cerca de 60% dos solos ácidos estão localizados em regiões tropicais e subtropicais (KOCHIAN et al., 2015).

A toxidez do alumínio está intimamente relacionada com o pH do solo. Em pH próximo ao neutro, o alumínio existente no solo encontra-se na sua forma insolúvel, complexado com sílica e oxigênio, entretanto, a medida que o pH do solo vai se tornando mais ácido, o alumínio começa a se tornar solúvel e conseqüentemente fitotóxico (MATSUMOTO, 2000). O baixo crescimento das plantações pode ser correlacionado diretamente à saturação de alumínio e não a alterações no pH (VON UEXKÜLL; MUTERT, 1995).

No Brasil, 23% do território apresenta características de savana, região denominada Cerrado, contendo pH ácido. A partir de amostras coletadas no cerrado brasileiro, foi possível observar que 49% das amostras apresentaram  $\text{pH} < 5$  e 50% com valores entre 5,0 e 5,9 (LOPES; GUIMARÃES GUILHERME, 2016).



Em solos ácidos, o alumínio é encontrado na rizosfera na forma de cátion  $Al^{+3}$ , o qual causa danos nas raízes das plantas, devido ao fato de ser uma molécula muito reativa. Esta reação impede o crescimento e a alongação das raízes, reduzindo assim sua capacidade de absorver água e nutrientes (KOCHIAN et al., 2004). Ademais, o aumento da concentração de alumínio no solo prejudica a biodisponibilidade de alguns elementos essenciais para a planta, como por exemplo, o fósforo (P), que se fixa fortemente ao alumínio em solos com pH abaixo de 5,0 (KOCHIAN; HOEKENGA; PINEROS, 2004).

A disponibilidade de P é um dos principais limitantes nutricionais para o crescimento vegetal (RYAN; DELHAIZE, 2001). As plantas podem sofrer com deficiência desse nutriente mesmo quando a quantidade total é elevada, e essa aparente discrepância se deve a diferença entre o quanto de fósforo está presente no solo e quanto está biodisponível para a planta. Em experimentos no bioma Cerrado, foram analisados os níveis de extratibilidade do fósforo no solo, e a média da quantidade de fósforo biodisponível foi  $< 2,0 \text{ mg.dm}^{-3}$ , valor considerado 1/15 do nível crítico utilizado para interpretação de análises de solo, ou seja, muito abaixo do mínimo indicado para uma cultura (LOPES; GUIMARÃES GUILHERME, 2016).

O alumínio não só afeta o comportamento das raízes das plantas e a biodisponibilidade de nutrientes, como também altera a eficiência fotossintética quando a planta é exposta a condições de toxidez. Para plantas sensíveis, a presença do alumínio pode alterar a condutância estomática e o conteúdo de clorofila (MUKHOPADYAY et al., 2012), além de reduzir a taxa fotossintética (MIHAJLOVIC; DRAZIC; VUCINIC, 2008). Essas variações na fotossíntese não são observadas em cultivares tolerantes (LAZAREVIĆ; HORVAT; POLJAK, 2014).

As plantas desenvolveram durante o processo evolutivo dois mecanismos principais de adaptação ao alumínio presente no solo: (1) liberação de ácidos orgânicos pela raiz, com o objetivo de evitar que o alumínio penetre no ápice da raiz, mantendo este metal neutralizado na rizosfera; e (2) que consiste do alumínio que é absorvido pela planta, onde ocorrerá sua neutralização e armazenamento (KOCHIAN et al., 2015). Visando o rápido crescimento, os mecanismos de resistência ao alumínio apresentam vantagens em relação a tolerância no plantio, uma vez que impedem ou minimizam a entrada do alumínio dentro das células da raiz. Portanto, a resistência a solos ácidos é uma das características mais importantes para se obter plantas de crescimento rápido (SAWAKI et al., 2014).

Alguns ácidos orgânicos, intermediários do ciclo de Krebs, como por exemplo o ácido cítrico e o ácido málico, apresentam papéis fundamentais no processo de resistência das plantas aos solos ricos em alumínio. A medida que formam complexos com Al tóxico,

influenciam indiretamente no aumento de biodisponibilidade de fósforo no solo que antes estavam fixados ao alumínio (LOPEZ-BUCIO et al., 2002). A relação dos ácidos orgânicos e o alumínio não se restringe a quelatização externa do alumínio e mobilização de fósforo, mas também na detoxificação interna da planta ao alumínio e liberação de fósforos inorgânicos livres no citoplasma (RYAN; DELHAIZE, 2001). Muitas espécies de dicotiledôneas utilizam da liberação de ânions orgânicos pela raiz quando existe a deficiência de fósforo no solo, como por exemplo, *Brassica napus* (HOFFLAND; FINDENEGG; NELEMANS, 1989), *Oryza sativa* (KIRK; SANTOS; FINDENEGG, 1999), *Lupinus albus* (JOHNSON; VANCE; ALLAN, 1996) e *Medicago sativa* (LIPTON; BLANCHAR; BLEVINS, 1987).

## 2.2 ALMT

Canais iônicos é uma classe muito diversa de proteína de membrana presente tanto em procariotos quanto em eucariotos. Elas são proteínas integrais de membrana, dando origem a poros aquosos através da membrana lipídica permitindo o fluxo de íons através do gradiente eletroquímico (ROBERTS; ROBERTS, 2006). No final da década de 1990 houve um aumento na pesquisa de canais iônicos envolvidos com o fluxo de compostos através da membrana plasmática e do tonoplasto. Assim foi caracterizado o mecanismo pelo qual as plantas, tanto mono quanto dicotiledôneas, neutralizavam o Al tóxico na rizosfera, sendo através do fluxo de intermediários do ciclo de Krebs, malato, oxalacetato e citrato, para a rizosfera (DELHAIZE; RYAN; RANDALL, 1993; ZHANG; MA; CAO, 1997).

Protoplastos isolados de *Triticum aestivum* (RYAN et al., 1997) forneceram os primeiros indícios do envolvimento de proteínas de membrana no fluxo de ácidos orgânicos em resposta ao estresse de Al em plantas. Sendo caracterizada comparando linhagens de *Triticum aestivum* que apresentavam diferença no locus relacionado a tolerância ao Al, sendo caracterizado o gene *TaALMT1* (*Aluminum- activated Malate Transporters*) (SASAKI et al., 2004). Expressão heteróloga desse gene em *Oryza sativa* e *Nicotiana tabacum* proporcionaram aumento na tolerância dessas plantas ao estresse de Al, e expressão em oócitos de *Xenopus* demonstrou que o *TaALMT1* era responsável pelo fluxo de malato (SASAKI et al., 2004). Quando esse gene foi inserido em *Hordeum vulgare* demonstrou o mesmo efeito, aumentando a tolerância na raiz ao Al (DELHAIZE et al., 2004).

Embora o *TaALMT1* também apresente expressão na ausência de Al, a característica de responder a presença de Al não se aplica a toda a família, apresentado membros envolvidos em diversas rotas metabólicas e em outros órgãos diferentes da raiz (SHARMA et al., 2016).

Depois da caracterização do TaALMT1, foram caracterizados diversos membros dessa família exercendo outras funções como abertura e fechamento estomático (SASAKI et al., 2010) e envolvimento na qualidade do fruto (DE ANGELI et al., 2013).

O transportador ALMT é permeável tanto a íons orgânico quanto inorgânico e realiza tanto o efluxo quanto o influxo. Em experimentos com tabaco demonstraram que o TaALMT1 apresenta alta seletividade ao malato, no entanto, também realiza o efluxo de nitrato e cloreto (ZHANG et al., 2008). Evidencia-se, portanto, a necessidade de um maior estudo dessa família afim de se obter informações para compreender melhor o papel da família ALMT.

A família ALMT é classificada, evolutivamente, como ArAE (*Aromatic Acid Exporter*) tendo esse grupo membros em bactérias e eucariontes como: plantas, fungos e protozoários. Contudo o ALMT apresenta uma diferença importante entre os outros membros desse grupo, uma vez que é exclusivo de plantas (SHARMA et al., 2016). Ainda é inexistente a estrutura cristalográfica de membros dessa família, o que levanta muita controvérsia a respeito da sua estrutura e topologia. Através de comparações entre os membros já caracterizados dessa família, há um indicativo que o ALMT apresenta alta similaridade na porção N-terminal e apresenta de 6-7 domínios transmembranares (SHARMA et al., 2016).

### 2.3 MATE

A família gênica *Multidrug and Toxic Exclusion (MATE)* é muito ampla com representantes tanto em organismos procariotos quanto em eucariotos. Os primeiros membros dessa família foram identificados em *Vibrio parahaemolyticus* e *Escherichia coli*, e devido à diversidade no efluxo de substâncias e a homologia com outros transportadores, essas proteínas foram denominadas MATE (MORITA et al., 1998).

Os transportadores do tipo MATE estão amplamente distribuídos em bactérias, fungos, mamíferos e plantas. Em Archaea, Eubacteria e Eukarya foram identificadas 861 transportadores MATE, os quais foram classificados em três grandes subfamílias e divididos em 14 pequenos grupos (OMOTE et al., 2006). Em plantas, o número de ortólogos dos genes MATE é grande, por exemplo, em *Arabidopsis thaliana* a família MATE apresenta 58 ortólogos, sendo alguns com funções ainda não elucidadas (YAZAKI, 2005).

As proteínas MATE são transportadoras, mais especificamente, transportadoras secundárias, uma vez que utilizam um gradiente eletroquímico de Na<sup>+</sup> ou H<sup>+</sup> através da membrana para direcionar o efluxo (TAKANASHI; SHITAN; YAZAKI, 2014). A família

*MATE* apresenta algumas características em comum como: tamanho médio de 400 a 700 resíduos de aminoácidos e 12 domínios transmembranares (OMOTE et al., 2006). Outra característica dessa família é a similaridade das sequências proteicas, embora não exista um consenso nas sequências globais, os *MATE* já descritos apresentam uma similaridade de aproximadamente 40% e essa similaridade é encontrada, principalmente, entre os domínios transmembranares (MAGALHAES, 2010).

Em plantas, a família *MATE* apresenta papel importante em diversos processos fisiológicos, entre eles: exclusão de xenóbioticos, acumulação de metabólitos secundários incluindo alcalóides e flavonóides, translocação de ferro (Fe), sinalização hormonal e desintoxicação por alumínio (Al) (TAKANASHI; SHITAN; YAZAKI, 2014). A localização desses transportadores dentro da célula também apresenta diversidade. É possível encontrar essas proteínas tanto na membrana plasmática da célula quanto no vacúolo (OMOTE et al., 2006).

Os *MATE* que transportam citrato apresentam as mesmas características da família, entretanto, a topologia desse subgrupo é um pouco diferente. O subgrupo de *MATE* que realiza o efluxo de citrato apresenta um loop intracelular (possui um tamanho de aproximadamente 100 aminoácidos) entre o segundo e o terceiro domínio transmembranar e a sequência de aminoácidos (PLVSxTTSFVAEED) da primeira metade desse loop é altamente conservada (LIU et al., 2009).

Dentre as funções desses genes, o efluxo de ácido cítrico vem ganhando destaque devido ao seu envolvimento com a tolerância a solos ricos em alumínio. Os primeiros estudos sobre o efluxo de ácidos orgânicos para tolerância ao alumínio ocorreram em *Triticum aestivum* (RYAN et al., 1997) e *Zea mays* (KOLLMEIER et al., 2001). Já a caracterização de genes que codificam transportadores do citrato na raiz ocorreu em *Sorghum bicolor* (*SbMATE*) (MAGALHAES et al., 2007) e *Hordeum vulgare* (*HvAACT1*) (FURUKAWA et al., 2007). Atualmente existem muitos membros dessa família que realizam o efluxo de citrato identificados em diversas plantas, como por exemplo: *Arabidopsis thaliana* (*AtMATE1*) (LIU et al., 2009), *Zea mays* (*ZmMATE1*) (MARON et al., 2010), *Vigna umbellate* (*VuMATE1*) (YANG et al., 2011), *Oryza sativa* (*OsFRD1*) (YOKOSHO; YAMAJI; MA, 2011) e *Coffea arabica* (*CaMATE*) (PINTO, 2016).

O comportamento dos genes *MATE* que realizam o efluxo de ácido cítrico ainda não está completamente elucidado, tanto em relação à regulação transcricional quanto à estrutura desses genes no genoma das plantas. Linhagens de milho cultivadas em regiões com o solo ácido apresentaram maior expressão do gene *MATE*, mas isso se deve ao maior número de

cópias desse gene no genoma dessas linhagens (MARON et al., 2013). Em cevada, a expressão do *HvAACT1* é maior em linhagens tolerantes ao alumínio do que em linhagens sensíveis, mas a expressão desse gene é constitutiva, ou seja, é expresso independente do estresse causado pelo alumínio (FUJII et al., 2012). Em soja, o gene *GmMATE75* mostrou expressão diferencial nas pontas das raízes, aumentando a expressão com o passar do tempo e cultivares tolerantes apresentaram aumento mais discrepante do que as cultivares sensíveis (LIU et al., 2016).

A exsudação de ácidos orgânicos pode vir a ser benéfica para a planta, aumentando a biodisponibilidade de nutrientes a serem absorvidos pela raiz, reduzindo a concentração de cátions tóxicos na rizosfera e/ou reduzindo a acumulação de metabólitos potencialmente tóxicos no citoplasma (RYAN; DELHAIZE, 2001). Em sorgo, quando o gene *MATE* estava ativo, observou-se um aumento na produtividade de 0,6 ton ha<sup>-1</sup> na presença de alumínio reativo no solo, em relação a planta com o gene inativo. Enquanto que, em solos com alumínio tóxico ausente, não houve diferença detectável na produção (CARVALHO et al., 2016). Isso demonstra a importância do estudo dos genes *MATE* visando o aumento da produtividade em solos ácidos.

## 2.4 Eucalipto

As espécies de eucaliptos são muito versáteis e capazes de adaptarem as mais distintas e severas condições de clima e temperatura, ocorrendo tanto em áreas tropicais, quanto em regiões de temperaturas mais baixas. Devido ao grande número de espécies de eucaliptos é possível obter uma grande variedade de tipos de madeira. Considerando essa diversidade, os eucaliptos podem ser utilizados para as mais diferentes finalidades, como na produção de celulose e de papel, para a construção de mobiliários, postes, dormentes e mourões, bem como fonte de energia e na construção civil (INDUSTRIA BRASILEIRA DE ARVORES, 2017).

Atualmente, os plantios de eucalipto ocupam 5,6 milhões de hectares e estão localizados principalmente em Minas Gerais (24%), São Paulo (17%) e em Mato Grosso do Sul (15%), apresentando nos últimos cinco anos crescimento de área de 2,8% ao ano. Essa dispersão geográfica das plantações submete as plantas a diferentes condições fisiológicas, climáticas e do solo, sendo necessário estudos visando a uma maior adaptabilidade desse gênero a diferentes condições ambientais. O rendimento médio na produção de madeira de uma floresta de eucalipto no Brasil varia de 35 a 50 m<sup>3</sup> por hectare por ano e, dependendo da

região, podem-se obter valores ainda maiores (INDUSTRIA BRASILEIRA DE ARVORES, 2017). Esses dados são expressivos quando comparados com seu país de origem, a Austrália, onde obtém-se rendimento médio de, aproximadamente, 25 m<sup>3</sup> por hectare por ano (PINTO et al., 2014).

No Brasil, a espécie de eucalipto mais plantada é a *E. grandis* devido a diversos fatores, entre eles: as características silviculturais desejáveis, a aplicabilidade da madeira para diversos fins, aliada à grande variabilidade genética e a facilidade de aquisição de sementes em quantidade e qualidade (PEREIRA et al., 2000). Entretanto, o plantio de *E. dunnii* vem ganhando espaço como alternativa ao *E. grandis* devido ao seu melhor comportamento frente ao déficit hídrico e, principalmente, em regiões que sofrem com as geadas (THOMAS et al., 2009). Assim, essa espécie vem sendo utilizada amplamente nos plantios na região Sul do Brasil.

Uma das vantagens do gênero *Eucalyptus* que possibilita este grande desempenho em produção é a facilidade do cruzamento entre espécies, processo conhecido como hibridação. Um dos híbridos mais utilizados e conhecidos no setor florestal e industrial brasileiro é o *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*. Este cruzamento reúne as melhores características do *E. grandis* (crescimento e qualidade da madeira) e do *E. urophylla* (adaptação e resistência a doenças, particularmente ao fungo, *Cryphonectria cubensis*, causador do cancro do eucalipto), sendo ambos os genótipos utilizados para diversos fins como produção de celulose, papel, chapas duras, serraria, carvão e outros (PINTO et al., 2014).

As espécies de eucaliptos são conhecidas por apresentarem tolerância ao alumínio (NEVES et al 1982), sendo que para algumas espécies a presença em pequenas doses desse metal no meio de cultura *in vitro*, favoreceu o crescimento da planta (VALE et al 1984, HUANG; BACHELARD, 1993). Essa tolerância está relacionada com o acúmulo de alumínio principalmente no vacúolo da célula. Em *Eucalyptus camaldulensis* quando exposto a concentrações de 0,5 mM de Al, ocorre maior acúmulo do metal nas folhas, com concentrações duas vezes maiores em folhas velhas quando comparado à folhas jovens (NGUYEN et al., 2005).

Estudos em *Eucalyptus camaldulensis* demonstraram a liberação de ácido málico e ácido cítrico em ambiente controlado, tanto na presença quanto na ausência de alumínio. Contudo, o aumento da liberação de ácido cítrico foi correlacionado com o aumento da concentração de alumínio no meio, correspondendo com o aumento da expressão do gene *EcMATE1* na presença de alumínio (SAWAKI et al., 2013).

A correlação entre a expressão dos genes *MATE* e a liberação de ácido cítrico também foi elucidada em um clone de eucalipto denominado GUT5, proveniente do cruzamento entre *E. grandis* e *E. urophylla*, onde a expressão do *EguMATE1* sofreu acréscimo na presença de alumínio (SAWAKI et al., 2014). A adaptação do gênero *Eucalyptus* é resultado de uma combinação entre a quelatização no Al na rizosfera e a neutralização intracelular desse metal (SILVA et al., 2004).

Dentre as diferentes espécies estudadas quanto a tolerância ao alumínio, o *Eucalyptus grandis* foi a que apresentou maior susceptibilidade no crescimento radicular em comparação com as demais espécies. Em *Eucalyptus urophylla* foi observado uma elevada liberação de ácidos orgânicos quando exposto a 465  $\mu\text{M}$  de Al durante 6 horas, sendo o ácido málico o mais secretado pela raiz, quando comparado com a planta sem alumínio. Apesar da liberação ter aumentado na presença de alumínio a secreção de ácido málico também foi encontrada na ausência de alumínio, ao contrário do ácido cítrico, que foi exsudado somente na presença do metal. No mesmo experimento foi possível observar que a espécie *Eucalyptus dunnii* foi a que apresentou maior liberação de ácido cítrico (SILVA et al., 2004).

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Visto o impacto socioeconômico que os solos ácidos tem mundialmente, devido ao fato de, eles serem localizados principalmente em regiões onde a produção de alimento está intimamente relacionada a subsistência (KOCHIAN et al., 2015). Aliado a isso o eucalipto é a espécie florestal mais plantada no Brasil, tendo impacto direto no PIB do país, também ser plantada em regiões de solos ácidos. O estudo dos genes relacionados a esse estresse é de relevância tanto acadêmica quanto para o setor empresarial.

Desta forma, o entendimento da rede de correlação genica da planta quando está exposta a condições de toxidez de Al e deficiência de P é importante para elucidação de rotas e seleção de genes que podem vir a ser utilizados no processo de melhoramento. Igualmente importante é o entendimento da expressão conjunta dos genes das famílias *ALMT* e *MATE* em espécies modelo, como *Populus thrichocarpa*, submetidas a estresse de Al e deficiência de P. Do mesmo modo, analisar o comportamento, tanto anatômico quanto de expressão genica, de espécie considerada tolerantes, como é o caso do eucalipto. Tais informações poderão ser utilizadas p/ o melhoramento das próprias espécies, bem como em outras espécies, utilizando marcadores moleculares e técnicas de engenharia genética.

## REFERÊNCIAS

- BRUNNER, I.; SPERISEN, C. Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 4, 2013.
- CARVALHO, G. et al. Back to Acid Soil Fields: The Citrate Transporter SbMATE Is a Major Asset for Sustainable Grain Yield for Sorghum Cultivated on Acid Soils. **Genes, Genomes, Genetics**: New York, v. 6, n. February, p. 475–484, 2016.
- CORNEY, H. J.; SASSE, J. M.; ADES, P. K. Assessment of salt tolerance in eucalypts using chlorophyll fluorescence attributes. **New Forests**: Amsterdã, v. 26, n. 3, p. 233–246, 2003.
- DE ANGELI, A. et al. The vacuolar channel VvALMT9 mediates malate and tartrate accumulation in berries of *Vitis vinifera*. **Planta**: Berlin Heidelberg, v. 238, n. 2, p. 283–291, 2013.
- DELHAIZE, E. et al. Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [S.l.: s.n.], v. 101, n. 42, p. 15249–15254, 2004.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P. R.; RANDALL, P. J. Aluminum Tolerance in Wheat ( *Triticum aestivum* 1 ). **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 103, n. 3, p. 695–702, 1993.
- FUJII, M. et al. Acquisition of aluminium tolerance by modification of a single gene in barley. **Nature Communications**: New York, v. 3, p. 713, 2012.
- FURUKAWA, J. et al. An aluminum-activated citrate transporter in barley. **Plant and Cell Physiology**: London, v. 48, n. 8, p. 1081–1091, 2007.
- HERMANS, C. et al. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? **Trends in Plant Science**: Kidlington, v. 11, n. 12, p. 610–617, 2006.
- HOFFLAND, E.; FINDENEGG, G. R.; NELEMANS, J. A. Solubilization of rock phosphate by rape - I. Evaluation of the role of the nutrient uptake pattern. **Plant and Soil**: Amsterdã, v. 113, n. 2, p. 155–160, 1989.
- IGAMBERDIEV, A. U.; EPRINTSEV, A. T. Organic Acids: The Pools of Fixed Carbon Involved in Redox Regulation and Energy Balance in Higher Plants. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 7, n. July, p. 1–15, 2016.
- JOHNSON, J. F.; VANCE, C. P.; ALLAN, D. Phosphorus Deficiency in *Lupinus albus*. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 112, n. 22243, p. 31–41, 1996.
- KIRK, G. J. D.; SANTOS, E. E.; FINDENEGG, G. R. Phosphate solubilization by organic anion excretion from rice (*Oryza sativa* L.) growing in aerobic soil. **Plant and Soil**: Amsterdã, v. 211, n. 1, p. 11–18, 1999.
- KOCHIAN, L. V. et al. How Do Crop Plants Tolerate Acid Soils? Mechanisms of Aluminum Tolerance and Phosphorous Efficiency. **Annual Review of Plant Biology**: [S.l.: s.n.], v. 55, n. 1, p. 459–493, 2004.



KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Biology**: [S.l.: s.n.], v. 46, n. 1, p. 237–260, 1995.

KOCHIAN, L. V et al. Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. **Annual Review of Plant Biology**: [S.l.: s.n.], v. 6623281, n. 23, p. 1–23, 2015.

KOCHIAN, L. V; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? - Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**: [S.l.: s.n.], v. 55, p. 459–493, 2004.

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** [S.l.: s.n.], v. 126, n. 1, p. 397–410, 2001.

LAZAREVIĆ, B.; HORVAT, T.; POLJAK, M. Effect of Acid Aluminous Soil on Photosynthetic Parameters of Potato (*Solanum tuberosum* L.). **Potato Research**: Amsterdã, v. 57, n. 1, p. 33–46, 2014.

LIPTON, D. S.; BLANCHARD, R. W.; BLEVINS, D. G. Citrate, Malate, and Succinate Concentration in Exudates from P-Sufficient and P-Stressed *Medicago sativa* L. Seedlings. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 85, n. 2, p. 315–7, 1987.

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

LIU, J. et al. Genome-wide analysis of MATE transporters and expression patterns of a subgroup of MATE genes in response to aluminum toxicity in soybean. **BMC Genomics**: London, v. 17, n. 1, p. 223, 2016.

LOPES, A. S.; GUIMARÃES GUILHERME, L. R. A career perspective on soil management in the Cerrado region of Brazil. **Advances in Agronomy**: [S.l.: s.n.], v. 137, n. August, p. 1–72, 2016.

LOPEZ-BUCIO, J. et al. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root system. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 129, n. 1, p. 244–256, 2002.

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

MAGALHAES, 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**: Oxford, v. 106, n. 1, p. 199–203, 2010.

MAGALHAES, 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, 2007.

MARON, L. G. et al. 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. **Plant Journal**: London, v. 61, n. 5, p. 728–740, 2010.

MARON, L. G. et al. Aluminum tolerance in maize is associated with higher MATE1 gene copy number. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [S.l.: s.n.], v. 110, n. 13, p. 5241–5246, 2013.

MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **International review of cytology**: [S.l.: s.n.], v. 200, p. 1–46, 2000.

MIHAILOVIC, N.; DRAZIC, G.; VUCINIC, Z. Effects of aluminium on photosynthetic performance in Al-sensitive and Al-tolerant maize inbred lines. **Photosynthetica**: Praga, v. 46, n. 3, p. 476–480, 2008.

MORITA, Y. et al. NorM, a Putative Multidrug Efflux Protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Homolog in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**: [S.l.: s.n.], v. 42, n. 7, p. 1778–1782, 1998.

MUKHOPADYAY, M. et al. Changes of growth, photosynthesis and alteration of leaf antioxidative defence system of tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] seedlings under aluminum stress. **BioMetals**: Amsterdã, v. 25, n. 6, p. 1141–1154, 2012.

NGUYEN, N. T. et al. Distribution of Accumulated Aluminum and Changes in Cell Wall Polysaccharides in *Eucalyptus camaldulensis* and *Melaleuca cajuputi* under Aluminum Stress. Distribution of Accumulated Aluminum and Changes in Cell Wall Polysacc. **Soil Science and Plant Nutrition**: [s.l.: s.n.], v. 51, n. July 2011, p. 37–41, 2005.

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

PEREIRA, J. C. D. et al. **CARACTERÍSTICAS DA MADEIRA DE ALGUMAS ESPÉCIES DE EUCALIPTO PLANTADAS NO BRASIL**. [s.l.: s.n.].

PINTO, D. S. et al. Seleção precoce para características de crescimento em testes clonais de *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**: Piracicaba, v. 42, n. 102, p. 251–257, 2014.

PINTO, R. T. **CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE GENES DA FAMÍLIA MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION ( MATE ) POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA ADAPTAÇÃO DE *Coffea arabica* A SOLOS ÁCIDOS**. [s.l.: s.n.].

ROBERTS, S. K.; ROBERTS, S. K. Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots - Roberts - 2006 - New Phytologist - Wiley Online Library. p. 647–666, 2006.

RYAN, P. R. et al. Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [s.l.: s.n.], v. 94, n. 12, p. 6547–6552, 1997.

RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. Function and mechanism of Organic Anion Exudation from

- Plant Roots. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**: Palo Alto, v. 52, p. 527–560, 2001.
- SASAKI, T. et al. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **Plant Journal**: London, v. 37, n. 5, p. 645–653, 2004.
- SASAKI, T. et al. Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum-activated malate transporter. **Plant and Cell Physiology**: London, v. 51, n. 3, p. 354–365, 2010.
- SAWAKI, Y. et al. Characterization of Al-responsive citrate excretion and citrate-transporting MATEs in *Eucalyptus camaldulensis*. **Planta**: Berlin Heidelberg, v. 237, n. 4, p. 979–989, 2013.
- SAWAKI, Y. et al. Identification of a STOP1-like protein in *Eucalyptus* that regulates transcription of Al tolerance genes. **Plant Science**: Amsterdã, v. 223, p. 8–15, 2014.
- SHARMA, T. et al. The ALMT family of organic acid transporters in plants and their involvement in detoxification and nutrient security. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 7, n. October, p. 1488, 2016.
- SILVA, I. R. et al. Responses of eucalypt species to aluminum: the possible involvement of low molecular weight organic acids in the Al tolerance mechanism. **Tree physiology**: London, v. 24, n. 11, p. 1267–1277, 2004.
- TAKANASHI, K.; SHITAN, N.; YAZAKI, K. The multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family in plants. **Plant Biotechnology**: Amsterdã, v. 31, n. 5, p. 417–430, 2014.
- THOMAS, D. et al. Review of growth and wood quality of plantation-grown *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Australian Forestry**: [s.l: s.n.], v. 72, n. 1, p. 3–11, 2009.
- VON UEXKÜLL, H. R.; MUTERT, E. Global Extent, Development and Economic-Impact of Acid Soils. **Plant and Soil**: Amsterdã, v. 171, p. 1–15, 1995.
- 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 and Environment**: Malden, v. 34, n. 12, p. 2138–2148, 2011.
- YAZAKI, K. Transporters of secondary metabolites. **Current Opinion in Plant Biology**: Amsterdã, v. 8, n. 3 SPEC. ISS., p. 301–307, 2005.
- YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; MA, J. F. An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. **Plant Journal**: Oxford, v. 68, n. 6, p. 1061–1069, 2011.
- ZHANG, F.; MA, J.; CAO, Y. Phosphorus deficiency enhances root exudation of low-molecular weight organic acids and utilization of sparingly soluble inorganic phosphates by radish (*Raphanus sativus* L.) and rape (*Brassica napus* L.) plants, **Plant and Soil**: Amsterdã, 1997.
- ZHANG, W. H. et al. Characterization of the TaALMT1 protein as an Al<sup>3+</sup>-activated anion channel in transformed tobacco (*Nicotiana Tabacum* L.) cells. **Plant and Cell Physiology**: London, v. 49, n. 9, p. 1316–1330, 2008.

**SEGUNDA PARTE**  
Artigos

**Artigo 1:** Análise de redes de co-expressão entre genes de *Populus* spp. envolvidos na resposta ao déficit de fosfato e toxidez por alumínio

## ANÁLISE DE REDES DE CO-EXPRESSIONÃO ENTRE GENES DE *POPULUS* SPP. ENVOLVIDOS NA RESPOSTA AO DÉFICIT DE FOSFATO E TOXIDEZ POR ALUMÍNIO

### RESUMO

A adaptação das plantas cultiváveis à solos ácidos é uma necessidade para a manutenção da segurança alimentar de forma sustentável, já que a diminuição da utilização de fertilizantes e intervenções mecânicas no solo favorece a redução nos custos e no impacto das práticas agrícolas. O déficit de fosfato e a presença de alumínio solúvel afetam processos vitais para a planta, como absorção de água e nutrientes, fotossíntese e processos metabólicos. O entendimento da resposta molecular a estes estresses pode fomentar estratégias de melhoramento genético e, para tanto, objetivou-se analisar de forma ampla as variações transcricionais em *Populus* spp. em resposta a estes estresses abióticos. Foi estabelecida uma rede de co-expressão entre 3.180 genes diferencialmente expressos em plantas estressadas por alumínio, com 34.988 conexões. Do total, 344 genes apresentaram variação transcricional superior à 100% e o grupo de genes associados aos regulados em 246 horas de estresse apresentou maior valor de conexões por gene e genes conhecidamente relacionados à este estresse. Outra rede de co-expressão foi constituída por 8.380 conexões entre 550 genes ativados pelos estresses de alumínio e déficit de fosfato, com 380 genes regulados de forma similar entre os dois estresses, dos quais, apenas 8 com variação transcricional superior à 20%. A abordagem geral apresentada neste trabalho pode auxiliar no entendimento das respostas à toxidez por alumínio e ao déficit de fosfato, bem como a identificação de genes específicos poderão ser utilizadas em estudos aprofundados visando o melhoramento genético de espécies para adaptação à solos ácidos.

**Palavras-chave:** Estresses abióticos. Solos ácidos. Melhoramento genético

ANALYSIS OF CO-EXPRESSION NETWORKS AMONG *POPULUS* SPP. GENES INVOLVED IN THE RESPONSE TO THE DEFICIT OF PHOSPHATE AND TOXICITY BY ALUMINUM

**ABSTRACT**

The adaptation of arable crops to acid soils is a necessity for the maintenance of food security in a sustainable way, since the reduction of the use of fertilizers and mechanical interventions in the soil favors the reduction of the impact of agricultural practices. Phosphate deficiency and the presence of soluble aluminum affect vital processes to the plant in this soil, such as water and nutrient absorption, photosynthesis and metabolic processes. From this, the understanding of the molecular response to these stresses can foster strategies for genetic improvement and, in order to do so, the objective was to analyze broadly the transcriptional variations in *Populus* spp. in response to these abiotic stresses. A co-expression network was established among 3,180 genes differentially expressed in aluminum-stressed plants with 34,988 connections. Of the total, 344 genes presented transcriptional variation greater than 100% and the group of genes associated with those regulated in 246 hours of stress had higher value of connections per gene and genes known to be related to this stress. Another co-expression network consisted of 8,380 connections between 550 genes activated by aluminum stress and phosphate deficiency, with 380 genes regulated similarly between the two stresses, of which only 8 with transcriptional variation higher than 20%. The general approach presented in this paper can help in the understanding of the responses to aluminum toxicity and phosphate deficiency, as well as the specific ones highlighted for specific genes can be used in in-depth studies aiming at the genetic improvement of species for adaptation to acid soils.

**Key words:** Abiotic stresses. Acid soils. Breeding

## 1 INTRODUÇÃO

A agricultura em regiões de solos ácidos é dificultada por diversos fatores relacionados a absorção de nutrientes essenciais para as plantas, com destaque para de íons  $Al^{3+}$  nestes solos com pH inferior à 5,5 e a baixa disponibilidade de fosfato em detrimento da complexação com os íons livres de alumínio e adsorção no solo (LOPES e GUILHERME, 2016). Em termos de distribuição, cerca de 30% da porção arável do planeta é composta por este tipo de solo (VON UEXKULL e MUTERT, 1995), com maioria nas regiões tropicais e subtropicais, justamente as regiões com maior atividade agrícola (KOCHIAN *et al.*, 2015).

O alumínio livre em função do baixo pH, na forma  $Al^{3+}$ , pode interagir com vários componentes extra e intracelulares das células vegetais, causando distúrbios em vias de sinalização, transporte, ocorreu também modificações nas paredes celulares e membranas plasmáticas, com maior impacto morfológico observado nas raízes (SINGH *et al.*, 2017), que têm o crescimento afetado e, conseqüentemente, ocorre redução na absorção de água e nutrientes. Acompanhado pela toxicidade por alumínio, o déficit de fosfato em solos ácidos afeta severamente o crescimento e desenvolvimento do vegetal, já que este é um nutriente essencial na maioria dos processos metabólicos (HEUER *et al.*, 2017) sendo necessária a aplicação regular de fertilizantes.

A aplicação de fertilizantes fosfatados tem aumentado nos últimos anos em função da demanda de produção de alimentos, algo que gera preocupação devido aos riscos de exaustão, bem como pela distribuição global desfavorável das reservas (HEUER *et al.*, 2017). Neste contexto, as estratégias focadas na adaptação das plantas ao ambiente de cultivo podem ser interessantes para o objetivo de manutenção da segurança alimentar de forma sustentável e, para tanto, o entendimento dos mecanismos moleculares associados à tolerância à solos ácidos podem ser úteis à programas de melhoramento genético que visem o aumento da produtividade de plantas cultivadas neste tipo de ambiente.

Já existem relatos na literatura de aplicações bem sucedidas do conhecimento molecular relacionado à adaptação à solos ácidos no cultivo de plantas comercialmente relevantes. Como exemplo, a partir da descoberta das relações do gene *TaALMT1* de *Triticum aestivum* com a tolerância ao alumínio tóxico, via exsudação de malato intermediada pela proteína codificada, foi possível desenvolver plantas transgênicas de *Hordeum vulgare* mais



adaptadas à solos ácidos que, em ensaios de longo prazo, apresentaram maior massa seca de raízes e parte aérea e produção de grãos neste tipo de solo (FERREIRA *et al.*, 2018).

Diante do exposto, objetivou-se neste estudo analisar as respostas à toxicidade por alumínio e déficit de fosfato em espécies de *Populus* spp. via utilização de dados públicos de *microarray* e estabelecer conexões entre as respostas aos dois estresses de Al e P por meio de redes de co-expressão gênica. Esta abordagem justifica-se pela importância do entendimento das relações entre as respostas destes dois estresses que coexistem em solos ácidos e pelo reduzido número de trabalhos que abordam esta relação, bem como as respostas para cada estresse de forma específica, em dados transcriptômicos amplos.

Na análise da resposta à toxicidade de alumínio foram identificados 3.272 genes diferencialmente expressos, dos quais 344 apresentaram variação transcricional superior à 100% por decorrência do estresse. A rede de co-expressão aglomerou 3.180 genes com 34.988 conexões entre si ( $p \geq 0,8$ ). Nesta rede o grupo de genes relacionados aos ativados em 246 horas de estresse apresentou maior quantidade de conexões por gene, bem como membros similares à genes já associados à tolerância ao alumínio em outras espécies.

Foi estabelecida uma rede de co-expressão entre os genes diferencialmente expressos em resposta à toxicidade por alumínio e ao déficit de fosfato, com 550 genes conectados mediante 8.380 conexões com  $p \geq 0,8$ . Com isso, foram identificados grupos de genes com regulação específica para cada estresse que exibiram características distintas. Do total, 380 genes foram identificados com o mesmo perfil de regulação para ambos os estresses, porém, apenas 8 apresentaram variação transcricional superior à 20%, sendo quatro deles similares à genes já relacionados ao déficit de fosfato. Estas constatações e as demais observações específicas expostas no trabalho são úteis como ponto de partida para estudos moleculares aprofundados que poderão auxiliar programas de melhoramento na adaptação de plantas à solos ácidos.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Análise dos dados provenientes de experimentos de *microarray***

Os dados de *microarray* utilizados neste trabalho foram obtidos a partir dos números de acesso GSE19297 e E-MTAB-3934. Em relação ao primeiro conjunto de dados, foram

utilizadas as bibliotecas de raiz expostas ou não ao alumínio por 6, 54 e 246 horas, com triplicatas biológicas para cada tratamento, totalizando 18 bibliotecas. Para o segundo conjunto de dados, foram utilizadas as bibliotecas referentes à raiz em alta concentração de fosfato, média concentração de fosfato e baixa concentração de fosfato, com triplicatas biológicas, totalizando 9 bibliotecas.

Os dados foram analisados mediante o software de estatística livre R (R version 3.3.2) utilizando o protocolo descrito por Janz (JANZ et al., 2010). O pacote do R “*affy*” (GAUTIER et al., 2004) foi utilizado para normalizar as sondas, utilizando a função “*rma*”, disponível no Bioconductor (KAUFFMANN et al., 2009). Os valores das expressões dos transcritos em  $\log_2$  que estavam presentes em todas as repetições, feito pela função “*mas5calls*”, em pelo menos uma das condições, foram utilizadas para as análises posteriores. Para identificar os genes que apresentavam expressão diferencial nos tratamentos com alumínio e doses de fosfato em relação a cada tempo foi utilizado o teste t-Student ( $p < 0,05$ ). Foram considerados diferencialmente expressos todos aqueles genes que apresentaram: (1) expressão em todas as repetições em pelo menos uma biblioteca e (2) abundância do transcrito em pelo menos um tratamento estatisticamente diferente em relação a outro utilizando o teste t-Student, ou seja, expressão diferencial em pelo menos uma biblioteca.

Para a anotação dos transcritos diferencialmente expressos de acordo com o genoma de *Populus trichocarpa*, foi utilizada a ferramenta *Blastx* alinhando as sondas contra o banco de dados de CDS de *P. trichocarpa* (<http://popgenie.org/>). Foi utilizado um e-valor  $< 1e-5$  e no máximo 10 alinhamentos para cada sonda e o melhor alinhamento foi selecionado.

## 2.2 Construção das redes de co-expressão gênica

A partir dos valores de expressão obtidos para as bibliotecas referentes à cada experimento, foram elaboradas duas redes de co-expressão distintas. A primeira, utilizou-se apenas genes diferencialmente expressos entre as 18 bibliotecas referentes ao experimento de estresse por alumínio, e para verificar a proximidade do perfil de expressão dos genes utilizou-se da correlação de *Spearman*, sendo selecionadas correlações com  $\rho \geq 0,8$ . Para a segunda rede de co-expressão, também construída a partir de correlação de *Spearman* com  $\rho \geq 0,8$ , foram utilizados todos os genes que foram diferencialmente expressos em bibliotecas

referentes ao estresse por alumínio juntamente com as bibliotecas com as variações de doses de fosfato.

### 2.3 Enriquecimento das redes de co-expressão gênica

Para estabelecer o tipo de regulação em relação ao estresse para cada conjunto de dados foram utilizados os seguintes procedimentos: (1) para as bibliotecas relacionadas ao estresse por alumínio foi estimada a média entre os valores de expressão das triplicatas biológicas de cada gene nas diferentes bibliotecas e posteriormente os valores das bibliotecas referentes à condição de estresse por alumínio foram divididos pelos valores da biblioteca de mesmo tempo de estresse, porém na condição controle e (2) para as bibliotecas relacionadas ao fosfato, novamente foi estimada a média dos valores de expressão para cada gene entre as triplicatas biológicas de todas as bibliotecas e, em seguida, os valores da biblioteca de média concentração de fosfato foram divididos pelos de alta dose de fosfato (para caracterizar o estresse) e, da mesma forma, os valores de baixa concentração de fosfato foram divididos pelos de alta dose (estresse severo). Vale ressaltar que as plantas deste experimento em média dose de fosfato apresentaram características de estresse, porém menos severas que plantas em baixa dose deste elemento (KAVKA e POLLE, 2016).

A partir dos valores obtidos das divisões citadas acima, foi possível gerar os filtros abordados no trabalho como, regulação positiva (quociente  $> 1$ ), regulação negativa (quociente  $< 1$ ), variação transcricional superior à 20% ( $0,83 \leq \text{quociente} \leq 1,2$ ) e variação transcricional superior à 100% ( $0,5 \leq \text{quociente} \leq 2,0$ ). Para cada rede de co-expressão gênica elaborada, as proteínas de *P. trichocarpa* correspondentes às probes utilizadas na respectiva rede foram submetidas ao software *TF prediction server* do banco de dados *PlantTFDB* (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>) para a predição de possíveis fatores de transcrição presentes na rede, além da família de fatores de transcrição à qual pertence. Além disso foi utilizado o software *Blast2GO* (CONESA *et al.*, 2005) para identificar classes de *Gene Ontology* enriquecidas nos dados referentes à grupos distintos das redes de co-expressão gênica.

Para a identificação de genes similares aos regulados por *AtSTOP1*, regulador majoritário da resposta transcricional a toxicidade de Al em *A. thaliana*, e aos comumente ativados por déficit de fosfato (*Core PSR genes*) foram utilizadas informações da literatura (SAWAKI *et al.*, 2009; LAN *et al.*, 2015) para identificar proteínas de *A. thaliana* e obtê-las a

partir do banco de dados *TAIR* (<https://www.arabidopsis.org/>). Com estas sequências, foi realizada uma análise via *blastp* contra o proteoma de *P. trichocarpa* para identificar as proteínas possivelmente reguladas por *STOPI* e pertencentes ao *Core PSR* nesta espécie e verificar a presença dos genes codificantes nas redes de co-expressão.

### 3 RESULTADO E DISCUSSÃO

As ferramentas atuais para análise de dados transcriptômicos (ex: *Microarray* e *RNA-seq*) associadas ao conhecimento do genoma e fisiologia de plantas modelo possibilitam a compreensão mais ampla do impacto de um determinado estresse sobre o metabolismo vegetal, como já demonstrado com a utilização de dados provenientes de quatro experimentos de análise transcriptômica ampla em *A. thaliana*, abordagem que possibilitou o conhecimento de 95 genes comumente ativados pelo déficit de fosfato (LAN *et al.*, 2015).

