

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Análise funcional dos genes *SbMATE1* e  
*SbMATE7* quanto à tolerância ao alumínio em  
sorgo**

**Orientado:** Matheus Thomaz Nogueira Silva Lima  
**Orientador:** Dr. Jurandir Vieira de Magalhães

**BELO HORIZONTE**  
Agosto - 2018

**Matheus Thomaz Nogueira Silva Lima**

**Análise funcional dos genes *SbMATE1* e *SbMATE7* quanto à tolerância ao alumínio em sorgo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética.

**Áreas de concentração:** Genômica e Bioinformática

**Orientação:** Dr. Jurandir Vieira de Magalhães

Programa de pós-graduação em genética – UFMG

Núcleo de Biologia Aplicada

EMBRAPA Milho e Sorgo

**Belo Horizonte**

Agosto 2018

043

Lima, Matheus Thomaz Nogueira Silva.

Análise funcional dos genes *SbMATE1* e *SbMATE7* quanto à tolerância ao alumínio em sorgo [manuscrito] / Matheus Thomaz Nogueira Silva Lima. - 2018.

68 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dr. Jurandir Vieira de Magalhães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Genética - Teses. 2. Alumínio Toxicologia - Teses. 3. Sorgo - Teses. 4. Genes. 5. Solos Acidez. I. Magalhães, Jurandir Vieira de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575



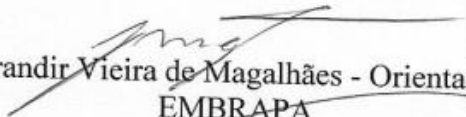
Pós-Graduação em Genética  
Departamento de Biologia Geral, ICB  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG  
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570



**"Análise funcional dos genes SbMATE1 e SbMATE7 quanto à tolerância ao alumínio em sorgo"**

**Matheus Thomaz Nogueira Silva Lima**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Jurandir Vieira de Magalhães - Orientador  
EMBRAPA

  
Frederico Marianetti Soriani  
UFMG

  
Claudia Teixeira Guimarães  
EMBRAPA

Belo Horizonte, 30 de agosto de 2018.

## Agradecimentos

---

Agradeço aos meus pais pelo incentivo ao longo de toda minha carreira acadêmica. Pelo suporte emocional, carinho e dedicação.

Agradeço ao Dr. Jurandir Vieira de Magalhães pela oportunidade, orientação e ensinamentos ao longo destes dois anos de mestrado.

Agradeço imensamente à analista Dr. Beatriz de Almeida Barros, Bia, pelos valiosos conselhos e, principalmente, pela disponibilidade e generosidade em compartilhar seu conhecimento de forma paciente e atenciosa. Muito obrigado!

À Dr. Andrea Carneiro, sempre atenciosa e disponível para conversar, por me acompanhar nos experimentos de transformação de Arabidopsis.

À Dr. Sylvia Sousa por me auxiliar nos experimentos de fenotipagem.

Obrigado aos analistas Ubiraci Lana, Meire Alves e Marcos de Oliveira e aos técnicos Gisleni Cristeli, Miguel Reis e Célio Ramos pelo suporte durante a execução dos experimentos no NBA e na câmara de crescimento.

Às queridas amigas que fiz no NBA, Gleyce, Amanda, Mariana, Rayanne, Bárbara, Simara, Laiane, Daianne, Jéssica, Raquel e Nataly. Obrigado pelo carinho, conversas, abraços, risadas e pela torcida.

Aos amigos Malu, César e Júlia pelo grupo de apoio e experiências divididas.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Biologia Geral – Genética pela oportunidade e pela qualidade de ensino.

À EMBRAPA Milho e Sorgo por permitir que este trabalho fosse executado.

Agradeço à CAPES pelo financiamento desta pesquisa.