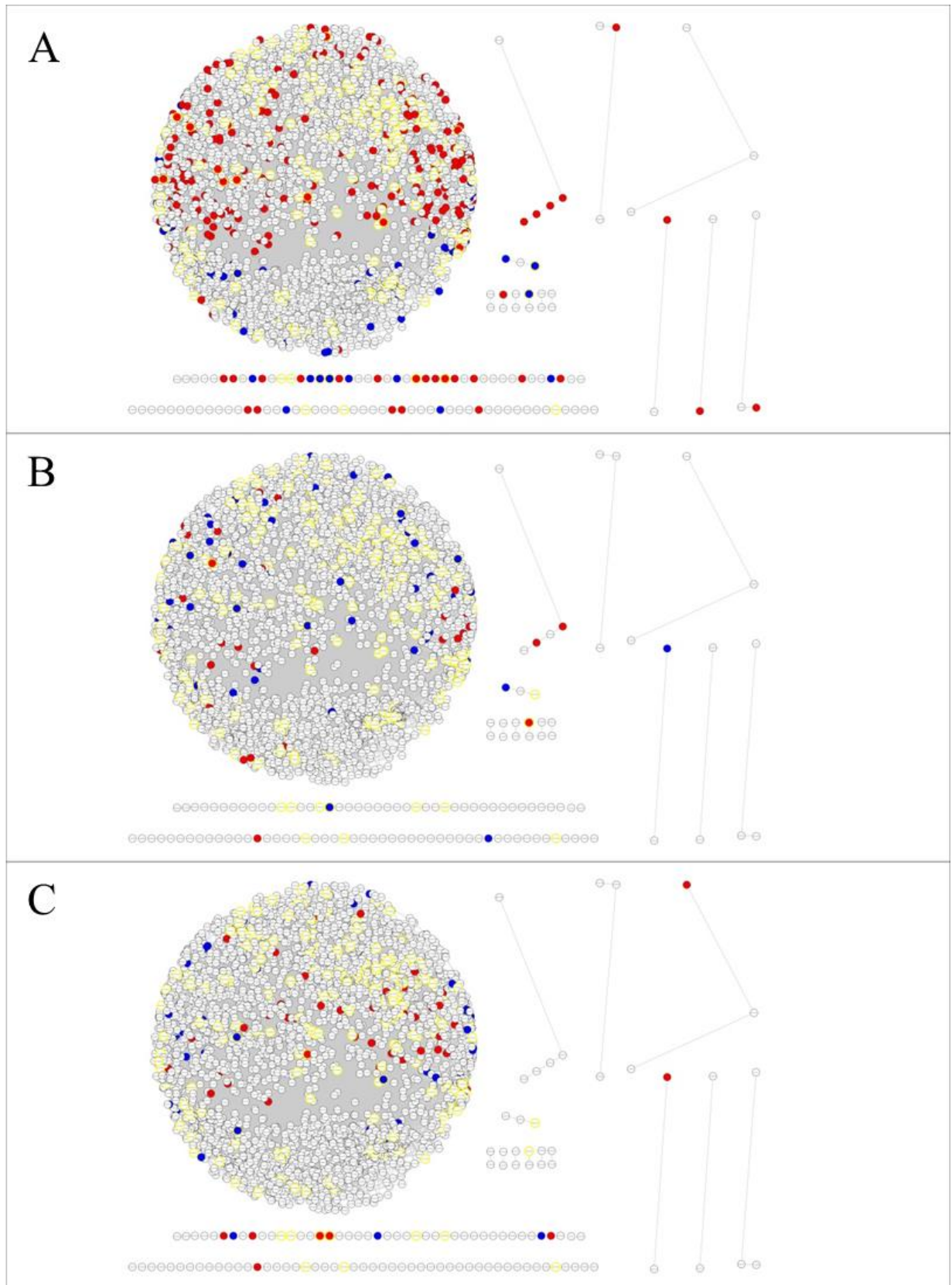
Com o mesmo objetivo, foi utilizado dados de *microarray* de raiz de *Populus* expostas a 500µM Al<sup>3+</sup> por 6, 54 e 246 horas (código de acesso: GSE19297). Esses dados foram analisados e resultaram na identificação de 5359 *probes* com expressão diferencial em pelo menos uma das bibliotecas e, deste montante, foi possível relacionar 3272 *probes* à genes já anotados no genoma de *P. trichocarpa*. Devido ao grande número de genes encontrados, foi utilizado o critério de 100% de variação entre a condição de plantas estressadas com alumínio e plantas controle, para selecionar somente os genes com maior resposta a presença de Al. Assim, somente 344 genes foram considerados como regulados pelo Al, podendo ser de forma positiva ou negativa, ou seja, aumentando ou diminuindo a expressão no estresse em relação ao controle. Esta regulação é influenciada pela duração do estresse e em cada tempo houve a presença de genes exclusivos, ou seja, que foram diferencialmente expressos em somente um dos tempos de exposição (Tabela 1).

**Tabela 1** Descrição geral do número de genes com regulação diferencial em função do estresse por alumínio em diferentes tempos de exposição.

|  | <b>6h de estresse</b> | <b>54h de estresse</b> | <b>246h de estresse</b> |
|--|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| <b>n° de genes regulados positivamente</b> | 62 (44 exclusivos)    | 52 (10 exclusivos)     | 45 (8 exclusivos)       |
| <b>n° de genes regulados negativamente</b> | 250 (148 exclusivos)  | 31 (6 exclusivos)      | 48 (5 exclusivos)       |

É notória a quantidade superior de genes regulados em 6 horas de estresse, principalmente negativamente, onde esta regulação corrobora com a inibição severa do crescimento radicular que as plantas apresentaram (GRISEL *et al.*, 2010). Assim, podemos observar que a resposta inicial da planta ao estresse é reduzir a expressão de diversos genes. Nos genes regulados negativamente houve uma redução de 8 vezes no número de genes entre o intervalo de 6 e 54h, sendo que o número volta a aumentar no intervalo de 54 a 246h. Interessantemente, o crescimento da raiz foi recuperado nos tempos seguintes (54 e 246 horas), o que pode estar relacionado à eficiência da resposta precoce ao estresse (GRISEL *et al.*, 2010) e que os genes regulados neste período desencadearam a ativação de mecanismos de tolerância à toxicidade do metal. Esta regulação precoce da resposta ao estresse por alumínio já foi observada em outras espécies por análises transcriptômicas amplas (RNA-seq), como em *Fagopyrum esculento* (XU *et al.*, 2017), *Medicago sativa* (LIU *et al.*, 2017) e *Urochloa decumbensis* (SALGADO *et al.*, 2017).

Afim de elucidar a relação entre os genes com regulação de 100%, positivamente e negativamente nos diferentes tempos, e os demais genes diferencialmente expressos foi realizado a análise de co-expressão, na qual é possível visualizar a distribuição topológica dos genes na rede de correlação. Deste modo, foi utilizado os valores de expressão dos genes diferencialmente expressos em pelo menos uma biblioteca, para estabelecer uma rede de co-expressão gênica, utilizando correlação de Spearman. Desses, apenas 92 genes não apresentaram nenhuma conexão com  $\rho \geq |0,85|$  e os outros 3.180 formaram 34.988 conexões entre si (Figura 1).



**Figura 1** Redes de co-expressão gênica entre genes regulados positivamente (azul) e negativamente (vermelho) pelo estresse com alumínio em 6 horas (A), 54 horas (B) e 246 horas (C). Círculos com borda amarela referem-se à genes anotados como fatores de transcrição com auxílio do software *TF prediction* do banco de dados *PlantTFDB*.

Cerca de 56% do total de genes estão conectados diretamente aos genes regulados pelo estresse em 6 horas, 20,6% aos regulados em 54 horas e 28,3% aos em 246 horas de estresse. Os 344 genes que são regulados positivamente e negativamente formam apenas 84 conexões entre si, porém, estão conectados diretamente a outros 2.306 genes por 32.316 conexões, o que evidencia a complexidade da resposta da planta a presença de Al.

Apesar de haver mais genes relacionados àqueles que são regulados inicialmente no estresse, este grupo (G6h) é o que apresenta menor número médio de conexões, com 26 conexões por gene, seguido do grupo de 54 horas (G54h) com 35,06 conexões por gene e de 246 horas (G246h) com 86,40 conexões por gene. O alto índice de conexões no G246h reflete a alta correlação entre seus perfis de expressão nos tratamentos aplicados, o que indica a regulação transcricional similar destes genes em resposta ao estresse. Isso pode ser explicado, pelo fato de no tempo de 246h a expressão dos genes estarem mais estabilizada, em contrapartida, a resposta inicial ter um caráter mais emergencial e menos homogêneo, resultando em um maior número de genes com comportamento transcricional diferente dos restantes no G6h.

A maior parte dos genes nesta rede de co-expressão apresentou poucas conexões. Entretanto, os genes chaves ou *hubs*, compondo-se daqueles que estão envolvidos em diversas etapas e rotas do estresse, tendem a apresentar um maior número de conexões. Assim, a identificação desses genes é importante para determinar quais são os principais genes relacionados ao estresse. A análise dos genes com mais conexões na rede geral (*hubs*) revelou que, 9 dos 10 genes mais conectados, são provenientes do G246h, fato que pode ser determinante na alta média de conexões por gene deste grupo, visto que nenhum dos *hubs* aparece no G6h. O gene com maior quantidade de conexões na rede geral (*main hub*) aparece no G246h e codifica uma proteína similar à ALS3 de *Arabidopsis thaliana*, que é um transportador ABC conhecida associada à mecanismos de tolerância ao alumínio, sendo responsável pela redistribuição do Al acumulado nos tecidos sensíveis (LARSEN *et al.*, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 2013).

Interessantemente, outro *hub* presente no G246h é pertencente à família *Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)*, similar à proteínas como EcMATE1 de *Eucalyptus camaldulensis* que realiza o efluxo de citrato na rizosfera em resposta ao estresse por alumínio (SAWAKI *et al.*, 2013) e AtFRD3 de *A. thaliana* que intermedeia o transporte de ferro complexado à citrato no xilema (ROGERS e GUERINOT, 2002)(GREEN, 2004)(GREEN,

2004)(GREEN, 2004)(GREEN, 2004)(GREEN, 2004). Além destes transportadores, o grupo G246h possui dois genes que codificam proteínas da família de fatores de transcrição C2H2, similares às proteínas STOP2 e STOP1 (*Sensitive to proton rhizotoxicity*) de *A. thaliana*, que são as principais reguladoras da resposta de tolerância ao alumínio nesta espécie e, especificamente, ativam a transcrição de genes *MATE* e do gene *ALS3* (SAWAKI *et al.*, 2009; KOBAYASHI *et al.*, 2014).

A regulação transcricional realizada através dos fatores de transcrição é de extrema importância, uma vez que eles são responsáveis por desencadear a transcrição de diversos outros genes relacionados ao estresse e, conseqüentemente, podem ser aplicados diretamente no melhoramento genético de plantas (MICKELBART; HASEGAWA; BAILEY-SERRES, 2015). Deste modo, foram identificados no total 203 genes, a partir de sondas diferencialmente expressas nas bibliotecas analisadas, que foram anotados como fatores de transcrição pelo software *TF prediction* do banco de dados *PlantTFDB* (JIN *et al.*, 2017). Porém foi identificada alteração da expressão gênica superior à 100% em apenas 25 genes, por influência do tratamento com alumínio (Tabela 3). Todos os 25 fatores de transcrição influenciados pelo estresse são regulados já em 6 horas de contato com o alumínio, enquanto apenas 8 e 6 deles permanecem regulados em 54 e 246 horas, respectivamente.



**Tabela 2** Genes anotados como fatores de transcrição com variação na expressão gênica superior à 100% por influência do tratamento com alumínio.

| <b>Código em <i>P. trichocarpa</i></b> | <b>Anotação</b> | <b>Regulação 6h</b> | <b>Regulação 54h</b> | <b>Regulação 246h</b> |
|--|-----------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| Potri.017G099800.1                     | MIKC-MADS       | negativa            | positiva             | negativa              |
| Potri.019G011500.1                     | GRAS            | positiva            |                      | positiva              |
| Potri.015G016100.1                     | B3              | positiva            | positiva             | negativa              |
| Potri.015G017000.1                     | B3              | positiva            |                      | negativa              |
| Potri.001G137800.2                     | HD-ZIP          | negativa            | positiva             |                       |
| Potri.012G133800.1                     | ARR-B           | negativa            |                      |                       |
| Potri.003G103500.1                     | NAC             | negativa            |                      |                       |
| Potri.009G117200.2                     | MYB_related     | negativa            |                      |                       |
| Potri.014G047000.1                     | ERF             | negativa            |                      |                       |
| Potri.010G143600.1                     | GRAS            | negativa            |                      |                       |
| Potri.001G214900.1                     | M-type-MADS     | positiva            |                      |                       |
| Potri.001G220500.1                     | NAC             | negativa            |                      |                       |
| Potri.T050600.1                        | ERF             | positiva            |                      |                       |
| Potri.T144800.1                        | MYB             | negativa            | positiva             | positiva              |
| Potri.002G129900.1                     | B3              | negativa            |                      |                       |
| Potri.001G197000.1                     | MYB             | negativa            |                      |                       |
| Potri.001G461000.1                     | bHLH            | negativa            | negativa             |                       |
| Potri.003G214000.1                     | C2H2            | negativa            |                      |                       |
| Potri.012G024200.1                     | NAC             | negativa            |                      | positiva              |
| Potri.012G133700.1                     | LBD             | negativa            | positiva             |                       |
| Potri.005G095100.1                     | GRAS            | positiva            |                      |                       |
| Potri.002G228700.1                     | MYB             | negativa            | positiva             |                       |
| Potri.006G048700.2                     | MIKC-MADS       | negativa            |                      |                       |
| Potri.006G105300.1                     | WRKY            | positiva            | negativa             |                       |
| Potri.010G167500.1                     | MYB             | negativa            |                      |                       |

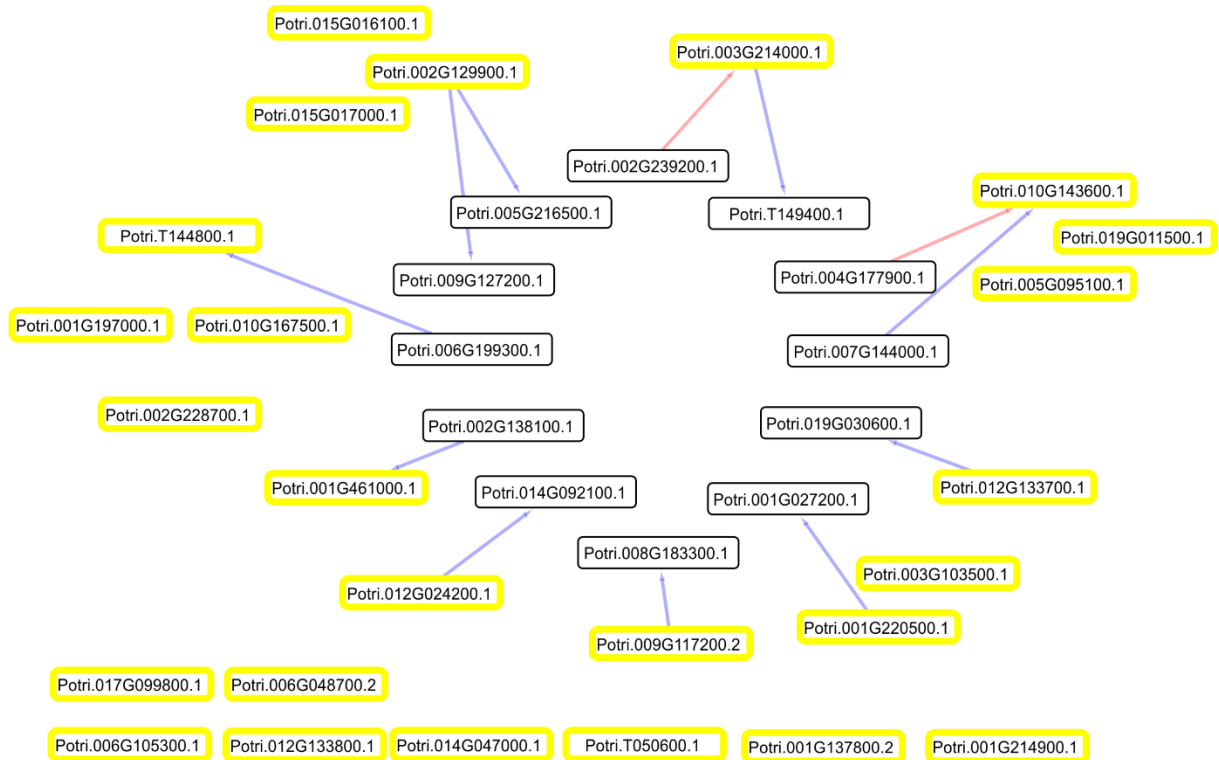
Dentre os fatores de transcrição que possuem regulação em 54 e/ou 246 horas, apenas *Potri.019G011500.1* (*GRAS*) e *Potri.001G461000.1* (*bHLH*) permanecem com regulação compatível à de 6 horas. Isto demonstra que a resposta da planta ao estresse ocorre nas primeiras horas de exposição, com o aumento da expressão dos fatores de transcrição, e a medida que a planta mais responde ao estresse, a expressão desses fatores de transcrição tendem a diminuir.

Fatores de transcrição da família *bHLH* são amplamente distribuídos em diversos reinos, com membros caracterizados em seres humanos, camundongos, mosquitos, leveduras e diversas plantas (SKINNER *et al.*, 2010), porém ainda não há nenhum membro caracterizado em plantas relacionado à resposta ao estresse por toxicidade de alumínio. No entanto, alguns membros desta família em plantas, como *Root hair defective six-like 2 e 3 e 4* (*RSL2*, *RSL3*, *RSL4*) são reguladores positivos do desenvolvimento de radículas (MARZOL *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018). Como há inibição do desenvolvimento das raízes devido a presença de alumínio, isto poderia estar relacionado com a regulação negativa do membro da família *bHLH* identificado. Da mesma maneira, a família *GRAS* possui um membro em plantas (*Scarecrow-like 28*, *SCL8*) que é regulador da alongação e divisão das células da raiz (CHOE *et al.*, 2018), órgão principal afetado pelo estresse em questão.

Dentre estes fatores de transcrição regulados por alumínio, 18 são negativamente regulados pelo estresse em 6 horas, o que pode sugerir seu envolvimento com funções relacionadas ao crescimento e desenvolvimento normal da planta, que podem deixar de serem priorizadas em função da resposta ao estresse. Estes reguladores possuem poucas conexões com outros genes que tiveram variação transcricional superior à 100% por influência do alumínio (Figura 2) e os dentre os genes abordados acima, *Potri.019G011500.1* não apresentou conexões e *Potri.001G461000.1* apenas com uma proteína de domínio indefinido.

Outro fator de transcrição da família *GRAS* (*Potri.01G143600.1*) que é negativamente regulado pelo estresse em 6 horas, apresentou conexões com genes que possuem domínios de quinases e fosfatases de proteínas. Além disso, um fator de transcrição da família *LBD* (*Potri.012G133700*) e outro da família *AP2/B3* (*Potri.002G129900*), também negativamente regulados, correlacionaram-se à genes com domínios de proteínas quinases e de indução por auxina. Interessantemente, o gene com domínio de indução por auxina (*Potri.009G127200*) é pertencente à família *SAUR* (*Small auxin up-regulated*) e já foi demonstrado que a expansão de células de hipocótilo em *A. thaliana* é influenciada pela ação de genes desta família

juntamente com kinases e fosfatases de proteínas (SPARTZ *et al.*, 2014). É possível que a regulação negativa destes genes conectados esteja associada a inibição da expansão de células da raiz por influência da toxicidade por alumínio.

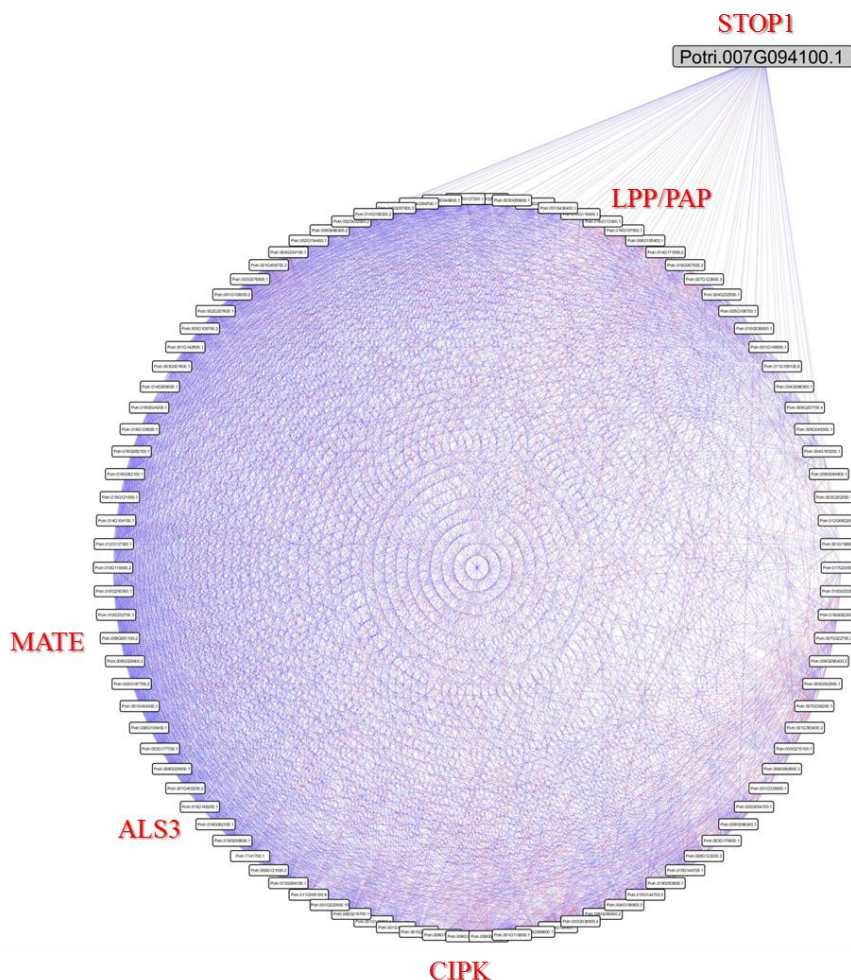


**Figura 2** Rede de co-expressão entre os fatores de transcrição com variação transcricional superior à 100% pelo estresse e genes correlacionados com o mesmo nível de variação. Rede estabelecida com correlações com  $\rho \geq 0,8$ . Círculos com bordas amarelas referem-se a fatores de transcrição, linhas azuis referem-se a correlações positivas e vermelhas a negativas.

Os 203 fatores de transcrição (total) estão conectados a outros 1495 genes por 26343 conexões, enquanto os 25 que são regulados pelo estresse estão conectados à apenas 12 genes, mediante 12 conexões. Em termos gerais, o gene *Potri.007G094100.1* é, dentre os anotados como fatores de transcrição, o que possui maior número de conexões (100) e foi classificado como pertencente à família *C2H2-zinc finger* (Figura 3). Esta família possui membros já caracterizados em várias espécies relacionados à regulação da resposta ao estresse por alumínio, sendo o gene *AtSTOP1* e seus homólogos nas demais espécies estudadas, o principal regulador do mecanismo de tolerância ao Al (SAWAKI *et al.*, 2009; SAWAKI *et al.*, 2014; FAN *et al.*, 2016; DASPUTE *et al.*, 2018).

A partir de análise via algoritmo *blastp* contra o genoma de *A. thaliana*, constatou-se que o gene mais similar à *Potri.007G094100.1* é o *At1G34370*, caracterizado como *AtSTOP1*.

Portanto, existe fortes indícios do Potri.007G094100 ser o responsável por regular os mecanismos de resposta do populus ao Al. A regulação da tolerância ao alumínio, como comentada acima, inicia-se pela sensibilidade das células da raiz à  $Al^{3+}$  e  $H^+$ , o que culmina na regulação, em geral pós-traducional, da proteína STOP1 que, por sua vez, ativa genes relacionados, principalmente, à exsudação de ácidos orgânicos (como *MATEs* e *ALMTs*), homeostase de íons (como *SULTR3*, *NRAMP3* e *HAK5*) e translocação de alumínio (como *ALS3*) (SAWAKI *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2016). Normalmente, a regulação do gene *STOP1* é correlacionada com a de genes que codificam proteínas quinases, e sugere-se que este fato esteja relacionado com a regulação diferencial do *STOP1* em relação a respostas à variações de  $Al^{3+}$  e  $H^+$  (FAN *et al.*, 2016).



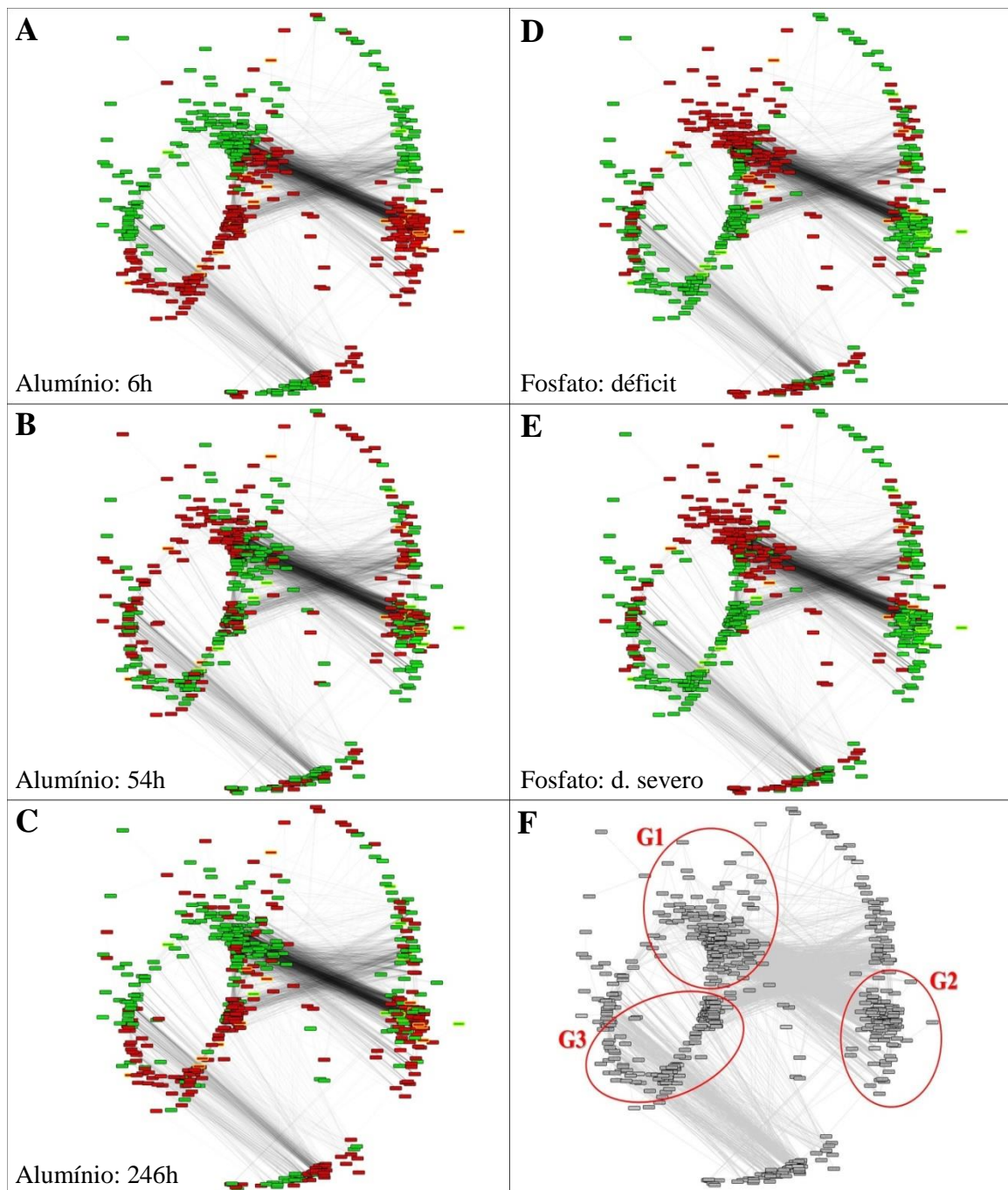
**Figura 3** Conexões diretas do gene *Potri.007G094100.1*, anotado como fator de transcrição da família *C2H2-zinc finger*, ortólogo ao *AtSTOP1* de *A. thaliana* e *main hub* entre os fatores de transcrição identificados. Conexões azuis referem-se à correlações positivas e vermelhas à negativas, entre o gene *Potri.007G094100.1* e os demais 100 genes aos quais está correlacionado, com  $\rho \geq |0,8|$ .

Dentre os 100 genes com perfil transcricional correlacionado ao *Potri.007G094100.1*, foram identificados, via análise por *blastp*, quatro genes em *A. thaliana* que também foram regulados pelo *AtSTOP1* (SAWAKI *et al.*, 2009), são eles *Potri.009G061100.2*, *Potri.016G082100.1*, *Potri.001G222600.1* e *Potri010G119400.1*, similares aos genes *AtMATE*, *AtALS3*, *AtCIPK23*, *AtLPP3/AtPAP1*, respectivamente. Os dois primeiros genes, *AtMATE* e *AtALS3*, como já mencionado, estão envolvidos com o efluxo de citrato e transporte de alumínio, respectivamente, enquanto que *AtCIPK23* está relacionado com a regulação do transporte de íons e *AtLPP3/AtPAP1* são fosfatases de ácidos fosfatídico (SAWAKI *et al.*, 2009).

Além destes genes similares à alvos do fator de transcrição *AtSTOP1* já caracterizados em *A. thaliana*, foi possível identificar alguns domínios conservados nas demais proteínas codificadas pelos genes correlacionados com *Potri.007G094100.1* que podem sugerir envolvimento com respostas à toxicidade do alumínio. Podem ser destacadas proteínas com domínios *Glycosyl-transferases*, uma vez que já foram caracterizadas proteínas deste tipo ativadas pelo alumínio e associadas a modificações na parede celular e proteção contra espécies reativas de oxigênio (DIMITRIEV *et al.*, 2016) e *Serine/threonine kinases* que já foram associadas ao desenvolvimento de raízes sob estresse por deficiência de fosfato em solos ácidos (GAMUYAO *et al.*, 2012). Foram identificados quatro genes com o domínio *Glycosyl transferase* e três com *Serine/threonine kinase*.

Além da elevada concentração de alumínio tóxico em solos ácidos, a baixa disponibilidade de fosfato livre é limitante para as práticas da agricultura (LOPES e GUILHERME, 2016). Algumas respostas ao déficit de fosfato são comuns às respostas à toxicidade por alumínio, como a exsudação de ácidos orgânicos que podem quelatizar os íons  $Al^{3+}$  tóxicos e ainda disponibilizar o fosfato que estava fixado nesse metal (CHEN e LIAO, 2016). Portanto, identificar respostas comuns entre os dois estresses pode ser fundamental para aprimorar a adaptação de plantas cultiváveis a este ambiente. Esta abordagem é possível já que, neste ambiente, as plantas enfrentam ambos os estresses simultaneamente. Afim de comparar a regulação transcricional e as relações entre genes ativados por alumínio e déficit de fosfato, foram utilizados dados de *microarray* em raiz *Populus* spp submetidas a alta, média e baixa concentração de fosfato (E-MTAB-3934), sendo utilizados somente os genes que apresentaram expressão diferencial em pelo menos uma das bibliotecas.

No total foram identificados 550 genes diferencialmente expressos nos experimentos com déficit de fosfato (9 bibliotecas) e estresse por alumínio (18 bibliotecas) que possuem perfis de expressão com correlação  $\rho \geq 0,8$ . Estes genes apresentam 8380 conexões entre si e, a partir da análise da variação transcricional entre o estresse por alumínio e os estresses de fosfato, foi possível identificar três grupos onde a regulação por cada estresse ocorre de maneira diferencial (Figura 4). Foi considerado os genes diferencialmente expressos no estresse brando de fosforo, os que apresentaram diferenças significativas entre as bibliotecas de alta e média concentração de fosfato, enquanto que, o estresse severo é em relação a concentração alta e baixa de fosfato.



**Figura 4** Redes de co-expressão entre genes regulados por deficiência de fosfato e toxicidade de alumínio. Em verde, genes regulados positivamente (estresse/condição normal > 1) e em vermelho genes regulados negativamente (estresse/condição normal < 1). A- Regulação pelo estresse com alumínio em 6 horas; B- regulação pelo estresse com alumínio em 54 horas; C- regulação pelo estresse com alumínio em 246 horas; D- regulação por déficit normal de fosfato; E- regulação por déficit severo de fosfato; F- grupos de genes que apresentam regulações diferenciais entre os dois estresses, G1, G2 e G3.

A separação dos grupos destacados na Figura 4 foi baseada na topologia da rede de co-expressão entre os genes regulados por déficit de fosfato e toxidez de Al. O grupo 1 (G1) é composto por genes (1) regulados positivamente em 6 e 246 horas de estresse com alumínio, (2) regulados positivamente e negativamente em 54 horas com o mesmo estresse e (3)

negativamente pelos déficits de fosfato normal e severo. Já os grupos 2 e 3 (G2 e G3) o comportamento é o inverso ao relatado para G1, sendo os genes do G2 mais distantes dos demais grupos. Em consideração ao fato de que o estresse por alumínio causou mais variações transcricionais, mudanças fisiológicas e morfológicas em 6 horas (GRISEL *et al.*, 2010) é possível interpretar que os genes alocados em G1 são, majoritariamente, ativados pelo alumínio tóxico e inibidos durante o déficit de fosfato e que os genes alocados em G2 e G3 apresentam o perfil oposto, sendo regulados negativamente pelo alumínio e positivamente pelo déficit de fosfato.

Afim de analisar as especificidades de cada grupo, foi realizada uma análise via software *Blast2GO* para G1, G2 e G3, separadamente. Em relação à classe “*Celular component*”, G1 e G2 apresentaram perfil de distribuição similar entre as subclasses “*Membrane*”, “*Intracellular*” e “*Organelle*”, com maiores quantidades de sequências na segunda subclasse (*Intracellular*), acompanhado de *Membrane* e por fim *Organelle*. Já os genes do G3 possuem a “*Organelle*” como segunda subclasse mais representativa (tabela 3). Além disso, é interessante ressaltar que G1 possui genes alocados na subclasse “*Ribosome*” (11 genes), que é exclusiva para este grupo; G2 apresenta genes possivelmente relacionados à fotossíntese, por estarem exclusivamente presentes subclasses como “*Chloroplast*” (3 genes), “*Photossintetic membrane*” (3 genes) e “*Thylacoid part*” (3 genes) e G3 possui a maior quantidade de genes alocados nas subclasses “*Nucleus*” (7 genes) e “*cytoeskeleton*” (4 genes).

Para a classe “*Molecular function*”, o G2 e G3 possuem genes mais alocados na subclasse “*Binding*” em relação à subclasse “*Catalytic activity*”, ao contrário de G1 (Tabela 3). G1 é o único grupo que apresenta 3 subclasses relacionadas à atividade catalítica, “*Oxidoreductase*” (13 genes), “*Transferase*” (22 genes) e “*Hydrolase*” (19 genes) e não apresentou subclasses presentes nos outros dois grupos, como “*Protein binding*” e “*DNA binding*”. Vale ressaltar também que G3 possui, exclusivamente, genes alocados nas subclasses “*Protein kinase activity*” (8 genes) e “*Pyrophosphate activity*” (8 genes).

Já para a classe “*Biological process*”, não foi observada similaridade entre a distribuição dos genes de cada grupo nas subclasses, porém, G2 e G3 apresentaram um perfil mais similar em relação à G1 (tabela 3). Em relação às especificidades identificadas para cada grupo, G1 possui exclusivamente a subclasse “*Cellular amino acid metabolic process*” (9 genes), G2 possui genes alocados na subclasse “*Photosynthesis*” (4 genes) e G3 possui genes agrupados em diversas classes relacionadas ao metabolismo de RNAs, como “*RNA metabolic*



*process*" (14 genes), *"RNA processing"* (5 genes), *"ncRNA metabolic process"* (6 genes), *"Transcription, DNA-templated"* (6 genes).

**Tabela 3** Discriminação dos perfis de distribuição dos genes pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 nas classes e subclasses do primeiro nível da análise em software Blast2GO. As porcentagens referem-se ao número de genes em relação ao número total de genes em cada grupo.

| Subclasses (Blast2GO)                                 | Classes (Blast2GO) e porcentagens de genes pertencentes em relação ao total de cada grupo |                    |                    |
|---|---|--------------------|--------------------|
| <b>Celular componente</b>                             | <b>G1 (28,73%)</b>  | <b>G2 (20,83%)</b> | <b>G3 (25%)</b>    |
| <b>Membrane</b>                                       | 11,49%  | 10,41%             | 7,26%              |
| <b>Intracellular</b>                                  | 15,51%  | 14,58%             | 117,74%            |
| <b>Organelle</b>                                      | 10,34%  | 9,37%              | 12,90%             |
| <b>Molecular function</b>                             | <b>G1 (63,21%)</b>  | <b>G2 (56,25%)</b> | <b>G3 (45,40%)</b> |
| <b>Catalytic activity</b>                             | 37,93%  | 15,62%             | 27,42%             |
| <b>Binding</b>  | 30,45%  | 40,62%             | 52,42%             |
| <b>Biological function</b>                            | <b>G1 (51,15%)</b>  | <b>G2 (37,5%)</b>  | <b>G3 (47,58%)</b> |
| <b>Metabolic process</b>                              | 37,36%  | 27,08%             | 29,84%             |
| <b>Cellular process</b>                               | 33,33%  | 27,08%             | 32,25%             |
| <b>Localization</b>                                   | 10,34%  | 5,21%              | 8,87%              |
| <b>Biological regulation</b>                          | 6,32%   | 6,25%              | 11,29%             |
| <b>Single organism process</b>                        | 22,99%  | 21,87%             | 12,90%             |
| <b>Cellular component, organization or biogenesis</b> | 10,34%  | 6,25%              | 5,64%              |
| <b>Response to stimulus</b>                           | n.d.  | 3,12%              | 4,03%              |

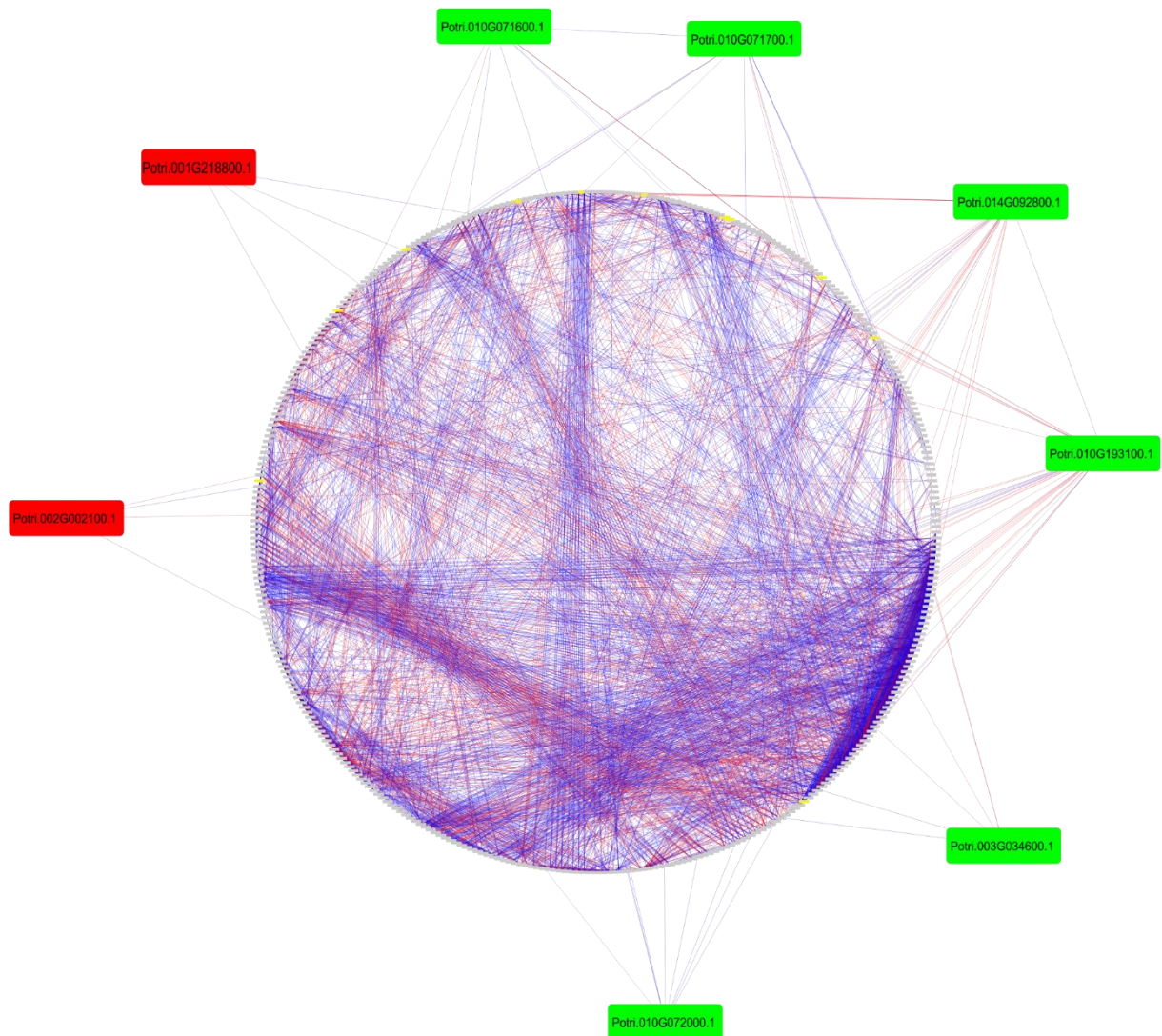
Os genes agrupados em G1, que são ativados por alumínio, apresentaram características específicas na análise por Blast2GO condizentes com o observado fisiologicamente e morfológicamente nas plantas estressadas por alumínio. O número elevado de genes (em relação à G2 e G3) anotados com função catalítica, como transferases, hidrolases e oxidoredutases regulados positivamente pelo alumínio e não pelo déficit de fosfato pode estar relacionado aos mecanismos de proteção ativados pela planta para sobreviver ao estresse (GRISEL *et al.*, 2010; DIMITRIEV *et al.*, 2016). As análises em relação aos genes de G2 não revelaram especificidades, apesar de conter poucos genes possivelmente envolvidos na fotossíntese, observação que não é elucidativa pois foram usadas apenas bibliotecas derivadas de raízes nesta análise. Como mencionado acima, é possível que alguns genes deste grupo, apesar de serem ativados pelo déficit de fosfato, não estejam envolvidos em processos distantes dos relacionados à G1, já que o critério usado para definição da regulação gênica foi abrangente e os genes destes dois grupos estão conectados na rede de co-expressão.

Genes ativados por fosfato e não ativados por alumínio agrupados em G3 apresentaram, exclusivamente, classes relacionadas a proteínas quinases, pirofosfatases e processos relacionados ao metabolismo de RNA. Considerando a distância deste grupo na rede de co-expressão (Figura 4) em relação aos G1 e G2 e este perfil específico identificado por análise via Blast2GO, é interessante observar que uma parte significativa da regulação da resposta ao déficit de fosfato é dependente de modificações pós-transcricionais e pós-traducionais (LAN *et al.*, 2015) e, portanto, os genes alocados no grupo 3 podem estar relacionados a regulações deste nível dos mecanismos de resposta à falta de fosfato.

Para identificar mecanismos comuns aos dois estresses é necessária a análise dos genes que possuem a mesma regulação para as respostas à toxicidade por alumínio e déficit de fosfato. Entre os genes expressos em 6, 54 e 246 horas de estresse há discrepância no tipo de regulação transcricional (positiva ou negativa), portanto, para fins de comparação, foram utilizadas as informações de regulação às 6 horas de estresse por alumínio, tempo no qual foram constatadas mais variações transcricionais, e do estresse severo por déficit de fosfato.

Neste contexto, foi utilizado com critério de regulação positiva ou negativa, variação transcricional igual ou acima de 20%, para que genes com comportamento “constante” entre os dois estresses pudessem ser identificados. Genes que foram regulados negativamente em

um estresse e positivamente em outro foram excluídos da análise. Por fim, foi gerada uma rede de co-expressão com 380 genes, conectados por 4.159 conexões (Figura 5).



**Figura 5:** Rede de co-expressão entre genes com mesmo perfil de regulação transcricional em relação à toxicidade por alumínio e déficit de fosfato. Retângulos verdes referem-se à genes ativados e vermelhos à inibidos por ambos os estresses; retângulos cinzas à borda do círculo referem-se à genes com expressão considerada constante entre os dois estresses (variação abaixo de 20%). Conexões azuis referem-se à correlações positivas e vermelhas à negativas, com  $p \geq 0,8$ .

Do total, apenas 8 genes possuem variação transcricional igual ou superior à 20%, sendo 5 regulados positivamente e 2 negativamente, por ambos os estresses (Tabela4). Estes 8 genes correlacionam-se a outros 77 genes por 486 conexões e, dentre os genes regulados, *Potri.010G193100* é o que possui maior número de conexões, com 37 no total. Com o intuito de analisar possíveis funções dos genes considerados regulados por ambos estresses, estes foram anotados com base em *blastp* contra o banco de dados de *A. thaliana* (Tabela 4) e,

apenas uma proteína, codificada pelo gene *Potri.002G002100*, apresentou similaridade com proteínas de função ainda desconhecida.