## Sumário

---

Lista de figuras .....	8
Lista de tabelas .....	11
Lista de abreviaturas .....	13
Resumo .....	15
Abstract .....	17
1. Introdução .....	19
1.1. Sorgo: taxonomia, potencial nutricional e comercial .....	19
1.2. Agricultura em solos ácidos .....	20
1.3. Mecanismos fisiológicos de tolerância ao alumínio rizosférico .....	21
1.4. Genes que conferem tolerância ao alumínio em vegetais .....	23
1.5. Controle transcricional de genes transportadores relacionados a tolerância ao alumínio ..	25
1.6. Transportadores MATE: estrutura, diversidade taxonômica e funcional .....	27
2. Objetivos .....	30
2.1. Objetivo geral .....	30
2.2. Objetivos específicos .....	30
3. Material e métodos .....	30
3.1. Identificação de genes candidatos .....	30
3.2. Clonagem e sequenciamento .....	31
3.3. Análise filogenética .....	32
3.4. Predição topológica e modelagem <i>in silico</i> das proteínas SbMATE1 e SbMATE7 .....	33
3.5. Análise de expressão relativa temporal e espacial por qRT-PCR .....	33
3.6. Avaliação da tolerância ao alumínio em eventos transgênicos de <i>Arabidopsis thaliana</i> superexpressando <i>SbMATE7</i> .....	35
3.6.1. Material biológico .....	35
3.6.4. Análise da tolerância ao alumínio .....	37
4. Resultados e discussão .....	39
4.1. Modelos gênicos e análise filogenética de SbMATE1 e SbMATE7 .....	39
4.1.1. Estruturas gênicas .....	39
4.1.2. Análise filogenética de SbMATE1 e SbMATE7 .....	40
4.2. Predição e modelagem <i>in silico</i> das estruturas proteicas de SbMATE1 e SbMATE7 .....	45

4.3.	Identificação da variação alélica de <i>SbMATE1</i> e <i>SbMATE7</i> entre linhagens tolerantes e sensíveis de sorgo ao alumínio .....	49
4.4.	Perfil de expressão relativa, temporal e espacial de <i>SbMATE1</i> e <i>SbMATE7</i> .....	50
4.4.1.	Perfil de expressão de <i>SbMATE1</i> .....	50
4.4.2.	Perfil de expressão de <i>SbMATE7</i> .....	53
4.5.	Efeitos da superexpressão de <i>SbMATE7</i> em <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	56
5.	Conclusão .....	59
6.	Referências bibliográficas .....	59

## Lista de figuras

**Figura 1:** Representação esquemática do vetor pMDC32 contendo os sítios de restrição utilizados no procedimento de transformação de *Arabidopsis* para caracterização fenotípica de plantas transgênicas contendo *SbMATE7* derivado do genótipo SC566. 36

**Figura 2:** Estrutura gênica de *SbMATE*, *ZmMATE1* e *HvMATE* e predição das estruturas gênicas de *SbMATE1* e *SbMATE7* com base na identificação de íntrons (caixas em cinza) e éxons (caixas em preto). *SbMATE1* e *SbMATE7* apresentam ORFs maiores que *SbMATE* (ORF de 2407 pb org organizada em 5 éxons e 4 íntrons). *SbMATE1* apresenta uma ORF predita de 4042 pb enquanto a de *SbMATE7* é de 5467 pb. *SbMATE 1* e *7* estão organizadas em uma estrutura gênica de 13 éxons e 12 íntrons, assim como *ZmMATE1* (ORF de 4474 pb) e *HvMATE* (ORF de 3812 pb). Análise realizada em Gene Structure Display Server (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>). ORF: Open Reading Frame. *Sb*: *Sorghum bicolor*; *Zm*: *Zea mays*; *Hv*: *Hordeum vulgare* 40