**Tabela 4** Descrição dos genes de *P. thricocarpa* com o mesmo perfil de regulação por déficit de fosfato e toxicidade de alumínio.

| Gene                    | Best hit em <i>A. thaliana</i> | Anotação em <i>A. thaliana</i>                                 | Variação |          | Regulação       |
|-------------------------|--------------------------------|--|----------|----------|-----------------|
|                         |                                |  | Fósforo  | Alumínio |                 |
| <b>Potri.003G034600</b> | AT1G17710.1                    | <i>AtPEPC1</i><br>(fosfoetanolamina/fosfocolina phosphatase 1) | 1,845046 | 1,220214 | <b>positiva</b> |
| <b>Potri.010G071600</b> | AT2G38940.1                    | <i>AtPT2/AtPHT1;4</i><br>(transportador de fosfato)            | 1,673688 | 1,230394 | <b>positiva</b> |
| <b>Potri.010G071700</b> | AT2G38940.1                    | <i>AtPT2/AtPHT1;4</i><br>(transportador de fosfato)            | 1,561246 | 1,226014 | <b>positiva</b> |
| <b>Potri.001G218800</b> | AT3G44350.2                    | <i>AtANAC61</i> (contém domínio NAC)                           | 0,745537 | 0,753407 | <b>negativa</b> |
| <b>Potri.002G002100</b> | AT1G21010.1                    | <i>Função desconhecida</i>                                     | 0,748707 | 0,631502 | <b>negativa</b> |
| <b>Potri.010G072000</b> | AT2G38940.1                    | <i>AtPT2/AtPHT1;4</i><br>(transportador de fosfato)            | 1,738861 | 1,274632 | <b>positiva</b> |
| <b>Potri.014G092800</b> | AT5G24090.1                    | <i>AtCHIA/AtLYS1</i> (kitinase A/Lisozima1)                    | 1,254137 | 2,475638 | <b>positiva</b> |
| <b>Potri.010G193100</b> | AT2G38080.1                    | <i>AtALMCO4</i> (Laccase-like multi-copper oxidase)            | 1,226961 | 4,14973  | <b>positiva</b> |

No entanto, metade dos genes identificados nesta análise *Potri.003G034600*, *Potri.010G071600*, *Potri.010G071700* e *Potri.010G072000*, foram relacionados a funções já relatadas como induzidas pelo déficit de fosfato. O primeiro gene é similar à *AtPEPC1*, que é relatado como responsivo ao déficit de fosfato, e a proteína codificada por ele está relacionada à hidrólise de lipídeos (fosfoetanolamina) para mineralização e reciclagem interna de fosfato em condições de déficit (TANNERT *et al.*, 2017). Os três últimos genes mencionados são

similares à *AtPT2/AtPHT1;4*, que é um dos genes principais que codificam proteínas transportadoras de fosfato, que intermedeiam o influxo deste elemento da rizosfera para o interior da raiz (AYADI *et al.*, 2015). Além disso, estes três genes já foram estudados em *Populus* spp. e estão anotados como *PtPHT1.5* (*Potri.010G071700*), *PtPHT1.6* (*Potri.010G071600*) e *PtPHT1.7* (*Potri.010G072000*), membros da família de transportadores de fosfato, tendo sido demonstrado que *PtPHT1.6* é expresso exclusivamente em raízes e, juntamente com *PtPHT1.5*, é mais expresso em condições de fosfato normais e baixas em relação às condições com alta suplementação deste elemento (ZHANG *et al.*, 2016).

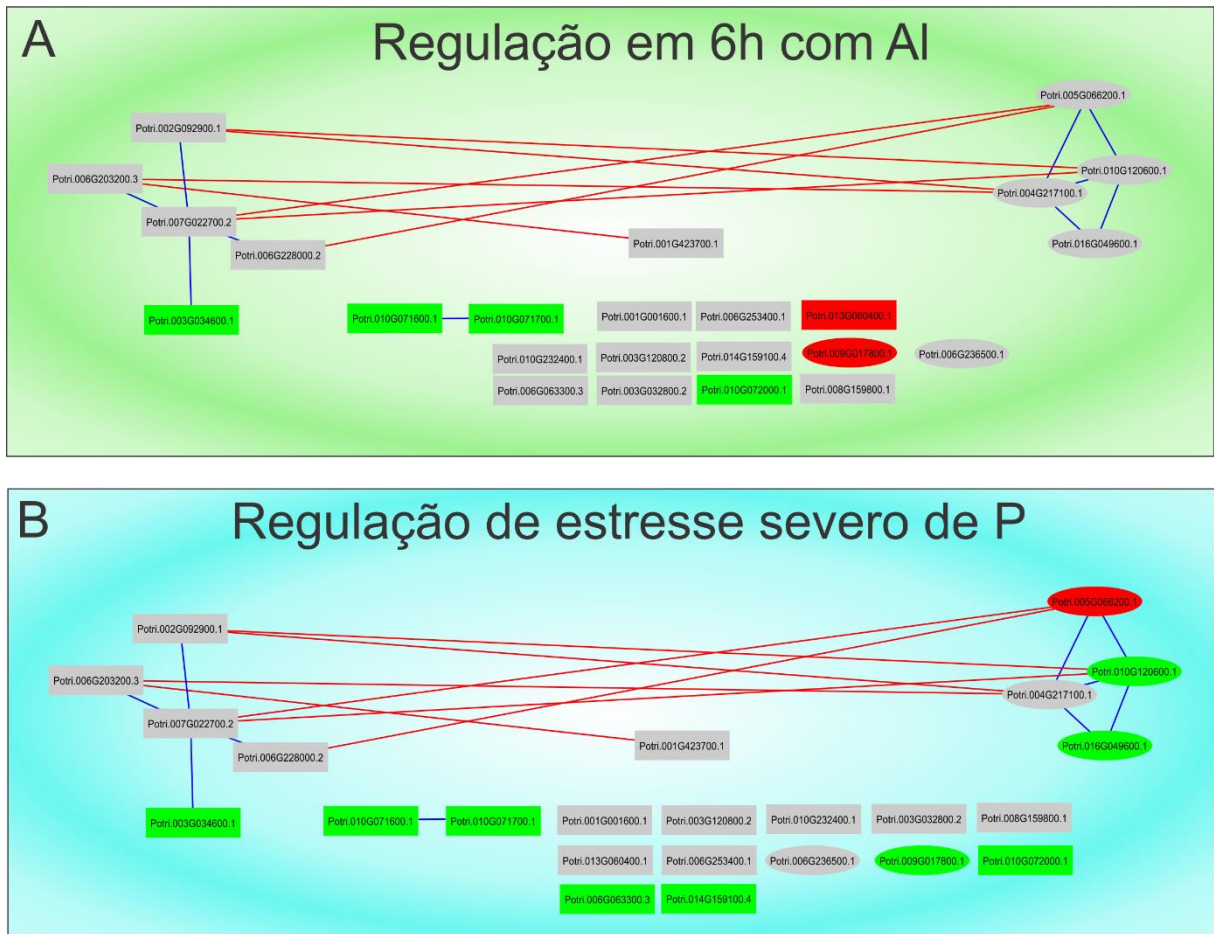
Os quatro genes identificados em *Populus*, das famílias *PHT* e *PEPC* são ativados nos dois estresses com variação superior à 20%, no entanto, ainda não há relatos na literatura do envolvimento de genes destas duas famílias com mecanismos de resposta à toxicidade de alumínio. É possível que a regulação positiva do gene *Potri.003G034600* (*PEPC*) na presença de alumínio esteja associada a mudanças na camada de fosfolípidos da membrana de células da raiz, já que este é o primeiro sítio de interação com o íon  $Al^{3+}$  e que a ativação de transportadores de fosfato esteja relacionada com a redução da disponibilidade deste elemento inerente à condição de alumínio disponível, sugerindo a possibilidade de estratégias co-evoluídas para resposta à estes dois estresses.

O gene *Potri.001G218800* que codifica uma proteína similar à *AtNAC61*, a qual não foi especificamente caracterizada, porém, em *Oryza sativa*, cerca de 25 fatores de transcrição membros da família NAC são regulados pelo contato com alumínio tóxico, sendo a maioria ativada pelo estresse (ALVARADO *et al.*, 2017). No caso da presente análise, este fator de transcrição putativo foi inibido tanto pelo estresse de alumínio quanto pelo déficit de fosfato, efeito ainda não destacado na literatura, no entanto, esta família de fatores de transcrição é ampla e associada a respostas variadas à diversos estresses (JENSEN e SKRIVER, 2014), portanto, mais estudos são necessários para associar o papel destes genes nos estresses abordados.

Do mesmo modo, ainda não há relações destacadas na literatura entre o gene *AtCHIA/AtLYS1* de *A. thaliana* (similar à *Potri.014G092800*), porém este codifica uma proteína com atividade de lisozima, sendo possível a associação desta atividade de quebra de carboidratos de alto peso molecular com as modificações que podem ocorrer na membrana plasmática em decorrência de ambos os estresses estudados. Por fim, o gene *Potri.010G0193100* codifica uma proteína similar à *AtALMCO4/LAC4* que está relacionada

com a biossíntese de lignina (WANG *et al.*, 2015). Interessantemente, há relatos de deposição de lignina em raízes de *Triticum aestivum* e *Eucalyptus* spp. em função de estresse por alumínio (SASAKI *et al.*, 1996; KAHARA *et al.*, 2005), porém não em relação ao déficit de fosfato.

Em análise de quatro experimentos com dados transcriptômicos amplos de *A. thaliana* submetida ao déficit de fosfato foram identificados 95 genes responsivos ao estresse em todos os experimentos, e foram denominados “Core PSR genes” (genes centrais responsivos ao déficit de fosfato (GCRDF)) (LAN *et al.*, 2015). Para o estresse em relação ao alumínio tóxico, como já abordado anteriormente, a rede de regulação conhecida está associada aos genes regulados pelo fator de transcrição *STOP1* em *A. thaliana* (SAWAKI *et al.*, 2009). Portanto, via análise por *blastp*, foram identificados genes que codificam proteínas similares às reguladas por *STOP1* em *A. thaliana* e às proteínas codificadas pelos “GCRDF”. Foram utilizados apenas genes da rede de co-expressão relacionada aos estresses por alumínio e déficit de fosfato, afim de observar as relações estabelecidas (Figura 6).



**Figura 6** Correlações ( $\rho \geq |0,8|$ ) entre genes que codificam proteínas similares às responsivas ao déficit de fosfato (retângulos) e reguladas pelo fator de transcrição *STP1* em *A. thaliana* (elipses). A- Perfil de regulação em 6 horas de estresse com alumínio; B- perfil de regulação em estresse severo por déficit de fosfato. Cor verde representa regulação positiva e vermelha negativa, conexões azuis representam correlações positivas e vermelhas, negativas.

Como pode ser observado, os genes similares aos regulados por *STP1* em *A. thaliana* não possuem correlações positivas com os genes “Core PSR”. Isso pode sugerir que, apesar dos dois estresses serem simultâneos em solos ácidos, podem haver mecanismos de resposta associados a cada estresse de maneira específica. Estes genes foram anotados com diversas funções já relacionadas ao déficit de fosfato e resposta à toxicidade por alumínio (Apêndice A) (SAWAKI *et al.*, 2009; LAN *et al.*, 2015) e, portanto, podem estar relacionados à resposta a estes dois estresses de maneira distinta em *Populus* spp.

#### 4 CONCLUSÃO

A abordagem geral das modificações transcricionais relacionadas aos estresses por déficit de fosfato e toxidez de alumínio permitiu a construção de redes de co-expressão gênica

que destacaram características específicas das respostas a cada estresse, bem como características comuns à ambos, que devem ser analisadas mais profundamente e comprovadas mediante ensaios específicos. Dentre os destaques abordados, é interessante ressaltar que genes similares aos comumente ativados pelo déficit de fosfato não apresentaram correlações positivas diretas com genes similares aos ativados pelo fator de transcrição *STOP1*, regulador central da tolerância ao alumínio, o que evidencia a distinção das principais respostas a estes dois estresses comuns à solos ácidos.

Além disso, foram identificados neste trabalho 8 genes que possuem o mesmo perfil de regulação perante os dois estresses, que podem ser alvos de estudos futuros para o entendimento de mecanismos de tolerância interligados para o déficit de fosfato e toxidez por alumínio. Estas constatações e futuras interpretações a partir dos dados gerados neste trabalho podem auxiliar a ampliação do conhecimento à respeito dos dois principais problemas enfrentados no cultivo de plantas em solos ácidos, e poderá contribuir o desenvolvimento da agricultura moderna.

## REFERENCIAS

AYADI, A., DAVID, P., ARRIGHI, J.F., CHIARENZA, S., THIBAUD, M.C., NUSSAUME, L. AND MARIN, E. Reducing the genetic redundancy of Arabidopsis PHOSPHATE TRANSPORTER1 transporters to study phosphate uptake and signaling. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 167, n. 4, p.1511-1526, 2015.

CHOE, J.E., KIM, B., YOON, E.K., JANG, S., KIM, G., DHAR, S., LEE, S.A. AND LIM, J. Characterization of the GRAS transcription factor SCARECROW-LIKE 28's role in Arabidopsis root growth. **Journal of Plant Biology**: Berlin Heidelberg, v. 60, n. 5, p.462-471, 2017.

DASPUTE, A.A., KOBAYASHI, Y., PANDA, S.K., FAKRUDIN, B., KOBAYASHI, Y., TOKIZAWA, M., IUCHI, S., CHOUDHARY, A.K., YAMAMOTO, Y.Y. AND KOYAMA, H. Characterization of CcSTOP1; a C2H2-type transcription factor regulates Al tolerance gene in pigeonpea. **Planta**: Berlin Heidelberg, v. 247, n. 1, p.201-214, 2018.

DMITRIEV, A.A., KRASNOV, G.S., ROZHMINA, T.A., KISHLYAN, N.V., ZYABLITSIN, A.V., SADRITDINOVA, A.F., SNEZHKINA, A.V., FEDOROVA, M.S., YURKEVICH, O.Y., MURAVENKO, O.V. AND BOLSHEVA, N.L. Glutathione S-transferases and UDP-glycosyltransferases are involved in response to aluminum stress in flax. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 7, p.1920, 2016.



FAN, W., LOU, H.Q., YANG, J.L. AND ZHENG, S.J. The roles of STOP1-like transcription factors in aluminum and proton tolerance. **Plant signaling & behavior**: London, v. 11, n. 2, p. e1131371, 2016.

GRISEL, N., ZOLLER, S., KÜNZLI-GONTARCZYK, M., LAMPART, T., MÜNSTERKÖTTER, M., BRUNNER, I., BOVET, L., Métraux, J.P. and Sperisen, C. Transcriptome responses to aluminum stress in roots of aspen (*Populus tremula*). **BMC plant biology**: London, v.10, n. 1, p.185, 2010.

GAMUYAO, R., CHIN, J.H., PARIASCA-TANAKA, J., PESARESI, P., CATAUSAN, S., DALID, C., SLAMET-LOEDIN, I., TECSON-MENDOZA, E.M., WISSUWA, M. AND HEUER, S. The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. **Nature**: London, v. 488, n. 7412, p.535, 2012.

GAUTIER, L. et al. Affy - Analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. **Bioinformatics**: Oxford, v. 20, n. 3, p. 307–315, 2004.

GREEN, L. S. FRD3 Controls Iron Localization in Arabidopsis. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 136, n. 1, p. 2523–2531, 2004.

HEUER, S., GAXIOLA, R., SCHILLING, R., HERRERA-ESTRELLA, L., LÓPEZ-ARREDONDO, D., WISSUWA, M., DELHAIZE, E. AND ROUACHED, H. Improving phosphorus use efficiency: a complex trait with emerging opportunities. **The Plant Journal**: Oxford, v. 90, n. 5, p.868-885, 2017.

JANZ, D. et al. Pathway analysis of the transcriptome and metabolome of salt sensitive and tolerant poplar species reveals evolutionary adaption of stress tolerance mechanisms. **BMC plant biology**: London, v. 10, p. 150, 2010.

JENSEN, M.K. AND SKRIVER, K. NAC transcription factor gene regulatory and protein–protein interaction networks in plant stress responses and senescence. **IUBMB life**: New York, v. 66, n. 3, p.156-166, 2014.

JIN, J., TIAN, F., YANG, D.C., MENG, Y.Q., KONG, L., LUO, J. AND GAO, G. PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. **Nucleic acids research**: London, p.gkw982, 2016.

KAUFFMANN, A. et al. Importing ArrayExpress datasets into R/Bioconductor. **Bioinformatics**: Oxford, v. 25, n. 16, p. 2092–2094, 2009.

KAVKA, M. AND POLLE, A., 2017. Dissecting nutrient-related co-expression networks in phosphate starved poplars. **PLoS one**: Cambridge, v. 12, n. 2, p.e0171958, 2017

KAVKA, M. AND POLLE, A. Phosphate uptake kinetics and tissue-specific transporter expression profiles in poplar (*Populus× canescens*) at different phosphorus availabilities. **BMC plant biology**: London, v. 16, n. 1, p.206, 2016.

- KOBAYASHI, Y., OHYAMA, Y., KOBAYASHI, Y., ITO, H., IUCHI, S., FUJITA, M., ZHAO, C.R., TANVEER, T., GANESAN, M., KOBAYASHI, M. AND KOYAMA, H. STOP2 activates transcription of several genes for Al-and low pH-tolerance that are regulated by STOP1 in Arabidopsis. **Molecular plant**: [S.l.: s.n.], v. 7, n. 2, p.311-322, 2014.
- KOCHIAN, L.V., PIÑEROS, M.A., LIU, J. AND MAGALHAES, J.V. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**: [S.l.: s.n.], v. 66, p.571-598, 2015.
- LAN, P., LI, W. AND SCHMIDT, W. 'Omics' Approaches Towards Understanding Plant Phosphorus Acquisition and Use. **Annual Plant Reviews**: [S.l.: s.n.], 2015
- LARSEN, P.B., GEISLER, M.J., JONES, C.A., WILLIAMS, K.M. AND CANCEL, J.D. 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, 2005.
- LIU, W., XIONG, C., YAN, L., ZHANG, Z., MA, L., WANG, Y., LIU, Y. AND LIU, Z. Transcriptome analyses reveal candidate genes potentially involved in al stress response in alfalfa. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 8, p.26, 2017
- LIU, X., GRABHERR, H.M., WILLMANN, R., KOLB, D., BRUNNER, F., BERTSCHE, U., KÜHNER, D., FRANZ-WACHTEL, M., AMIN, B., FELIX, G. AND ONGENA, M. Host-induced bacterial cell wall decomposition mediates pattern-triggered immunity in Arabidopsis. **Elife**: [S.l.: s.n.], v. 3, 2014.
- MARZOL, E., BORASSI, C., JUÁREZ, S.P.D., MANGANO, S. AND ESTEVEZ, J.M. RSL4 takes control: multiple signals, one transcription factor. **Trends in Plant Science**: Kidlington, v. 22, n. 7, p.553-555, 2017.
- MICKELBART, M. V.; HASEGAWA, P. M.; BAILEY-SERRES, J. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. **Nature Reviews Genetics**: London, v. 16, n. 4, p. 237–251, 2015.
- MORENO-ALVARADO, M., GARCÍA-MORALES, S., TREJO-TÉLLEZ, L.I., HIDALGO-CONTRERAS, J.V. AND GÓMEZ-MERINO, F.C. Aluminum enhances growth and sugar concentration, alters macronutrient status and regulates the expression of NAC transcription factors in rice. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 8, p.73, 2017
- NUNES-NESE, A., BRITO, D.S., INOSTROZA-BLANCHETEAU, C., FERNIE, A.R. AND ARAÚJO, W.L. The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends in Plant Science**: Kidlington, v. 19, n. 6, p.399-407, 2014.
- ROGERS, E.E. AND GUERINOT, M.L. FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in Arabidopsis. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 14, n. 8, p.1787-1799, 2002.
- SALGADO, L.R., LIMA, R., DOS SANTOS, B.F., SHIRAKAWA, K.T., DE ALMEIDA VILELA, M., ALMEIDA, N.F., PEREIRA, R.M., NEPOMUCENO, A.L. AND CHIARI, L. De novo RNA sequencing and analysis of the transcriptome of signalgrass (Urochloa

decumbens) roots exposed to aluminum. **Plant Growth Regulation:** Amsterdã, v. 83, n. 1, p.157-170, 2017.

SASAKI, M., YAMAMOTO, Y. AND MATSUMOTO, H. Lignin deposition induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum*) roots. **Physiologia Plantarum:** Malden, v. 96, n. 2, p.193-198, 1996.

SAWAKI, Y., KOBAYASHI, Y., KIHARA-DOI, T., NISHIKUBO, N., KAWAZU, T., KOBAYASHI, M., KOBAYASHI, Y., IUCHI, S., KOYAMA, H. AND SATO, S., 2014. Identification of a STOP1- like protein in *Eucalyptus* that regulates transcription of Al tolerance genes. **Plant Science:** Amsterdã, v. 223, p.8-15, 2014.

SAWAKI, Y., KIHARA-DOI, T., KOBAYASHI, Y., NISHIKUBO, N., KAWAZU, T., KOBAYASHI, Y., KOYAMA, H. AND SATO, S. Characterization of Al-responsive citrate excretion and citrate-transporting MATEs in *Eucalyptus camaldulensis*. **Planta:** Berlin Heidelberg, v. 237, n. 4, p.979-989, 2013.

SAWAKI, Y., IUCHI, S., KOBAYASHI, Y., KOBAYASHI, Y., IKKA, T., SAKURAI, N., FUJITA, M., SHINOZAKI, K., SHIBATA, D., KOBAYASHI, M. AND KOYAMA, H. STOP1 regulates multiple genes that protect *Arabidopsis* from proton and aluminum toxicities. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 150, n. 1, p.281-294, 2009.

SINGH, S., TRIPATHI, D.K., SINGH, S., SHARMA, S., DUBEY, N.K., CHAUHAN, D.K. AND VACULÍK, M. Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review. **Environmental and Experimental Botany:** Amsterdã, v. 137, p.177-193, 2017.

SKINNER, M.K., RAWLS, A., WILSON-RAWLS, J. AND ROALSON, E.H. Basic helix-loop-helix transcription factor gene family phylogenetics and nomenclature. **Differentiation**, v. 80, n. 1, p.1-8, 2010.

SPARTZ, A.K., REN, H., PARK, M.Y., GRANDT, K.N., LEE, S.H., MURPHY, A.S., SUSSMAN, M.R., OVERVOORDE, P.J. AND GRAY, W.M. SAUR inhibition of PP2C-D phosphatases activates plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases to promote cell expansion in *Arabidopsis*. **The Plant Cell:** Waterbury, v. 26, n. 5, p.2129-2142, 2014.

SUN, X.H., YU, G., LI, J.T., JIA, P., ZHANG, J.C., JIA, C.G., ZHANG, Y.H. AND PAN, H.Y. A heavy metal-associated protein (AChMA1) from the halophyte, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt., confers tolerance to iron and other abiotic stresses when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 8, p.14891-14906, 2014.

TAHARA, K., NORISADA, M., HOGETSU, T. AND KOJIMA, K. Aluminum tolerance and aluminum-induced deposition of callose and lignin in the root tips of *Melaleuca* and *Eucalyptus* species. **Journal of Forest Research:** [S.l.: s.n.], v. 10, n. 4, p.325-333, 2005.

TANNERT, M., MAY, A., DITFE, D., BERGER, S., BALCKE, G.U., TISSIER, A. AND KÖCK, M. Pi starvation-dependent regulation of ethanolamine metabolism by phosphoethanolamine phosphatase PECP1 in *Arabidopsis* roots. **Journal of experimental botany**, 2017

XU, J.M., FAN, W., JIN, J.F., LOU, H.Q., CHEN, W.W., YANG, J.L. AND ZHENG, S.J. Transcriptome analysis of Al-induced genes in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) root apex: New insight into Al toxicity and resistance mechanisms in an Al accumulating species. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 8, p.1141, 2017.

WANG, J., FENG, J., JIA, W., CHANG, S., LI, S. AND LI, Y. Lignin engineering through laccase modification: a promising field for energy plant improvement. **Biotechnology for biofuels**: New York, v. 8, n. 1, p.145, 2015.

ZHANG, C., MENG, S., LI, M. AND ZHAO, Z. Genomic identification and expression analysis of the phosphate transporter gene family in poplar. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 7, p.1398, 2016.

ZHANG, C., SIMPSON, R.J., KIM, C.M., WARTHMANN, N., DELHAIZE, E., DOLAN, L., BYRNE, M.E., WU, Y. AND RYAN, P.R. Do longer root hairs improve phosphorus uptake? Testing the hypothesis with transgenic *Brachypodium distachyon* lines overexpressing endogenous RSL genes. **New Phytologist**: London, 2018.

**APÊNDICE A** - Descrição dos genes regulados por déficit de fósforo e *STOP1* em *A. thaliana* identificados em *P. trichocarpa*.

| Gene               | Grupo | Anotação ( <i>A. thaliana</i> )                      | Alumínio (6h) |          | Déficit severo de P |          |
|--------------------|-------|--|---------------|----------|---------------------|----------|
|                    |       |  | Regulação     | Variação | Regulação           | Variação |
| Potri.010G120600.1 | STOP1 | Class I glutamine amido transferase                  | CONST         | 0,944928 | up                  | 1,434528 |
| Potri.016G049600.1 | STOP1 | Polygalacturonase inhibiting protein                 | CONST         | 1,059747 | up                  | 1,300667 |
| Potri.009G017800.1 | STOP1 | Aluminium activated malate transporter               | down          | 0,521916 | up                  | 1,313935 |
| Potri.006G236500.1 | STOP1 | Malic enzyme   | CONST         | 1,061843 | CONST               | 0,860748 |
| Potri.005G066200.1 | STOP1 | S-adenosil-L-methionine dependent methyl transferase | CONST         | 0,963972 | down                | 0,8156   |
| Potri.004G217100.1 | STOP1 | STOP2  | CONST         | 1,102479 | CONST               | 0,844238 |
| Potri.007G022700.2 | PSR   | Pyrophosphorilase                                    | CONST         | 1,045632 | CONST               | 1,031644 |
| Potri.002G092900.1 | PSR   | Protein of unknown function                          | CONST         | 1,112129 | CONST               | 0,950276 |
| Potri.003G034600.1 | PSR   | Phosphoethanolamine/Phosphocholine Phosphatase       | up            | 1,220214 | up                  | 1,845046 |
| Potri.001G423700.1 | PSR   | Purple acid phosphatase                              | CONST         | 1,057528 | CONST               | 0,92748  |
| Potri.003G120800.2 | PSR   | Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase               | CONST         | 0,928615 | CONST               | 1,084203 |
| Potri.010G072000.1 | PSR   | Phosphate transporter                                | up            | 1,274632 | up                  | 1,738861 |
| Potri.013G060400.1 | PSR   | Pyruvate kinase family protein                       | down          | 0,729423 | CONST               | 1,140315 |
| Potri.010G071600.1 | PSR   | Phosphate transporter                                | up            | 1,230394 | up                  | 1,673688 |
| Potri.010G071700.1 | PSR   | Phosphate transporter                                | up            | 1,226014 | up                  | 1,561246 |
| Potri.006G063300.3 | PSR   | Monogalactosyl diacylglycerol synthase               | CONST         | 1,059821 | up                  | 1,432183 |
| Potri.001G001600.1 | PSR   | Pyruvate kinase family protein                       | CONST         | 1,023278 | CONST               | 0,937568 |
| Potri.003G032800.2 | PSR   | Phospholipase D ZETA 2                               | CONST         | 1,037505 | CONST               | 0,963523 |

|                           |     |   |       |          |       |          |
|---------------------------|-----|---|-------|----------|-------|----------|
| <b>Potri.010G232400.1</b> | PSR | Phosphate transporter traffic facilitator             | CONST | 1,072055 | CONST | 1,160215 |
| <b>Potri.006G253400.1</b> | PSR | SPX domain gene                                       | CONST | 1,027302 | CONST | 1,092804 |
| <b>Potri.006G228000.2</b> | PSR | Sulfoquinovosyl diaacylglycerol                       | CONST | 1,045427 | CONST | 1,154844 |
| <b>Potri.014G159100.4</b> | PSR | Plant and fungi atypical dual-specificity phosphatase | CONST | 1,110284 | up    | 1,456325 |
| <b>Potri.008G159800.1</b> | PSR | Protein of unknown function                           | CONST | 1,035914 | CONST | 1,115067 |
| <b>Potri.006G203200.3</b> | PSR | Digalactosyl diacylglycerol deficient                 | CONST | 0,936416 | CONST | 1,133418 |

---

**Artigo 2:** Análise global da família ALMT e MATE em *Populus trichocarpa* e correlação entre genes dessas famílias no estresse de Al e P

ANALISE GLOBAL DA FAMÍLIA ALMT EM *POPULUS TRICHOCARPA* E  
CORRELAÇÃO ENTRE GENES DA FAMÍLIA ALMT E MATE NO ESTRESSE DE AL E  
P

### RESUMO

As plantas desenvolveram diversos mecanismos para manter o desenvolvimento em solos com Al, sendo a liberação de ácidos orgânicos na rizosfera responsável por quelar o Al e, de modo indireto, disponibilizar o P que estava fixado com esse metal. As duas famílias mais bem caracterizadas em relação ao transporte de ácidos orgânicos no estresse de Al são: ALMT (*Aluminium-activated Malate Transporter*) e MATE (*Multi-drug And Toxic compound Extrusion*). Em *Populus trichocarpa* foram identificados 20 membros da família ALMT, dos quais todas as duplicações e a maior parte dos parálogos estão relacionados ao estresse de Al, e 56 membros da família MATE. Sendo que 32 membros MATE apresentaram correlação com 13 membros ALMT. Os que apresentaram maior correlação envolvidos no estresse de Al foram o *PoptrMATE54* e *PoptrALMT10*, que no estresse de P não compartilharam nenhum gene na folha e apenas 3 na raiz, no entanto, na raiz sobre estresse de Al compartilharam 35 genes dos quais 3 são fatores de transcrição das famílias: Trihelix, NF-YB e bHLH. Embora o *PoptrMATE54* tenha apresentado alta expressão na raiz, ele apresenta uma maior rede de conexões na folha do que na raiz, ao contrário do observado em *PoptrALMT10*. Portanto, através de análises filogenéticas, sintenicas e de expressão foi possível fornecer fortes evidências da funcionalidade dos membros da família ALMT. Bem como estabelecer uma correlação com a família MATE e elucidar a correlação entre os genes *PoptrMATE54* e *PoptrALMT10* na folha em estresse de P, e na raiz e folha no estresse de Al.

**Palavras-chave:** Solo ácido. Rede de correlação. Qualidade do fruto. Abertura e fechamento estomático.



GENOME-WIDE ANALYSIS OF ALMT FAMILY IN *POPULUS THRICHOCARPA* AND CORRELATION BETWEEN GENES OF MATE AND ALMT FAMILY UNDER AL AND P STRESS

**ABSTRACT**

The plants developed several mechanisms to maintain the development in soils with Al, being the release of organic acids in the rhizosphere responsible for chelating the Al and, indirectly, making available the P that was fixed on that metal. The two families most well characterized in relation to the transport of organic acids in Al stress are: ALMT (aluminum-activated Matate Transporter) and MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion). In *Populus trichocarpa*, 20 members of the ALMT family were identified, of which all duplications and most of the paralogues are related to Al stress, and 56 members of the MATE family. Being that 32 MATE members presented correlation with 13 ALMT members. The ones with the highest correlation involved in the stress of Al were the *PoptrMATE54* and *PoptrALMT10*, that in the stress of P did not share any gene in the leaf and only 3 in the root, however, in the root on Al stress shared 35 genes of which 3 are factors families: Trihelix, NF-YB and bHLH. Although *PoptrMATE54* has presented high expression in root, it features a larger network of connections in the leaves than in the root, in contrast to *PoptrALMT10*. Therefore, through phylogenetic, syntenic and expression analyzes it was possible to provide strong evidence of the functionality of members of the ALMT family. As well as establishing a correlation with the *MATE* family and elucidating the correlation between the *PoptrMATE54* and *PoptrALMT10* genes on leaf P stress, and root and leaf Al stress.

**Keywords:** Acid soil. Correlation network. Fruit quality. Stomatal opening and closing.

## 1 INTRODUÇÃO

Um dos fatores primários na diminuição na produção agrícola é a acidez do solo. No globo 50% dos solos potencialmente aráveis apresentam características ácidas e ocorrem principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde a produção agrícola é crucial (KOCHIAN et al., 2015; VON UEXKÜLL; MUTERT, 1995). Em pH inferior a 5,5 o alumínio (Al), terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre, é solubilizado de minerais adquirindo a forma de  $Al^{+3}$ , sendo este íon responsável pela toxidez na raiz das plantas (KOCHIAN et al., 2015). O impacto da toxidez de Al na queda da produção só é inferior, dentre os estresse abióticos, a causada pela déficit hídrico (VON UEXKÜLL; MUTERT, 1995). Além do Al causar impacto direto na planta ele também é responsável por se ligar com o fosforo (P) e ferro (Fe) presentes no solo tornando-os indisponíveis para a planta. A disponibilidade de (P) é um dos principais limitantes nutricionais e um dos minerais mais caros na adubação, encontrando-se frequentemente não disponível para absorção em solos ácidos devido a fixação com o Al (KOCHIAN et al., 2004; RYAN; DELHAIZE, 2001).

A toxidez do Al é focada principalmente no ápice da raiz, impedindo o seu crescimento e alongação, que conseqüentemente irá impactar na produtividade reduzindo a eficiência na absorção de água e nutrientes (DELHAIZE; GRUBER; RYAN, 2007; RYAN; DELHAIZE, 2001). Em solos ácidos as plantas desenvolveram mecanismos para manter um crescimento razoável na presença de Al, podendo ser eles divididos em dois grupos: (A) mecanismo de neutralização do Al, impedindo que ele se ligue nas células da raiz e (B) mecanismos de tolerância ao Al, sendo ele absorvido e neutralizado no interior da planta. O mecanismo mais bem estudado é o de liberação de ácidos orgânicos (AO) na rizosfera, os quais irão quelar o  $Al^{+3}$  presente no solo tornando um complexo não tóxico para a planta (KOCHIAN et al., 2015). Os compostos fenólicos também neutralizam o Al na rizosfera, embora com menor potência que os AOs (BARCELO; POSCHENRIEDER, 2002). A liberação de AOs além de neutralizar o alumínio também biodisponibiliza o fosforo que estava fixado com metais (RYAN; DELHAIZE, 2001).

As duas principais famílias de transportadores de ácidos orgânicos para a rizosfera são: ALMT (*Aluminium-activated Malate Transporter*) e MATE (*Multi-drug And Toxic compound Extrusion*). A família ALMT, diferentemente da família MATE, é exclusiva de plantas e o primeiro gene relacionado a tolerância ao Al foi um transportador de malato

(*TaALMT1*), isolado de *Triticum aestivum*, expresso constitutivamente na raiz de linhagens de trigo tolerantes a Al (SASAKI et al., 2004). A expressão da *TaALMT1* em *Hordeum vulgare* resultou no aumento da tolerância ao Al (DELHAIZE et al., 2004). Estudos posteriores demonstraram que essa família não era exclusivamente relacionada ao estresse de Al, podendo estar envolvida com a qualidade do fruto (DE ANGELI et al., 2013) e abertura e fechamento estomático (SASAKI et al., 2010).

O *AtALF5*, *Arabidopsis thaliana aberrant lateral root formation 5*, foi o primeiro membro da família MATE a ser caracterizado em plantas, responsável por conferir resistência a compostos tóxicos (DIENER; GAXIOLA; FINK, 2001). O *SbMATE* foi caracterizado em *Sorghum bicolor*, sendo o primeiro da família MATE em plantas a ser caracterizado no estresse de Al como transportador de citrato (MAGALHAES et al., 2007). Desde dessa época até o presente momento diversos membros dessa família foram caracterizados como transportadores de citrato em resposta a toxidez de Al, além disso, também foram caracterizados transportando diferentes substratos em resposta a diferentes estímulos, como por exemplo, detoxificação de metal pesado (LI et al., 2002), resistência a doenças (ISHIHARA et al., 2008; SUN et al., 2011), absorção de Fe (GREEN, 2004; ZHANG et al., 2017), transporte de metabolitos secundários: alcaloide (SHOJI et al., 2009), flavonoides (ZHAO; DIXON, 2009) e antocianinas (PÉREZ-DÍAZ et al., 2014), assim como hormônios vegetais (SERRANO et al., 2013; YAMASAKI et al., 2013).

Em *A. thaliana* foi relatado que o transporte de malato, através do ALMT, e o transporte do citrato, através do MATE, contribuem de modo independente para a tolerância ao Al (LIU et al., 2009). Entretanto, ainda não está elucidado se essas duas famílias de transportadores de ácidos orgânicos compartilham dos mesmos genes para a toxidez de Al e deficiência P. Assim, com o objetivo de contribuir com a elucidação da relação da família ALMT e MATE em resposta ao estresse de Al, foram identificados 20 membros da família ALMT em *Populus trichocarpa*, sendo que os genes responsivos ao Al apresentaram maior número de parálogos e foram os únicos a apresentarem duplicações. A família MATE em *P. trichocarpa* é composta por 56 membros dos quais 32 membros apresentaram correlação com 13 membros da família ALMT. No estresse de P os genes *PoptrMATE54* e *PoptrALMT10* não compartilharam nenhum gene na folha e apenas 3 na raiz, em compensação, no estresse de Al na raiz esses genes compartilharam 35 conexões, sendo 3 classificados como fatores de transcrição.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Caracterização da família de transportadores ALMT e MATE em *Populus trichocarpa*

As sequências proteicas, dos genes já caracterizados da família de transportadores *MATE* e *ALMT*, foram obtidas a partir do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)). Estas sequências foram utilizadas como padrão para identificar homólogos em banco de dados de *Populus trichocarpa*, disponíveis no *PopGenIE.org* (<http://popgenie.org/>), onde foram efetuadas buscas a partir da ferramenta *BLASTp* (*Basic local alignment search tool*), utilizando como critérios, identidade maior que 50% e e-valor menor que  $1e^{-5}$ .

Para identificar a similaridade com a família *MATE* e *ALMT* foi realizada uma análise da presença do domínio conservado característico de cada uma das famílias, onde as sequências que saíram de resultado do BLAST foram submetidas à busca por domínios conservados no banco de dados *Conserved Domain Database – National Center for Biotechnology Information* (*CDD-NCBI*) a partir da ferramenta *Conserved Domain Search* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) (MARCHLER-BAUER et al., 2017). A ferramenta HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/index.php>) (TUSNÁDY; SIMON, 1998) foi utilizada para a predição do número e localização dos domínios transmembranares de cada proteína.

### 2.2 Análises filogenéticas da família ALMT e MATE

Para a construção da árvore filogenética foi realizado o alinhamento das sequências de transportadores *MATE* de *populus* e os membros caracterizados dessa família, sendo o mesmo feito para o estudo da família *ALMT*, utilizando o software *MEGA 7* ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), para a realização do alinhamento proteico e construção da árvore filogenética do tipo *neighbor joining*, com *bootstrap* de 1000 repetições. Os grupos e subgrupos foram selecionados manualmente com base na distribuição dos genes caracterizados.

### 2.3 Análises de sintenia da família ALMT

Para identificação dos blocos sintenicos tanto no próprio genoma quanto em comparação entre *Populus trichocarpa* e *Arabidopsis thaliana*, foi utilizado o *SynMap* (<https://genomeevolution.org/coge/SynMap.pl>) (LYONS et al., 2008), através do algoritmo *DAGchainer* (HAAS et al., 2004) utilizando a opção de ordem de gene relativa com um mínimo de 5 pares de genes alinhados e uma distância máxima de 20 genes entre duas combinações. Foi utilizado QuotaAlign para fundir blocos sintenicos adjacentes (HAUG-BALTZELL et al., 2017). Para determinar as duplicações genicas foi utilizado o algoritmo Blast2raw disponível nas ferramentas do CoGe (<https://genomeevolution.org/coge/>) (LYONS; FREELING, 2008).

### 2.4 Perfil de expressão dos membros da família ALMT e MATE em *P. trichocarpa*

A expressão dos genes pertencentes a família de transportadores MATE e ALMT em *populus* em diferentes bibliotecas foi determinada através de dados públicos disponível *PopGenIE.org* (<http://popgenie.org/>). Foi utilizado o banco de dados Expression Atlas (Potra exAtlas) contendo 24 bibliotecas de *P. tremula* (SUNDELL et al., 2015).

### 2.5 Correlação genica em *Populus*

A rede de correlação genica entre a família ALMT e MATE foi montada utilizando 24 bibliotecas de *P. tremula* no banco de dados Expression Atlas (Potra exAtlas) disponíveis em *PopGenIE.org* (<http://popgenie.org/>) (SUNDELL et al., 2015), aplicando correlação de Pearson com valor de correlação  $\rho \geq |0,7|$ .

A análise dos genes *PoptrALMT10* e *PoptrMATE54* utilizando bibliotecas públicas de microarray de folha e raiz de *Populus tremula x Populus alba* sob estresse de fosforo (código EMBL: E-MTAB-3934) e raiz de *Populus tremula* sob estresse alumínio (código GEO: GSE19297), foi realizada mediante a correlação de Spearman com valor de correlação  $\rho \geq |0,8|$ .

### 2.6 Identificação dos fatores de transcrição relacionados aos MATE em *E. grandis*

As sequencias de nucleotídeos dos transcritos que apresentaram coeficiente de correlação  $\rho \geq |0,85|$  com os transportadores MATE foram analisadas utilizando a ferramenta

*Transcription Factor Prediction* disponível no PlantTFDB 4.0 (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/prediction.php>) (JIN et al., 2017). Somente os transcritos que foram categorizados em alguma das famílias de fatores de transcrição e as sequências dos transportadores MATE foram utilizadas para a construção da rede de coexpressão dos fatores de transcrição.

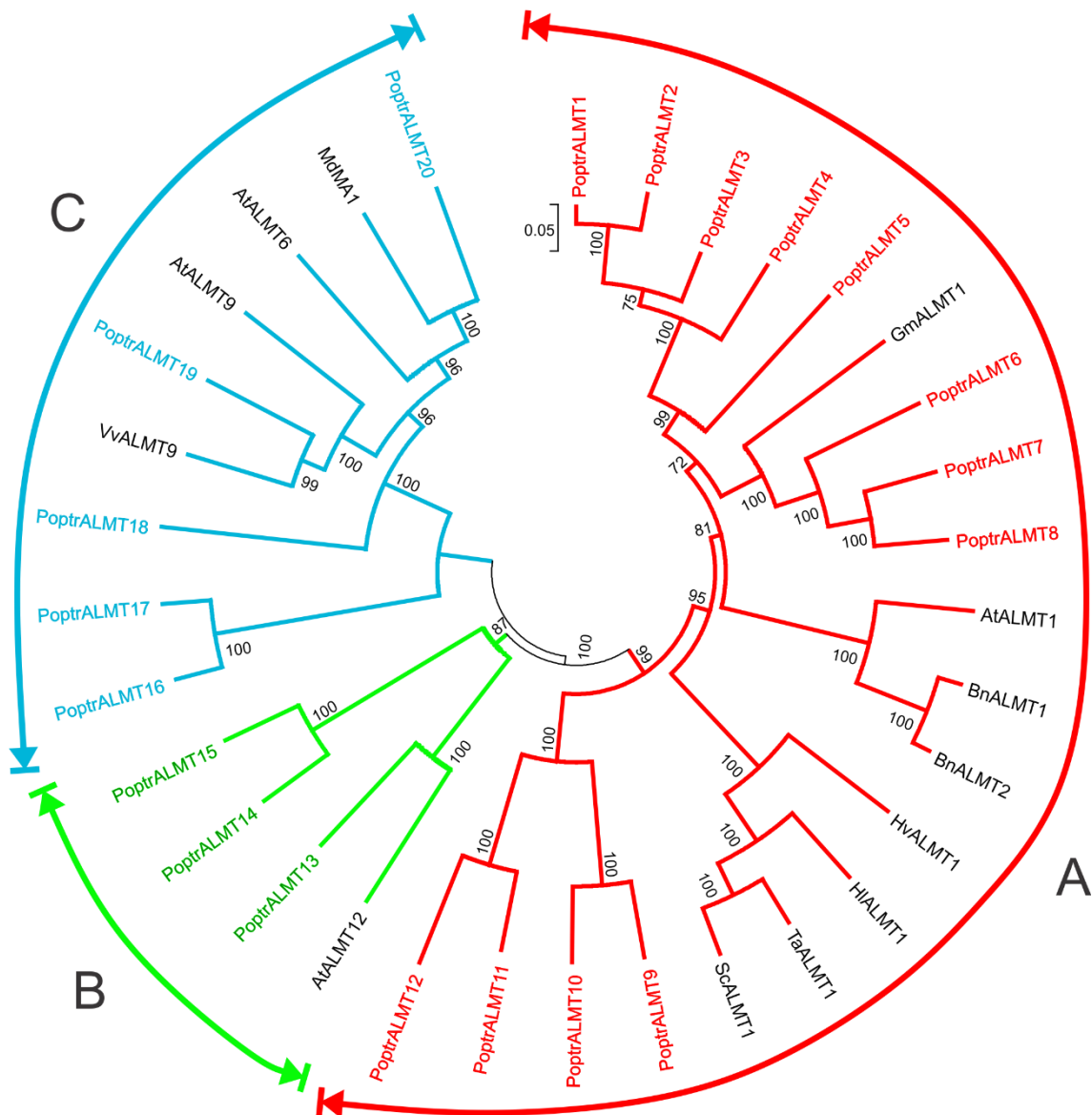
## 2.7 Enriquecimento dos dados utilizando BLAST2GO

O enriquecimento dos genes foi realizado através do protocolo do software BLAST2GO (CONESA et al., 2005). Para determinação dos motivos das sequências e seus domínios conservados, e para geração dos gráficos foi utilizado o algoritmo InterProScan (ZDOBNOV; APWEILER, 2001)

## 3 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 3.1 Análise filogenética da família ALMT em *Populus trichocarpa*

No genoma do populus foram encontrados 20 membros da família de transportadores ALMT (Apêndice A), sendo esses, os que apresentaram maior similaridade com os 12 ALMT caracterizados funcionalmente em diferentes espécies. É possível prever afinidade de um transportador a um substrato comparando sequências de aminoácidos de proteínas já caracterizadas, não sendo esse um critério exato, mas sim um indicativo. A árvore foi dividida em três clados, sendo o clado A (vermelho) o que apresentou o maior número de sequências, correspondendo a 12 sequências de populus e 8 sequências de proteínas já caracterizadas. O clado B (verde) apresenta somente 3 proteínas de populus e 1 caracterizada e o clado C (azul) apresenta 3 transportadores caracterizados e 6 proteínas de populus (Figura 1).



**Figura 1** Filogenia da família de transportadores ALMT no genoma de *populus*. A árvore filogenética mostra a distribuição das sequências de ALMT em *populus* (20 sequências) junto com outros membros caracterizados funcionalmente em outras espécies de plantas (12 sequências). A árvore está em escala, com a distância das ramificações nas mesmas unidades que as distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método *p-distance*. A história evolutiva foi inferida utilizando o método *Neighbor-Joining* com 1000 bootstraps.