**Figura 3:** Análise filogenética entre *SbMATE1*, *SbMATE7* e outras proteínas MATE funcionalmente caracterizadas e descritas na literatura. As sequências de aminoácidos foram alinhadas em MUSCLE e as relações filogenéticas foram inferidas a partir de máxima verossimilhança com bootstrap equivalente a 1000 em MEGA 7.0. *At*: *Arabidopsis thaliana*; *Bd*: *Brachypodium distachyon*; *Bo*: *Brassica oleraceae*; *Ec*: *Eucalyptus camaldulensis*; *Gm*: *Glycine max*; *Hv*: *Hordeum vulgare*; *La*: *Lupinus albus*; *Lj*: *Lotus japonicus*; *Nt*: *Nicotiana tabacum*; *Os*: *Oriza sativa*; *Pf*: *Pyrococcus furiosus*; *Sb*: *Sorghum bicolor*; *Sc*: *Saccharomyces cerevisiae*; *Sc*: *Secale cereale*; *Ta*: *Triticum aestivum*; *Vp*: *Vibrio parahaemolyticus*; *Vu*: *Vigna umbellata*; *Zm*: *Zea mays*. 44

**Figura 4:** Alinhamento das sequências de aminoácidos preditas para *SbMATE*, *SbMATE1* e *SbMATE7*. Alinhamento realizado e adaptado utilizando-se o Toffee Server (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:tmcoffee>). Os domínios transmembrana (TM1 – TM12) conservados estão representados em cinza. Detalhe, em amarelo, dado à região entre TM2 e TM3 designada na formação de uma alça intracelular. 45

**Figura 5:** Esquema de organização geral de proteínas MATE. Está representado o plano de simetria organizado em dois blocos contendo 6 domínios transmembrana TM1-TM6 e

TM7-TM12 com um canal central de transporte. Extremidades C e N-terminais intracelulares. 47

**Figura 6:** Predição da estrutura proteica das proteínas SbMATE, SbMATE1 e SbMATE7 geradas a partir de MODELLER 9.17. (a) Visão da superfície extracelular de PfmATE, SbMATE, SbMATE1 e SBMATE7. Os domínios transmembrana estão numerados de 1 a 12 e identificados por cores únicas. (b) Apresentação das superfícies laterais evidenciando o plano de simetria descrito. Setas vermelhas indicam as alças intracelulares. 49

**Figura 7:** Análise de expressão temporal do gene *SbMATE1* no ápice radicular de sorgo. Quantificação relativa foi analisada a partir de ápices radiculares (primeiro centímetro) de plântulas cultivadas sem (barras brancas) e com  $27 \mu\text{M Al}^{3+}$  (barras pretas) por 1, 3 e 5 dias. (S) sensível; (T) tolerante. As barras indicam a expressão relativa média acompanhadas de seus desvios padrão. A significância das diferenças de expressão entre as amostras foi verificada pelo Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Letras distintas indicam diferenças estatísticas significativas. 52

**Figura 8:** Análise de expressão espacial de *SbMATE1* nos ápices radiculares (primeiro centímetro), raízes e folhas de sorgo. A quantificação relativa foi analisada nos ápices radiculares, raízes (excluído os ápices radiculares) e partes aéreas de plântulas cultivadas sem (barras brancas) e com  $27 \mu\text{M Al}^{3+}$  (barras pretas) por 5 dias. (S) sensível; (T) tolerante. As barras indicam a expressão relativa média acompanhadas de seus desvios padrão. A significância das diferenças de expressão entre as amostras foi verificada pelo Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Letras distintas indicam diferenças estatísticas significativas. 53

**Figura 9:** Análise de expressão temporal de *SbMATE7* no ápice radicular de sorgo. Quantificação relativa foi analisada a partir de ápices radiculares (primeiro centímetro) de plântulas cultivadas sem (barras brancas) e com alumínio  $27 \mu\text{M}$  (barras pretas) por 1, 3 e 5 dias. (S) sensível; (T) tolerante. As barras indicam a expressão relativa média acompanhadas de seus desvios padrão. A significância das diferenças de expressão

entre as amostras foi verificada pelo Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Letras distintas indicam diferenças estatísticas significativas. 54