A família ALMT, sigla correspondente a *Aluminum-Activated Malate Transporter*, foi caracterizada inicialmente como uma família de transportadores de malato em resposta ao Al. Embora essa família esteja relacionada com outras atividades metabólicas o maior número de genes caracterizados correspondem aos envolvidos no estresse ao Al, como é possível observar no clado vermelho. A exudação de malato na rizosfera é um dos principais mecanismos responsáveis pela adaptação de *Glycine max* a solos ácidos com altas concentrações de Al e baixas concentrações de P. A proteína responsável por esse efluxo de

malato é a GmALMT1, onde a expressão do gene que a codifica está relacionada com pH, Al e P, principalmente em genótipos considerados P-eficientes (LIANG et al., 2013). Ficaram localizadas próximas dessa proteína 3 sequencias de populus, PoptrALMT6, PoptrALMT7 e PoptrALMT8, conseqüentemente, sendo as que apresentam maiores chances de realizarem o transporte de malato em resposta a presença de Al e deficiência de P.

As proteínas BnALMT1 e BnALMT2, são responsáveis pelo aumento no transporte de malato nas raízes em resposta ao Al e não mostraram alteração na deficiência de P, entretanto, houve alteração quando exposto a metais trivalentes como lantânio (La) (LIGABA et al., 2006). Um dos diversos efeitos na planta ao Al tóxico é o acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas pontas das raízes e a redução do pH, sendo esses fatores responsáveis por aumentar a expressão do *AtALMT1*, assim como, ácido indolilacético (IAA) e ácido abscísico (ABA) (KOBAYASHI et al., 2013). Em *Holcus lanatus* (HlALMT1) e *Secale cereale* (ScALMT1) o transporte de malato através da proteína de membrana ALMT é fundamental para a tolerância ao Al tóxico no solo (CHEN et al., 2013; FONTECHA et al., 2007). O TaALMT1, de *Triticum aestivum*, também é uma proteína de membrana responsável por proporcionar maior tolerância ao Al, o mesmo foi observado quando o gene foi inserido em outras plantas (SASAKI et al., 2004). As proteínas de populus PoptrALMT1, PoptrALMT2, PoptrALMT3, PoptrALMT4 e PoptrALMT5, embora não estejam no mesmo subclado, estão filogeneticamente mais próximas dos transportadores caracterizados como responsáveis ao Al, sendo um indicio de que elas realizam o transporte de malato em resposta ao mesmo estresse.

Nem todos os genes do clado A estão relacionados com o estresse ao Al, o transportador HvALMT1 de *Hordeum vulgare* L., apesar de apresentar alta similaridade proteica com o TaALMT1, não está envolvido diretamente com a tolerância ao Al, apresentando expressão do gene em células da raiz em expansão e em células guarda (GRUBER et al., 2010). A superexpressão do *HvALMT1* mostrou que ele está envolvido em diferentes rotas metabólicas da planta, podendo a proteína estar relacionada com o transporte de outros ácidos orgânicos como fumarato e succinato, mas as principais funções relacionadas a esse gene são abertura e fechamento estomático e no balanço osmótico das células em expansão (GRUBER et al., 2011). Nenhuma proteína de populus ficou próxima desse grupo de ALMT, mas 4 sequencias de populus, PoptrALMT9, PoptrALMT10, PoptrALMT11 e PoptrALMT12, ficaram isoladas, não apresentando indicativo de função evidente.



O único gene caracterizado do clado B, que está associada a abertura e fechamento estomática, o *AtALMT12* apresenta expressão na membrana plasmática da células guarda, onde o *AtALMT12* é responsável pela rápida ativação (*R-typr*) do canal iônico (QUAC) que permite a passagem de nitratos e cloridratos (SASAKI et al., 2010). As sequencias proteicas de PoptrALMT15, PoptrALMT14 e, principalmente, PoptrALMT13 ficaram próximas da *AtALMT12*, sendo um forte indicio de estarem envolvidas na mesma função.

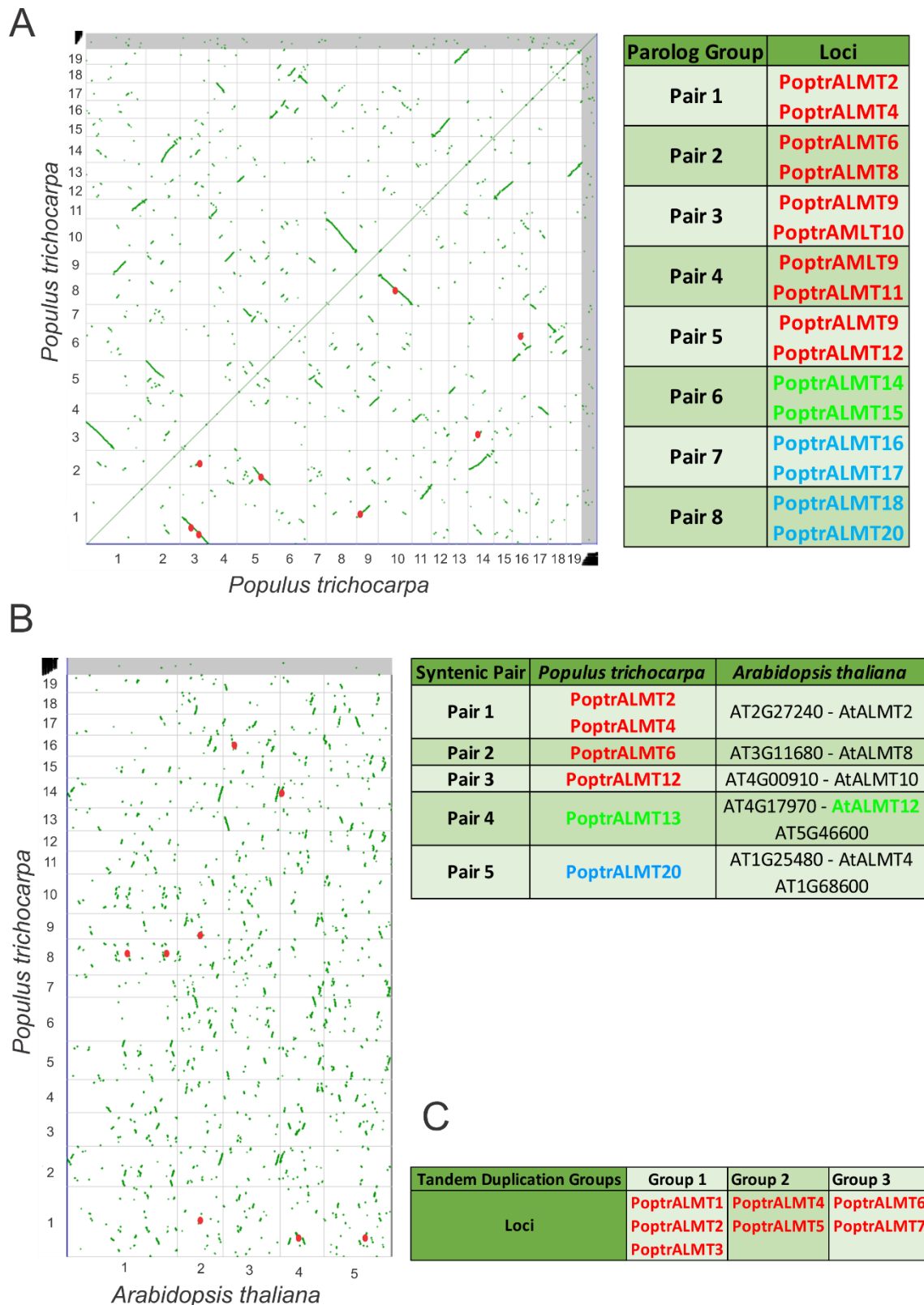
Os ALMT que estão presentes no clado C, assim como os demais membros da família estão localizados na membrana plasmática, sendo nesse clado focalizadas no tonoplasto. As proteínas MdMA1 e VvALMT9 estão envolvidas com a qualidade do fruto de maçã e uva, regulando o transporte de ácidos orgânicos para dentro do vacúolo, e consequentemente, o acúmulo desses ácidos está envolvido com a qualidade do fruto final (DE ANGELI et al., 2013). O VvALMT9 mostrou estar relacionado tanto com o transporte de ácido málico ( $C_4H_6O_5$ ) quanto ácido tartárico ( $C_4H_6O_6$ ), e sua expressão aumenta de acordo com a maturação do fruto, sendo baixa no fruto verde (DE ANGELI et al., 2013). Ficaram localizadas nesse clado 5 sequencias de populus, dentre estas as proteínas PoptrALMT19 e PoptrALMT20 são as mais prováveis de estarem relacionadas com o transporte de malato no vacúolo do fruto.

### 3.2 Análise sintenica e de duplicação dos genes *ALMT* em *P. trichocarpa*

Uma das características que distinguem as angiospermas dos mamíferos em geral é o processo de expansão do genoma, através de duplicação e até triplicação, e a redução da ploidia, tornando o genoma das angiospermas mais complexo estruturalmente que o dos mamíferos (WANG; PATERSON, 2011). Esse aumento seguido de diminuição do tamanho do genoma foi importante para a criação de novas funções para os genes, chamado de neofuncionalização, como também para subdivisões das suas atividades biológicas, subfuncionalização, portanto, sendo a duplicação genica a fonte primária para a geração de novos genes (HE; ZHANG, 2005). Durante a evolução aproximadamente 8000 pares de duplicações tenham resistido ao processo de redução da ploidia no genoma de populus (TUSKAN et al., 2006).

Afim de determinar o número de parálogos da família *ALMT* foi realizado uma análise de microssintenia comparando o genoma de populus com ele mesmo (Figura 2.A), em seguida determinou-se o número de duplicações (Figura 2.C). Para estabelecer uma

comparação evolutivo e identificar os ortólogos foi realizada análise sintenica entre os genomas de *populus* e *Arabidopsis thaliana*, dado que essa espécie apresentar o maior número de genes caracterizados da família ALMT (Figura 2.B).



**Figura 2** Análise de sintenia dos genes *ALMT* no genoma do populus. **A** identificação de oito pares de parálogos dentro do genoma de populus utilizando microsyntenia. **B** análise sintenica entre a família *ALMT* em populus e o genoma de *Arabidopsis thaliana*, tendo cinco parálogos sintenicos, **C** duplicações em tandem dos genes *ALMT* no genoma de populus.

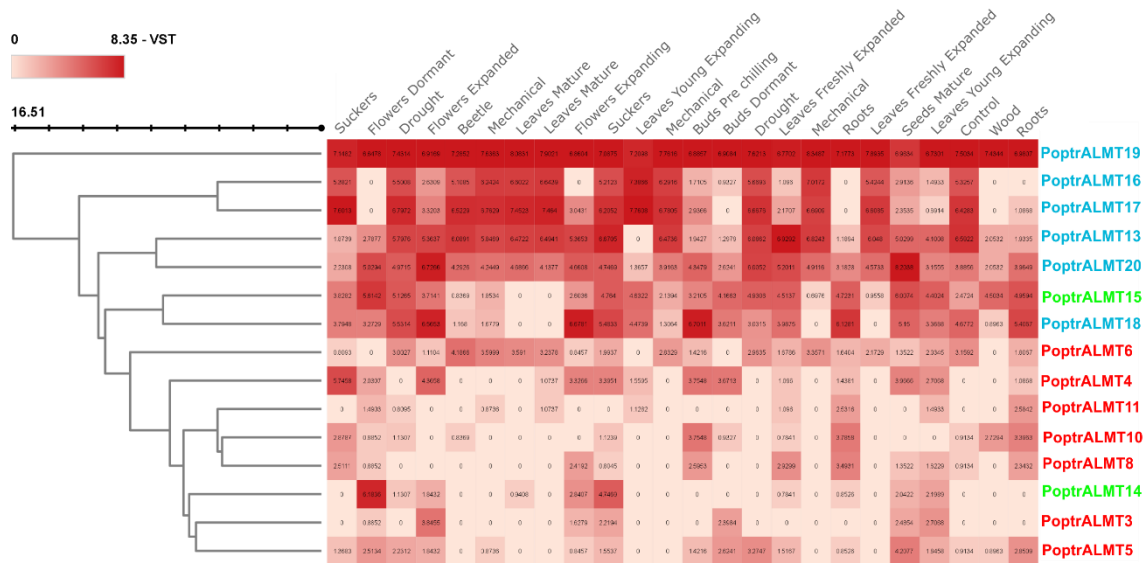
Na família de transportadores *ALMT* foram encontrados 8 pares de parálogos no genoma do *populus*. Sendo 5 pares presentes no clado A da árvore filogenética, clado esse composto majoritariamente por *ALMT* responsáveis ao estresse de Al. O número de parálogos de uma família de transportadores tende a ser maior quando está relacionado a estresses abióticos (RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011). A maior concentração de parálogos está entre os genes *PoptrALMT9*, *PoptrALMT10*, *PoptrALMT11* e *PoptrALMT12*, que filogeneticamente estão no clado de resposta ao estresse de Al embora não tenham apresentado alta similaridade com nenhuma proteína *ALMT* caracterizada. Também foi possível observar a presença de parálogos no clado B (1 par) e no clado C (2 pares).

O estabelecimento dos ortólogos entre o genoma de *A. thaliana* e o *populus* é importante para futuros estudos, uma vez que essa é uma família de transportadores ainda pouco caracterizada. Foram encontrados 5 pares de ortólogos entre a família *ALMT* e o genoma de *A. thaliana*. Em relação aos membros responsáveis ao Al, 4 genes apresentaram ortólogos com membros da família *ALMT* em *A. thaliana*, entretanto, esses genes ainda não foram caracterizados funcionalmente. O gene *PoptrALMT20*, que segundo a árvore filogenética está envolvida com a qualidade do fruto, apresentou 2 ortólogos em *A. thaliana* (*AtALMT4* e o AT1G68600) que ainda não foram caracterizados funcionalmente. Devido o gene *PoptrALMT13* ser ortólogo do *AtALMT12*, pode-se inferir que esteja relacionado com o transporte de nitrato e cloridratos nas células guardas.

No genoma de *populus* as duplicações genicas encontradas foram relacionadas somente ao clado da árvore filogenética relacionada com o estresse de Al. Foram divididas em três grupos, sendo todos os membros desse grupo filogeneticamente próximos do *GmALMT1*.

### 3.3 Expressão em diferentes bibliotecas dos genes *ALMT* em *P. trichocarpa*

Utilizando a plataforma online *PopGenIE* (SUNDELL et al., 2015) foi realizada uma análise de expressão da família *ALMT* em 24 bibliotecas, 15 dos 20 membros apresentaram expressão em pelo menos uma das bibliotecas (Figura 3). Os genes *PoptrALMT1*, *PoptrALMT2*, *PoptrALMT7*, *PoptrALMT9* e *PoptrALMT12* os que não apresentaram expressão em nenhuma das bibliotecas, estando presentes no clado A da árvore filogenética (Figura 1).



**Figura 3** Perfil de expressão dos transportadores ALMT. Os dados de expressão foram analisados utilizando a plataforma *PopGenIE*. Genes estão ordenados de acordo com o seu perfil de expressão e coloridos de acordo com a árvore filogenética.

Os genes foram agrupados no mapa de expressão de acordo com o seu perfil de expressão, sendo que genes que estão em clados diferentes na árvore filogenética estão agrupados no mesmo clado no mapa de expressão, isso se deve a diferença entre as análises de expressão e filogenéticas. Na árvore filogenética os genes são agrupados de acordo com a sua estrutura proteica primária, indicando uma afinidade por determinado substrato, enquanto que no mapa de expressão os genes estão agrupados de acordo com o perfil de expressão nas diferentes bibliotecas, correlacionando a sua expressão a um tecido ou estresse envolvido, portanto, genes que transportam diferentes substratos podem estar envolvidos no mesmo tecido e/ou no mesmo estresse.

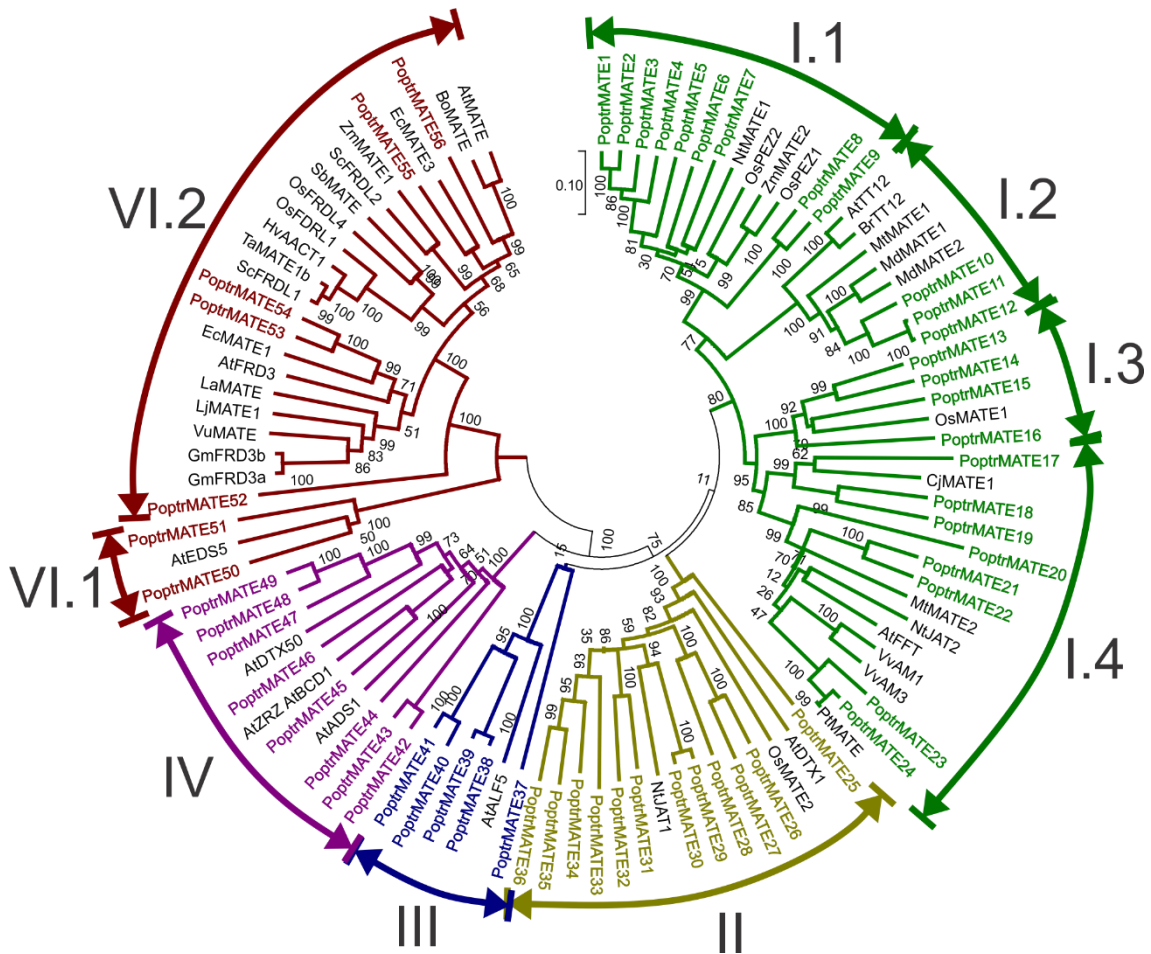
Em relação a família de *ALMT* responsáveis ao alumínio, os membros em *populus* demonstraram baixa expressão em média comparados com outros clados. O único membro que não apresentou expressão nas raízes foi o *PoptrALMT3*, tendo apresentado expressão elevada em bibliotecas relacionadas a órgãos reprodutivos como: botão floral, flor e ovário. O *PoptrALMT6* mostrou expressão em diferentes bibliotecas, indicando que está relacionado a diversas rotas metabólicas na planta.

Alguns membros da família de transportadores *ALMT* estão relacionados indiretamente com o efluxo de diferentes compostos. Entre esses compostos pode-se citar o nitrato e cloreto, importantes moléculas sinalizadoras na planta, envolvidas por exemplo, no

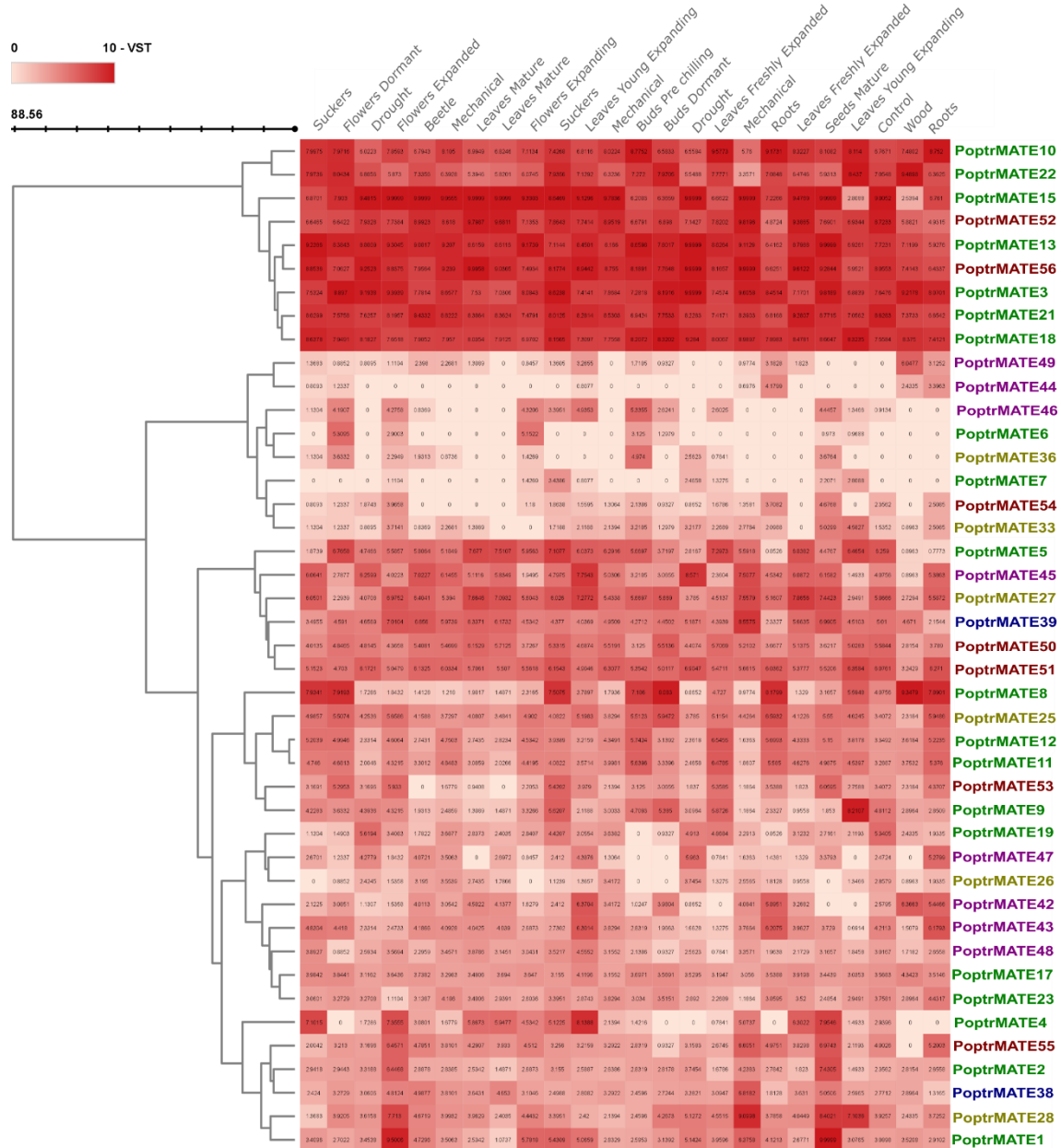
estágio de dormência e germinação de sementes (ALBORESI et al., 2005). O *PoptrALMT14* apresentou alta expressão na biblioteca relacionada a dormência das flores, corroborando com a árvore filogenética que diz que o *PoptrALMT14* está relacionado com abertura e fechamento do canal iônico.

### **3.4 Expressão em diferentes bibliotecas dos genes *MATE* em *P. trichocarpa***

Foram identificados 56 transportadores MATE no genoma de *Populus trichocarpa* (Apêndice B) que apresentaram similaridade com os 43 membros dessa família caracterizados na literatura em diferentes espécies. Em seguida foi possível subdividir a árvore em clados e subclados de acordo com a distribuição dos transportadores MATE já caracterizados (Figura 4). Afim de se obter um maior entendimento das funções dessa família em *populus* foi analisado os 56 MATE de *populus* contra um banco de dados de transcritos disponível na plataforma PopGenIE.org (SUNDELL et al., 2015), Desses, apenas 43 apresentaram expressão nas bibliotecas testadas, tendo 9 com expressão elevada e constitutiva (Figura 5). A árvore filogenética e o mapa de calor não são suficientes para definir a função biológica de uma proteína, mas são fortes indícios de uma possível função.



**Figura 4** A árvore filogenética mostra a distribuição das sequências de MATE em *populus* (56 sequências) junto com outras sequências de transportadores MATE caracterizados funcionalmente em outras espécies de plantas (43 sequências). A árvore está em escala, com a distância das ramificações nas mesmas unidades que as distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método *p-distance*. A história evolutiva foi inferida utilizando o método *Neighbor-Joining* com 1000 bootstraps.



**Figura 5** Expressão da família de transportadores MATE em diferentes bibliotecas. A cor dos genes corresponde a sua localização na árvore filogenética. Os genes foram agrupados de acordo com o perfil de expressão.

O clado I (verde escuro), é o clado com maior número de membros de populus com um total de 24 transportadores. Esse clado foi subdividido em 4 subclados, de acordo com o agrupamento de membros MATE caracterizados. O subclado I.1 apresentou transportadores do PoptrMATE1 até o PoptrMATE9, sendo agrupados junto com OsPEZ1 e OsPEZ2 que são transportadores de compostos fenólicos envolvidos com a precipitação de Ferro (Fe) e detoxificação ao Al em *Oryza sativa* (BASHIR; ISHIMARU; SHIMO, 2005; ISHIMARU et al., 2011). O NtMATE1 envolvido com o transporte de nicotina na raiz de *Nicotiana tabacum* (SHOJI et al., 2009) e o ZmMATE2 que está associado a uma *Quantitative trait locus* ( QTL)



em *Zea mays* relacionada a tolerância ao Al (MARON et al., 2010), esses genes apresentaram majoritariamente expressão na raiz. Entretanto, no clado I.1 somente o *PoptrMATE8* apresentou expressão na raiz e os demais apresentaram expressão elevada em bibliotecas relacionadas a parte aérea da planta, principalmente folha e flor. No clado I.2 estão 3 membros de populus (*PoptrMATE10*, *PoptrMATE11* e *PoptrMATE12*) que apresentaram expressão quase que constitutivamente em diversas bibliotecas. Além desses membros caracterizados no transporte de flavonoides no vacúolo também agruparam nesse subclado, *AtTT12* de *A. thaliana* (DEBEAUJON et al., 2001), *BrTT12* de *Brassica rapa* (CHAI et al., 2009), *MtMATE1* de *Medicago truncatula* (ZHAO; DIXON, 2009), *MdMATE 1* e *MdMATE2* de *Malus domestica* (FRANK et al., 2011).

Alguns membros dessa família estão envolvidos com diferentes rotas metabólicas, o *OsMATE1* quando foi superexpresso em *A. thaliana* provocou diversas alterações morfológicas e fisiológicas, com destaque para resposta negativa ao estresse biótico (TIWARI et al., 2014). Esse transportador ficou agrupado, subclado I.3, junto com *PoptrMATE13*, *PoptrMATE14*, *PoptrMATE15* e *PoptrMATE16*, sendo o *PoptrMATE13* o único que apresentou expressão nas bibliotecas testadas, demonstrando ser altamente expresso em diferentes tecidos e em resposta a diferentes estresses. Em contrapartida, no subclado I.4 agrupou-se transportadores localizados no vacúolo que transportam alcaloides, como é o caso do *CjMATE1* de *Coptis japonica* (TAKANASHI et al., 2017) e *NtJAT2* de *N. tabacum* (SHITAN et al., 2014), ou no transporte de flavonoides como *MtMATE2* de *Medicago truncatula* (ZHAO et al., 2011), *AtFFT* de *A. thaliana* (THOMPSON et al., 2010), *VvAM1* e *VvAM2* de *Vitis vinifera* (PÉREZ-DÍAZ et al., 2014). Sendo que nesse subclado ficou agrupado 8 MATE de populus, dentre esses o *PoptrMATE18*, *PoptrMATE21* e *PoptrMATE22* apresentaram expressão constitutiva e o *PoptrMATE23* apresentou expressão baixa em todas as bibliotecas e o *PoptrMATE19* foi mais responsável a seca.

O clado II, de cor mostarda, possui 12 membros de populus e 3 já caracterizados. O *AtADX1* demonstrou estar envolvido com o transporte de alcaloides e compostos tóxicos (LI et al., 2002). O *OsMATE1*, assim como o *OsMATE2*, demonstra estar envolvido em diferentes rotas do crescimento e desenvolvimento da planta (TIWARI et al., 2014). O *NtJAT1* está relacionado com o transporte de nicotina na planta (MORITA et al., 2009). De acordo com os dados de expressão em diferentes bibliotecas, a maior parte dos genes de populus desse clado apresentou aumento da expressão em biblioteca de sementes maduras e

flor em expansão. O *PoptrMATE28* também mostrou elevada expressão em biblioteca de choque mecânico.

O clado III, apresenta 5 genes de populus agrupados com um transportador MATE caracterizado, o *AtALF5* que é responsável pela defesa da planta contra compostos tóxicos que entram em contato com a raiz de *A. thaliana* (DIENER; GAXIOLA; FINK, 2001). Os genes *PoptrMATE37*, *PoptrMATE38* e *PoptrMATE39* apresentaram aumento da expressão em bibliotecas de ataque de besouro e o *PoptrMATE38* e *PoptrMATE39* apresentaram maior expressão em biblioteca de dano mecânico. Todos os genes apresentaram expressão nas raízes, entretanto, a expressão foi maior na parte aérea do que na raiz. Assim, esse clado pode estar envolvido com a defesa contra compostos tóxicos na raiz, mas também pode ter essa função na parte aérea da planta.

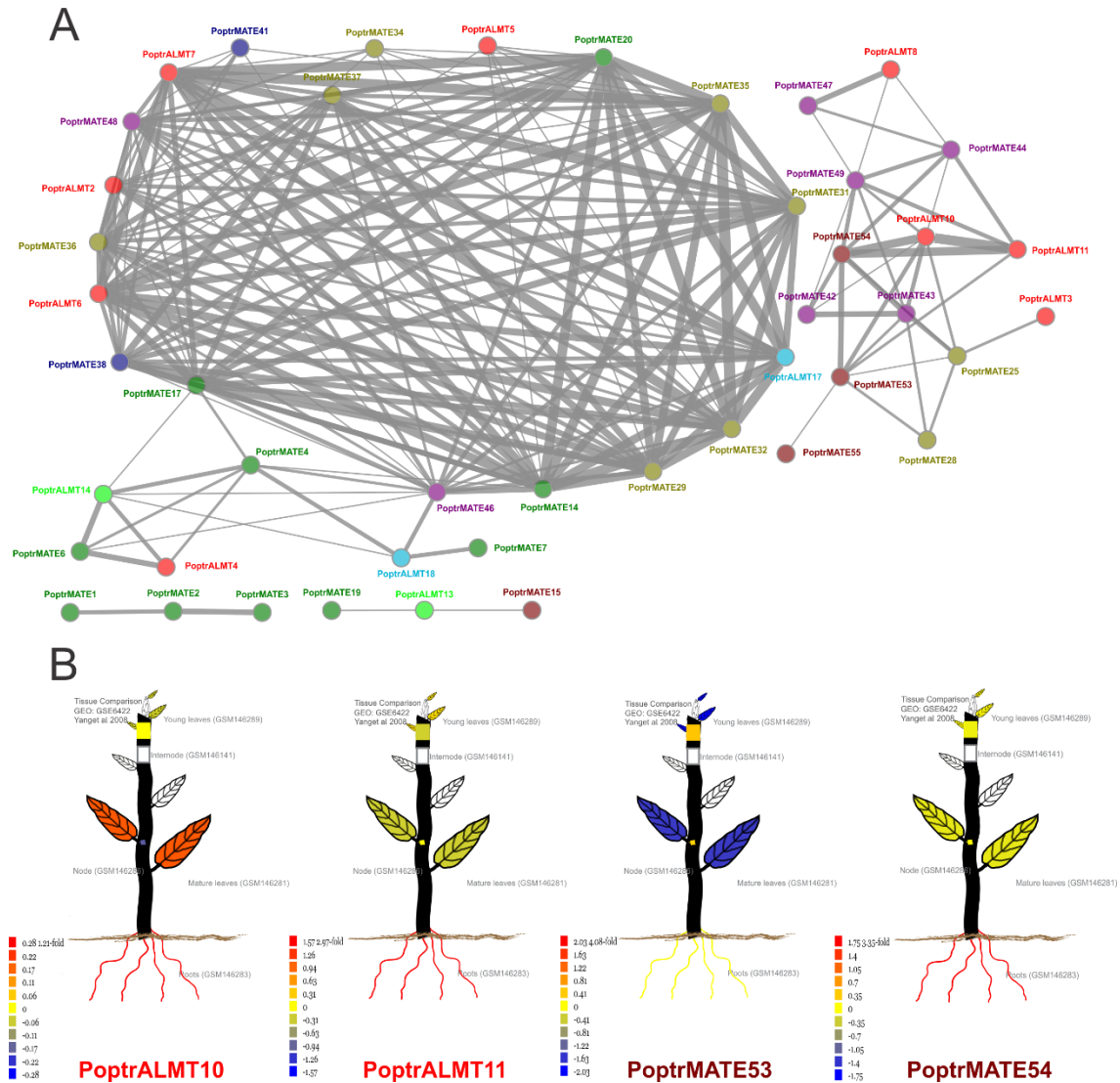
O clado IV apresentou 8 sequencias do genoma de populus próximas filogeneticamente de 3 MATE caracterizados na literatura como, responsáveis pela homeostase de Fe (*AtBCD1*) (SEO et al., 2012), efluxo de ácido abscísico (*AtDTX50*) (ZHANG et al., 2014) e com mecanismos de defesa da planta (*AtADS1*) (SUN et al., 2011) em *A. thaliana*. Em condições de estresse osmótico, como alta salinidade e seca, um grande número de genes envolvidos no processo de tolerância e resposta ao estresse são ativados devido ao acúmulo de ácido abscísico (ABA), sendo um hormônio chave na sinalização (YOSHIDA; MOGAMI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2014). Os genes *PoptrMATE45* e *PoptrMATE47* apresentaram a maior expressão em bibliotecas relacionadas ao estresse hídrico, podendo esses genes estarem relacionados com o transporte de ácido abscísico. O *PoptrMATE45* também apresentou elevada expressão em resposta a ataque de besouro e danos mecânicos. Todos os genes de populus desse clado apresentaram aumento da expressão em bibliotecas de expansão de folhas jovens.

O clado V apresentou 7 sequencias de populus que apresentaram alta similaridade filogenética com 19 sequencias caracterizadas de populus. Esse é um dos clado de maior concordância na árvore, em relação ao substrato transportado, devido à grande quantidade de membros da família MATE caracterizados. Esse clado foi subdividido em dois subclados sendo eles: clado V.1 que possui 2 sequencias de populus e um MATE caracterizado como transportador de ácido salicílico em *A. thaliana* (*AtEDS5*)(NAWRATH et al., 2002) e o clado V.2 que apresenta diversos genes caracterizados como transportadores de citrato tanto em resposta ao alumínio presente no solo quando ao deficit de Fe, além de, 5 sequencias de

populus. No subclado V.1 o gene *PoptrMATE50* apresentou a maior expressão em bibliotecas de RNA-seq de folhas maduras, e por ter alta identidade com o gene *AtEDS5*, deve ser o responsável pelo transporte de ácido salicílico. No mesmo subclado, o gene *PoptrMATE51* apresentou expressão máxima em bibliotecas de estresse hídrico. No subclado V.2 todos os genes de populus apresentaram elevada expressão em biblioteca de semente madura. Os genes *PoptrMATE55* e *PoptrMATE56* apresentaram elevada expressão nas bibliotecas de choque mecânico e em flores expandidas.

### **3.5 Rede de correlação entre os membros da família MATE e ALMT em *P. trichocarpa***

Foi obtido uma rede de correlação entre os membros da família *MATE* e da família *ALMT* (Figura 6), ambos em *P. trichocarpa*, correlacionando-os em 24 bibliotecas públicas, disponíveis no banco de dados PlantGenIE.org (SUNDELL et al., 2015), através do método de Pearson utilizando uma correlação de  $\rho \geq |0,7|$ . A espessura das linhas que conectam os genes é proporcional ao grau de correlação entre os genes, sendo a linha fina uma correlação mais próxima de  $|0,7|$  e a mais grossa uma correlação próxima de  $|1|$ . A rede de correlação entre as famílias de transportadores é importante para ter um entendimento de como elas estão conectadas e entender como os membros das famílias de transportadores estão correlacionados.



**Figura 6** Rede de correlação entre as famílias de transportadores MATE e ALMT e expressão em diferentes tecidos dos transportadores de ácidos orgânicos correlacionados ao estresse de Al. **A** Rede de correlação entre os membros das famílias ALMT e MATE construída utilizando correlação de Pearson com correlação mínima de  $|0,7|$ . **B** Expressão relativa em diferentes tecidos dos membros das famílias MATE e ALMT respondíveis ao estresse de alumínio e correlacionados entre si. A cor dos genes é correspondente a localização na árvore filogenética.

A rede de correlação entre as famílias de transportadores apresentou 32 membros *MATE* e 13 membros *ALMT* que apresentaram correlação superior a mínima com outro membro de ambas as famílias. Esta rede demonstrou que embora a maioria dos transportadores estejam correlacionados em algum grau, o que indica um forte envolvimento em rotas metabólicas semelhantes, foi possível observar também a geração de redes de conexões isoladas, fornecendo indicio de que essas estão envolvidas com rotas mais específicas. Na correlação entre a família *MATE* e *ALMT* é possível observar a formação de 4 subgrupos de genes, um maior contendo 25 genes, sendo 17 *MATE* e 8 *ALMT*, uma menor

(lado direito) com 10 *MATE* e 4 *ALMT*, e duas pequenas contendo 3 genes cada, sendo uma delas composta exclusivamente por *MATE*.

Em uma das pequenas redes encontram-se genes próximos filogeneticamente como os genes *PoptrMATE1*, *PoptrMATE2* e *PoptrMATE3*, sendo eles candidatos a transportar alcaloides e compostos fenólicos, e na outra, genes mais distantes como o *PoptrMATE19*, *PoptrALMT13* e *PoptrMATE15*, envolvidos no transporte de alcaloides, abertura e fechamento estomático e desenvolvimento e crescimento da planta, respectivamente. Outro grupo de genes que apresentou poucas conexões, contém os genes *PoptrMATE4*, *PoptrMATE6* e *PoptrMATE7* da família *MATE*, relacionados com o transporte de metabolitos secundários, e os da família *ALMT* *PoptrALMT4*, *PoptrALMT14* e *PoptrALMT18*, envolvidos com estresse de Al, abertura e fechamento estomático e qualidade do fruto, respectivamente.

Uma rede composta de 10 membros da família *MATE* e 4 da família *ALMT* ficou separada dos demais membros. Os membros da família *MATE* estão relacionados a mecanismos de defesa da planta, assim como, transporte de ácido abscísico, manutenção da homeostase de Fe e transporte de citrato em resposta a toxidez de Al. Os membros da família *ALMT* estão relacionados ao transporte de malato em resposta a presença de Al tóxico no solo. Portanto é possível concluir que essas duas famílias estão envolvidas no processo de resposta ao Al. Assim é possível relacionar esses genes ao estresse de Al, uma vez que, na presença de Al tóxico é observado deficiência na absorção de Fe e, conseqüentemente, liberação de ácidos orgânicos para neutraliza o Al (KOCHIAN et al., 2015). Bem como em eucalipto, foi observado que ocorre o acúmulo de Al nas folhas velhas, sendo essa folha eliminada através da abscisão foliar posteriormente (SILVA et al., 2004).

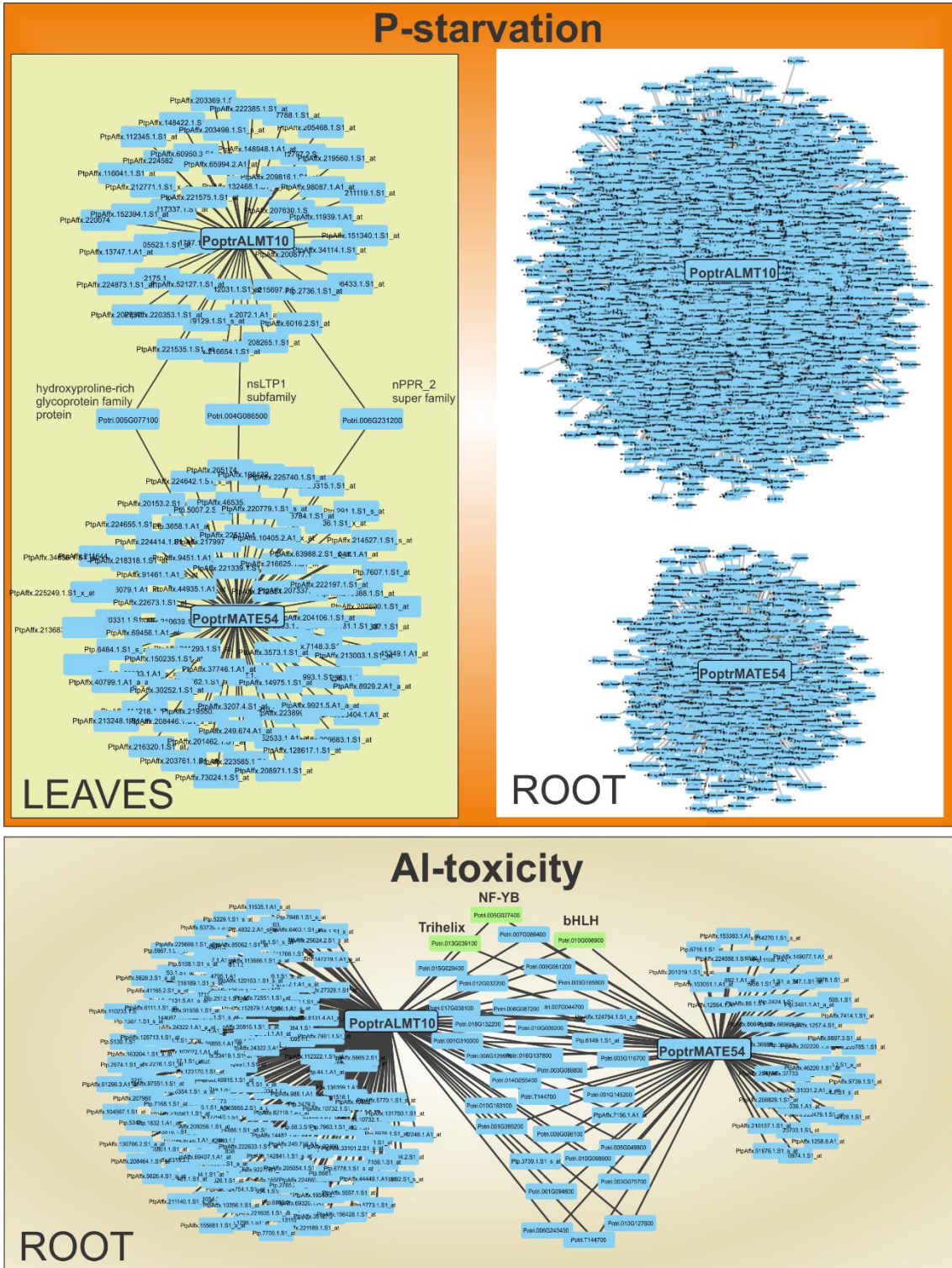
Foi analisada a expressão dos genes: *PoptrALMT10*, *PoptrALMT11*, *PoptrMATE53* e *PoptrMATE54*, em diferentes tecidos de *P. trichocarpa* afim de observar qual o comportamento de expressão desses genes na planta. Uma vez que, esses foram os genes relacionados ao estresse de Al que apresentaram a maior grau de correlação na rede de co-expressão. Foram analisados a expressão relativa desses genes nos seguintes tecidos: folhas jovens e maduras, nó, entrenó e raiz. Foi possível observar que ambos os membros da família *ALMT* apresentaram elevada expressão na raiz assim como o *PoptrMATE54*. O *PoptrALMT10* foi o único que apresentou maior expressão nas folhas maduras em relação as jovens, enquanto que nos outros transportadores não houve diferenças significativas entre a

idade dos tecidos foliares. O *PoptrMATE53* apresentou elevada expressão no entrenó, e baixa expressão nas folhas.

### **3.6 Rede de correlação entre os genes *PoptrALMT10* e *PoptrMATE54* em bibliotecas de P e Al**

Os genes *PoptrALMT10* e *PoptrMATE54* foram avaliados em bibliotecas de Al e P afim de determinar quais genes estavam correlacionados a eles, utilizando correlação de Spearman com  $\rho \geq |0,8|$ , nos tecidos de raiz e folha (Figura 7). Foi observado que em na deficiência de fosforo, houve um comportamento diferente entre esses genes na folha e na raiz. Na raiz, tanto da deficiência de fosforo quanto na toxidez de Al o *PoptrALMT10* apresentou um maior número de genes correlacionados, em compensação na folha o *PoptrMATE54* apresentou maior número de genes correlacionados na parte área.