**Figura 10:** Análise de expressão temporal de *SbMATE7* nos ápices radiculares (primeiro centímetro), raízes e folhas de sorgo. A quantificação relativa foi analisada nos ápices radiculares, raízes (excluído os ápices radiculares) e partes aéreas de plântulas cultivadas sem (barras brancas) e com alumínio {27}  $\mu\text{M}$  (barras pretas) por 5 dias. (S) sensível; (T) tolerante. As barras indicam a expressão relativa média acompanhadas de seus desvios padrão. A significância das diferenças de expressão entre as amostras foi verificada pelo Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Letras distintas indicam diferenças estatísticas significativas. 55

**Figura 11:** Representação esquemática dos procedimentos de seleção de transgênicos T2, utilizadas nos experimentos de fenotipagem para tolerância ao alumínio em *A. thaliana* superexpressando *2x35S::SbMATE7*. (1) Indivíduos T0 – Plantas não transformadas de *A. thaliana* knockout para *ALMT1*. (2) Após transformação por *A. tumefaciens*, os possíveis transformantes foram selecionados com tratamento de Higromicina B (marcador de seleção). A ocorrência do gene de interesse foi confirmada por PCR e os (3) eventos positivos (Indivíduos T1 - hemizigotos) foram autopolinizados. (4) As sementes segregantes derivadas dos indivíduos T1, identificadas como sementes T2, foram utilizadas para os testes de fenotipagem. 56

**Figura 12:** Tolerância ao alumínio (Relative Net Root Growth %) foi avaliada em solução nutritiva pH 4.2, contendo 1,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ . *AtALMT1* KO e a linhagem transgênica homozigota para o gene *SbMATE* foram utilizadas como controle. *AtALMT1* KO apresenta alta sensibilidade ao alumínio. As médias de RNRG% ( $n=20$ ) para os eventos 5 e 9, segregantes para *SbMATE7* e para *SbMATE* (controle) são apresentadas com seus respectivos erros padrão. A significância das diferenças de expressão entre as amostras foi verificada a partir do teste de variância, ANOVA ( $\alpha = 0,1$ ) seguido de teste de Dunnet, para identificação das médias com diferenças significativas, em relação à média de *AtALMT* KO, indicada pelas diferentes letras. 58

## Lista de tabelas

- Tabela 1:** Sequências de primers selecionados para sequenciamento. ....32
- Tabela 2:** Sequências de primers selecionados para os experimentos de expressão de *SbMATE1* e *SbMATE7*. (Tente padronizar as tabelas: espaçamento, cabeçalho, espaços antes e depois do parágrafo. Evite linhas horizontais desnecessárias) .....35
- Tabela 3:** Sequências de primers selecionados para os experimentos de superexpressão em de *SbMATE1*, *SbMATE7* e *SbMATE* em *Arabidopsis*. ....37
- Tabela 4:** Detalhes dos genes *SbMATE1* e *SbMATE7*. Posição física de *SbMATE1* e *SbMATE7* no genoma de sorgo (Phytozome, v3.1, <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). A análise de similaridade ao nível proteico em relação à proteína *SbMATE* (*query*). Score e e-value (expected value) obtidos a partir BLASTp (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). ....39
- Tabela 5:** Relação de proteínas utilizadas para a construção da árvore filogenética (Figura 4). Proteínas MATE descritas na literatura e suas respectivas funções. ....42
- Tabela 6:** Resultados de cobertura, identidade e E-value em relação ao modelo cristalográfico 3VVN. A sequência de aminoácidos de *SbMATE1*, *SbMATE7* e *SbMATE* foram confrontadas com a base de dados PDB. Para as três proteínas o modelo cristalográfico com maior resolução, cobertura e similaridade foi 3VVN (PfMATE). E-value: expected value. ....46
- Tabela 7:** Parâmetros de qualidade identificados para a definição dos modelos proteicos 3D gerados em MODELLER 9.17. A similaridade entre os modelos, RMSD; a energia relativa de cada modelo, DOPE Score; e a acurácia dos modelos gerados, GA341, estão indicados na tabela. R1, R2 e R3 identificam regiões termodinamicamente favoráveis. Mais de 90% dos aminoácidos dos três modelos escolhidos estão na região R1, com maior estabilidade termodinâmica. ....48
- Tabela 8:** Polimorfismos observados no gene *SbMATE7* entre os genótipos sensíveis ao alumínio, BR012 e BTx623 e a linhagem tolerante SC566. As posições estão indicadas

em relação ao ATG predito para cada gene MATE. S: sensível ao alumínio. T: tolerante  
ao alumínio.....50

## Lista de abreviaturas

°C	Graus centígrados
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ABC	<i>ATP- Binding Cassette Superfamily</i>
ABRC	Arabidopsis Biological Resource Center
Al <sup>3+</sup>	Íon alumínio
ALMT	<i>Aluminum-Activated Malate Transporter</i>
Alt <sub>SB</sub>	Loco de tolerância ao alumínio em <i>Sorghum bicolor</i>
ANOVA	Análise de variância
ART	<i>Aluminum Resistance Transcription Factor</i>
ASR	<i>Abscisic acid, Stress and Ripening</i>
B12	Vitamina B12 - Cobalamina
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
cDNA	DNA complementar
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DMT	<i>Drug Metabolite Transporter Superfamily</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPE	<i>Discrete Optimized Protein Energy</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Fator</i>
<i>e-value</i>	<i>Expected velue</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FAOSTAT	<i>Food and Agriculture Organization Statistics</i>
FRD	<i>Ferric Reductase Defective</i>
FRDL	<i>Ferric Reductase Defective Like</i>
g	Grama
GUB	Galacturonic acid binding
GWAS	Genome-Wide Association Study
kb	Kilo base
KO	<i>Knockout</i>
<i>kT/e</i>	Unidade de medida de entropia. Energia livre.
L	Litro
MATE	<i>Multidrug and Toxin Extrusion Family</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
mg	Miligrama
min	Minuto
MITE	<i>Tourist-like miniature inverted repeat transposable element</i>
mM	Milimolar
MOP	<i>Multidrug Oligosaccharidyl-lipid Polysaccharide</i>

MS	Murashige & Skoog
ng	Nanograma
Nrat	<i>Nramp Aluminum Transporter</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pb	Pares de base
PDB	Protein Data Base
pH	Potencial hidrogeniônico
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PVC	<i>Poly Vinyl Chloride</i>
RMSD	<i>Root-Mean-Square Deviation</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNASeq	<i>RNA sequencing</i>
RND	<i>Resistance/Nodulation/Division</i>
<i>RNRG</i>	<i>Relative Net Root Growth</i>
rRNA	RNA ribossômico
RT-PCR	<i>Reverse Transcription - Polimerase Chain Reaction</i>
s	Segundos
STAR	<i>Sensitive to Aluminum Rhizotoxicity</i>
STOP	<i>Sensitive to Proton Rhizotoxicity</i>
T <sub>m</sub>	Melting Temperature
WAK	<i>Cell Wall-Associated Kinases</i>
ΔΔCT	Método de comparação de Cts: Variação de CT do gene alvo subtraída da variação de CT do gene calibrador