Na raiz exposta a baixa concentração de fosforo o gene *PoptrALMT10* apresentou 2757 genes conectados a ele e o gene *PoptrMATE54* apenas 680 genes conectados, sendo que não houve genes em comum entre o membro da família ALMT e o membro da família MATE. Em contrapartida, sob o mesmo estresse na folha foi observado um número bem menor de genes correlacionados aos dois membros dessas famílias sendo que, o gene *PoptrALMT10* apresentou 49 genes correlacionados enquanto que o *PoptrMATE54* apresentou 85 genes conectados, sendo que 3 eram em comum entre os dois.



**Figura 7** Rede de correlação entre os genes *PoptrALMT10* e *PoptrMATE54* nos estresses de P e Al. No estresse de fósforo foram analisados dois tecidos: folha e raiz. No estresse de alumínio somente raiz. A rede de correlação foi construída utilizando correlação de spearman com correlação mínima de |0,8|.

Na deficiência de fósforo quanto na toxidez de Al, na raiz, o *PoptrALMT10* apresentou um maior número de genes correlacionados, em compensação na folha o *PoptrMATE54* apresentou maior número de genes correlacionados na parte área. Em A.

*thaliana* o AtALMT1 é o responsável por conferir tolerância ao Al, embora o AtMATE auxilia com uma pequena contribuição na tolerância (LIU et al., 2009). Os genes *PoptrALMT10* e *PoptrMATE54* só apresentaram genes correlacionados em comum na raiz em estresse de Al, embora é bem estabelecido na literatura que a toxidez de Al está intimamente relacionada com a deficiência de fosforo (CARVALHO et al., 2016; KOCHIAN et al., 2015; RYAN; DELHAIZE, 2001).

Quando a raiz foi exposta ao alumínio foi observado um perfil diferente em comparação com o fosforo. O gene *PoptrALMT10* apresentou 203 genes conectados a ele, enquanto que o *PoptrMATE54* conteve 81 genes. Todavia o mais interessante é o número de genes que eles compartilharam, 35 genes dos quais 3 são fatores de transcrição: TrihelliX, NF-YB e bHLH. Uma das famílias de fatores de transcrição predominantes no estresse de Al em *A. thaliana* foi bHLH (KUMARI; TAYLOR; DEYHOLOS, 2008). Além disso, essa família é essencial na regulação genica em *Oryza sativa* em deficiência de Fe (OGO et al., 2007).

Os genes que apresentaram em conexões com *PoptrMATE54* e *PoptrALMT10* estão relacionados principalmente com o transporte de primário e secundário de ions através da membrana, maioritariamente, do núcleo, citoplasma e vacúolo, respectivamente (Apêndice C). Portanto, é possível afirmar que os genes *PoptrALMT10* e *PoptrMATE54* compartilham uma maquinaria de genes associados para contribuir no estresse de Al, enquanto que no estresse de P, eles atuam de modo isolado.

#### 4 CONCLUSÃO

Foi possível fornecer informações filogenéticas, sintenicas e de perfil de expressão de membros da família ALMT em *P. thrichocarpa*. Assim como, correlacionar as duas principais famílias de transportadores de ácidos orgânicos, MATE e ALMT, sendo um indicativo que, embora transportem diferentes substratos, podem estar envolvidos na mesma rota metabólica. Também foi possível observar que embora o estresse de Al esteja normalmente associado a deficiência de P, os genes *PoptrALMT10* e *PoptrMATE54* não apresentam correlação com genes em comum na folha, e apenas 3 genes na raiz sob estresse de P, sendo que no estresse de Al eles apresentaram 35 genes, sendo 3 fatores de transcrição. Além disso, o número de genes associados ao *PoptrALMT10* é maior na raiz, enquanto que, *PoptrMATE54* é maior nos tecidos foliares.



## REFERÊNCIAS

- ALBORESI, A. et al. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis. **Plant, Cell and Environment**: Malden, v. 28, n. 4, p. 500–512, 2005.
- BARCELO, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. **Environmental and Experimental Botany**: Amsterdã, v. 48, n. 1, p. 75–92, 2002.
- BASHIR, K.; ISHIMARU, Y.; SHIMO, H. Rice phenolics efflux transporter 2 (PEZ2) plays an important role in solubilizing apoplasmic iron. **Soil Science and Plant Nutrition**: [s.l: s.n.], v. 768, n. 57, p. 803–812, 2011.
- CARVALHO, G. et al. Back to Acid Soil Fields: The Citrate Transporter SbMATE Is a Major Asset for Sustainable Grain Yield for Sorghum Cultivated on Acid Soils. **Genes, Genomes, Genetics**: New York, v. 6, n. February, p. 475–484, 2016.
- CHAI, Y. et al. TRANSPARENT TESTA 12 genes from Brassica napus and parental species : cloning , evolution , and differential involvement in yellow seed trait. p. 109–123, 2009.
- CHEN, Z. C. et al. Adaptation to acidic soil is achieved by increased numbers of cis-acting elements regulating ALMT1 expression in *Holcus lanatus*. **Plant Journal**: Oxford, v. 76, n. 1, p. 10–23, 2013.
- CONESA, A. et al. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**: Oxford, v. 21, n. 18, p. 3674–3676, 2005.
- DE ANGELI, A. et al. The vacuolar channel VvALMT9 mediates malate and tartrate accumulation in berries of *Vitis vinifera*. **Planta**: Berlin Heidelberg, v. 238, n. 2, p. 283–291, 2013.
- DEBEAUJON, I. et al. The TRANSPARENT TESTA12 gene of Arabidopsis encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 13, n. 4, p. 853–871, 2001.
- DELHAIZE, E. et al. Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences: United States**: [s.l: s.n.], v. 101, n. 42, p. 15249–15254, 2004.
- DELHAIZE, E.; GRUBER, B. D.; RYAN, P. R. The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. **FEBS Letters**: Berlin, v. 581, n. 12, p. 2255–2262, 2007.
- DIENER, A. C.; GAXIOLA, R. A.; FINK, G. R. Arabidopsis ALF5, a multidrug efflux transporter gene family member, confers resistance to toxins. **Plant Cell**: Plant Cell, v. 13, n. 7, p. 1625–1638, 2001.
- FONTECHA, G. et al. Candidate gene identification of an aluminum-activated organic acid transporter gene at the Alt4 locus for aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.). **Theoretical and Applied Genetics**: Amsterdã, v. 114, n. 2, p. 249–260, 2007.

- FRANK, S. et al. Two differentially expressed MATE factor genes from apple complement the Arabidopsis transparent testa2 mutant. **Plant Biology**: Berlin, v. 13, n. 1, p. 42–50, 2011.
- GREEN, L. S. FRD3 Controls Iron Localization in Arabidopsis. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 136, n. 1, p. 2523–2531, 2004.
- GRUBER, B. D. et al. HvALMT1 from barley is involved in the transport of organic anions. **Journal of Experimental Botany**: London, v. 61, n. 5, p. 1455–1467, 2010.
- GRUBER, B. D. et al. Characterisation of HvALMT1 function in transgenic barley plants. **Functional Plant Biology**: [S.l.: s.n.], v. 38, n. 2, p. 163–175, 2011.
- HAAS, B. J. et al. DAGchainer: A tool for mining segmental genome duplications and synteny. **Bioinformatics**: Oxford, v. 20, n. 18, p. 3643–3646, 2004.
- HAUG-BALTZELL, A. et al. SynMap2 and SynMap3D: Web-based whole-genome synteny browsers. **Bioinformatics**: Oxford, v. 33, n. 14, p. 2197–2198, 2017.
- HE, X.; ZHANG, J. Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution. **Genetics**: [s.l.: s.n.], v. 169, n. 2, p. 1157–1164, 2005.
- ISHIHARA, T. et al. Overexpression of the Arabidopsis thaliana EDS5 gene enhances resistance to viruses. **Plant Biology**: Berlin, v. 10, n. 4, p. 451–461, 2008.
- ISHIMARU, Y. et al. A rice phenolic efflux transporter is essential for solubilizing precipitated apoplasmic iron in the plant stele. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 28, p. 24649–24655, 2011.
- JIN, J. et al. PlantTFDB 4.0: Toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. **Nucleic acids research**: London, v. 45, n. D1, p. D1040–D1045, 2017.
- KOBAYASHI, Y. et al. Characterization of the Complex Regulation of AtALMT1 Expression in Response to Phytohormones and Other Inducers. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 162, n. 2, p. 732–740, 2013.
- KOCHIAN, L. V. et al. How Do Crop Plants Tolerate Acid Soils? Mechanisms of Aluminum Tolerance and Phosphorous Efficiency. **Annual Review of Plant Biology**: [S.l.: s.n.], v. 55, n. 1, p. 459–493, 2004.
- KOCHIAN, L. V. et al. Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. **Annual Review of Plant Biology**: [S.l.: s.n.], v. 66, n. 1, p. 1–23, 2015.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7 . 0 for bigger datasets. p. 1–11, 2016.
- KUMARI, M.; TAYLOR, G. J.; DEYHOLOS, M. K. Transcriptomic responses to aluminum stress in roots of Arabidopsis thaliana. **Molecular Genetics and Genomics**: Amsterdã, v. 279, n. 4, p. 339–357, 2008.

- LI, L. et al. Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. **Journal of Biological Chemistry**: Rockville, v. 277, n. 7, p. 5360–5368, 2002.
- LIANG, C. et al. Low pH, Aluminum, and Phosphorus Coordinately Regulate Malate Exudation through GmALMT1 to Improve Soybean Adaptation to Acid Soils. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 161, n. 3, p. 1347–1361, 2013.
- LIGABA, A. et al. The BnALMT1 and BnALMT2 Genes from Rape Encode Aluminum-Activated Malate Transporters That Enhance the Aluminum Resistance of Plant Cells. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 142, n. 3, p. 1294–1303, 2006.
- LIU, J. et al. Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. **Plant Journal**: Oxford, v. 57, n. 3, p. 389–399, 2009.
- LYONS, E. et al. The Value of Nonmodel Genomes and an Example Using SynMap Within CoGe to Dissect the Hexaploidy that Predates the Rosids. **Tropical Plant Biology**: Amsterdã, v. 1, n. 3–4, p. 181–190, 2008.
- LYONS, E.; FREELING, M. How to usefully compare homologous plant genes and chromosomes as DNA sequences. **Plant Journal**: Oxford, v. 53, n. 4, p. 661–673, 2008.
- MAGALHAES, 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, 2007.
- MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures. **Nucleic acids research**: London, v. 45, n. D1, p. D200–D203, 2017.
- MARON, L. G. et al. 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. **Plant Journal**: Oxford, v. 61, n. 5, p. 728–740, 2010.
- MORITA, M. et al. Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [s.l: s.n.], v. 106, n. 7, p. 2447–52, 2009.
- NAWRATH, C. et al. EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in Arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 14, n. 1, p. 275–86, 2002.
- OGO, Y. et al. The rice bHLH protein OsIRO2 is an essential regulator of the genes involved in Fe uptake under Fe-deficient conditions. **Plant Journal**: Oxford, v. 51, n. 3, p. 366–377, 2007.
- PÉREZ-DÍAZ, R. et al. VvMATE1 and VvMATE2 encode putative proanthocyanidin transporters expressed during berry development in *Vitis vinifera* L. **Plant Cell Reports**: Amsterdã, v. 33, n. 7, p. 1147–1159, 2014.

- RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling and Behavior**: Amsterdã, v. 6, n. 11, p. 1720–1731, 2011.
- RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. Function and mechanism of Organic Anion Exudation from Plant Roots. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**: London, v. 52, p. 527–560, 2001.
- SASAKI, T. et al. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **Plant Journal**: Oxford, v. 37, n. 5, p. 645–653, 2004.
- SASAKI, T. et al. Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum-activated malate transporter. **Plant and Cell Physiology**: London, v. 51, n. 3, p. 354–365, 2010.
- SEO, P. J. J. et al. A Golgi-localized MATE transporter mediates iron homeostasis under osmotic stress in Arabidopsis. **The Biochemical journal**: London, v. 442, n. 3, p. 551–61, 2012.
- SERRANO, M. et al. Export of salicylic acid from the chloroplast requires the multidrug and toxin extrusion-like transporter EDS5. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 162, n. 4, p. 1815–21, 2013.
- SHITAN, N. et al. Involvement of the leaf-specific multidrug and toxic compound extrusion (mate) transporter Nt-JAT2 in vacuolar sequestration of nicotine in nicotiana tabacum. **PLoS one**: Cambridge, v. 9, n. 9, p. 1–10, 2014.
- SHOJI, T. et al. Multidrug and Toxic Compound Extrusion-Type Transporters Implicated in Vacuolar Sequestration of Nicotine in Tobacco Roots. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 149, n. 2, p. 708–718, 2009.
- SILVA, I. R. et al. Responses of eucalypt species to aluminum: the possible involvement of low molecular weight organic acids in the Al tolerance mechanism. **Tree physiology**: London, v. 24, n. 11, p. 1267–1277, 2004.
- SUN, X. et al. ADS1 encodes a MATE-transporter that negatively regulates plant disease resistance. **New Phytologist**: London, v. 192, n. 2, p. 471–482, 2011.
- SUNDELL, D. et al. The Plant Genome Integrative Explorer Resource: PlantGenIE.org. **New Phytologist**: London, v. 208, n. 4, p. 1149–1156, 2015.
- TAKANASHI, K. et al. A multidrug and toxic compound extrusion transporter mediates berberine accumulation into vacuoles in *Coptis japonica*. **Phytochemistry**: Amsterdã, v. 138, p. 76–82, 2017.
- THOMPSON, E. P. et al. An Arabidopsis flavonoid transporter is required for anther dehiscence and pollen development. **Journal of Experimental Botany**: London, v. 61, n. 2, p. 439–451, 2010.
- TIWARI, M. et al. Expression of OsMATE1 and OsMATE2 alters development, stress responses and pathogen susceptibility in Arabidopsis. **Scientific reports**: New York, v. 4, p. 3964, 2014.

TUSKAN, G. A. et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). **Science**: New York, v. 313, n. 5793, p. 1596–1604, 2006.

TUSNÁDY, G. E.; SIMON, I. Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. **Journal of molecular biology**: Amsterdã, v. 283, n. 2, p. 489–506, 1998.

VON UEXKÜLL, H. R.; MUTERT, E. Global Extent, Development and Economic-Impact of Acid Soils. **Plant and Soil**: Amsterdã, v. 171, p. 1–15, 1995.

WANG, X. Y.; PATERSON, A. H. Gene conversion in angiosperm genomes with an emphasis on genes duplicated by polyploidization. **Genes**: Zurique, v. 2, n. 1, p. 1–20, 2011.

YAMASAKI, K. et al. Chloroplast envelope localization of EDS5, an essential factor for salicylic acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Signaling and Behavior**: Amsterdã, v. 8, n. 4, p. 6–11, 2013.

YOSHIDA, T.; MOGAMI, J.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. **Current Opinion in Plant Biology**: Amsterdã, v. 21, p. 133–139, 2014.

ZDOBNOV, E. M.; APWEILER, R. InterProScan - an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. **Bioinformatics**: Oxford, v. 17, n. 9, p. 847–848, 2001.

ZHANG, H. et al. A DTX/MATE-type transporter facilitates abscisic acid efflux and modulates ABA sensitivity and drought tolerance in *Arabidopsis*. **Molecular plant**: [S.l.: s.n.], v. 7, n. 10, p. 1522–1532, 2014.

ZHANG, H. et al. Two tonoplast MATE proteins function as turgor-regulating chloride channels in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [s.l.: s.n.], v. 114, n. 10, p. E2036–E2045, 2017.

ZHAO, J. et al. MATE2 Mediates Vacuolar Sequestration of Flavonoid Glycosides and Glycoside Malonates in *Medicago truncatula*. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 23, n. 4, p. 1536–1555, 2011.

ZHAO, J.; DIXON, R. A. MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-O-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 21, n. 8, p. 2323–2340, 2009.

**APÊNDICE A** - Lista de membros da família ALMT em *Populus trichocarpa*

| Name        | Gene             | Conserved domain |                     | Transmembrane domain | Aminoacidic number |
|-------------|------------------|------------------|---------------------|----------------------|--------------------|
|             |                  | Accession        | Short name          |                      |                    |
| PoptrALMT7  | Potri.016G070000 | pfam11744        | ALMT                | 6                    | 474                |
| PoptrALMT8  | Potri.006G203100 | pfam11744        | ALMT                | 5                    | 505                |
| PoptrALMT6  | Potri.016G070100 | pfam11744        | ALMT                | 5                    | 487                |
| PoptrALMT4  | Potri.009G017800 | pfam11744        | ALMT                | 6                    | 483                |
| PoptrALMT3  | Potri.001G217200 | pfam11744        | ALMT                | 6                    | 451                |
| PoptrALMT5  | Potri.009G017900 | pfam11744        | ALMT                | 5                    | 466                |
| PoptrALMT1  | Potri.001G217400 | pfam11744        | ALMT                | 5                    | 450                |
| PoptrALMT2  | Potri.001G217300 | pfam11744        | ALMT                | 4                    | 476                |
| PoptrALMT9  | Potri.001G085900 | pfam11744        | ALMT                | 6                    | 498                |
| PoptrALMT11 | Potri.002G174600 | pfam11744        | ALMT                | 7                    | 491                |
| PoptrALMT10 | Potri.003G145000 | pfam11744        | ALMT                | 7                    | 510                |
| PoptrALMT13 | Potri.001G144300 | pfam11744        | ALMT                | 5                    | 528                |
| PoptrALMT12 | Potri.014G101200 | cl26164          | ALMT<br>superfamily | 5                    | 424                |
| PoptrALMT14 | Potri.002G054300 | pfam11744        | ALMT                | 6                    | 424                |
| PoptrALMT15 | Potri.005G208500 | pfam11744        | ALMT                | 6                    | 425                |
| PoptrALMT20 | Potri.008G118600 | pfam11744        | ALMT                | 6                    | 555                |
| PoptrALMT16 | Potri.001G097300 | pfam11744        | ALMT                | 6                    | 541                |
| PoptrALMT19 | Potri.015G053400 | pfam11744        | ALMT                | 7                    | 630                |
| PoptrALMT18 | Potri.010G127400 | pfam11744        | ALMT                | 5                    | 393                |
| PoptrALMT17 | Potri.003G134100 | pfam11744        | ALMT                | 7                    | 513                |

**APÊNDICE B** – Lista de membros da família MATE em *Populus trichocarpa*

| Name        | Gene             | Conserved Domain |                          | Transmembrane domain | Aminoacidic number |
|-------------|------------------|------------------|--------------------------|----------------------|--------------------|
|             |                  | Accession        | Short name               |                      |                    |
| PoptrMATE1  | Potri.011G002800 | cd13132          | MATE_eukaryotic          | 12                   | 501                |
| PoptrMATE2  | Potri.011G002700 | cd13132          | MATE_eukaryotic          | 12                   | 500                |
| PoptrMATE3  | Potri.011G002900 | cd13132          | MATE_eukaryotic          | 12                   | 499                |
| PoptrMATE4  | Potri.004G016400 | cd13132          | MATE_eukaryotic          | 12                   | 499                |
| PoptrMATE5  | Potri.011G002600 | cd13132          | MATE_eukaryotic          | 12                   | 516                |
| PoptrMATE6  | Potri.014G153100 | cd13132          | MATE_eukaryotic          | 12                   | 503                |
| PoptrMATE7  | Potri.011G002200 | cd13132          | MATE_eukaryotic          | 12                   | 508                |
| PoptrMATE8  | Potri.011G002500 | cd13132          | MATE_eukaryotic          | 12                   | 513                |
| PoptrMATE9  | Potri.011G002400 | cd13132          | MATE_eukaryotic          | 12                   | 513                |
| PoptrMATE10 | Potri.002G055100 | cd13132          | MATE_eukaryotic          | 12                   | 423                |
| PoptrMATE11 | Potri.005G207600 | cd13132          | MATE_eukaryotic          | 12                   | 505                |
| PoptrMATE12 | Potri.005G207500 | cd13132          | MATE_eukaryotic          | 12                   | 505                |
| PoptrMATE13 | Potri.002G102100 | cd13132          | MATE_eukaryotic          | 12                   | 492                |
| PoptrMATE14 | Potri.002G102000 | cd13132          | MATE_eukaryotic          | 12                   | 486                |
| PoptrMATE15 | Potri.007G010200 | cd13132          | MATE_eukaryotic          | 11                   | 521                |
| PoptrMATE16 | Potri.005G160700 | cd13132          | MATE_eukaryotic          | 12                   | 488                |
| PoptrMATE17 | Potri.002G132300 | cl09326          | MATE_like<br>superfamily | 2                    | 157                |
| PoptrMATE18 | Potri.019G063500 | cd13132          | MATE_eukaryotic          | 13                   | 556                |
| PoptrMATE19 | Potri.008G187100 | cd13132          | MATE_eukaryotic          | 12                   | 504                |
| PoptrMATE20 | Potri.012G125700 | cl09326          | MATE_like<br>superfamily | 1                    | 120                |
| PoptrMATE21 | Potri.015G147600 | cd13132          | MATE_eukaryotic          | 12                   | 506                |

|             |                  |         |                          |    |     |
|-------------|------------------|---------|--------------------------|----|-----|
| PoptrMATE22 | Potri.012G144900 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 12 | 515 |
| PoptrMATE23 | Potri.014G086800 | cl09326 | MATE_like<br>superfamily | 4  | 171 |
| PoptrMATE24 | Potri.002G161200 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 12 | 544 |
| PoptrMATE25 | Potri.010G116700 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 12 | 481 |
| PoptrMATE26 | Potri.010G117000 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 12 | 485 |
| PoptrMATE27 | Potri.008G126500 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 12 | 467 |
| PoptrMATE28 | Potri.010G116900 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 12 | 402 |
| PoptrMATE29 | Potri.004G093400 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 12 | 475 |
| PoptrMATE30 | Potri.004G094700 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 12 | 475 |
| PoptrMATE31 | Potri.019G075800 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 10 | 390 |
| PoptrMATE32 | Potri.013G101500 | cl09326 | MATE_like<br>superfamily | 2  | 203 |
| PoptrMATE33 | Potri.017G120500 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 12 | 479 |
| PoptrMATE34 | Potri.004G094800 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 9  | 380 |
| PoptrMATE35 | Potri.004G094900 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 13 | 478 |
| PoptrMATE36 | Potri.017G120600 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 12 | 501 |
| PoptrMATE37 | Potri.004G016600 | cl09326 | MATE_like<br>superfamily | 0  | 88  |
| PoptrMATE38 | Potri.011G117100 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 12 | 485 |
| PoptrMATE39 | Potri.011G117300 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 12 | 489 |
| PoptrMATE40 | Potri.011G117400 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 11 | 476 |
| PoptrMATE41 | Potri.011G117200 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 10 | 385 |
| PoptrMATE42 | Potri.013G115600 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 12 | 502 |
| PoptrMATE43 | Potri.019G086100 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 12 | 501 |
| PoptrMATE44 | Potri.016G134800 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 10 | 475 |
| PoptrMATE45 | Potri.002G107200 | cd13132 | MATE_eukaryotic          | 11 | 555 |

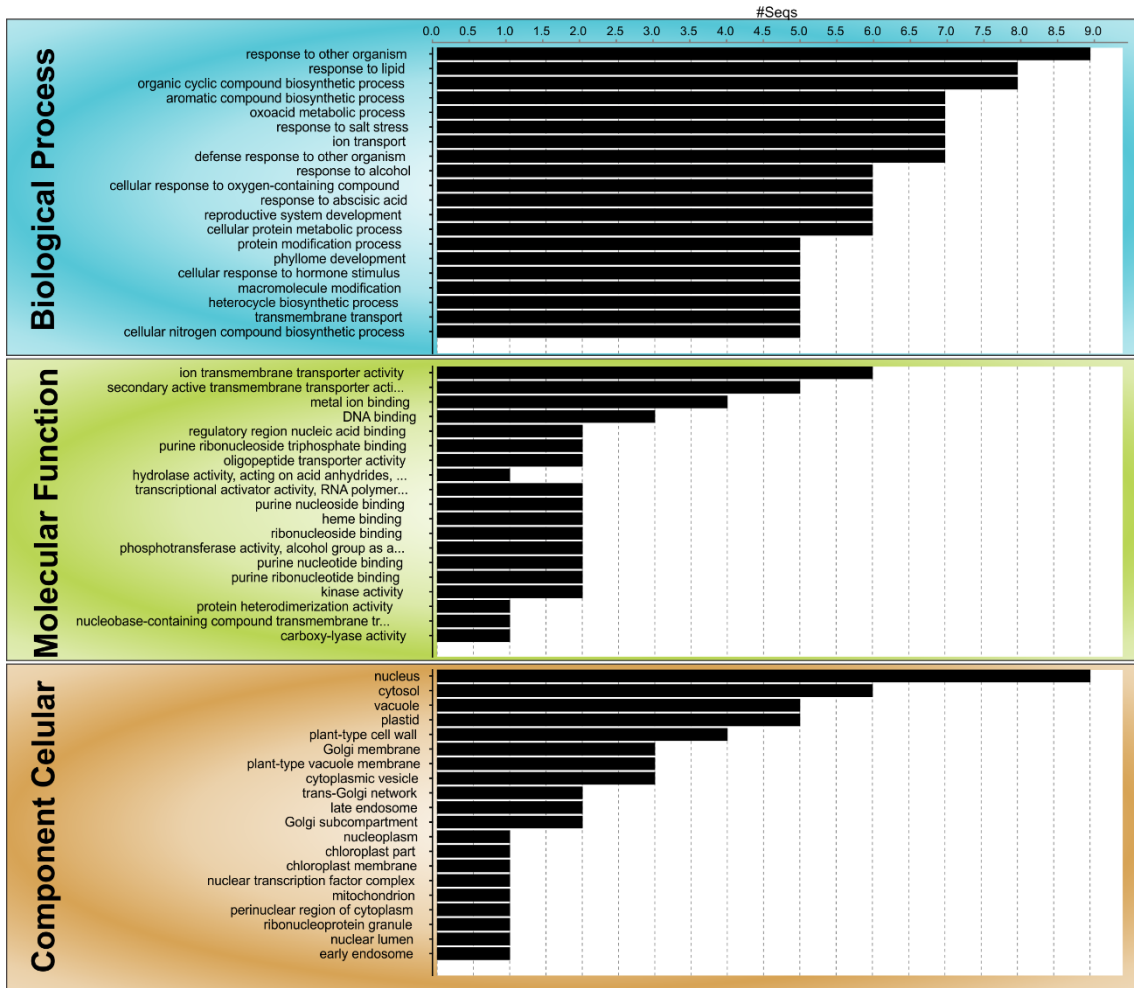


|             |                  |         |                 |    |     |
|-------------|------------------|---------|-----------------|----|-----|
| PoptrMATE46 | Potri.007G043100 | cd13132 | MATE_eukaryotic | 12 | 526 |
| PoptrMATE47 | Potri.003G121400 | cd13132 | MATE_eukaryotic | 12 | 526 |
| PoptrMATE48 | Potri.012G133500 | cd13132 | MATE_eukaryotic | 12 | 518 |
| PoptrMATE49 | Potri.015G135600 | cd13132 | MATE_eukaryotic | 11 | 554 |
| PoptrMATE50 | Potri.009G122600 | cd13136 | MATE_DinF_like  | 12 | 473 |
| PoptrMATE51 | Potri.009G122900 | cd13136 | MATE_DinF_like  | 10 | 483 |
| PoptrMATE52 | Potri.016G126000 | cd13136 | MATE_DinF_like  | 10 | 608 |
| PoptrMATE53 | Potri.009G061100 | cd13136 | MATE_DinF_like  | 12 | 548 |
| PoptrMATE54 | Potri.001G266900 | cd13136 | MATE_DinF_like  | 12 | 536 |
| PoptrMATE55 | Potri.016G053600 | cd13136 | MATE_DinF_like  | 13 | 511 |
| PoptrMATE56 | Potri.009G053700 | cd13136 | MATE_DinF_like  | 12 | 514 |

---

**APÊNDICE C - Anotação dos genes correlacionados tanto ao *PoptrALMT10* quanto ao *PopMATE54* através da ferramenta BLAST2GO.**

**GO Distribution by Level (5) - Top 20**



**Artigo 3:** Análise global da família de transportadores MATE em *Eucalyptus grandis*

## ANALISE GLOBAL DA FAMÍLIA DE TRANSPORTADORES MATE EM *Eucalyptus grandis*

### RESUMO

*Eucalyptus* (família das *Myrtaceae*) é uma gênero que apresenta impacto econômico tanto no Brasil quanto no mundo. Os produtos advindos do eucalipto merecem destaque, do caule extrai, a madeira e celulose, e da folha, essências e fármacos. A família de transportadores MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) é responsável pelo transporte tanto de compostos do metabolismo primários quanto secundário. Portanto, afim de elucidar essa família em eucalipto foi realizada análises filogenéticas, sintenicas e de expressão para fornecer indicativos da provável função das proteínas MATE. Com o mesmo intuito, foi realizado estudos de correlação para fornecer uma base teórica dos fatores de transcrição correlacionados com genes, bem como a interação entre os próprios membros da família. Dessa maneira, foram identificados 58 membros da família de transportadores *MATE*, dos quais 55% estavam duplicados e 40% apresentam expressão constitutiva, sendo que 20 membros apresentaram ortólogos em *A. thaliana*. Em eucalipto, 32 *MATE* foram fortemente associados com famílias de fatores de transcrição, tanto positivamente: *MYB*, *bHLH* e *C2H2*; como negativamente: *MIKC\_MADS* e *M\_type\_MADS*. Os genes correlacionados com os *MATE* em eucalipto estão envolvidos principalmente em processos: metabólicos e celulares, sendo que 43 *MATE* estão correlacionados entre si, tanto positivamente quanto negativamente. Dos 58 *MATE* de eucalipto apenas 15 não apresentaram correlação com nenhum outro membro da família, mostrando que alguns membros estão envolvidos em rotas metabólicas mais específicas. Portanto, esse trabalho serve elucidar a família MATE em eucalipto bem como fornece informações para a maior compreensão da família e vir a ser utilizado no futuro para o melhoramento genético.

**Palavra-chave:** Filogenia. Sintenia. RNA-seq. Rede de correlação.

## GENOME-WIDE ANALYSIS OF THE MATE TRANSPORTERS FAMILY IN *Eucalyptus grandis*

### ABSTRACT

*Eucalyptus* (family of *Myrtaceae*) is a genus that has economic impact both in Brazil and in the world. The products derived from eucalyptus stand out, from the stem extracts, the wood and cellulose, and the leaf, essences and drugs. The family of transporters MATE (multidrug and toxic compound extrusion) is responsible for transport compounds in both primary and secondary metabolism. Therefore, in order to elucidate this family in eucalyptus, phylogenetic, syntenic and expression analyzes were performed to provide indications of the probable function of MATE proteins. With the same intention, correlation studies were carried out to provide a theoretical basis of the transcription factors correlated with genes, as well as the interaction among the family members themselves. In this way, 58 members of the *MATE* transporter family were identified, of which 55% were duplicates and 40% presented constitutive expression, and 20 members presented orthologs in *A. thaliana*. In eucalyptus, 32 *MATE* were strongly associated with families of transcription factors, both positively: *MYB*, *bHLH* and *C2H2*; as negatively: *MIKC\_MADS* and *M\_type\_MADS*. The genes correlated with *MATE* in eucalyptus are mainly involved in: metabolic and cellular processes, and 43 *MATE* are correlated with each other, both positively and negatively. Of the 58 *MATE* of eucalyptus, only 15 showed no correlation with any other family member, showing that some members are involved in more specific metabolic pathways. Therefore, this work serves to elucidate the *MATE* family in eucalyptus as well as provides information for the greater understanding of the family and to be used in the future for breeding.

**Keyword:** Phylogeny. Synteny. RNA-seq. Network.

## 1 INTRODUÇÃO

*Eucalyptus* (família das *Myrtaceae*) é um gênero nativo da Austrália, apresentando tanto diversidade no número de espécies, mais de 700 espécies catalogadas, quanto em aplicações (ANDRADE, 1961). O plantio de florestas, principalmente aquelas utilizando o gênero *Eucalyptus*, possuem um impacto na economia mundial. Em 2016 o Brasil possuía 7,84 milhões de hectares de área plantadas com árvores onde 5,7 milhões de hectares eram ocupados por eucaliptos (72%). Tendo no mesmo ano uma receita de US\$8,9 bilhões com exportação madeireira, sendo responsável por 6,2% do PIB do Brasil (IBA, 2017).

O eucalipto além de ser utilizado para a indústria de madeira, carvão e celulose também exercer uma série de serviços secundários através dos óleos essenciais, como por exemplo, inseticida, fungicida e bactericida (BROOKER; KLEINING, 2006; DE SOUZA; FAVERO, 2015; QUATRIN et al., 2017). Além disso, para indústria farmacêutica e de perfumaria o eucalipto se destaca em relação a outras lenhosas, devido a qualidade superior de seu óleo e a sua vasta aplicabilidade (SILVA et al., 2015). Assim, os metabolitos secundários apresentam impacto na cultura do eucalipto por estarem envolvidos tanto nos aspectos fisiológicos: desenvolvimento, comunicação com outras espécies e adaptação a estresses ambientais, como agregando valor econômico.

A família de transportadores MATE, *multi drug and toxic compound extrusion*, responsável pelo transporte de substratos relacionados ao metabolismo primário quanto secundário, está presente em todos os reinos (HVORUP et al., 2003; TAKANASHI; SHITAN; YAZAKI, 2014). Diversos membros dessa família foram caracterizados em plantas, transportando diferentes substratos em resposta a diferentes estímulos, como por exemplo, detoxificação de metal pesado (LI et al., 2002), resistência a doenças (ISHIHARA et al., 2008; SUN et al., 2011), tolerância a estresse de Al (KOCHIAN et al., 2015; LIU et al., 2009, 2016; MAGALHAES et al., 2007; YOKOSHO et al., 2009), absorção de Fe (GREEN, 2004; ZHANG et al., 2017), transporte de metabolitos secundários: alcaloide (SHOJI et al., 2009), flavonoides (ZHAO; DIXON, 2009) e antocianinas (PÉREZ-DÍAZ et al., 2014), assim como hormônios vegetais (SERRANO et al., 2013; YAMASAKI et al., 2013).

Apesar da diversidade tanto de atividade quanto do substrato a ser transportado a família MATE apresenta algumas características em comum. O MATE é um transportador secundário, utilizando um gradiente eletroquímico de  $\text{Na}^+$  ou  $\text{H}^+$  como força motriz, sendo

assim, ele realiza o transporte no sentido citoplasma para apoplasto ou para vacúolo (TAKANASHI; SHITAN; YAZAKI, 2014). Em relação a proteína, os membros dessa família apresentam aproximadamente 500 resíduos de aminoácidos, 12 domínios transmembranares e com uma identidade proteica próxima dos 40% entre os membros da família (MAGALHAES, 2010). Outra característica comum dessa família é a presença do domínio conservado *MATE-like superfamily* (cl09326), região onde apresenta maior identidade entre os membros (MARCHLER-BAUER et al., 2017).

Em *Eucalyptus* spp. Submetidos ao estresse de Al já foram caracterizados membros da família MATE responsáveis pelo transporte de citrato na raiz sob o estresse de alumínio: 4 membros em *E. camaldulensis* (SAWAKI et al., 2013), e 1 membro *E. urograndis* (SAWAKI et al., 2014), sendo o *EcMATE1* e o *EguMATE1* os únicos a serem responsáveis ao Al. Logo é necessário o estudo mais geral dessa família genica para fornecer subsídios para o programa de melhoramento, uma vez que não está somente relacionada ao estresse de Al. Assim, o estudo da família MATE em eucalipto se justifica pelo impacto econômico da cultura e ampla gama de processos biológicos que essa família está envolvida. Isso posto, foram identificados 58 membros da família de transportadores MATE, dos quais 43 demonstram compartilhar das mesmas rotas biológicas. Além disso, foi possível, com base nos membros caracterizados na literatura e as análises filogenéticas e sintenicas, prover indícios da provável função e afinidade de substrato desses transportadores. Portanto, essas informações servem como base para estudos mais aprofundados dessa família em eucalipto.

## 2 MATÉRIAS E MÉTODOS

### 2.1 Caracterização da família MATE em *E. grandis*

Por meio do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)), foram obtidas as sequências proteicas dos genes já caracterizados da família de transportadores *MATE* em diferentes espécies. Estas sequências foram utilizadas para identificar homólogos em banco de dados de *E. grandis* disponíveis no *Phytozome* ([phytozome.jgi.doe.gov](http://phytozome.jgi.doe.gov)), onde foram efetuadas buscas por genes homólogos a partir da ferramenta *BLASTp* (*Basic local alignment search tool*), utilizando como critérios, identidade maior que 50% e e-valor menor que  $1e^{-5}$ .

Para identificar a similaridade com a família MATE foi realizada uma análise do domínio conservado, onde as sequencias que saíram de resultado do BLAST foram submetidas à busca por domínios conservados no banco de dados *Conserved Domain Database – National Center for Biotechnology Information (CDD-NCBI)* a partir da ferramenta *Conserved Domain Search* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) (MARCHLER-BAUER et al., 2017).

Para identificação do número de domínios transmembranares foi utilizado a ferramenta HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/index.php>) (TUSNÁDY; SIMON, 1998), sendo preditos o número e a posição dos domínios transmembranares de cada proteína.

## 2.2 Análises filogenéticas e sintenicas

As sequências proteicas de eucaliptos (58 sequencias) e a dos MATE caracterizados na literatura (43 sequencias) foram submetidas aos softwares *MEGA 7* ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), para a realização do alinhamento proteico e construção da árvore filogenética do tipo *neighbor joining* com *bootstrap* 1000 repetições. Os grupos e subgrupos foram selecionados manualmente com base na distribuição dos MATE caracterizados.

Para identificação dos blocos sintenicos foram realizadas comparações entre o genoma de eucalipto (*E. grandis* x *E. grandis*) e com o genoma de arabidopsis (*E. grandis* x *A. thaliana*), utilizando o algoritmo *SynMap* (<https://genomevolution.org/coge/SynMap.pl>) (LYONS et al., 2008), através do algoritmo *DAGchainer* (HAAS et al., 2004) utilizando a opção de ordem de gene relativa com um mínimo de 5 pares de genes alinhados e uma distância máxima de 20 genes entre duas combinações. Foi utilizado QuotaAlign para fundir blocos sintenicos adjacentes (HAUG-BALTZELL et al., 2017). Para determinar as duplicações genicas foi utilizado o algoritmo Blast2raw disponível nas ferramentas do CoGe (<https://genomevolution.org/coge/>) (LYONS; FREELING, 2008).

## 2.3 Perfil de expressão dos genes MATE

A expressão absoluta dos 58 genes de *E. grandis* pertencentes a família de transportadores MATE foi determinada através de dados públicos de RNA-seq (Apêndice A), utilizando o alinhador Salmon (PATRO et al., 2017) e o transcriptoma primário de *E. grandis*



disponível no *Phytozome* ([phytozome.jgi.doe.gov](http://phytozome.jgi.doe.gov)) . Os dados de cambium, xilema em desenvolvimento, folha jovem, folha adulta, folhas infestadas, folhas controle, raiz controle e raiz com elevado CO<sub>2</sub> foram obtidas no banco SRA, sendo mostrado no gráfico a média aritmética da quantificação dos transcritos obtidos em cada uma repetição dessas bibliotecas. O gráfico do perfil de expressão foi construído utilizando o pacote *heatmap* disponível no banco de dados *Bioconductor* (<https://bioconductor.org>).

## 2.4 Correlação dos genes *MATE*

Foram alinhadas utilizando Salmon (PATRO et al., 2017) 51 bibliotecas de RNA-seq (Apêndice A), contra o transcriptoma primário de *E. grandis*. A correlação de expressão entre os transportadores *MATE* com o transcriptoma foi realizada utilizando correlação de Spearman com um coeficiente de correlação  $\rho \geq |0,85|$ . E a correlação entre os próprios transportadores *MATE* foi utilizado coeficiente  $\rho \geq |0,7|$ .

As sequencias de nucleotídeos dos transcritos que apresentaram coeficiente de correlação  $\rho \geq |0,85|$  com os transportadores *MATE* foram analisadas utilizando a ferramenta *Transcription Factor Prediction* disponível no PlantTFDB 4.0 (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/prediction.php>) (JIN et al., 2017). A rede de coexpressão de fatores de transcrição foi construída utilizando somente os transcritos que foram categorizados como fatores de transcrição e os genes *MATE*. Sendo que para a visualização de todas as redes de correlação foi utilizado o software *Cytoscape* (CLINE et al., 2007).

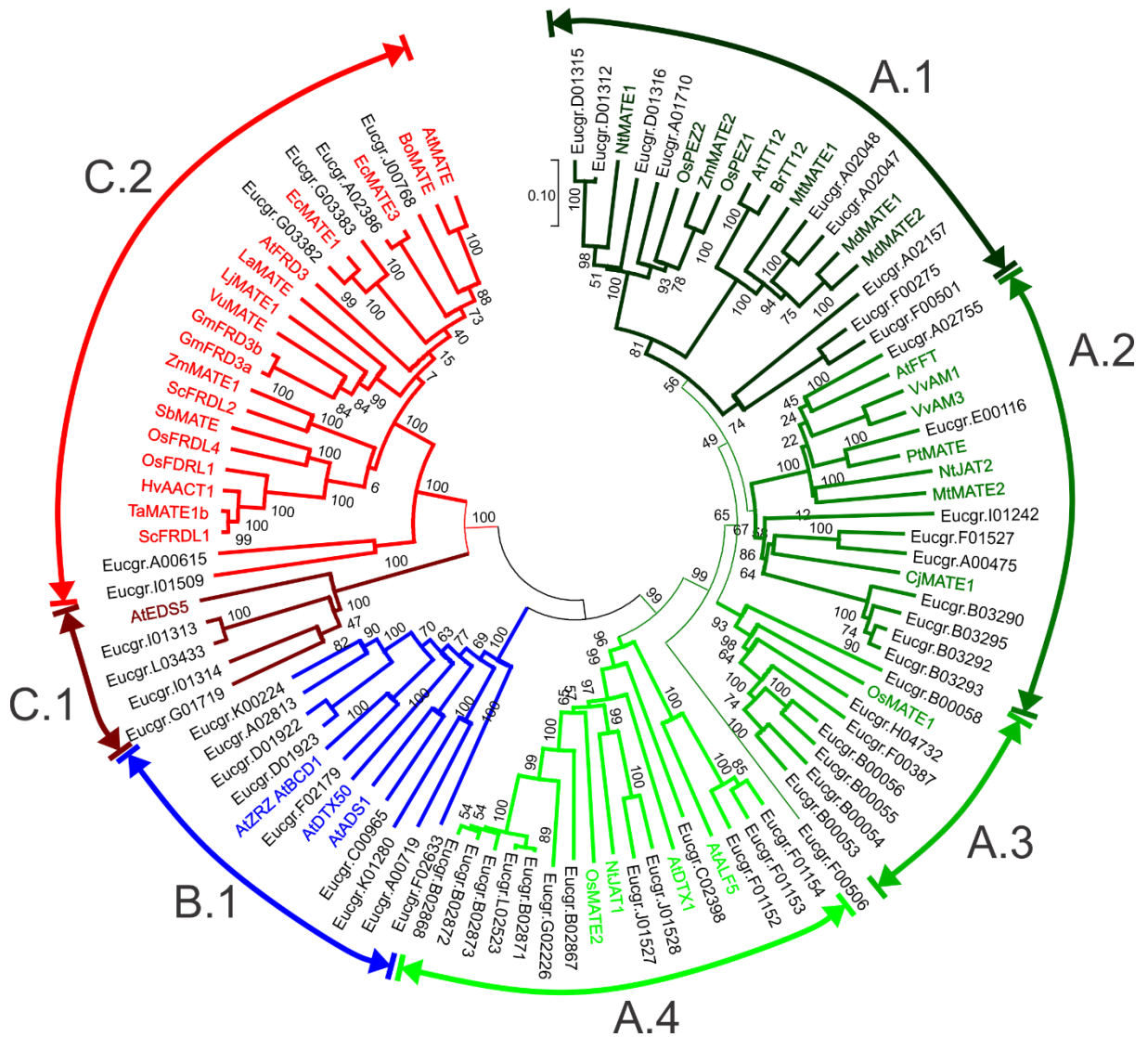
## 2.5 Enriquecimento dos dados utilizando BLAST2GO

O enriquecimento dos genes que apresentaram correlação  $\rho \geq |0,7|$  foi realizado através do protocolo do BLAST2GO (CONESA et al., 2005). Utilizando o algoritmo InterProScan (ZDOBNOV; APWEILER, 2001) para determinação dos motivos das sequências e seus domínios conservados.

### **3 RESULTADO E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Análise filogenética da família de transportadores MATE em *E. grandis***

Foram identificados 58 membros da família de transportadores MATE em *E. grandis* (Apêndice B) que apresentaram homologia através de alinhamento proteico com 43 sequências desta família caracterizadas funcionalmente em outras espécies de plantas. A árvore foi dividida em três clados ou 7 subclados, sendo a categorização dos clados feita com base no substrato transportado e na funcionalidade dos MATE caracterizados na literatura (Figura 1).



**Figura 1** Filogenia da família de transportadores MATE. Todas as sequencias proteicas dos transportadores MATE encontradas em eucalipto (58 sequencias) agrupadas conjuntamente com outros transportadores MATE caracterizados funcionalmente em outras espécies de plantas (43 sequencias). A árvore está em escala, com a distância das ramificações nas mesmas unidades que as distancias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distancias evolutivas foram calculadas utilizando o método *p-distance*. A história evolutiva foi inferida utilizando o método *Neighbor-Joining* com 1000 bootstraps.

O grande número de membros da família de transportadores MATE pode ser resultado de duplicações genéticas ocorridas durante a evolução das plantas (CANNON et al., 2004). O número de membros encontrados em *E. grandis* condiz com o valor encontrados na literatura para outras espécies de plantas: 45 em *Oryza sativa* (WANG et al., 2017), 56 em *A. thaliana* (LI et al., 2002), 67 em *Solanum lycopersicum* (SANTOS et al., 2017), 70 em *Medicago truncatula* (WANG et al., 2017), 71 em *Populus trichocarpa* (LI et al., 2017) e 117 em *Glycine max* (LIU et al., 2016). Em vista do alto número de membros, um ponto de partida para a determinação da afinidade por substrato ou atividade da proteína é através de

alinhamentos proteicos e a construção da árvore filogenética com membros já caracterizados funcionalmente.

O clado A (verde) é o que apresenta o maior número de sequências, com 39 transportadores MATE de eucalipto e pode ser subdividido em 4 subgrupos. A proteína Eucgr.F00506 está no clado A mas não apresentou proximidade filogenética significativa com nenhum dos MATE caracterizados, portanto não ficou alocado em nenhum subclado.

O subgrupo A.1, que contém 9 membros de eucalipto, apresenta sequências relacionadas majoritariamente ao transporte de compostos fenólicos, sendo dois *PHENOLICS EFFLUX ZERO* em arroz, OsPEZ1 e OsPEZ2, que estão envolvidos com a translocação de ferro no xilema, transportando diferentes compostos fenólicos e OsPEZ2 que também está envolvido na destoxificação de Al (BASHIR; ISHIMARU; SHIMO, 2011; ISHIMARU et al., 2011). ZmMATE2 está associado a uma *Quantitative trait locus* (QTL) relacionada a tolerância ao alumínio em milho, onde os compostos fenólicos transportados podem auxiliar na tolerância ao Al (KIDD et al., 2001; MARON et al., 2010). O gene *NtMATE1* é o único desse subgrupo que apresenta expressão somente na raiz, onde a proteína transporta nicotina para o vacúolo auxiliando na destoxificação da raiz, onde ocorre a síntese desse composto (SHOJI et al., 2009). No mesmo subclado, existe MATE que estão envolvidos com o transporte de flavonoides para o vacúolo, como *TRANSPARENT TESTE 12* (AtTT12) de *Arabidopsis thaliana* (DEBEAUJON et al., 2001; MARINOVA et al., 2007), BrTT12 de *Brassica rapa* (CHAI et al., 2009), MtMATE1 de *Medicago truncatula* (ZHAO; DIXON, 2009) e MdMATE1 e MdMATE2 de *Malus domestica* (FRANK et al., 2011).

Os transportadores *FLOWER FLAVONOID TRANSPORTER* (AtFFT) em *A. thaliana*, VvAM1 e VvAM3 de videira, PtMATE de *Populus trichocarpa*, NtJAT2 de *Nicotiana tabacum* e MtMATE2 de *Medicago truncatula*, ficaram localizados no subclado A.2 juntamente com 9 membros de eucalipto. Os membros caracterizados desse grupo estão envolvidos com transporte de metabolitos secundários. A proteína AtFFT é considerada como transportadora de flavonoides, sendo o gene que a codifica o mais expresso nos tecidos florais, embora quanto tenha sido silenciado, houve alterações na raiz, semente e pólen (THOMPSON et al., 2010). MtMATE2, VvAM1 e VvAM3 estão envolvidos no transporte de antocianina para o vacúolo (GOMEZ et al., 2009; MARINOVA et al., 2007). NtJAT2 transporta alcaloides, como a nicotina, para o vacúolo das células da folha de Tabaco (SHITAN et al., 2014). A proteína CJMATE1, caracterizado em *Coptis japonica* como

transportador de berberina, um alcaloide, no vacúolo e o gene apresenta expressão preferencial no rizoma (TAKANASHI et al., 2017).

Alguns membros da família MATE agrupados no subclado A.3 não apresentam função bem definida, como é o caso do OsMATE1, que quando o gene foi superexpressado em *A. thaliana* demonstrou a sua relação com o crescimento da planta, desenvolvimento e resposta negativa ao estresse biótico (TIWARI et al., 2014). Neste clado que possui apenas um gene caracterizado, foram agrupadas 7 sequências de eucalipto.

O subgrupo A.4 apresenta 13 proteínas MATE de eucalipto e 4 já caracterizadas. Apesar de não transportarem o mesmo substrato, estão envolvidas no transporte de componentes específicos para a defesa da planta. O NtJAT1 é um transportador de nicotina em *N. tabacum* com expressão em caule, folha e raiz, sendo o gene ativado pelo jasmonato (MORITA et al., 2009). Em *A. thaliana* o gene *ABERRANT LATERAL ROOT FORMATION 5* (*AtALF5*) é expresso nas células epidérmicas da raiz e a proteína codificada por esse gene protege a raiz de compostos tóxicos presentes no solo (DIENER; GAXIOLA; FINK, 2001). O AtDTX1 quando codificado em *Escherichia coli* demonstrou ser responsável pelo efluxo de compostos tóxicos como antibióticos e cádmio, assim como dois alcaloides de plantas: berberina e palmatina (LI et al., 2002).

O clado B ( azul) não apresenta subgrupos, sendo composto por 9 sequencias de eucalipto e 3 proteínas MATE caracterizadas. Foi observado em *A. thaliana* que mutantes do gene *AtBCD1* apresentavam folhas pálidas com redução na clorofila II e no conteúdo de Ferro (Fe), indicando o envolvimento dessa proteína com a manutenção da homeostase de Fe (SEO et al., 2012). O AtDTX50 atua no efluxo de ácido abscísico (ABA), onde mutantes *atdtx50* observou maior acúmulo de ABA nas folhas, resultando no aumento da tolerância a seca devido a baixa condutância estomática (KANG et al., 2010; KANNO et al., 2012; KUROMORI et al., 2010). O *ACTIVATED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1* (*AtADS1*) em *A. thaliana* está relacionado a mecanismos de defesa, onde mutantes mostraram-se susceptíveis a patógenos. Isso sugere que o *AtADS1* seja um regulador negativo da resistência da planta a doenças, atuando através da regulação de ácido salicílico (SUN et al., 2011).

Alguns grupos da família MATE apresentam maior número de membros já caracterizados, como é possível observar no clado C (vermelho), o qual apresenta 10 membros de eucalipto e 19 proteínas caracterizadas. O subgrupo C.1 apresenta somente um MATE caracterizado o *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 5* (*AtEDS5*) que está

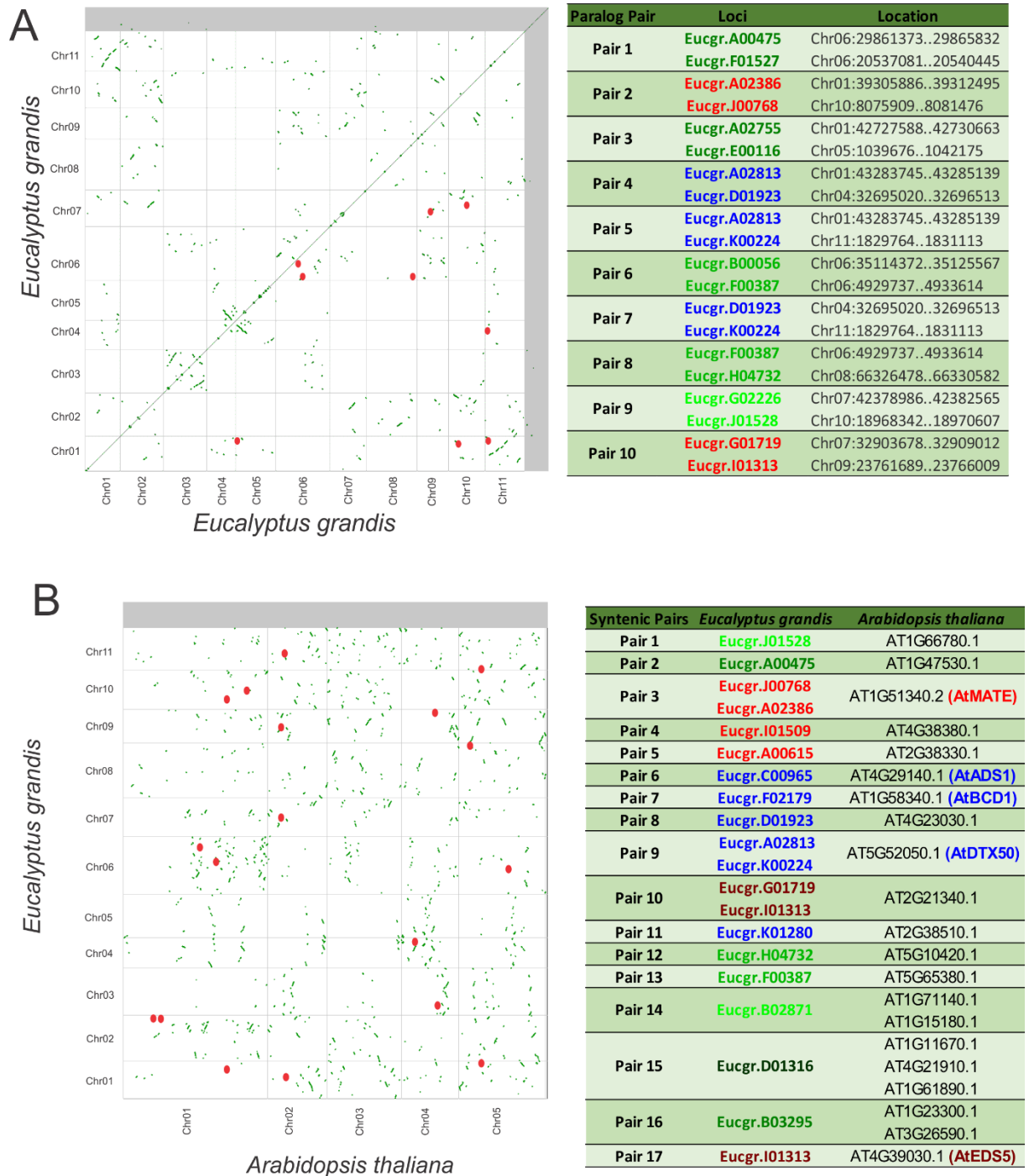
relacionado com o transporte de ácido salicílico. A superexpressão desse gene resultou em resistência a viroses, devido ao acúmulo desse fitohormônio (ISHIHARA et al., 2008) e mutantes *ateds5* apresentaram baixo acúmulo de AS e, conseqüentemente, redução na resistência basal da planta (NAWRATH et al., 2002). Foram alocadas nesse subclado 4 sequências de transportadores MATE em eucalipto.

O maior número de proteínas MATE caracterizados é localizado no subclado C.2, conseqüentemente, sendo considerado o subgrupo de maior concordância em termos filogenéticos quanto a especificidade de substrato. As principais funções relacionadas a esse subclado estão envolvidas no efluxo de citrato tanto para maior absorção de Fe quanto para mecanismos de tolerância ao Al. O SbMATE e HvAACT1 foram os primeiros a serem caracterizados relacionados a resposta a toxidez de alumínio, em *Sorghum bicolor* e *Hordeum vulgare* respectivamente. Ambos foram localizados na membrana plasmática e são considerados responsáveis pelo efluxo de citrato para auxiliar a alongação da raiz na presença de Al (FURUKAWA et al., 2007; MAGALHAES et al., 2007; SIVAGURU; LIU; KOCHIAN, 2013).

O ZmMATE1, diferentemente do ZmMATE2, realiza o efluxo de citrato e mostrou-se respondível a presença de Al (MARON et al., 2010). Existe diversos MATE transportadores de citrato caracterizados na literatura: AtMATE em *A. thaliana*, OsFRDL4 em *Oryza sativa*, ScFRDL2 em *Secale cereale*, VuMATE em *Vigna umbrellata*, TaMATE1b em *Triticum aestivum*, BoMATE em *Brassica oleracea*, EcMATE1 e EcMATE3 em *Eucalyptus camaldulensis* (LIU et al., 2009; SAWAKI et al., 2013; TOVKACH et al., 2013; WU et al., 2014; YANG et al., 2011; YOKOSHO; YAMAJI; MA, 2011). Nesse subclado estão localizadas 6 sequências de eucalipto.

### **3.2 Estudo de sintenia e duplicação nos genes MATE em *E. grandis***

Foi realizado um estudo de ancestralidade afim de fornecer um maior entendimento da origem dessa família em eucalipto. Para análise de microsintenia dentro do genoma do eucalipto, comparou-se o genoma do eucalipto com ele mesmo, visando a determinação dos parálogos presentes na família *MATE* (Figura 2.A) e determinar o número de duplicações genicas (Figura 2.B). Para a determinação dos ortólogos foi realizada a análise sintenica com *A. thaliana*, a escolha da espécie foi devido ao grande número de genes da família *MATE* caracterizados nessa espécie (Figura 2.C).



**Figura 2** Análise de sintenia dos genes *MATE* no genoma do eucalipto. **A** identificação dos pares de parálogos em microsintenia com o genoma do eucalipto, onde foram encontrados dez pares de parálogos em eucalipto. **B** análise sintenica entre os genes *MATE* em *E. grandis* e o genoma de *A. thaliana*, com dezessete ortólogos encontrados.

Segundo o modelo *Power-law* proposto por Huynen e van Nimwegen (HUYNEN; VAN NIMWEGEN, 1998), as famílias genicas tem origem em um único ancestral, e através de duplicações e deleções durante o tempo ocorrem flutuações no tamanho das famílias, com a possibilidade inclusive de extinção do genoma. A identificação de parálogos e duplicações

no genoma são importantes para entender as redundâncias oriundas de eventos de poliploidização e repleidização que ocorreram em linhagens de angiosperma (WANG; PATERSON, 2011). Isso se intensifica em relação aos transportadores de metabolitos secundários, nos quais atuam em diversas rotas, principalmente na resposta a estresses abióticos (RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011). Além disso, o estudo de ortologos é relevante para gerar novas hipóteses que resultarão em um maior entendimento da família e da sua função biológica (SANTOS et al., 2017).

Foram encontrados 10 grupos de paralogos no genoma do eucalipto (Figura 2A). Os paralogos estão localizados nos 3 cladros da árvore filogenética; sendo 5 no clado A, 3 no clado B e 2 no clado C. Isso corrobora com a literatura, demonstrando que para rotas envolvidas com regulação e respostas a estresse tendem a ser mantidos em maior número de genes, do que para aquelas rotas envolvidas com metabolismo (CHEN et al., 2013). A comparação entre os genomas para a identificação dos ortologos é importante para estabelecer hipóteses sobre a funcionalidade da proteína ainda não caracterizada. Deste modo foram identificados 17 pares de ortologos, sendo que os pares 3, 6, 7, 9 e 17 apresentaram relações sintenicas com genes *MATE* de *A. thaliana* caracterizados (Figura 2B). O resultado obtido na análise de sintenica corroborou com o observado na árvore filogenética.

A duplicação genica é um mecanismo importante para a geração de novos grupos gênicos, no qual *crossing-over* aleatórios entre os duplicados irão resultar em uma maior diversidade no genoma (CANNON et al., 2004). O número de cópias de um gene está correlacionado com os fatores ambientais, por exemplo, em linhagens de milho que apresentavam maior número de cópias do gene *HvAACT1*, um *MATE* transportador de ácido orgânico, eram tolerantes ao Al. Portanto, o número de cópias pode estar relacionado com características adaptativas (MARON et al., 2013). Assim, pode se utilizar como estratégia a quantificação do número de cópias como seleção de linhagens tolerantes (CHEN et al., 2013).

O genoma do eucalipto apresenta um grande número de duplicações, com 34% de todos os genes, o que corresponde a maior proporção entre as espécies de plantas (MYBURG et al., 2014). Foram encontrados 11 grupos de duplicação contendo 32 genes *MATE*, que correspondem a 55% de duplicação genica nesta família. Essas duplicações encontram-se majoritariamente localizadas no cromossomos 2 e 6, correspondendo 59,37% de todos os genes duplicados (Figura 3). A proporção de duplicações dessa família em eucalipto foi superior a encontrada em tomate, que apresentou 13 grupos contendo 33 genes duplicados dos



67 genes, ou seja, 49% de duplicação na família *MATE* (SANTOS et al., 2017) e em *populus* a porcentagem de duplicações em tandem foi de 35 dos 71 genes da família *MATE*, portanto aproximadamente metade (LI et al., 2017).

| Tandem Duplication Groups | Loci                | Location                 |
|---------------------------|---------------------|--------------------------|
| Goup 1                    | <b>Eucgr.A02047</b> | Chr01:35919773..35923621 |
|                           | <b>Eucgr.A02048</b> | Chr01:35935015..35945010 |
| Goup 2                    | <b>Eucgr.B00053</b> | Chr06:35164138..35169441 |
|                           | <b>Eucgr.B00054</b> | Chr06:35156914..35162552 |
|                           | <b>Eucgr.B00055</b> | Chr06:35143405..35147983 |
|                           | <b>Eucgr.B00056</b> | Chr06:35114372..35125567 |
|                           | <b>Eucgr.B00058</b> | Chr06:35092744..35099173 |
| Group 3                   | <b>Eucgr.B02871</b> | Chr02:49034714..49039456 |
|                           | <b>Eucgr.B02872</b> | Chr02:49012181..49016305 |
|                           | <b>Eucgr.B02873</b> | Chr02:48978738..48982923 |
|                           | <b>Eucgr.B02867</b> | Chr02:49071836..49074504 |
|                           | <b>Eucgr.B02868</b> | Chr02:49063410..49068013 |
| Goup 4                    | <b>Eucgr.B03290</b> | Chr02:53959146..53963165 |
|                           | <b>Eucgr.B03292</b> | Chr02:53917403..53921588 |
|                           | <b>Eucgr.B03293</b> | Chr02:53902319..53906857 |
|                           | <b>Eucgr.B03295</b> | Chr02:53867684..53872983 |
| Group 5                   | <b>Eucgr.D01312</b> | Chr04:16874233..16880339 |
|                           | <b>Eucgr.D01315</b> | Chr04:16909310..16915218 |
|                           | <b>Eucgr.D01316</b> | Chr04:16921200..16928384 |
| Group 6                   | <b>Eucgr.D01922</b> | Chr04:32658506..32659896 |
|                           | <b>Eucgr.D01923</b> | Chr04:32695020..32696513 |
| Group 7                   | <b>Eucgr.F00501</b> | Chr06:6625914..6629047   |
|                           | <b>Eucgr.F00506</b> | Chr06:6590036..6594163   |
| Group 8                   | <b>Eucgr.F01152</b> | Chr06:15754801..15758986 |
|                           | <b>Eucgr.F01153</b> | Chr06:15770596..15774433 |
|                           | <b>Eucgr.F01154</b> | Chr06:15778458..15782835 |
| Group 9                   | <b>Eucgr.G03382</b> | Chr07:54390163..54395791 |
|                           | <b>Eucgr.G03383</b> | Chr07:54421844..54428914 |
| Group 10                  | <b>Eucgr.I01313</b> | Chr09:23761689..23766009 |
|                           | <b>Eucgr.I01314</b> | Chr09:23769584..23773682 |
| Group 11                  | <b>Eucgr.J01527</b> | Chr10:18950755..18953261 |
|                           | <b>Eucgr.J01528</b> | Chr10:18968342..18970607 |

**Figura 3** Duplicações em tandem dos genes *MATE* no genoma de *E. grandis*.

A poliploidização e retração da poliploidia são importantes pois geram espaço na duplicação genica para subdivisões de uma função, subfuncionalização, ou atribuição a uma nova função, a neofuncionalização (WANG; PATERSON, 2011). Os grupos que apresentam o maior número de genes duplicados são o grupo 2 e 3, com cinco genes duplicados em cada

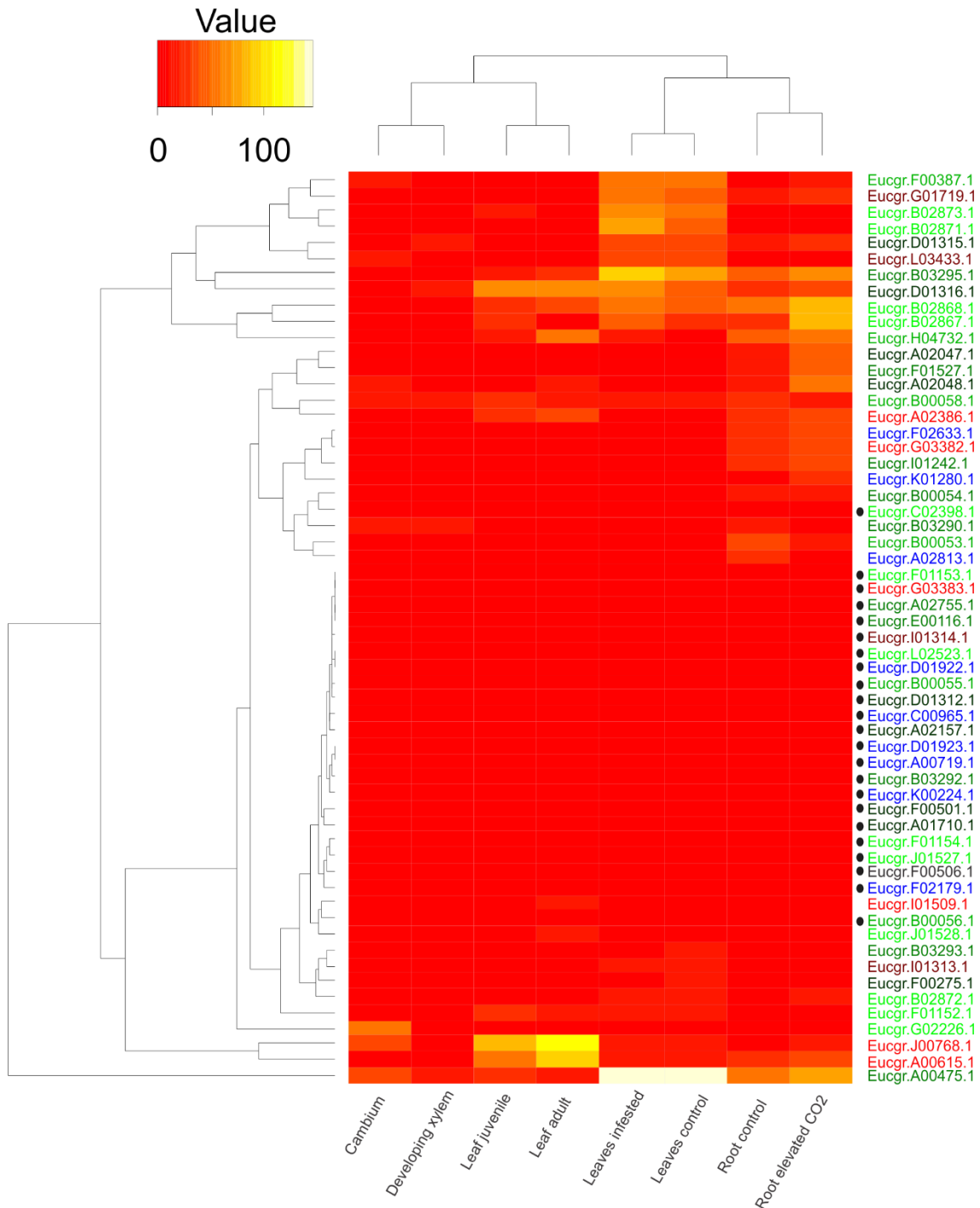
grupo. Estão localizados no clado A, e estão próximos filogeneticamente de: OsMATE1 e OsMATE2, respectivamente (Figura 1). Esses genes estão relacionados em diversas rotas da morfologia e do desenvolvimento, assim o grande número de duplicações em *E. grandis* pode ser um indicio que houve uma fragmentação das funções excedidas pelos OsMATE1 e OsMATE2 em *O. sativa*, no eucalipto. O grupo dos alcaloides em plantas é o mais vasto dentre os metabolitos secundários, apresentando um vasta variedade na estrutura química e atividade biológica (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). As proteínas MATE relacionados ao transporte de alcaloides também apresentaram vários grupos duplicados, sendo eles os grupos 4, 5 e 11 que estão filogeneticamente próximos do CjMATE, NtMATE e NtJAT1, respectivamente.

A relação entre o tempo e a quantidade do hormônio vegetal presente na célula é fundamental para a sua regulação. Os genes *Eucgr.K00224* e *Eucgr.A02813*, são parálogos entre si e ortólogos do transportador *AtDTX50* responsável pelo efluxo de ácido abscísico (ZHANG et al., 2014). O gene *Eucgr.D01923*, que tem uma duplicação (*Eucgr.D01922*), apresentou blocos sintênicos com os genes *Eucgr.K00224* e *Eucgr.A02813*, e um ortólogo em *A. thaliana* (*AT4G23030*), sendo esse um *MATE up-regulated* em resposta a deficiência de giberelina na germinação de sementes e desenvolvimento floral (CAO et al., 2006). Assim, é possível hipotetizar que os genes *Eucgr.K00224*, *Eucgr.A02813*, *Eucgr.D01922* e *Eucgr.D01923* codificam proteínas relacionadas com o transporte de hormônios vegetais.

### **3.3 Expressão de genes da família MATE em *E. grandis* em diferentes bibliotecas de RNA-seq**

Com o intuito de visualizar a perfil de expressão e identificar quais tecidos os genes da família *MATE* estão relacionados, fornecendo informações que possam auxiliar na predição da função. Para isso foram utilizadas bibliotecas públicas de *RNA-seq*, em que todos os 58 membros da família *MATE* apresentaram expressão em pelo menos uma das bibliotecas (Figura 4). O gráfico foi estruturado para agrupar os genes que apresentam perfis de expressão similares. Assim fica evidente a organização dos genes e, é interessante notar que, genes que estão próximos filogeneticamente (Figura 1) apresentam perfis de expressão distintos. Isso se deve ao fato de que na árvore filogenética o agrupamento é de acordo com similaridade proteica e pode estar relacionado com a especificidade do substrato a ser transportado. Em contrapartida, o gráfico de expressão é de acordo com o perfil

transcriptômico, ou seja, genes que transportam o mesmo substrato podem estar envolvidos em rotas metabólicas diferentes, resultando em perfis de expressão diferenciados.



**Figura 4** Perfil de expressão dos transportadores MATE de eucalipto. As amostras de RNA-seq foram quantificadas utilizando Salmon e o heatmap montado utilizando o pacote *heatmap.2* da ferramenta R. Os pontos pretos correspondem a genes com expressão constitutiva. Os genes foram organizados de acordo com análise *hclust*.

Dos genes que codificam transportadores MATE de eucalipto, 23 apresentaram expressão constitutiva, com variação na expressão  $\Delta \leq 8$ . O clado que apresentou a maior

porcentagem de genes com expressão constitutiva foi o B (Figura 1), com 6 dos 9 genes de eucalipto. Os genes que apresentaram maior expressão foram: *Eucgr.A00475*, na biblioteca “folhas controle”, *Eucgr.A00615* e *Eucgr.J00768*, ambos em “folhas adultas”.

Os tecidos que tiveram maior expressão dos genes da família *MATE* foram os relacionados a folha e raiz. Sendo que nas bibliotecas de “câmbio” e “xilema em desenvolvimento” poucos genes apresentaram expressão elevada, concluindo que o número de genes relacionados a esses tecidos é mais restrito.

Comparando os tecidos de raiz, de modo geral, os genes apresentaram maior expressão em bibliotecas de “raiz com elevado CO<sub>2</sub>” do que em relação a “raiz controle”. O mesmo é observado quando se analisa as bibliotecas “folhas infectadas” e “folhas controle”, com maior expressão dos genes naquelas submetidas ao estresse, corroborando com a literatura quando diz que são proteínas responsivas tanto ao estresse biótico quanto ao abiótico (TAKANASHI; SHITAN; YAZAKI, 2014).

Os genes *Eucgr.D01316* e *Eucgr.D01315* apresentaram perfil de expressão diferenciado nos tecidos, sendo expresso na raiz, xilema e, principalmente, na parte aérea; sendo um forte indicio de que esses genes estão relacionados ao transporte de alcaloides em eucalipto. O gene que apresentou maior expressão em folha foi o *Eucgr.A00475* e está próximo filogeneticamente do CjMATE, caracterizado como um transportador de alcaloide para o vacúolo e preferencialmente expresso na raiz (TAKANASHI et al., 2017). Embora o gene *Eucgr.A00475* tenha tido expressão elevada na raiz, a maior expressão foi observada nas folhas, sendo um indicio possa ter maior atividade com o transporte de alcaloide na folha.

As duplicações *Eucgr.A02048* e *Eucgr.A02047*, estão próximos na árvore de *MATE* responsáveis pelo transporte de flavonoides para o vacúolo. Esses genes de eucalipto apresentaram expressão elevada na raiz quanto exposta a elevados índices de CO<sub>2</sub>. Em experimento com elevada concentração de CO<sub>2</sub>, houve expressão diferencial de genes relacionados a biossíntese de flavonoides em *E. grandis* (PLETT et al., 2015).

Filogeneticamente próximos das proteínas *MATE* caracterizadas como transportadoras de citrato estão os genes *Eucgr.G03382* e *Eucgr.G03383*. De acordo com análises sinténicas esses dois genes são considerados duplicações genicas. No entanto, o *Eucgr.G03383* apresentou expressão constitutiva e o *Eucgr.G03382* apresentou maior expressão na raiz. O que corrobora com os dados encontrados na literatura, uma vez que o *Eucgr.G03382*

apresentou 100% de identidade com o *EcMATE1*, gene esse expresso na raiz e responsável ao Al em *E. camaldulensis* (SAWAKI et al., 2013).

### 3.4 Análise de co-expressão dos fatores de transcrição correlacionados com genes da família *MATE* em *E. grandis*

Os fatores de transcrição são proteínas que regulam a expressão genética se ligando em regiões específicas do gene alvo (região promotora) a sequências específicas do DNA (motifs), podendo aumentar ou diminuir a transcrição. O estudo dos genes responsáveis pela regulação transcricional e, conseqüentemente, responsáveis por desencadear a adaptação da planta ao ambiente, são fundamentais para a construção da rede de regulação genética. A partir dessas informações pode-se aplicar diretamente no melhoramento genético da planta (MICKELBART; HASEGAWA; BAILEY-SERRES, 2015).

Dos 58 genes da família *MATE*, apenas 32 apresentaram correlação  $\rho \geq |0,85|$  com genes de eucalipto que codificam fatores de transcrição (Figura 5A). As famílias com o maior número de membros nessa rede de co-expressão foram as famílias *MYB* e *bHLH*, ambas com 28 membros. O gene com maior número de fatores de transcrição correlacionados foi *Eucgr.L02523* com 56 possíveis reguladores correlacionados. E os que apresentaram correlação com somente um fator de transcrição foram: *Eucgr.A01710*, *Eucgr.C02398*, *Eucgr.G01719*, *Eucgr.F00501* e *Eucgr.F01153*.

Alguns fatores de transcrição apresentaram correlação positiva com os genes da família *MATE*, ou seja, o aumento da expressão de um está relacionado com o aumento do outro. Os fatores de transcrição que possuem maior número de conexões com correlação positivas com genes *MATE* são: *Eucgr.I01069* (bHLH) e *Eucgr.A01297* (C2H2) ambos com 5 conexões (Figura 5B). A maioria dos genes já caracterizados da família *bHLH* foram identificados em *A. thaliana*, e estão relacionados a diversas funções com destaque para: síntese de flavonoides, formação dos tricomas e raiz em cabeleira (QUATTROCCHIO et al., 2006). O complexo denominado MBW, fundamental na regulação da síntese de flavonoides, é composto por dois fatores de transcrição: bHLH e MYB (SINGH; FOLEY; OÑATE-SÁNCHEZ, 2002). As proteínas do tipo C2H2 *zinc finger*, uma das maiores famílias de fatores de transcrição em *A. thaliana*, atuam em diversas rotas do metabolismo assim como resposta a estresse e ativação dos mecanismos de defesa (CIFTCI-YILMAZ; MITTLER, 2008).

Em contrapartida, a correlação negativa indica que os genes tem expressão divergente, portanto, quando um gene aumenta a expressão o outro diminui, e vice-versa. Os fatores de transcrição com o maior número de conexões com correlação negativas foram: os da família MIKC\_MADS (*Eucgr.B00634* e *Eucgr.K00208*), e M\_type\_MADS (*Eucgr.D02425*) (Figura 5C). A família de fatores de transcrição MADS está intimamente relacionada com processos de desenvolvimento da planta. O subgrupo MIKC\_MADS está relacionado com o processo de florescimento, sendo um regulador negativo de diversas rotas de transição (SMACZNIAK et al., 2012). M-type MADS ou MDAS I são fatores de transcrição que podem estar envolvidos com o desenvolvimento do saco embrionário e desenvolvimento da semente (BEMER et al., 2008).



Na árvore filogenética, *Eucgr. A01710* e *Eucgr.D01316* ficaram pertos dos transportadores de compostos fenólicos *OsPEZ1* e *OsPEZ2*. O gene *Eucgr.A01710* apresentou correlação positiva com o fator de transcrição da família *GRAS*, responsável pela nodulação da raiz e sinalização para promover relações simbióticas (SMIT et al., 2005; WANG et al., 2012). Foi demonstrado que a liberação de compostos fenólicos, principalmente ácido protocatecúico e ácido p-hidroxibenzóico, pelas raízes de *Mimosa pudica* resultaram na indução dos genes (*nodD*) relacionados a nodulação em isolados de *beta-rhizobium* (MANDAL et al., 2016).

O *Eucgr.A02047*, próximo filogeneticamente dos transportadores de flavonoides *MdMATE1* e *MdMATE2*, apresentou com as famílias: *HSF* e *NAC*, sendo membros dessa família responsáveis por regular a biossíntese de flavonoides em resposta a estresse biótico (MORISHITA et al., 2009).

Os genes *Eucgr.K01280*, *Eucgr.A00719* e *Eucgr.F02633* não apresentaram nenhum transportador MATE próximo filogeneticamente, entretanto, as famílias de fatores de transcrição com maior número de conexões foram: *bHLH*, envolvida com diversos processos metabólicos e desenvolvimento (TOLEDO-ORTIZ; HUQ; QUAIL, 2003), *MYB*, relacionado com metabolitos secundários e proliferação e diferenciação celular (STRACKE; WERBER; WEISSHAAR, 2001), e *NAC*, regulando o crescimento e desenvolvimento da planta (FANG et al., 2008); podendo inferir que esses genes podem estar relacionados com rotas de desenvolvimento e diferenciação celular .

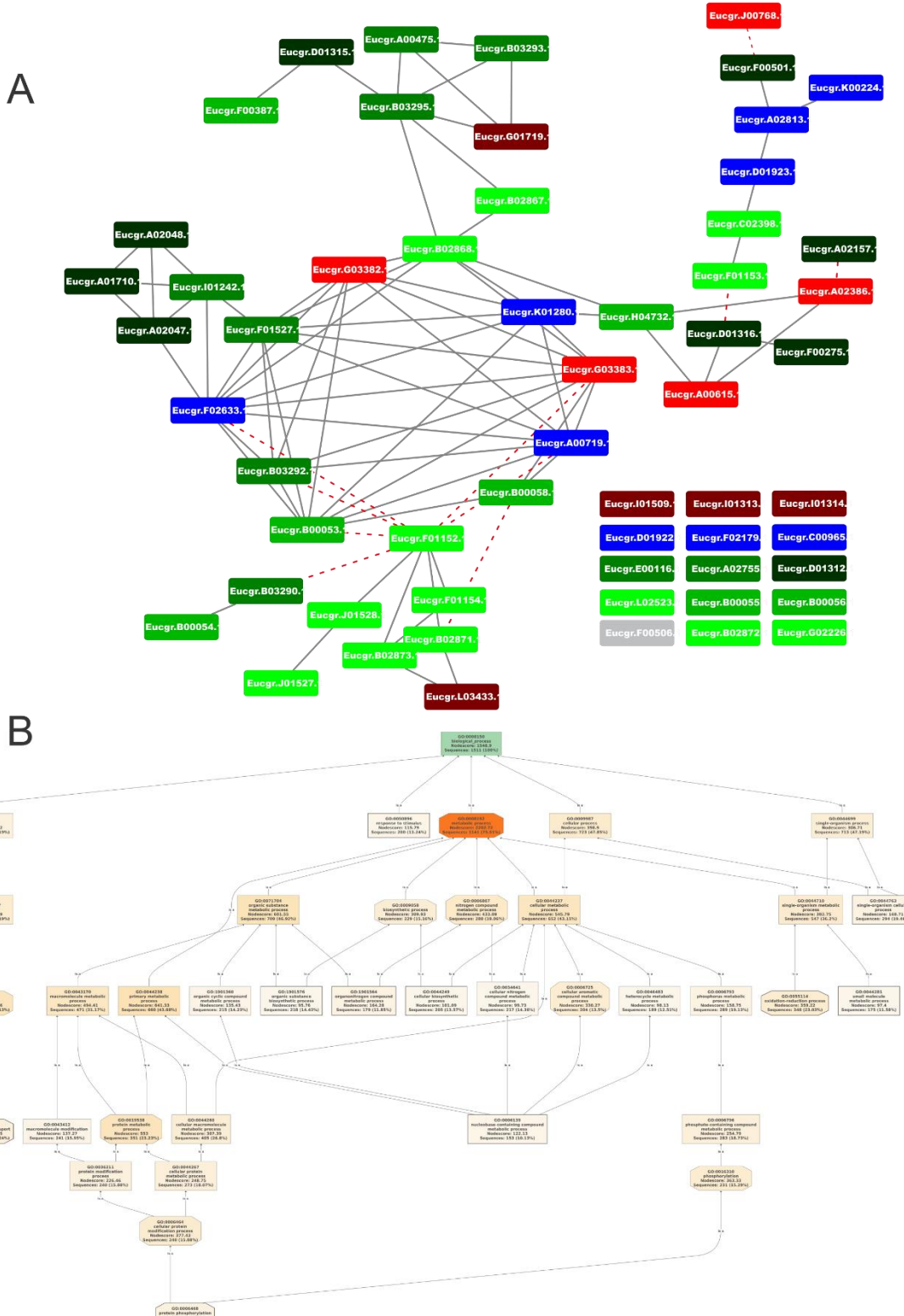
### **3.5 Análise de co-expressão e rede de interação dos processos biológicos relacionados aos genes MATE de *E. grandis***

A família de transportadores MATE realiza o efluxo de diferentes substratos, sendo importante tanto para o desenvolvimento da planta quanto para a adaptação ao ambiente. Mesmo que os membros da família de transportadores MATE transportem diferentes substratos não significa que eles estão envolvidos em rotas metabólicas distintas. Foi realizada a correlação entre os 58 *MATE* contra as 51 bibliotecas de RNA-seq, utilizando um coeficiente de correlação  $\rho \geq |0,7|$ . Foram encontrados 43 *MATE* que apresentaram correlação com pelo menos um outro transportador *MATE* e os 15 restantes não apresentaram correlação. O gene que apresentou o maior número de correlações positivas com outros *MATE* foi



*Eucgr.F02633* e o com maior número de negativas o *Eucgr.F01152* (Figura 6A). Dos 15 que não apresentaram correlação, 11 apresentaram expressão constitutiva (Figura 3).

De mesmo modo foi realizado a correlação dos *MATE* com os outros transcritos, sendo utilizado um coeficiente de correlação  $\rho \geq |0,85|$ . Foram encontrados 3152 transcritos que apresentaram correlação com os 58 *MATE*. As sequências proteicas desses transcritos foram enriquecidas utilizando a ferramenta BLAST2GO (CONESA et al., 2005), sendo que 1511 apresentaram similaridade com algum processo biológico (Figura 6B). Essas sequências foram correlacionadas com 37 processos biológicos subdivididos em 7 níveis, sendo as mais representativas vinculadas aos processos: *metabolic process*, *cellular process* e *single-organism process*, respectivamente.



**Figura 6** Rede de co-expressão da família de transportadores MATE em eucalipto. **A** Rede de co-expressão de co-expressão dos genes MATE utilizando cutoff  $\geq |0,7|$ , onde linhas descontinuas e vermelhas significam correlação negativa, e contínuas e pretas significam correlação positiva. **B** Rede de co-expressão de processo biológico, onde a intensidade de cor corresponde ao valor de sequencias classificadas nesse respectivo processo biológico.

O gene *Eucgr.G03383* apresentaram um alto número de conexões, 8 positivas e 1 negativa, evidenciando um envolvimento em diferentes rotas metabólicas. Além de que, esse gene apresentou expressão constitutiva (Figura 4) e foi o terceiro membro da família *MATE* com maior número de fatores de transcrição correlacionados (Figura 5). Como o citrato é um elemento fundamental no ciclo de Krebs, e conseqüentemente, na geração de energia na célula (IGAMBERDIEV; EPRINTSEV, 2016). E devido as atividades catalíticas do ciclo de Krebs, não pode haver um acúmulo de citrato no interior da mitocôndria, sendo maioritariamente armazenado no vacúolo (DELHAIZE et al., 2003; GOUT et al., 1993). Conseqüentemente, o transporte de citrato está diretamente relacionado a geração de energia, portanto, uma hipótese é que o gene *Eucgr.G03383* codifica proteína que atua no transporte do citrato envolvido no ciclo de Krebs.

Entre os membros da família *MATE* o gene *Eucgr.F01152* foi o que apresentou o maior número de correlações negativas, ocorrendo com genes envolvidos no transporte de alcaloides, transporte de citrato e relacionados com crescimento e desenvolvimento da planta. Em contrapartida, ele apresentou correlações positivas com membros do mesmo clado, relacionados com o transporte de compostos tóxicos (Figura 1). Aliais, o *Eucgr.F01152* apresentou expressão elevada em tecidos foliares, principalmente folhas jovens (Figura 4).

Em relação ao *nodescore*, os que apresentaram os maiores valores por níveis foram, nível 1: “processo biológico”, nível 2: “processos metabólicos”, nível 3: “processo metabólico de substancia orgânica”, nível 4: “processo metabólico de macromolécula”, nível 5: “processos metabólicos de compostos contendo fosfato”, nível 5: “processo celular de modificação de proteínas” e nível 7: “fosforilação de proteínas”. Foi proposto que a fosforilação tem um papel importante na ativação de fatores de transcrição, sendo essa etapa necessária para ativação do STOP1, principal ativador dos genes *MATE* relacionados ao estresse de Al (DELHAIZE; MA; RYAN, 2012). O ZmMATE1 apresentou 3 potenciais sítios para proteína Kinase C, sendo que o SbMATE também apresentou os 3 sítios na mesma localização, da mesma forma, o ZmMATE 2 apresentou 3 potenciais sítios, sendo 2 compartilhados com o OsPEZ1 (MARON et al., 2010). Evidenciando um a relação entre a fosforilação e as proteínas *MATE*, sendo necessário estudos mais aprofundados para a melhor compreensão desse envolvimento.

## 4 CONCLUSÃO

Com o estudo global da família de transportadores MATE em *Eucalyptus grandis*, foram identificados 58 genes que apresentaram similaridade com os genes já caracterizados da família, fornecendo fortes indícios da provável atividade biológica. A caracterização dos membros dessa família fornece subsídios para futuros trabalhos que visem a elucidação dos transportadores e suas funções no gênero *Eucalyptus*.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, E. N. **O eucalipto. Jundiaí: Companhia Paulista de Estradas de Ferro.** [s.l: s.n.].
- BASHIR, K.; ISHIMARU, Y.; SHIMO, H. Rice phenolics efflux transporter 2 (PEZ2) plays an important role in solubilizing apoplasmic iron. **Soil Science and Plant Nutrition:** [s.l: s.n.] , v. 768, n. 57, p. 803–812, 2011.
- BEMER, M. et al. The MADS Domain Protein DIANA Acts Together with AGAMOUS-LIKE80 to Specify the Central Cell in Arabidopsis Ovules. **the Plant Cell Online:** [s.l: s.n.], v. 20, n. 8, p. 2088–2101, 2008.
- BROOKER, M. I. H.; KLEINING, D. A. **Field guide to eucalyptus.** 15. ed. [s.l.] Inkata Press Pty Ltd, 2006.
- CANNON, S. B. et al. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in Arabidopsis thaliana. **BMC plant biology:** London, v. 4, p. 1–21, 2004.
- CAO, D. et al. Gibberellin Mobilizes Distinct DELLA-Dependent Transcriptomes to Regulate Seed Germination and Floral Development in Arabidopsis. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 142, n. 2, p. 509–525, 2006.
- CHAI, Y. et al. TRANSPARENT TESTA 12 genes from Brassica napus and parental species : cloning , evolution , and differential involvement in yellow seed trait. p. 109–123, 2009.
- CHEN, E. C. H. et al. The dynamics of functional classes of plant genes in rediploidized ancient polyploids. **BMC Bioinformatics:** Oxford, v. 14, n. Suppl 15, p. S19, 2013.
- CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. The zinc finger network of plants. **Cellular and Molecular Life Sciences:** [s.l: s.n.], v. 65, n. 7–8, p. 1150–1160, 2008.
- CLINE, M. et al. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. **Nature protocols:** New York, v. 2, n. 10, p. 2366–2382, 2007.
- CONESA, A. et al. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics:** Oxford, v. 21, n. 18, p. 3674–3676, 2005.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Secondary Metabolites. **Biochemistry Molecular Biology of Plants**: New York, v. 7, n. 7, p. 1250–1318, 2000.