## Resumo

---

A produção agrícola em solos ácidos é comprometida pela toxidez do alumínio (Al), que danifica o sistema radicular, levando a deficiências minerais e a menor absorção de água. Considerando que aproximadamente 50% dos solos cultivados no mundo são ácidos, o desenvolvimento de cultivares tolerantes ao alumínio é um importante meio para se garantir a segurança alimentar no mundo. A tolerância ao alumínio em sorgo é conferida pelo gene *SbMATE*, localizado no loco *Alt<sub>SB</sub>*, que contribui com a maior parte da variação fenotípica para a tolerância ao alumínio a partir de um mecanismo de exclusão de alumínio de sítios sensíveis ao metal no ápice radicular, pela exsudação radicular de citrato. O objetivo deste trabalho foi caracterizar os genes *SbMATE1* e *SbMATE7*, homólogos ao gene *SbMATE* e que, possivelmente, condicionam um mecanismo de tolerância análogo àquele conferido por *SbMATE*. Os genes candidatos foram selecionados a partir de análise de similaridade de sequência proteica, BLASTp, utilizando-se *SbMATE* como *query*, por experimentos de RNA-Seq. Predições estruturais *in silico* permitiram a identificação de 12 domínios transmembrana e estrutura gênica organizada em 13 éxons e 12 íntrons para ambos genes. O perfil de expressão via qRT-PCR foi avaliado em amostras de RNA total dos ápices radiculares (primeiro centímetro), por 1, 3 e 5 dias, do restante da raiz e das partes aéreas, 5 dias, submetidas a solução nutritiva sem (0 µM) e com alumínio (27 µM) em linhagens tolerantes, SC566 e SC283, e sensíveis ao Al, BR012 e BR007. *SbMATE7* apresenta uma tendência de declínio temporal da expressão nos ápices radiculares da linhagem tolerante SC566. *SbMATE7* foi mais expresso em linhagens tolerantes do que em linhagens sensíveis ao alumínio nos ápices radiculares e nas raízes. *SbMATE1* é mais expresso em linhagens sensíveis que em linhagens tolerantes e apresenta um perfil de expressão temporal induzida pelo alumínio nas linhagens sensíveis, BR012 e BR007. Análises filogenéticas com base em máxima verossimilhança, demonstram que *SbMATE7* ocupa um clado onde ocorrem proteínas exclusivamente relacionadas à tolerância ao alumínio. *SbMATE1*, ocupa um clado onde ocorrem transportadores MATE relacionados à homeostase de ferro e à tolerância ao alumínio. As linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o alelo *SbMATE7* derivado da linhagem tolerante SC566 apresentaram uma tendência de aumento na tolerância ao Al em relação ao controle não transformado, ainda que significância estatística não tenha sido detectada. Os valores de inibição do crescimento radicular em solução contendo alumínio, medidos de forma relativa ao controle sem Al, foram de 45,46% para o evento 5 e 11,79% para o evento 9. Estes resultados sugerem que *SbMATE7* apresenta um perfil de expressão, estrutura e similaridade filogenética mais próxima a proteínas que desempenham função na tolerância ao Al, o que não é evidenciado para *SbMATE1*. A confirmação da função do gene *SbMATE7* na tolerância ao Al depende da obtenção de linhagens homozigóticas para a redução do erro experimental. Cabe,

ainda, para completa elucidação funcional de SbMATE1 e SbMATE7, a identificação do compartimento celular em que estas proteínas estão localizadas e a análise das propriedades de transporte dessas proteínas. Estes resultados abrem perspectivas para aumentar a produtividade de sorgo em solos ácidos, expandindo o que já pode ser obtido com o gene *SbMATE*.