DE SOUZA, T. F.; FAVERO, S. Evaluation of the essential oil of *Eucalyptus urograndis* (Myrtaceae) in the control of Pentatomidae. **Revista Ciencia Agronomica**: [s.l.: s.n.], v. 46, n. 1, p. 216–222, 2015.

DEBEAUJON, I. et al. The TRANSPARENT TESTA12 gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 13, n. 4, p. 853–871, 2001.

DELHAIZE, E. et al. 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**: Amsterdã, v. 248, n. 1–2, p. 137–144, 2003.

DELHAIZE, E.; MA, J. F.; RYAN, P. R. Transcriptional regulation of aluminium tolerance genes. **Trends in Plant Science**: Kidlington, v. 17, n. 6, p. 341–348, 2012.

DIENER, A. C.; GAXIOLA, R. A.; FINK, G. R. *Arabidopsis* ALF5, a multidrug efflux transporter gene family member, confers resistance to toxins. **Plant Cell**: Rockville, v. 13, n. 7, p. 1625–1638, 2001.

FANG, Y. et al. Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. **Molecular Genetics and Genomics**: Amsterdã, v. 280, n. 6, p. 547–563, 2008.

FRANK, S. et al. Two differentially expressed MATE factor genes from apple complement the *Arabidopsis* transparent testa12 mutant. **Plant Biology**: Berlin, v. 13, n. 1, p. 42–50, 2011.

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

GOMEZ, C. et al. Grapevine MATE-Type Proteins Act as Vacuolar H<sup>+</sup>-Dependent Acylated Anthocyanin Transporters. **Plant Physiology**: [S.l.: s.n.], v. 150, n. 1, p. 402–415, 2009.

GOUT, E. et al. <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance studies of malate and citrate synthesis and compartmentation in higher plant cells. **J Biol Chem**: [S.l.: s.n.], v. 268, n. 6, p. 3986–3992, 1993.

GREEN, L. S. FRD3 Controls Iron Localization in *Arabidopsis*. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 136, n. 1, p. 2523–2531, 2004.

HAAS, B. J. et al. DAGchainer: A tool for mining segmental genome duplications and synteny. **Bioinformatics**: Oxford, v. 20, n. 18, p. 3643–3646, 2004.

HAUG-BALTZELL, A. et al. SynMap2 and SynMap3D: Web-based whole-genome synteny browsers. **Bioinformatics**: Oxford, v. 33, n. 14, p. 2197–2198, 2017.

HUYNEN, M. A.; VAN NIMWEGEN, E. The frequency distribution of gene family sizes in complete genomes. **Molecular Biology and Evolution**: London, v. 15, n. 5, p. 583–589,

1998.

HVORUP, R. N. et al. The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. **European Journal of Biochemistry**: London, v. 270, n. 5, p. 799–813, 2003.

IGAMBERDIEV, A. U.; EPRINTSEV, A. T. Organic Acids: The Pools of Fixed Carbon Involved in Redox Regulation and Energy Balance in Higher Plants. **Frontiers in Plant Science**: Lausanne, v. 7, n. July, p. 1–15, 2016.

ISHIHARA, T. et al. Overexpression of the Arabidopsis thaliana EDS5 gene enhances resistance to viruses. **Plant Biology**: Berlin, v. 10, n. 4, p. 451–461, 2008.

ISHIMARU, Y. et al. A rice phenolic efflux transporter is essential for solubilizing precipitated apoplasmic iron in the plant stele. **Journal of Biological Chemistry**: Rockville, v. 286, n. 28, p. 24649–24655, 2011.

JIN, J. et al. PlantTFDB 4.0: Toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. **Nucleic acids research**: London, v. 45, n. D1, p. D1040–D1045, 2017.

KANG, J. et al. PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [s.l: s.n.], v. 107, n. 5, p. 2355–2360, 2010.

KANNO, Y. et al. Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [s.l: s.n.], v. 109, n. 24, p. 9653–9658, 2012.

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**: London, v. 52, n. 359, p. 1339–1352, 2001.

KOCHIAN, L. V et al. Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 66, n. 23, p. 1–23, 2015.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7 . 0 for bigger datasets. p. 1–11, 2016.

KUROMORI, T. et al. ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [s.l: s.n.], v. 107, n. 5, p. 2361–2366, 2010.

LI, L. et al. Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. **Journal of Biological Chemistry**: Rockville, v. 277, n. 7, p. 5360–5368, 2002.

LI, N. et al. Genome-wide analysis of MATE transporters and molecular characterization of aluminum resistance in *Populus*. **Journal of Experimental Botany**: London, v. 68, n. 20, p. 5669–5683, 2017.

LIU, J. et al. Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. **Plant Journal**:

Oxford, v. 57, n. 3, p. 389–399, 2009.

LIU, J. et al. Genome-wide analysis of MATE transporters and expression patterns of a subgroup of MATE genes in response to aluminum toxicity in soybean. **BMC Genomics**: London, v. 17, n. 1, p. 223, 2016.

LYONS, E. et al. The Value of Nonmodel Genomes and an Example Using SynMap Within CoGe to Dissect the Hexaploidy that Predates the Rosids. **Tropical Plant Biology**: Amsterdã, v. 1, n. 3–4, p. 181–190, 2008.

LYONS, E.; FREELING, M. How to usefully compare homologous plant genes and chromosomes as DNA sequences. **Plant Journal**: Oxford, v. 53, n. 4, p. 661–673, 2008.

MAGALHAES, 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**: Oxford, v. 106, n. 1, p. 199–203, 2010.

MAGALHAES, 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, 2007.

MANDAL, S. M. et al. Induction of nodD Gene in a Betarhizobium Isolate, Cupriavidus sp. of Mimosa pudica, by Root Nodule Phenolic Acids. **Current Microbiology**: Amsterdã, v. 72, n. 6, p. 733–737, 2016.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD/SPARCLE: Functional classification of proteins via subfamily domain architectures. **Nucleic acids research**: London, v. 45, n. D1, p. D200–D203, 2017.

MARINOVA, K. et al. The Arabidopsis MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H<sup>+</sup> -antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 19, n. 6, p. 2023–38, 2007.

MARON, L. G. et al. 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. **Plant Journal**: Oxford, v. 61, n. 5, p. 728–740, 2010.

MARON, L. G. et al. Aluminum tolerance in maize is associated with higher MATE1 gene copy number. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [s.l.: s.n.], v. 110, n. 13, p. 5241–5246, 2013.

MICKELBART, M. V.; HASEGAWA, P. M.; BAILEY-SERRES, J. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. **Nature Reviews Genetics**: London, v. 16, n. 4, p. 237–251, 2015.

MORISHITA, T. et al. Arabidopsis NAC transcription factor, ANAC078, regulates flavonoid biosynthesis under high-light. **Plant and Cell Physiology**: London, v. 50, n. 12, p. 2210–2222, 2009.

MORITA, M. et al. Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. **Proceedings of the National**

**Academy of Sciences:** [s.l.: s.n.], v. 106, n. 7, p. 2447–52, 2009.

MYBURG, A. A. et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature:** London, v. 510, n. 7505, p. 356–+, 2014.

NAWRATH, C. et al. EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. **The Plant Cell:** Waterbury, v. 14, n. 1, p. 275–86, 2002.

PATRO, R. et al. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. **Nature Methods:** New York, v. 14, n. 4, p. 417–419, 2017.

PÉREZ-DÍAZ, R. et al. VvMATE1 and VvMATE2 encode putative proanthocyanidin transporters expressed during berry development in *Vitis vinifera* L. **Plant Cell Reports:** Amsterdã, v. 33, n. 7, p. 1147–1159, 2014.

PLETT, J. M. et al. The effect of elevated carbon dioxide on the interaction between *Eucalyptus grandis* and diverse isolates of *Pisolithus* sp. is associated with a complex shift in the root transcriptome. **New Phytologist:** London, v. 206, n. 4, p. 1423–1436, 2015.

QUATRIN, P. M. et al. Antimicrobial and antibiofilm activities of nanoemulsions containing *Eucalyptus globulus* oil against *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* spp. **Microbial Pathogenesis:** Amsterdã, v. 112, p. 230–242, 2017.

QUATTROCCHIO, F. et al. The science of flavonoids. p. 97–122, 2006.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling and Behavior:** Amsterdã, v. 6, n. 11, p. 1720–1731, 2011.

SANTOS, A. L. DOS et al. Global analysis of the MATE gene family of metabolite transporters in tomato. **BMC plant biology:** London, v. 17, n. 1, p. 185, 2017.

SAWAKI, Y. et al. Characterization of Al-responsive citrate excretion and citrate-transporting MATEs in *Eucalyptus camaldulensis*. **Planta:** Berlin Heidelberg, v. 237, n. 4, p. 979–989, 2013.

SAWAKI, Y. et al. Identification of a STOP1-like protein in *Eucalyptus* that regulates transcription of Al tolerance genes. **Plant Science:** Amsterdã, v. 223, p. 8–15, 2014.

SEO, P. J. J. et al. A Golgi-localized MATE transporter mediates iron homeostasis under osmotic stress in *Arabidopsis*. **The Biochemical journal:** [s.l.: s.n.], v. 442, n. 3, p. 551–61, 2012.

SERRANO, M. et al. Export of salicylic acid from the chloroplast requires the multidrug and toxin extrusion-like transporter EDS5. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 162, n. 4, p. 1815–21, 2013.

SHITAN, N. et al. Involvement of the leaf-specific multidrug and toxic compound extrusion (mate) transporter Nt-JAT2 in vacuolar sequestration of nicotine in *Nicotiana tabacum*. **PloS one:** Cambridge, v. 9, n. 9, p. 1–10, 2014.



SHOJI, T. et al. Multidrug and Toxic Compound Extrusion-Type Transporters Implicated in Vacuolar Sequestration of Nicotine in Tobacco Roots. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 149, n. 2, p. 708–718, 2009.

SILVA, F. S. et al. **New valorization strategies for Eucalyptus spp. bark extracts.** WASTES 2015--Solutions, Treatments and Opportunities: Selected papers from the 3rd Edition of the International Conference on Wastes: Solutions, Treatments and Opportunities, Viana Do Castelo, Portugal, 14-16 September 2015. **Anais...2015**

SINGH, K. B.; FOLEY, R. C.; OÑATE-SÁNCHEZ, L. Transcription factors in plant defense and stress responses. **Current Opinion in Plant Biology: Amsterdã**, v. 5, n. 5, p. 430–436, 2002.

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

SMACZNIAK, C. et al. Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. **Development**, v. 139, n. 17, p. 3081–3098, 2012.

SMIT, P. et al. NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial nod factor-induced transcription. **Science: New York**, v. 308, n. 5729, p. 1789–1791, 2005.

STRACKE, R.; WERBER, M.; WEISSHAAR, B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Current Opinion in Plant Biology: Amsterdã**, v. 4, n. 5, p. 447–456, 2001.

SUN, X. et al. ADS1 encodes a MATE-transporter that negatively regulates plant disease resistance. **New Phytologist: London**, v. 192, n. 2, p. 471–482, 2011.

TAKANASHI, K. et al. A multidrug and toxic compound extrusion transporter mediates berberine accumulation into vacuoles in *Coptis japonica*. **Phytochemistry: Amsterdã**, v. 138, p. 76–82, 2017.

TAKANASHI, K.; SHITAN, N.; YAZAKI, K. The multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family in plants. **Plant Biotechnology: Plant Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 417–430, 2014.

THOMPSON, E. P. et al. An *Arabidopsis* flavonoid transporter is required for anther dehiscence and pollen development. **Journal of Experimental Botany: London**, v. 61, n. 2, p. 439–451, 2010.

TIWARI, M. et al. Expression of OsMATE1 and OsMATE2 alters development, stress responses and pathogen susceptibility in *Arabidopsis*. **Scientific reports: New York**, v. 4, p. 3964, 2014.

TOLEDO-ORTIZ, G.; HUQ, E.; QUAIL, P. H. The *Arabidopsis* Basic / Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family. **The Plant Cell: Waterbury**, v. 15, n. August, p. 1749–1770, 2003.

TOVKACH, A. et al. Transposon-mediated alteration of TaMATE1B expression in wheat

confers constitutive citrate efflux from root apices. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 161, n. 2, p. 880–92, 2013.

TUSNÁDY, G. E.; SIMON, I. Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. **Journal of molecular biology**: Amsterdã, v. 283, n. 2, p. 489–506, 1998.

WANG, E. et al. A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. **Current Biology**: [S.l.: s.n.], v. 22, n. 23, p. 2242–2246, 2012.

WANG, X. Y.; PATERSON, A. H. Gene conversion in angiosperm genomes with an emphasis on genes duplicated by polyploidization. **Genes**: [S.l.: s.n.], v. 2, n. 1, p. 1–20, 2011.

WU, X. et al. Brassica oleracea MATE encodes a citrate transporter and enhances aluminum tolerance in arabidopsis thaliana. **Plant and Cell Physiology**: London, v. 55, n. 8, p. 1426–1436, 2014.

YAMASAKI, K. et al. Chloroplast envelope localization of EDS5, an essential factor for salicylic acid biosynthesis in arabidopsis thaliana. **Plant Signaling and Behavior**: Amsterdã, v. 8, n. 4, p. 6–11, 2013.

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 and Environment**: Malden, v. 34, n. 12, p. 2138–2148, 2011.

YOKOSHO, K. et al. OsFRDL1 is a citrate transporter required for efficient translocation of iron in rice. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 149, n. 1, p. 297–305, 2009.

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

ZDOBNOV, E. M.; APWEILER, R. InterProScan - an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. **Bioinformatics**: Oxford, v. 17, n. 9, p. 847–848, 2001.

ZHANG, H. et al. A DTX/MATE-type transporter facilitates abscisic acid efflux and modulates ABA sensitivity and drought tolerance in *Arabidopsis*. **Molecular plant**: [S.l.: s.n.], v. 7, n. 10, p. 1522–1532, 2014.

ZHANG, H. et al. Two tonoplast MATE proteins function as turgor-regulating chloride channels in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [s.l.: s.n.], v. 114, n. 10, p. E2036–E2045, 2017.

ZHAO, J.; DIXON, R. A. MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-O-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*. **The Plant Cell**: Waterbury, v. 21, n. 8, p. 2323–2340, 2009.

**APÊNDICE A – Códigos do banco de dados NCBI das bibliotecas utilizadas**

| <b>SRA code</b>            | <b>Description</b>   | <b>Layout</b> | <b>Instrument</b>        |
|----------------------------|--|---------------|--------------------------|
| <a href="#">SRR5830064</a> | Gene expression analysis of <i>Eucalyptus grandis</i> Brasuz1 - leaf juvenile - 080-G07  | PAIRED        | Illumina HiSeq 2500      |
| <a href="#">SRR5830065</a> | Gene expression analysis of <i>Eucalyptus grandis</i> Brasuz1 - leaf juvenile - 080-G08  | PAIRED        | Illumina HiSeq 2500      |
| <a href="#">SRR5830066</a> | Gene expression analysis of <i>Eucalyptus grandis</i> Brasuz1 - cambium - 080-H05  | PAIRED        | Illumina HiSeq 2500      |
| <a href="#">SRR5830067</a> | Gene expression analysis of <i>Eucalyptus grandis</i> Brasuz1 - leaf adult - 080-H02   | PAIRED        | Illumina HiSeq 2500      |
| <a href="#">SRR5830068</a> | Gene expression analysis of <i>Eucalyptus grandis</i> Brasuz1 - cambium - 080-H06  | PAIRED        | Illumina HiSeq 2500      |
| <a href="#">SRR5830069</a> | Gene expression analysis of <i>Eucalyptus grandis</i> Brasuz1 - leaf adult - 080-H03   | PAIRED        | Illumina HiSeq 2500      |
| <a href="#">SRR5830070</a> | Gene expression analysis of <i>Eucalyptus grandis</i> Brasuz1 - leaf adult - 080-H01   | PAIRED        | Illumina HiSeq 2500      |
| <a href="#">SRR5830071</a> | Gene expression analysis of <i>Eucalyptus grandis</i> Brasuz1 - leaf juvenile - 080-G09  | PAIRED        | Illumina HiSeq 2500      |
| <a href="#">SRR5830072</a> | Gene expression analysis of <i>Eucalyptus grandis</i> Brasuz1 - cambium - 080-H04  | PAIRED        | Illumina HiSeq 2000      |
| <a href="#">SRR2980740</a> | Egr_TAG5_infested-Transcriptome of two <i>Eucalyptus</i> clones challenged with the <i>Eucalyptus</i> gall wasp, <i>Leptocybe invasa</i>   | PAIRED        | Illumina HiSeq 2000      |
| <a href="#">SRR2980741</a> | Egr_TAG5_infested-Transcriptome of two <i>Eucalyptus</i> clones challenged with the <i>Eucalyptus</i> gall wasp, <i>Leptocybe invasa</i>   | PAIRED        | Illumina HiSeq 2000      |
| <a href="#">SRR2980742</a> | Egr_TAG5_infested-Transcriptome of two <i>Eucalyptus</i> clones challenged with the <i>Eucalyptus</i> gall wasp, <i>Leptocybe invasa</i>   | PAIRED        | Illumina HiSeq 2000      |
| <a href="#">SRR2980745</a> | Egr_TAG5_uninfested-Transcriptome of two <i>Eucalyptus</i> clones challenged with the <i>Eucalyptus</i> gall wasp, <i>Leptocybe invasa</i> | PAIRED        | Illumina HiSeq 2000      |
| <a href="#">SRR2980747</a> | Egr_TAG5_uninfested-Transcriptome of two <i>Eucalyptus</i> clones challenged with the <i>Eucalyptus</i> gall wasp, <i>Leptocybe invasa</i> | PAIRED        | Illumina HiSeq 2000      |
| <a href="#">SRR2980743</a> | Egr_TAG5_uninfested-Transcriptome of two <i>Eucalyptus</i> clones challenged with the <i>Eucalyptus</i> gall wasp, <i>Leptocybe invasa</i> | PAIRED        | Illumina HiSeq 2000      |
| <a href="#">SRR1951772</a> | ZG14 Infected BR3-Transcriptional profiling of <i>Eucalyptus grandis</i> challenged with <i>Chrysoporthe austroafricana</i>                | PAIRED        | Illumina Genome Analyzer |
| <a href="#">SRR1951771</a> | ZG14 Infected BR2- Transcriptional profiling of <i>Eucalyptus grandis</i> challenged with <i>Chrysoporthe austroafricana</i>               | PAIRED        | Illumina Genome Analyzer |
| <a href="#">SRR1951770</a> | ZG14 Infected BR1- Transcriptional profiling of <i>Eucalyptus grandis</i> challenged with <i>Chrysoporthe austroafricana</i>               | PAIRED        | Illumina Genome Analyzer |
| <a href="#">SRR1951769</a> | ZG14 Control BR3-Transcriptional profiling of <i>Eucalyptus grandis</i> challenged with <i>Chrysoporthe austroafricana</i>                 | PAIRED        | Illumina Genome Analyzer |
| <a href="#">SRR1951768</a> | ZG14 Control BR2-Transcriptional profiling of <i>Eucalyptus grandis</i> challenged with <i>Chrysoporthe austroafricana</i>                 | PAIRED        | Illumina Genome Analyzer |
| <a href="#">SRR1951767</a> | ZG14 Control BR1-Transcriptional profiling of <i>Eucalyptus grandis</i> challenged with <i>Chrysoporthe austroafricana</i>                 | PAIRED        | Illumina Genome          |

|                            |   |        | Analyzer                 |
|----------------------------|---|--------|--------------------------|
| <a href="#">SRR1951766</a> | TAG5 Infected BR3-Transcriptional profiling of <i>Eucalyptus grandis</i> challenged with <i>Chrysosporthe austroafricana</i>  | PAIRED | Illumina Genome Analyzer |
| <a href="#">SRR1951765</a> | TAG5 Infected BR2-Transcriptional profiling of <i>Eucalyptus grandis</i> challenged with <i>Chrysosporthe austroafricana</i>  | PAIRED | Illumina Genome Analyzer |
| <a href="#">SRR1951764</a> | TAG5 Infected BR1-Transcriptional profiling of <i>Eucalyptus grandis</i> challenged with <i>Chrysosporthe austroafricana</i>  | PAIRED | Illumina Genome Analyzer |
| <a href="#">SRR1951763</a> | TAG5 Control BR3-Transcriptional profiling of <i>Eucalyptus grandis</i> challenged with <i>Chrysosporthe austroafricana</i>   | PAIRED | Illumina Genome Analyzer |
| <a href="#">SRR1951762</a> | TAG5 Control BR2-Transcriptional profiling of <i>Eucalyptus grandis</i> challenged with <i>Chrysosporthe austroafricana</i>   | PAIRED | Illumina Genome Analyzer |
| <a href="#">SRR1951761</a> | TAG5 Control BR1-Transcriptional profiling of <i>Eucalyptus grandis</i> challenged with <i>Chrysosporthe austroafricana</i>   | PAIRED | Illumina Genome Analyzer |
| <a href="#">SRR1609830</a> | Control root 650-5-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500      |
| <a href="#">SRR1609831</a> | Control root 650-5-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500      |
| <a href="#">SRR1609828</a> | Control root 650-4-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500      |
| <a href="#">SRR1609829</a> | Control root 650-4-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500      |
| <a href="#">SRR1609827</a> | Control root 650-3-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500      |
| <a href="#">SRR1609826</a> | Control root 650-3-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500      |
| <a href="#">SRR1609824</a> | Control root 650-2-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500      |
| <a href="#">SRR1609825</a> | Control root 650-2-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500      |
| <a href="#">SRR1609823</a> | Control root 650-1-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500      |
| <a href="#">SRR1609822</a> | Control root 650-1-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500      |
| <a href="#">SRR1609821</a> | Control root 400-6-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500      |
| <a href="#">SRR1609820</a> | Control root 400-6-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500      |
| <a href="#">SRR1609819</a> | Control root 400-5-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500      |

|                            |   |        |                     |
|----------------------------|---|--------|---------------------|
| <a href="#">SRR1609818</a> | Control root 400-5-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500 |
| <a href="#">SRR1609816</a> | Control root 400-4-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500 |
| <a href="#">SRR1609817</a> | Control root 400-4-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500 |
| <a href="#">SRR1609815</a> | Control root 400-3-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500 |
| <a href="#">SRR1609814</a> | Control root 400-3-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500 |
| <a href="#">SRR1609812</a> | Control root 400-2-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500 |
| <a href="#">SRR1609813</a> | Control root 400-2-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500 |
| <a href="#">SRR1609810</a> | Control root 400-1-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500 |
| <a href="#">SRR1609811</a> | Control root 400-1-Elevated carbon dioxide alters the interaction between <i>Eucalyptus grandis</i> and <i>Pisolithus microcarpus</i> through a complex shift in the root transcriptome | PAIRED | Illumina HiSeq 1500 |
| <a href="#">SRR1015902</a> | transcriptome of <i>Eucalyptus</i> developing xylem   | PAIRED | Illumina HiSeq 2000 |
| <a href="#">SRR1230929</a> | transcriptome of <i>Eucalyptus</i> developing xylem   | PAIRED | Illumina HiSeq 2000 |

**APÊNDICE B** – Lista descritiva dos membros da família MATE em *E. grandis*

| Gene         | aminoacid number | Transmembrane domain | Conserved domain |          |
|--------------|------------------|----------------------|------------------|----------|
|              |                  |                      | Name             | Acession |
| Eucgr.F01154 | 492              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.F01152 | 501              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.F01153 | 422              | 11                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.J01528 | 482              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.B02871 | 481              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.B02872 | 489              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.B02868 | 489              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.L02523 | 188              | 5                    | MATE_like        | cl09326  |
| Eucgr.D01315 | 512              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.D01316 | 514              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.A01710 | 520              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.D01312 | 397              | 10                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.J01527 | 511              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.B02867 | 496              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.B02873 | 474              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.G02226 | 381              | 9                    | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.A02755 | 495              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.E00116 | 500              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.A02048 | 494              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.A02047 | 495              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.F01527 | 484              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.B03295 | 532              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.A00475 | 492              | 13                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.B03292 | 406              | 10                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.F00506 | 261              | 5                    | MATE_like        | cl09326  |
| Eucgr.B03293 | 409              | 10                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.J00768 | 528              | 12                   | MATE_DinF_like   | cd13136  |
| Eucgr.A02386 | 423              | 10                   | MATE_DinF_like   | cd13136  |
| Eucgr.G03382 | 466              | 8                    | MATE_like        | cl09326  |
| Eucgr.G03383 | 466              | 8                    | MATE_like        | cl09326  |
| Eucgr.F00275 | 224              | 5                    | MATE_like        | cl09326  |
| Eucgr.I01509 | 633              | 10                   | MATE_DinF_like   | cd13136  |
| Eucgr.A00615 | 556              | 10                   | MATE_DinF_like   | cd13136  |
| Eucgr.C00965 | 529              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.F02179 | 539              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.D01923 | 497              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.A02813 | 465              | 11                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.K00224 | 450              | 10                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.F02633 | 495              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.A00719 | 470              | 12                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.D01922 | 392              | 8                    | MATE_eukaryotic  | cd13132  |
| Eucgr.C02398 | 396              | 10                   | MATE_eukaryotic  | cd13132  |

|              |     |    |                 |         |
|--------------|-----|----|-----------------|---------|
| Eucgr.G01719 | 583 | 12 | MATE_DinF_like  | cd13136 |
| Eucgr.I01314 | 389 | 7  | MATE_like       | cl09326 |
| Eucgr.L03433 | 257 | 6  | MATE_like       | cl09326 |
| Eucgr.I01313 | 330 | 5  | MATE_like       | cl09326 |
| Eucgr.K01280 | 342 | 8  | MATE_like       | cl09326 |
| Eucgr.I01242 | 514 | 12 | MATE_eukaryotic | cd13132 |
| Eucgr.H04732 | 494 | 12 | MATE_eukaryotic | cd13132 |
| Eucgr.B00056 | 463 | 12 | MATE_eukaryotic | cd13132 |
| Eucgr.B00055 | 502 | 12 | MATE_eukaryotic | cd13132 |
| Eucgr.B00054 | 506 | 12 | MATE_eukaryotic | cd13132 |
| Eucgr.F00387 | 513 | 12 | MATE_eukaryotic | cd13132 |
| Eucgr.B00053 | 470 | 12 | MATE_eukaryotic | cd13132 |
| Eucgr.B00058 | 493 | 12 | MATE_eukaryotic | cd13132 |
| Eucgr.A02157 | 209 | 5  | MATE_like       | cl09326 |
| Eucgr.B03290 | 502 | 12 | MATE_eukaryotic | cd13132 |
| Eucgr.F00501 | 400 | 10 | MATE_eukaryotic | cd13132 |

**Artigo 4:** Diferença temporal na expressão de genes da família *Multi-drug and toxic compound extrusion (MATE)* no vacúolo foliar de *Eucalyptus urophylla* sob estresse de alumínio



DIFERENÇA TEMPORAL NA EXPRESSÃO DE GENES DA FAMÍLIA *MULTI-DRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION (MATE)* NO VACÚOLO FOLIAR DE *EUCALYPTUS UROPHYLLA* SOB ESTRESSE DE ALUMÍNIO

**RESUMO**

Durante a evolução, as plantas desenvolveram mecanismos para neutralizar Al presente nos solos, sendo: a neutralização do Al na rizosfera e/ou no interior da planta, onde o Al será neutralizado e armazenado na raiz ou nas folhas. A família de transportador de citrato mais bem elucidada é a MATE. Visando compreender a atuação dos MATE de citrato, foram avaliadas folhas de *Eucalyptus urophylla* expostas a duas concentrações de Al: 0 e 2mM em cinco tempos de exposição: 0, 1, 3, 7 e 14 dias. Foram realizadas análises histoquímicas e anatômicas para observar o estresse e RT-qPCR para quantificar a expressão de genes envolvidos no estresse, bem como análises *in silico* para se obter mais informações sobre esses genes alvos. A coloração com hematoxilina demonstrou que havia a presença de Al fixado nas células da raiz, ocorrendo alterações anatômicas tanto na raiz quanto nas folhas. As modificações ocorreram tanto no diâmetro da seção transversal quanto na área do periciclo e endoderme da raiz quanto na nervura central e limbo da folha. Os genes da família MATE que transportam citrato apresentaram diversos motivos na região promotora correlacionados ao estresse abiótico, com destaque para os membros da família C2H2, que está diretamente relacionado ao estresse de Al. Dos genes que codificam MATE localizados no vacúolo, o *Eucgr.A02386* apresentou expressão precoce e menos intensa enquanto que o *Eucgr.J00768* apresentou expressão tardia e intensa. Portanto, é possível concluir que os membros da família MATE, também estão envolvidos com o transporte de citrato no vacúolo em resposta ao Al na folha e os genes apresentam expressão em momentos diferentes do estresse.

**Palavras-chaves:** RT-qPCR. Solos ácidos. Ácidos orgânicos.

TEMPORAL DIFFERENCE IN THE EXPRESSION OF MULTI-DRUG AND TOXIC COMPOUND FAMILY EXTRUSION GENES (MATE) IN THE *Eucalyptus Urophylla* LEAF VACUOLE UNDER ALUMINUM STRESS

**ABSTRACT**

During evolution, the plants developed mechanisms to neutralize Al in the soil, being: the neutralization of Al in the rhizosphere and / or in the interior of the plant, where Al will be neutralized and stored in the root or leaves. The most well-elucidated citrate carrier family is MATE. Aiming to understand the performance of *MATE* of citrate, were evaluated *Eucalyptus urophylla* leaves exposed to two concentrations of Al: 0 and 2mM in five exposure times: 0, 1, 3, 7 and 14 days. Histochemical and anatomical analyzes were performed to observe the stress and RT-qPCR to quantify the expression of genes involved in stress, as well as *in silico* analyzes to obtain more information about these target genes. The staining with hematoxylin showed that there was the presence of Al fixed in the root cells, with anatomical alterations in both the root and the leaves. Modifications occurred in both the cross-sectional diameter and the pericycle and endoderm of the root as well as in the central vein and leaf blade. The genes of the *MATE* family carrying citrate presented several motifs in the promoter region correlated with the stress of abiotics, especially the members of the C2H2 family, which is directly related to Al stress. Of the genes encoding MATE located in the vacuole, *Eucgr.A02386* presented early and less intense expression whereas *Eucgr.J00768* presented late and intense expression. Therefore, it is possible to conclude that members of the MATE family are also involved in the transport of citrate in the vacuole in response to Al in the leaf and the genes present expression at different moments of stress.

**Keywords:** RT-qPCR. Acid soils. Organic acids.

## 1 INTRODUÇÃO

Os solos ácidos são um dos principais fatores limitantes a produtividade das culturas (MA; RYAN; DELHAIZE, 2001). Nas regiões onde o pH do solo é inferior a 5,0, o solo passa a ser classificado como ácido. É possível encontrar um grande número de formas solúveis do alumínio (Al) nessas condições de solo, que em contato com as raízes, inibem o crescimento e subsequentemente afetam a absorção de água e nutrientes (KOCHIAN, 1995). Além do mais, o fósforo (P), elemento essencial para o desenvolvimento vegetal, é normalmente indisponível para a planta devido a sua fixação com o alumínio em solos ácidos. A formação do complexo se torna mais forte à medida que o pH do solo decresce, dificultando a absorção (KOCHIAN et al., 2004).

Para conseguirem se desenvolver nesses ambientes, as plantas apresentam diversos mecanismos de adaptação ao alumínio no solo, podendo ser dividido em dois grandes grupos que atuam (1) na rizosfera para alterar a forma química do Al no solo e/ou (2) nas células da planta com redução dos impactos negativos do Al no metabolismo, sendo o mecanismo mais bem caracterizado o da exsudação de ácido orgânicos na rizosfera (KOCHIAN et al., 2015).

Os transportadores da família *Multi-drug and toxic compound* (MATE) são responsáveis por transportar diversos substratos, entre eles o citrato. Os primeiros genes dessa família a serem caracterizados foram o *SbMATE* em *Sorghum bicolor* (MAGALHAES et al., 2007) e *HvMATE* em *Hordeum vulgare* (WANG et al., 2007).

Como alternativa ao mecanismo de exsudação de ácidos orgânicos, ocorre o aumento da produção de compostos quelantes do Al intracelular e, consequentemente, redução das interações com o metabolismo da planta. A detoxificação do Al internamente está correlacionada com alta concentração celular de citrato e é priorizada em espécies que acumulam o metal, como é o caso *Hydrangea macrophylla* que chega a ter 15,7 mmol Al<sup>+3</sup>.Kg<sup>-1</sup> (MA et al., 1997a).

Outra espécie conhecida por tolerar o Al é o eucalipto. O *E. camaldulensis* consegue manter o crescimento da raiz em concentrações de até 1mM de Al<sup>+3</sup> (TAHARA et al., 2008) enquanto que *Sorghum bicolor* apresenta inibição com apenas 27µM de Al<sup>+3</sup> (MAGALHAES et al., 2007). Porém, estudos mostram que a quantidade de ácido orgânico liberada na rizosfera e presente na pontas das raízes de *E. camaldulensis* foram inferiores a encontradas em espécies sensíveis (TAHARA et al., 2008). Assim, a tolerância do eucalipto não pode ser explicada somente pelo mecanismo de exsudação de ácidos orgânicos, fortalecendo a hipótese de ser prioritariamente por mecanismos de neutralização interna do Al.

Algumas espécies de plantas são capazes de transportar o Al tóxico fixado na parede celular para o vacúolo da raiz ou transportá-lo para a parte aérea, onde será neutralizado e armazenado no vacúolo (KOCHIAN et al., 2015). Foi demonstrado em *E. globulus* que há um maior acúmulo de Al nas folhas velhas em relação as jovens (SILVA et al., 2004). Em *H. macrophylla* o citrato é a molécula responsável por neutralizar o Al nas folhas (MA et al., 1997a).

Em vista que o eucalipto é uma das principais espécies utilizadas na produção de celulose de fibra curta no mundo e a sua produção impacta 6,2% do PIB do Brasil (INSTITUTO BRASILEIRO DE ÁRVORES - IBÁ, 2017), agregado ao fato de sua produção concentrar-se em áreas de solos ácidos é justificável o estudo dessa espécie sob estresse de Al tanto para o melhoramento da produção de novos clones quanto para espécies mais sensíveis a esse estresse. Portanto, diante desse contexto, o objetivo do trabalho foi elucidar os mecanismos de resposta dos genes *MATE* em folhas de *E. urophylla* expostas ao Al.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Exposição das plântulas ao alumínio**

Plântulas de *E. urophylla*, clonadas *in vitro*, foram cultivadas em meio de cultura WPM (MCCOWN; LLOYD, 1981) sem a presença de hormônios por 30 dias. Em seguida foram transferidas para meio WPM contendo concentração de fósforo (P) reduzida em 10 vezes e dois tratamentos de Al: ausência e presença de 2mM de  $Al^{+3}$ . A adição de Al foi realizada após a autoclavagem, e em seguida o pH de ambos os tratamentos foram ajustados para  $4,0 \pm 0,2$ . Os tempos de exposição das plântulas ao Al foram de 0 (controle), 1, 3, 7 e 14 dias. Foram utilizadas três repetições biológicas para cada tempo de coleta, sendo cada repetição constituída de um frasco contendo 3 plântulas de *E. urophylla*.

### **2.2 Coloração com hematoxilina**

O método de coloração com hematoxilina foi utilizado para avaliar a acumulação de alumínio em raízes e folhas de plântulas de *E. urophylla*. O protocolo foi baseado em Ribeiro et al. (2017) com modificações. Foram seccionadas ápices de raízes (cinco centímetros) e cortes transversais de folhas de três plântulas de cada tratamento, que em seguida foram agitadas suavemente em 2 mL de água destilada durante 15 min. A água foi substituída por 2

mL de solução aquosa de hematoxilina (0,2% de hematoxilina e 0,02% de iodeto de potássio, p/v) e agitou-se durante 30 seg. Em seguida, a solução foi substituída por 2 mL de água destilada, repetindo assim o primeiro passo. Após a coloração, as raízes e folhas foram fotodocumentadas com o auxílio de um microscópio estereoscópio.

### **2.3 Análises histológicas e morfométricas**

Para a análise histológica foram coletados pequenos fragmentos de raiz acima da região meristemática (coifa) e retângulos de 3x5 mm no meio do limbo foliar das plântulas de *E. urophylla* sob os tratamentos com e sem alumínio. As amostras foram inicialmente fixadas em solução FAA 70% (70% álcool etílico, 15% formoldeído e 15% ácido acético) por 72h e posteriormente conservadas em álcool 70%. O material vegetal foi então desidratado em uma série crescente de concentrações de álcool etílico de 2 em 2 horas (70% - 80% - 90% - 100%). Em seguida foi realizado a infiltração em resina epóxi (Historesin® Leica) de acordo com o protocolo do fabricante.

Cortes com espessura de 10 µm foram obtidos em micrótomo manual (Easypath EP-31-20091), corados com solução de azul de toluidina a 5 % e selados com verniz transparente para fixação da lamínula. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Zeiss, Axio Scope) com sistema de câmera digital acoplada e as fotomicrografias registradas utilizando o programa de análise de imagem AxionVision versão 4.8.

Para a avaliação morfométrica, utilizou-se do programa AxionVision versão 4.8 e foram mensurados os seguintes parâmetros: FOLHA- espessura dos tecidos da epiderme adaxial e abaxial, do parênquima paliádico e lacunoso e do limbo foliar; RAIZ- área da seção transversal e da região celular do periciclo e endoderme. As medidas foram realizadas em quatro repetições de fotomicrografia de raiz e folha de cada tratamento. Foi realizado a análise de variância (ANAVA) e a diferença das médias foi dada pelo teste Tukey, ao nível de significância de 5%.

### **2.4 Análises de bioinformática**

Para realizar o estudo da região promotora dos genes *MATE* candidatos a transportar citrato, foram selecionados genes filogeneticamente próximos de transportadores MATE já caracterizados, desses foram analisadas a região superior a 5' *untranslated region* (5'UTR) de

2000 pares de base utilizando banco de dados de *E. grandis* disponível no Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>).

As sequências promotora dos 4 genes foram submetidas a plataforma online PlantRegMap (JIN et al., 2017) para a predição dos possíveis motivos presentes e de quais genes em *E. grandis* que são responsáveis por codificar tais fatores de transcrição. Foi realizado o agrupamento dos fatores de transcrição que apresentavam mais de um motivo no promotor, estabelecendo uma escala de pontuação para o número de motivos presentes em cada promotor.

A representação gráfica da rede de conexões entres os fatores de transcrição e as regiões promotoras dos genes *MATE* foi realizada utilizando a ferramenta Cytoscape (CLINE et al., 2007), onde a espessura das linhas que conectam cada nó é proporcional ao número de motivos presentes naquele promotor. O agrupamento dos genes foi de acordo com a família do fator de transcrição predita pela plataforma PlantRegMap (JIN et al., 2017).

Para a predição da sublocalização das proteínas MATE foram selecionadas as sequências proteicas no banco de dados de *E. grandis* disponível na plataforma Phytozome. E posteriormente submetidas a ferramenta WoLF PSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) para a predição da sublocalização celular dessas proteínas.

## 2.5 Extração de RNA e síntese de cDNA

Três repetições biológicas de cada tratamento foram utilizadas para a extração de RNA total, cada repetição foi constituída de três plântulas das quais foram coletadas de cada os dois pares de folhas, aquelas mais velhas, sendo as mais distantes do meristema apical. As amostras foram maceradas e submetidas ao protocolo de extração com CTAB (CHANG; PURYEAR; CAIRNEY, 1993). A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose (1%) e a pureza foi determinada em espectrofotômetro NanoVue™ (GE-Healthcare Life Sciences) com base nas razões  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  e  $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ , assegurando valores de 1,8 a 2,2. Para a eliminação do resíduo de DNA foi utilizado o kit Turbo DNA-free (Ambion) de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, para a conversão do RNA em cDNA, foi utilizado o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), seguindo as orientações do fabricante.

## 2.6 RT-qPCR

Os padrões de expressão para dois membros da família MATE (Eucgr.J00768 e Eucgr.A02386) foram analisados via RT-qPCR. As reações foram realizadas em aparelho ABI 7500 (Applied Biosystems) em volume total de 10  $\mu$ L contendo 10 ng de cDNA, 5  $\mu$ L SYBR green master mix (Applied Biosystems) e concentrações otimizadas para cada par de primer (Tabela 1). Todas as reações foram executadas em triplicata biológica. As condições de ciclagem foram utilizadas de acordo com as instruções do fabricante. A especificidade das reações foram verificadas pelas curvas de dissociação (Curva de Melting) e a eficiência dos *primers* foram determinadas pelo software LinRegPCR (RUIJTER; VAN DER VELDEN; ILGUN, 2009). Os níveis de expressão relativa foram calculados pela fórmula de Pfaffl (PFAFFL, 2001) e normalizados com a expressão dos genes de referência PP2A3, EF1 $\alpha$  e UBQ, previamente validados pela ferramenta RefFinder (<http://leonxie.esy.es/RefFinder/>) como os mais estáveis para as amostras deste experimento (Tabela 1).

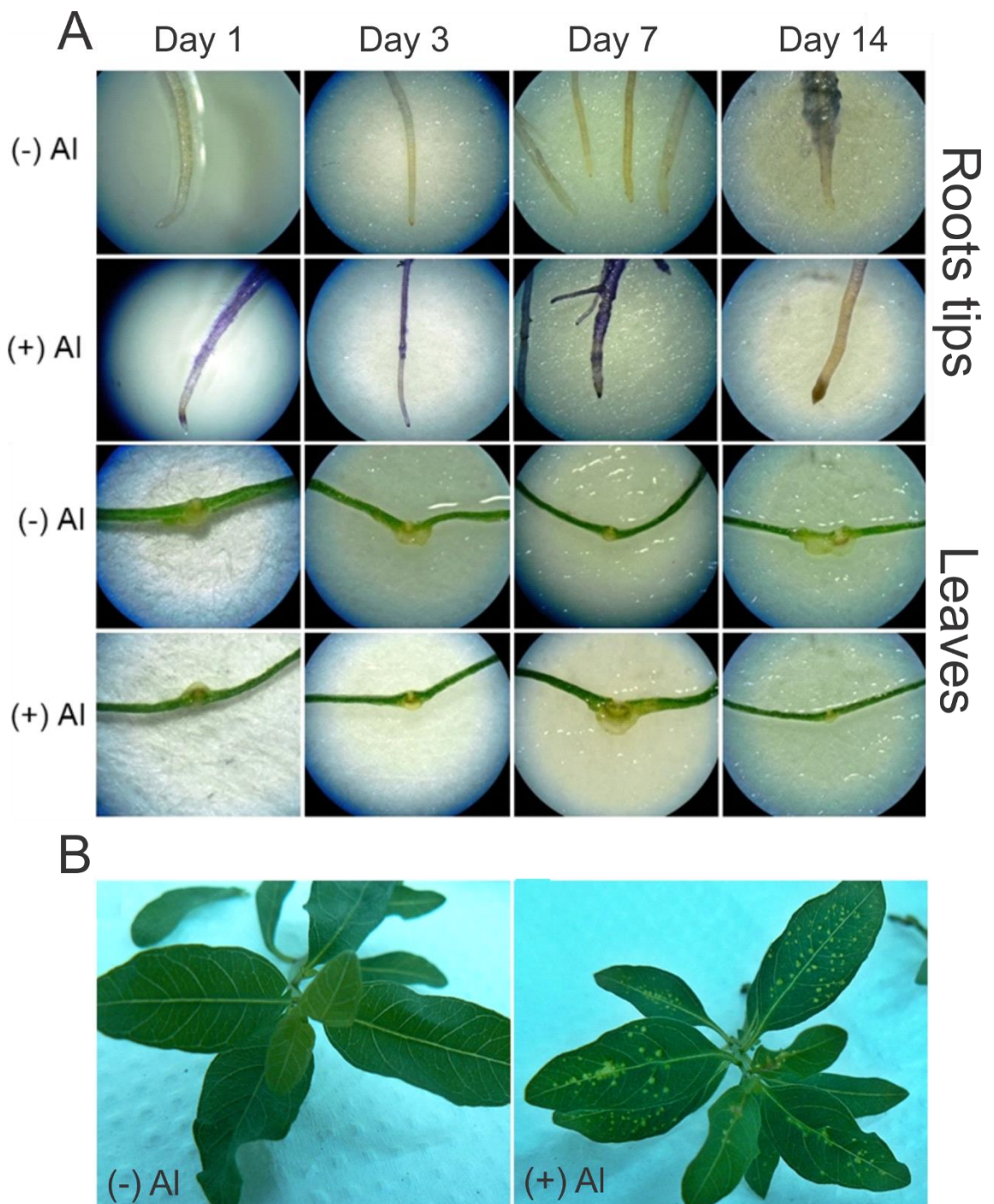
## 3 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 3.1 Análise histoquímica e anatômicas

Uma vez exposta ao alumínio, a planta tem seu sistema radicular afetado, comprometendo a absorção de água e nutrientes podendo levar a uma diminuição do crescimento e desenvolvimento geral das plantas sensíveis (TABALDI, 2008). O efeito tóxico mais severo se dá basicamente pela capacidade que o alumínio tem de se ligar à membrana plasmática, parede celular e protoplasma (KOCHIAN et al., 2004). Dentre os efeitos da toxidez por alumínio estão o aumento da rigidez (MOHANTY et al., 2004) e extensibilidade da parede celular (MA et al., 2004). Esses efeitos fitotóxicos sugerem danos no sistema histoanatômico da raiz.

O modelo geral para explicar a resistência ao Al tóxico presente no solos é que esse metal se fixa na parede celular das células da raiz, impedindo o processo de alongação, em seguida esse Al é absorvido e neutralizado, sendo transportado e armazenado na parte aérea da planta (KOCHIAN et al., 2015). Afim de entender melhor esse mecanismo em *E. urophylla*, plântulas foram expostas durante 1, 3, 7 e 14 dias a um meio de cultura WPM na ausência e

presença de 2mM de  $Al^{+3}$ . Tanto a raiz quanto as folhas foram coradas utilizando hematoxilina e analisadas em microscópio estereoscópio (Figura 1).



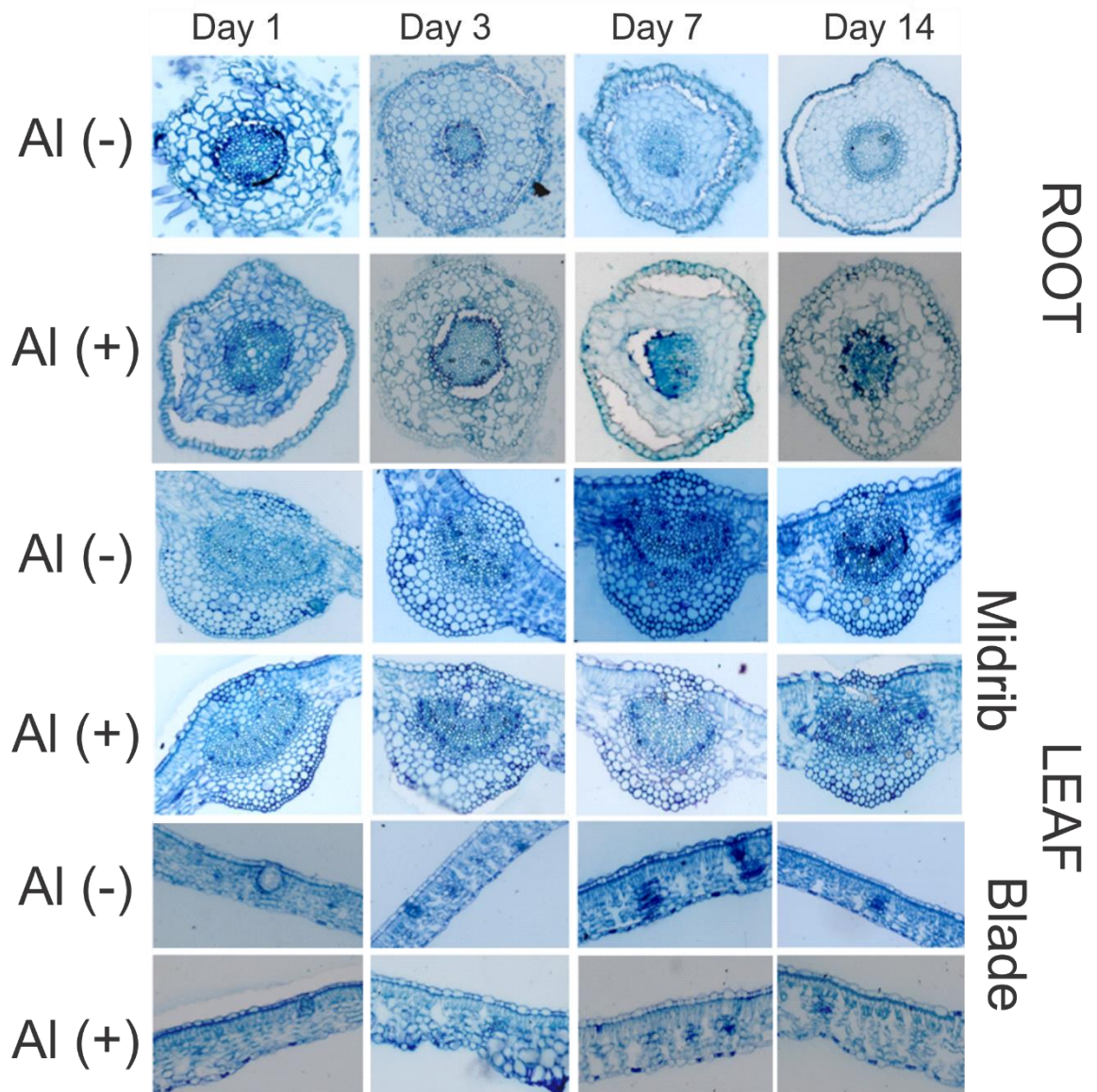
**Figura 1** Padrão de acúmulo de Al na raiz e na parte aérea de *E. urophylla*. **A** Raízes e fragmentos foliares corados com hematoxilina quando exposto em meio de cultura a 2mM de  $Al^{+3}$  [(+)Al] e 0mM de  $Al^{+3}$  [(-)Al] durante 1, 3, 7 e 14 dias. **B** Plântulas de *E. urophylla* cultivadas na ausência [(-)Al] e na presença [(+)Al] de 2mM de  $Al^{+3}$ , após 2 dias de cultivo.



A coloração com hematoxilina é um método bastante utilizado para monitorar a localização e acumulação de alumínio em plantas. No controle (0 dias de exposição), a reação com o corante hematoxilina foi negativa nas raízes. A partir do dia 1, quando as raízes foram expostas ao alumínio, a reação foi positiva, sinalizando a presença de alumínio nos tecidos das raízes, evidenciada pela cor arroxeada, diferentemente do que ocorreu na ausência de alumínio no meio de cultivo (Figura 1A – *roots tips*). Em todos os tempos de exposição testados, o cultivo no meio de cultura contendo o alumínio resultou em acúmulo da substância na raiz. No 14º dia, além do acúmulo na raiz, houve identificação de tecido necrosado no ápice radicular, representado pela cor amarronzada, que é típico da toxicidez por alumínio (SILVA et al., 2004).

Quanto maior a intensidade da cor após a coloração com hematoxilina, mais células estão com as funções vitais afetadas, e quando passam para a coloração amarronzada se tornam inviáveis (WANG et al., 2015). A coloração dos fragmentos foliares apresentou pequena diferença entre as plântulas cultivadas em meio de cultura normal e o meio com a adição de Al (Figura 1A – *leaves*). Desde a primeira avaliação após um dia de exposição ao Al, houve leve escurecimento do centro da nervura central da folha após a coloração com a hematoxilina, sugerindo a rápida translocação do alumínio da raiz para a parte aérea. Contudo, o efeito tóxico nas folhas apareceu logo após dois dias de exposição ao alumínio, com a formação de nódulos brancos sob as folhas das plântulas expostas ao alumínio (Figura 1B). Esses nódulos são possivelmente causados por desbalanço de fluídos e extravasamento celular causado pela presença do alumínio (WANG et al., 2015).

Devido as limitações da análise histoquímica na visualização dos efeitos causados pelo Al na folha, foi realizada análise anatômica tanto na raiz quanto da folha afim de se obter mais informações sobre os efeitos danosos causados pelo Al. Foram realizados cortes transversais da raiz e da folha, nervura central e limbo foliar, sendo corados com azul de toluidina (Figura 2).



**Figura 2** Secções transversais de raiz e folha (nervura central e limbo foliar) expostas em meio de cultura a 2mM de  $\text{Al}^{+3}$  [(+)Al] e 0mM de  $\text{Al}^{+3}$  [(-)Al] durante 1, 3, 7 e 14 dias.

Nas raízes que estavam em contato com Al houve o surgimento de aerênquimas, característica não observada nos tratamentos sem Al (Figura 2 – *ROOT*). Esse efeito foi observado em *Picea rubens* quando exposta ao Al em solução nutritiva (MCQUATTIE; SCHIER, 1990). Essa mudança anatômica também foi observado em plantas de *Zea mays* expostas ao déficit de P, onde o aparecimento de aerênquimas ocorreu em raízes com baixa disponibilidade de P, sendo essa formação correlacionada com a redução da respiração na raiz (FAN et al., 2003). Nesse trabalho, também foi observado que no limbo foliar houve o surgimento de aerênquimas na região abaxial (Figura 2 – *LEAF – Blade*).

As análises histológicas demonstraram que as raízes sob tratamento com Al sofreram severos danos nas suas células, sendo possível observar que o Al teve efeito tanto no diâmetro da seção transversal quanto na área do periciclo e endoderme (Tabela 4). O mesmo foi observado com os tecidos foliares, onde a nervura central e o limbo apresentaram modificações na sua estrutura causadas pelo efeito do Al (Tabela 3). Assim é possível concluir que a concentração de Al presente na solução nutritiva e o tempo de exposição das plântulas foram suficientes para causar o estresse.

No diâmetro da seção transversal da raiz não houve interação entre os tratamentos, ausência e presença de Al, e o tempo de exposição, 1, 3, 7 e 14 dias (p-valor = 0,35). Entretanto, foi possível observar nas plântulas que estavam na ausência de Al, em média 1,4 vezes maior diâmetro que as expostas ao Al. Esse fato pode ser explicado pela fixação do Al na parede celular das células da raiz, aliado à isso, as plântulas estavam em crescimento secundário, conseqüentemente, o Al fixado na parede das células impediu o processo de alongação celular resultando em um menor diâmetro da seção transversal. Resultado semelhante foi encontrado em *Phaseolus vulgaris* sob estresse de P, onde plantas em baixa concentração de P apresentaram retardo no crescimento secundário da raiz, apresentando menor diâmetro da seção transversal (FAN et al., 2003).

Houve interação, entre o tempo de exposição e a concentração de Al no tamanho do periciclo e endoderme (p-valor = 0,02), havendo diminuição na presença de Al. Essa alteração também foi identificadas nas raízes de um genótipo tolerante de *Secale cereale L.*, onde foi possível observar uma diminuição da região celular de periciclo e endoderme, precisamente na zona de alongamento, após 24 h de exposição ao Al (SILVA et al., 2012). Além disso, as células das camadas externas de centeio foram degradando em todos os tratamentos de exposição ao Al, corroborando com o que foi observado neste estudo.

Já nas folhas foram observadas algumas modificações na estrutura morfológica sob o efeito do Al. Os dados morfométricos mostraram que houve alterações no limbo foliar, no parênquima lacunoso e na nervura central em resposta a presença de Al. Houve um aumento de 1,1 vezes a espessura do limbo foliar na presença de Al, que corrobora com os resultados encontrados em *Theobroma cacao*, onde genótipos tolerantes ao Al apresentavam maior espessura do limbo foliar (DE ALMEIDA et al., 2015). Também ocorreu aumento de 1,14 vezes do parênquima lacunoso na presença de Al, não havendo alteração no tempo. Teve correlação entre o tempo de exposição e a concentração de Al na nervura central, com diminuição da espessura da nervura da nervura com o passar do tempo e somente após 3 dias



Os principais FT associados a resposta ao Al tóxico são: *Sensitive to Proton Rhizotoxicity 1-like zinc finger* (STOP1) e *Aluminum-Resistance Transcription fator 1* (ART1), ambos membros da família *Cysteine-2-Histidine-2-type zinc-finger* (C2H2) (LIU; PIÑEROS; KOCHIAN, 2014). O *AtSTOP1*, caracterizado em mutante de *Arabidopsis thaliana* sensível a baixo pH (IUCHI et al., 2007), é responsável por ativar uma série de genes relacionados ao estresse de Al, entre eles *Multi-drug And Toxic compound Extrusion* (*AtMATE1*), Aluminum-activated Malate Transporter1 (*AtALMT1*) e Aluminum-Sensitive3 (*AtALS3*) (SAWAKI et al., 2009).

Os genes de eucalipto da família C2H2 que apresentaram maior número de motivos na região promotora dos genes *MATE* foram: *Eucgr.A00553* e *Eucgr.F02627*. Especificamente o gene *Eucgr.A00553* apresentou 4,3,2 e 2 motivos na região promotora dos genes *MATE* *Eucgr.G03382*, *Eucgr.A02386*, *Eucgr.J00768* e *Eucgr.G03383*, respectivamente. Enquanto que o *Eucgr.F02627* apresentou 3 motivos na região promotora dos genes *Eucgr.G03382* e *Eucgr.J00768*, e 1 motivo nos genes *Eucgr.G03383* e *Eucgr.A02386*.

O gene *Eucgr.F02627* apresenta alta similaridade com o *EguSTOP1*, caracterizado em clone comercial de *E. grandis x E.urophylla* (GUT5), que quando silenciado diminuiu a expressão de dois genes diretamente envolvidos com o estresse de Al, sendo eles o *EguALS3* e o *EguMATE1* (SAWAKI et al., 2014). O transportador de citrato, *EguMATE1*, apresentou 100% de identidade nucleica no CDS com o *Eucgr.G03382*.

A família de FT que apresentou maior número de motivos por região promotora foi a GRAS, contendo apenas um membro. Esse FT apresentou 8 motivos no promotor do *Eucgr.G03382*, 7 em *Eucgr.J00768*, 5 em *Eucgr.G03383* e 4 em *Eucgr.A02386*. GRAS é uma família de FT exclusiva de plantas, relacionadas a diversas etapas do desenvolvimento vegetal, como por exemplo, desenvolvimento da raiz e manutenção da dominância apical (BOLLE, 2004). Esta família também mostrou-se ser fundamental no processo de sinalização para associação com fungos (Micorriza) (GOBBATO et al., 2012) e bactérias da gênero *Rhizobium* (SMIT et al., 2005).

As famílias de FT que apresentaram mais membros associados aos genes *MATE* foram ERF, NAC e WRKY com 53, 51 e 44, respectivamente. Essas três famílias de FT estão envolvidas tanto no estresse abiótico quanto no biótico, devido a esse *cross-talk* são de extrema relevância para o processo de melhoramento genético (ERPEN et al., 2018).

A família AP2/ERF é uma das maiores famílias específicas de plantas que compartilham um domínio conservado bem estabelecido, sendo um dos membros que mais se

destaca é o *DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING* (DREB), relacionado a diversos estresses abióticos, entre eles, frio e desidratação (MIZOI; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2012). A família NAC está envolvida com o regulação do crescimento, senescência, crescimento, divisão celular e resposta a estímulos ambientais (NAKASHIMA et al., 2012). Em *Glycine max*, foram testados 38 membros da família NAC sendo que 25 GmNAC apresentaram expressão diferencial alterada na escala de 2 vezes tanto para cima quanto para baixo, em resposta a desidratação (LE et al., 2011). Outra família de FT que apresenta um vasto número de membros e está envolvida no crescimento vegetal, resposta a estresse biótico e abiótico é a família WRKY (RUSHTON et al., 2010). *Oryza sativa* quando expressou constitutivamente o gene *OsWRKY11* mostrou aumentar a tolerância ao estresse hídrico, sendo que os principais genes envolvidos no estresse também apresentaram expressão constitutiva (LEE et al., 2018).

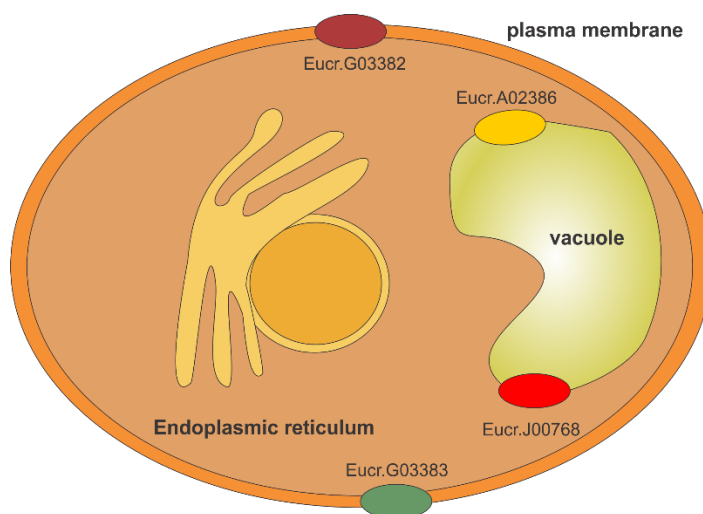
Além do compartilhamento das principais famílias relacionadas ao estresse hídrico, o estresse de Al está relacionado com o hormônio vegetal ácido abscísico (ABA). Foi demonstrado que em raízes de *Zea mays* e *Hordeum vulgare* de linhagens sensíveis quando em contato com o Al, aumentavam a concentração de ABA em 340% e 351%, respectivamente (FOY, 1988). Sivaguru et al. (2003) sugerem que o Al interfere na sinalização e transporte de ABA para a parte aérea da planta e resultando no fechamento do estômato.

Portanto, existe uma correlação entre o estresse hídrico e a toxidez de Al, sendo necessários estudos mais detalhados para elucidar o envolvimento dos genes da família *MATE* no estresse hídrico.

### **3.3 Predição da sublocalização das proteínas MATE**

Não levando em consideração os efeitos negativos na fotossíntese causados pela presença de Al, diversas plantas acumulam esse metal tóxico na parte aérea da planta, principalmente nas folhas velhas (KOCHIAN et al., 2015). Teorias foram propostas para a neutralização do Al internamente, como por exemplo, quelar no citosol ou ligação do Al à proteínas e compartimentalização no vacúolo (KOCHIAN, 1995). Estudos em *H. macrophylla* verificaram que o Al é quelado pelo citrato na folha na proporção de 1:1 (MA et al., 1997a). A neutralização e armazenamento no vacúolo é descrito como um mecanismo comum em diversas espécies que acumulam metais pesados (SHARMA; DIETZ; MIMURA, 2016).

Assim, com o objetivo de entender melhor a função dos genes *MATE* que codificam transportadores de citrato foi realizada uma análise de localização celular utilizando a ferramenta WoLF PSORT que converte a sequência de aminoácidos da proteína em localizações numéricas de: sinais de classificação, composição de aminoácidos e sítios de motivos para realizar a predição da localização celular (HORTON et al., 2007). As proteínas Eucgr.G03382 e Eucgr.G03383 apresentaram predição para localizar-se na membrana plasmática enquanto que as proteínas Eucgr.A02386 e Eucgr.J00768 na membrana do vacúolo (Figura 4).



**Figura 4** Localização celular dos transportadores MATE de citrato. A predição da localização foi através da ferramenta WoLF PSORT.

Os ácidos orgânicos são sintetizados nas mitocôndrias através principalmente do ciclo de Krebs. Devido a atividade catalítica do ciclo de Krebs, a quantidade de ácidos orgânicos presentes na mitocôndria é relativamente baixa, sendo esse majoritariamente armazenado no vacúolo (LOPEZ-BUCIO et al., 2000). Em estudos com *Acer pseudoplatanus L.* foi demonstrado que a maior parte do citrato presente na célula está localizado no vacúolo (GOUT et al., 1993). Portanto, deve haver transportadores que realizam a mobilização do citrato do interior da mitocôndria para o citoplasma, do mesmo modo que realiza o efluxo do citoplasma para dentro do vacúolo.

O MATE é uma família grande de transportadores onde estão envolvidos em diferentes atividades biológicas bem como transportam uma vasta gama de substratos. Alguns membros dessa família estão localizados na membrana plasmática como é o caso do SbMATE em *Sorghum bicolor* (MAGALHAES et al., 2007) e HvMATE em *Hordeum vulgare*

(WANG et al., 2007) que realizam o efluxo de citrato para a rizosfera em resposta a toxidez de Al. Entretanto, também existem membros que estão localizados no vacúolo como é o caso do NtMATE1 e NtMATE2 em *Nicotiana tabacum* (SHOJI et al., 2009) e NtJAT também em *N. tabacum* (MORITA et al., 2009) que são responsáveis pelo transporte de nicotina para o vacúolo.

Os genes *Eucgr.G03382* e *Eucgr.G03383* foram preditos a se localizar na membrana plasmática, entretanto, a ferramenta não tem precisão suficiente para informar, podendo ser a membrana plasmática da célula ou de alguma organela, como por exemplo, a mitocôndria. No entanto, o gene *Eucgr.G03382* apresentou 100% de identidade com o *EcMATE1*, que em *E. camaldulensis* é responsável pelo transporte de citrato na raiz em resposta a presença do Al, sendo a sua expressão sensível a concentração de Al assim como ao pH da solução (SAWAKI et al., 2013). Assim, esse é um forte indício de que a predição da proteína *Eucgr.G03382* está se referindo a membrana plasmática da célula, ou seja, ela pode ser responsável pelo efluxo de citrato em resposta a toxidez de Al na raiz.

Embora a proteína do gene *Eucgr.G03382* pode estar relacionada com o efluxo de citrato para a rizosfera em resposta a presença de Al, ela pode não só se restringir a essa função. Os genes *Eucgr.G03382* e *Eucgr.G03383* apresentaram um grande número de conexões com outros genes, sendo um forte indício de estar relacionado com diversas rotas metabólicas (Artigo 3). Assim, existe a possibilidade dessas proteínas estarem também localizadas na membrana plasmática da mitocôndria, realizando o transporte de citrato do interior da organela para o citoplasma da célula.

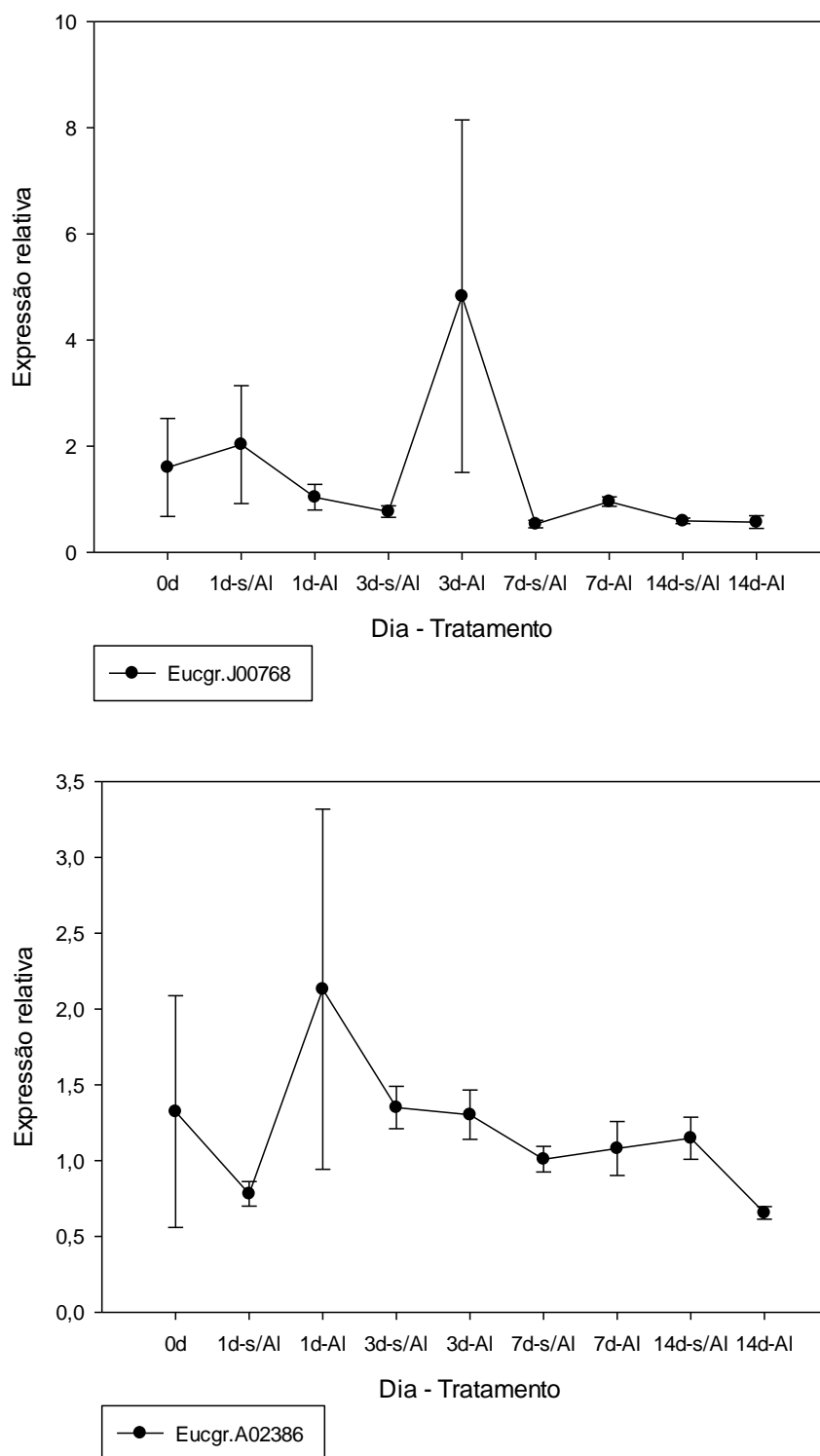
Na membrana do vacúolo foi predito duas das proteínas da família MATE que transportam citrato, *Eucgr.J00768* e *Eucgr.A02386*. Existem fortes indícios de serem responsáveis por realizar o efluxo de citrato do citoplasma para dentro do vacúolo, onde será acumulado. Na literatura ainda não está descrito o envolvimento, dos membros da família MATE que realizam o transporte de citrato, no transporte no vacúolo. Sendo necessário maiores estudos para comprovação da localização dessas proteínas.

### **3.4 Análise da expressão dos genes MATE em *E. urophylla***

Já se sabe na literatura que algumas plantas acumulam Al nas folhas, como mecanismo de resistência ao Al, mais especificamente no vacúolo (KOCHIAN et al., 2015). Em estudos com *Hydrangea macrophylla* sobre estresse de Al foi demonstrado que esse metal é neutralizado, principalmente, pelo citrato no vacúolo (MA et al., 1997b). Em *E. globulus*



quando exposto a  $465\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{+3}$  foi observado um maior acúmulo nas folhas velhas em relação as jovens (SILVA et al., 2004). Afim de elucidar o comportamento da família MATE, especificamente dos transportadores de citrato, foram selecionados 2 genes a partir de análises anteriores (Figura 4) sendo eles *Eucgr.J00768* e *Eucgr.A02386* para verificar o perfil de expressão na folha de eucalipto sobre estresse de Al (Figura 5). Até a presente data, não foram encontrados trabalhos que relatam a expressão de membros da família MATE, que codificam transportadores de citrato, em folhas de eucalipto.



**Figura 5** Expressão relativa dos genes *Eucgr.J00768* e *Eucgr.A02486* em *E. urophylla* na ausência e presença de 2mM de  $Al^{+3}$  em meio de cultura WPM durante 0, 1, 3, 7 e 14 dias de exposição. Os genes *PP2A3*, *EF1 $\alpha$*  e *UBQ* como genes de referência. A amostra do tempo zero foi utilizada como amostra calibradora para ambos os genes.

Foi observado que dos dois genes testados o que apresentou maior expressão diferencial na folha foi o *Eucgr.J00768*. Em 3 dias de exposição foi observada a expressão 6,2

vezes maior na presença de Al do que na ausência. Não foi possível observar aumento significativo na expressão relativa do gene *Eucgr.J00768* entre 1 e 7 dias de exposição. Assim podemos assumir que a resposta desse gene ao estresse de Al na folha está dentro do intervalo de 1 a 7 dias de exposição. Em experimento com *E. calmadulensis* sobe estresse de Al foi observado que, a expressão do gene *EcMATE1* na raiz apresentou uma resposta rápida a presença de Al, em apenas 4 horas de exposição ao Al o gene *EcMATE1* expressou 6,4 vezes mais que a controle (SAWAKI et al., 2013). Essa diferença no tempo de resposta pode ser resultado da translocação do Al da raiz para a parte aérea da planta.

O gene *Eucgr.A02386* apresentou aumento da expressão no dia 1 na presença de Al, sendo um aumento de 2,7 vezes em relação ao controle, exposto ao mesmo tempo na ausência de Al. Nos tempos entre 3 e 7 dias não ocorreu diferença entre os tratamentos com e sem Al. Houve uma diminuição da expressão no tratamento com Al no 14º dia, sendo uma repressão de 1,75 vezes do tratamento com Al em relação a ausência no mesmo dia.

Em raiz de *Vigna umbellata* o efluxo acontece em dois estágios, sendo um rápido, mas com baixo transporte de citrato e outro mais tardio com maior liberação de ácidos orgânicos. O transportador *VuMATE2* é responsável pela resposta precoce e o *VuMATE1* pelo maior efluxo, além disso o FT *VuSTOP1*, da família C2H2, apresentou maior influência no *VuMATE2* do que no *VuMATE1* (LIU et al., 2018). Isso corrobora com os dados obtidos neste trabalho, onde o gene *Eucgr.A02386* apresentou um aumento da expressão num menor tempo de exposição ao Al e esse aumento não foi muito intenso, quando comparado com o *Eucgr.J00768* que apresentou um pico de expressão mais tardio e de maior intensidade. Também é interessante ressaltar que o promotor do gene *Eucgr.A02386* apresenta um número maior de motivos para o fator de transcrição da família C2H2 do que o *Eucgr.J00768*.

#### 4 CONCLUSÃO

A concentração de 2mM de  $Al^{+3}$  foi suficiente para estressar o *E. urophylla*, comprovado nas alterações anatômicas causadas tanto na raiz quanto nas folhas. Devido a esse estresse, foi possível observar variações no perfil de expressão de dois membros da família *MATE*, sendo eles o gene *Eucgr.A2386* que apresentou uma expressão precoce e menos intensa e o gene *Eucgr.J00768* com uma expressão mais tardia e mais intensa. Ambas as proteínas, codificadas por esses genes, apresentam predição para localizar-se no vacúolo, fornecendo assim uma base para estudos futuros para elucidar a importância do transporte de citrato para o vacúolo na tolerância ao Al.

A partir de estudos da região promotora dos genes da família *MATE* que transportam citrato, foi possível observar que todos os membros apresentam fortes correlações com membros da família C2H2. O fator de transcrição Eucgr.G02163, da família GRAS, também demonstrou ter bastante influencia nos *MATE* devido ao grande número de motivos presentes na região promotora, sendo necessários estudos futuros para elucidar a real influencia desse fator de transcrição.

Interessantemente, foi identificada a presença de um grande número de famílias de fatores de transcrição associadas ao estresse hídrico. Evidenciando um estudo mais aprofundado da correlação entre o estresse hídrico e o estresse de Al.

Portanto, foi possível adquirir conhecimentos básicos da expressão dos genes da família *MATE* na parte área da planta, demonstrando a expressão diferencial tanto na intensidade quanto no tempo de dois membros dessa família. São subsídios para a melhor compreensão dos mecanismos moleculares do eucalipto envolvidos na tolerância ao Al. Estas constatações demonstram a pertinência do estudo desses genes para estratégias de melhoramento do eucalipto.

## REFERENCIAS

BOLLE, C. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. **Planta:** Berlin Heidelberg, v. 218, n. 5, p. 683–692, 2004.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter:** Amsterdã, v. 11, n. 2, p. 113–116, 1993.

CLINE, M. et al. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. **Nature protocols:** New York, v. 2, n. 10, p. 2366–2382, 2007.

DE ALMEIDA, N. M. et al. Molecular, biochemical, morphological and ultrastructural responses of cacao seedlings to aluminum (Al<sup>3+</sup>) toxicity. **Acta Physiologiae Plantarum:** [S.l.: s.n.], v. 37, n. 2, 2015.

ERPEN, L. et al. Potential use of the DREB/ERF, MYB, NAC and WRKY transcription factors to improve abiotic and biotic stress in transgenic plants. **Plant Cell: Plant Cell, Tissue and Organ Culture:** [S.l.: s.n.], v. 132, n. 1, p. 1–25, 2018.

FAN, M. et al. Physiological roles for aerenchyma in phosphorus-stressed roots. **Functional Plant Biology:** [S.l.: s.n.], v. 30, n. 5, p. 493–506, 2003.

FOY, C. D. Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis:** London, v. 19, n. 7–12, p. 959–987, 1988.

- GOBBATO, E. et al. A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. **Current Biology**: New York, v. 22, n. 23, p. 2236–2241, 2012.
- GOUT, E. et al. <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance studies of malate and citrate synthesis and compartmentation in higher plant cells. **J Biol Chem**, v. 268, n. 6, p. 3986–3992, 1993.
- HORTON, P. et al. WoLF PSORT: Protein localization predictor. **Nucleic acids research**: London, v. 35, n. SUPPL.2, p. 585–587, 2007.
- IMAI, T. et al. Evaluation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in *Pyrus pyrifolia* using different tissue samples and seasonal conditions. **PLoS one**: Cambridge, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2014.
- 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**: [s.l.: s.n.], v. 104, n. 23, p. 9900–9905, 2007.
- JIN, J. et al. PlantTFDB 4.0: Toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. **Nucleic acids research**: London, v. 45, n. D1, p. D1040–D1045, 2017.
- KOCHIAN, L. V. et al. How Do Crop Plants Tolerate Acid Soils? Mechanisms of Aluminum Tolerance and Phosphorous Efficiency. **Annual Review of Plant Biology**: [S.l.: s.n.], v. 55, n. 1, p. 459–493, 2004.
- KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Biology**: Palo Alto, v. 46, n. 1, p. 237–260, 1995.
- KOCHIAN, L. V et al. Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. **Annu. Rev. Plant Biol**: Palo Alto , v. 66, n. 1, p. 1–23, 2015.
- LE, D. T. et al. Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. **DNA Research**: Oxford, v. 18, n. 4, p. 263–276, 2011.
- LEE, H. et al. Rice WRKY11 Plays a Role in Pathogen Defense and Drought Tolerance. **Rice**: [S.l.: s.n.], v. 11, n. 1, p. 5, 2018.
- LIU, J.; PIÑEROS, M. A.; KOCHIAN, L. V. The role of aluminum sensing and signaling in plant aluminum resistance. **Journal of Integrative Plant Biology**: Beijing, v. 56, n. 3, p. 221–230, 2014.
- LIU, M. Y. et al. Two citrate transporters coordinately regulate citrate secretion from rice bean root tip under aluminum stress. **Plant, Cell & Environment**: New York, 2018.
- LOPEZ-BUCIO, J. et al. Organic acid metabolism in plants: From adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. **Plant Science**: Amsterdã, v. 160, n. 1, p. 1–13, 2000.
- LYNCH, J. P. Roots of the second green revolution. **Australian Journal of Botany**: [S.l.: s.n.], v. 55, n. 5, p. 493–512, 2007.

MA, J. F. et al. Internal Detoxification Mechanism of Al in Hydrangea. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 113, n. 1 1997, p. 1033–1039, 1997a.

MA, J. F. et al. Internal Detoxification Mechanism of Al in Hydrangea. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 113, n. 1 1997, p. 1033–1039, 1997b.

MA, J. F. et al. Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. **Plant and Cell Physiology**: London, v. 45, n. 5, p. 583–589, 2004.

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

MAGALHAES, 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, 2007.

MCCOWN, B. H.; LLOYD, G. **Woody plant medium (WPM)-a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant-species**. HortScience. **Anais...**1981

MCQUATTIE, C. J.; SCHIER, G. A. Response of red spruce seedlings to aluminum toxicity in nutrient solution: alterations in root anatomy. **Canadian Journal of Forest Research**: [s.l.: s.n.], v. 20, p. 1001–1011, 1990.

MIZOI, J.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**: [s.l.: s.n.], v. 1819, n. 2, p. 86–96, 2012.

MORITA, M. et al. Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**: [s.l.: s.n.], v. 106, n. 7, p. 2447–52, 2009.

NAKASHIMA, K. et al. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**: [s.l.: s.n.], v. 1819, n. 2, p. 97–103, 2012.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**: London, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

RUIJTER, J. M.; VAN DER VELDEN, S.; ILGUN, A. LinRegPCR: Analysis of quantitative RT-PCR data [computer program]. Version 11.0. **Heart Failure Research Center, Academic Medical Centre Amsterdam**:Amsterdã, 2009.

RUSHTON, P. J. et al. WRKY transcription factors. **Trends in Plant Science**: Kidlington, v. 15, n. 5, p. 247–258, 2010.

SAWAKI, Y. et al. STOP1 Regulates Multiple Genes That Protect Arabidopsis from Proton and Aluminum Toxicities. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 150, n. 1, p. 281–294, 2009.

SAWAKI, Y. et al. Characterization of Al-responsive citrate excretion and citrate-transporting MATEs in *Eucalyptus camaldulensis*. **Planta**: Berlin Heidelberg, v. 237, n. 4, p. 979–989, 2013.

SAWAKI, Y. et al. Identification of a STOP1-like protein in Eucalyptus that regulates transcription of Al tolerance genes. **Plant Science**: Amsterdã, v. 223, p. 8–15, 2014.

SHARMA, S. S.; DIETZ, K. J.; MIMURA, T. Vacuolar compartmentalization as indispensable component of heavy metal detoxification in plants. **Plant Cell and Environment**: New York, v. 39, n. 5, p. 1112–1126, 2016.

SHOJI, T. et al. Multidrug and Toxic Compound Extrusion-Type Transporters Implicated in Vacuolar Sequestration of Nicotine in Tobacco Roots. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 149, n. 2, p. 708–718, 2009.

SILVA, I. R. et al. Responses of eucalypt species to aluminum: the possible involvement of low molecular weight organic acids in the Al tolerance mechanism. **Tree physiology**: London, v. 24, n. 11, p. 1267–1277, 2004.

SILVA, S. et al. Al toxicity mechanism in tolerant and sensitive rye genotypes. **Environmental and Experimental Botany**: Amsterdã, v. 75, p. 89–97, 2012.

SINGH, K. B.; FOLEY, R. C.; OÑATE-SÁNCHEZ, L. Transcription factors in plant defense and stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**: Amsterdã, v. 5, n. 5, p. 430–436, 2002.

SIVAGURU, M. et al. Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in Arabidopsis. **Plant Physiology** [S.l.: s.n.], v. 132, n. 4, p. 2256–2266, 2003.

SMIT, P. et al. NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial nod factor-induced transcription. **Science**: New York, v. 308, n. 5729, p. 1789–1791, 2005.

TAHARA, K. et al. Role of aluminum-binding ligands in aluminum resistance of Eucalyptus camaldulensis and Melaleuca cajuputi. **Plant and Soil**: Amsterdã, v. 302, n. 1–2, p. 175–187, 2008.

WANG, J. et al. High-resolution mapping of the Alp locus and identification of a candidate gene HvMATE controlling aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**: Amsterdã, v. 115, n. 2, p. 265–276, 2007.

WANG, Y.-L. et al. Contrasting responses of root morphology and root-exuded organic acids to low phosphorus availability in three important food crops with divergent root traits. **AoB Plants**: [s.l.: s.n.], v. 7, p. plv097, 2015.

YANG, Q. et al. Reference gene selection for qRT-PCR in *Caragana korshinskii* Kom. under different stress conditions. **Molecular Biology Reports**: Basel, v. 41, n. 4, p. 2325–2334, 2014.

Tabela 1: Classificação com base nos valores de estabilidade, a partir do algoritmo do RefFinder, dos candidatos a genes de referência.

| Rank | Gene         | Definição                        | Acesso       | Sequência do primer (5' – 3')<br>Foward/Reverse      | Tm<br>(°C)     | Amplicon<br>(pb) | E<br>(%) | R <sup>2</sup> |
|------|--------------|----------------------------------|--------------|--|----------------|------------------|----------|----------------|
| 1    | PP2A3        | Fosfatase<br>Subunidade 2A-3     | Eucgr.B03031 | F:TTGACGAGCCTCTTTATCCAAT<br>R:GTCCTTTCTTCTCCGAGAGCAC | 60,10<br>61,78 | 124              | 89       | 0,997          |
| 2    | EF1 $\alpha$ | Fator de<br>elongação 1 $\alpha$ | Eucgr.B02473 | F:TGCTTTGCTCGCTTTCACTC<br>R:TTCATCGTACCTTGCCTTGG     | 61,77<br>61,02 | 100              | 83       | 0,993          |
| 3    | UBQ          | PoliUbiquitina                   | Eucgr.F04448 | F:TGTCCTCCATCTTGTGCTTG<br>R:GTCGATTCACACTGCAAACG     | 59,83<br>60,31 | 105              | 94       | 0,997          |
| 4    | SAND         | Proteína SAND                    | Eucgr.B02502 | F:CGTGTATGTCAATGGGTGAAAG<br>R:TAGCAGGCAATACATCACCAAG | 60,28<br>60,15 | 86               | 90       | 0,997          |
| 5    | PP2A1        | Fosfatase<br>Subunidade 2A-1     | Eucgr.B03386 | F:TGGAGAGAACATGGACCAGA<br>R:CTGTGAACCGGCATTACAAA     | 59,18<br>59,59 | 135              | 83       | 0,993          |
| 6    | TUB          | Tubulina                         | Eucgr.B03604 | F:TTCCATTTCCATTTCCGAAG<br>R:CCTGCCCAATGTGTATGCTT     | 59,87<br>60,91 | 139              | 90       | 0,994          |

**Rank** - Classificação de estabilidade estabelecido em pool de amostras, utilizando a ferramenta RefFinder

**E (%) e R<sup>2</sup>** - Eficiência da amplificação dos pares de *primers*, em %, em *pool* de amostras de todos os tratamentos.  
Coeficiente de determinação



Tabela 2: Informações gerais dos *primers* alvos utilizados no experimento

| Gene         | Definição   | Sequência do primer (5' – 3')<br>Foward/Reverse  | Tm<br>(°C)     | Amplicon<br>(pb) | E<br>(%) | R <sup>2</sup> |
|--------------|-------------|--|----------------|------------------|----------|----------------|
| Eucgr.J00768 | <i>MATE</i> | F:GCTGGGTTTGTTCATCGAGT<br>R:CCCTCCAGAGGCTCCATTAC | 60,12<br>60,98 | 124              | 88,9     | 0,999          |
| Eucgr.A02386 | <i>MATE</i> | F:GGAAGAACATTAGGGCGATG<br>R:GGAGTGCAATCTGGGCTATC | 59,53<br>59,66 | 86               | 92,9     | 0,999          |

**E (%)** - Eficiência de amplificação dos pares de *primers*, em %.

Tabela 3: Valores de distância ( $\mu\text{m}$ ) obtidos da análise de folha de *E. urophylla* sobe estresse de Al

|      |          | Folha   |         |         |        |            |        |          |        |         |        |         |       |           |          |       |        |       |
|------|----------|---------|---------|---------|--------|------------|--------|----------|--------|---------|--------|---------|-------|-----------|----------|-------|--------|-------|
|      |          | Limbo   |         | adaxial |        | paliçadico |        | lacunoso |        | Nervura |        | abaxial |       |           |          |       |        |       |
|      |          | Al      |         | Al      |        | Al         |        | Al       |        | Al      |        | Al      |       |           |          |       |        |       |
|      | tempo    | Com     | Sem     | Tempo   | Com    | Sem        | tempo  | Com      | Sem    | tempo   | Com    | Sem     | tempo | Com       | Sem      | tempo | Com    | Sem   |
|      |          | 117.18a | 105.82b |         | 13.37a | 11.88a     |        | 31.11a   | 29.17a |         | 61.05a | 53.46b  |       |           |          |       | 9.37a  | 9.15a |
| T1   | 116.25a  |         |         | 12.34a  |        |            | 30.36a |          |        | 59.59a  |        |         |       | 344.05aA  | 407.03aB | 9.64a |        |       |
| T2   | 114.89ab |         |         | 13.99a  |        |            | 26.63a |          |        | 63.45a  |        |         |       | 317.09abA | 304.93bA | 9.35a |        |       |
| T3   | 111.45ab |         |         | 11.79a  |        |            | 30.34a |          |        | 50.74a  |        |         |       | 254.54abA | 283.46bA | 8.79a |        |       |
| T4   | 103.39b  |         |         | 12.38a  |        |            | 33.25a |          |        | 55.26a  |        |         |       | 315.44bA  | 265.50bA | 9.27a |        |       |
|      |          | Média   |         |         | Média  |            |        | Média    |        |         | Média  |         |       | Média     |          |       | Média  |       |
| Fat  |          | 111.50a |         | Fat     | 12.62a |            |        | 30.14a   |        | Fat     | 57.26a |         | Fat   | 311.50b   |          | Fat   | 9.26a  |       |
| test |          | 119.16a |         | Test    | 12.87a |            |        | 30.81a   |        | test    | 66.50a |         | test  | 240.38a   |          | test  | 10.53a |       |

\*\* Médias seguidas de iguais letras minúsculas não diferem entre si na mesma coluna

\*\*\* Médias seguidas de iguais letras maiúsculas na mesma linha não diferem entre si

Tabela 4: Valores de distância ( $\mu\text{m}$ ) obtidos da análise de raiz de *E. urophylla* sobe estresse de Al

| Raiz                          |                     |        |                             |         |          |  |
|-------------------------------|---------------------|--------|-----------------------------|---------|----------|--|
| diâmetro da seção transversal |                     |        | área do periciclo+endoderme |         |          |  |
| Al                            |                     |        | Al                          |         |          |  |
| tempo                         | Com                 | Sem    | tempo                       | Com     | Sem      |  |
|                               | 321.89 <sup>a</sup> | 449.6b |                             |         |          |  |
| T1                            | 384.9a              |        |                             | 9.62aA  | 17.24acB |  |
| T2                            | 574.95b             |        |                             | 26.49bA | 26.16bA  |  |
| T3                            | 256.977c            |        |                             | 9.93aA  | 13.17cA  |  |
| T4                            | 362.17a             |        |                             | 13.03aA | 18.81aB  |  |
|                               | Média               |        |                             | Média   |          |  |
| Fat                           | 385.74 <sup>a</sup> |        | Fat                         | 16.80a  |          |  |
| test                          | 323.65b             |        | test                        | 16.80a  |          |  |

\*\* Médias seguidas de iguais letras minúsculas não diferem entre si na mesma coluna

\*\*\* Médias seguidas de iguais letras maiúsculas na mesma linha não diferem entre si