**Palavras-chave:** tolerância ao alumínio; solos ácidos; *Sorghum bicolor*, MATE

## Abstract

---

Agricultural production on acid soils is compromised by aluminum (Al) toxicity, which damages the root system leading to mineral nutrient deficiency and enhanced drought stress. Considering that approximately 50% of the cultivated soils in the world are acidic, developing crops that are more tolerant to aluminum toxicity is important for global food security. SbMATE is an Al-activated citrate transporter that is expressed in the root apices of Al-tolerant sorghum genotypes, which confers sorghum aluminum tolerance via a mechanism based on a citrate exudation. The gene encoding SbMATE is located on sorghum chromosome 3 and controls most of the Al tolerance phenotype in sorghum. *SbMATE* encodes a membrane citrate transporter, with 12 predicted transmembrane domains. This study was aimed at functionally characterizing two MATE genes, *SbMATE1* and *SbMATE7*. These genes are homologs to *SbMATE*, are hypothesized to underlie an analogous mechanism of aluminum tolerance based on Al-activated citrate release. Candidate genes were obtained based on RNA-Seq data, and from protein sequence similarity analyses (BLASTp) in sorghum using SbMATE as a query. *In silico* protein structure modeling allowed the identification of 12 transmembrane domains for the SbMATE1 and SbMATE7 proteins. A gene structure with 13 exons and 12 introns was also conserved between both genes. Expression profiling was performed with total RNA isolated from root apices (first centimeter) subjected to a nutrient solution without (0  $\mu$ M) and with aluminum (27  $\mu$ M) for 1, 3 and 5 days, roots and leaves, for 5 days with two Al-tolerant lines, SC566 and SC283, and two Al-sensitive lines, BR012 and BR007. *SbMATE7* expression decreased with time in the genotype SC566, which is the opposite behavior compared to *SbMATE*. For *SbMATE7* a lower expression was observed in aluminum sensitive genotypes when compared to the tolerant ones. *SbMATE1* shows a temporal expression induction by aluminum in Al-sensitive genotypes in comparison to tolerant ones. In the roots, the Al-induction is statistically significant for BR012 in the fifth day of stress. Phylogenetic analysis was undertaken, based on the maximum likelihood method, including *SbMATE1*, *SbMATE7* and other MATE proteins described in the literature. *SbMATE7* is present in a clade containing proteins associated with aluminum tolerance. *SbMATE1* is present in a clade with other MATE proteins associated with iron homeostasis and aluminum tolerance. Arabidopsis transgenic lines superexpressing *SbMATE7* from the tolerant genotype SC566 showed a trend for increased Al tolerance compared to the non-transformed control, which was, however not statistically significant. This was measured via inhibition of root growth in a nutrient solution containing aluminum. The values were 45,46% for event 5 and 11,79% for event 9. This suggests a positive effect of *SbMATE7* expression over the tolerance to aluminum, which has an expression profile, structure and phylogenetic patterns closer to proteins that confers Al-tolerance. However, an effect for *SbMATE7* on Al tolerance needs to be confirmed with homozygous lines, which should reduce the

experimental error. Physiological characterization and subcellular localization studies need to be undertaken to help clarify a possible relationship between protein structure and aluminum tolerance conferred by SbMATE1 and SbMATE7. Future findings are expected to open novel perspectives for increasing sorghum yields on acid soils, expanding to what is already provided by *SbMATE*.

**Key-words:** aluminum tolerance; acid soils; *Sorghum bicolor*; MATE

## 1. Introdução

---

### 1.1. Sorgo: taxonomia, potencial nutricional e comercial

O suprimento de alimentos, analisado face à expectativa do crescimento populacional mundial nas próximas décadas, torna o desenvolvimento de culturas vegetais com alta produtividade uma etapa importante para a garantia da segurança alimentar mundial. Isso, especialmente, em regiões onde a disponibilidade de alimentos é crítica, como na África subsaariana (Parry & Hawkesford, 2010; Godfray et al., 2010). Mudanças climáticas, processos de desertificação e degradação ambiental fazem necessário o desenvolvimento de estratégias que aumentem a produção de culturas com importância nutricional e socioeconômica, como o milho, o trigo e o sorgo, uma vez que essas espécies constituem as principais fontes de carboidratos, proteínas e renda para diversas populações humanas (Schmidhuber & Tubiello, 2007; Proietti et al., 2015).

O sorgo, *Sorghum bicolor* (L.) Moench, é uma gramínea anual cultivada em regiões tropicais e subtropicais (Hammer & Muchow, 1994; Price et al., 2005). O gênero *Sorghum* foi cunhado por Moench em 1794, pela divisão do gênero *Holcus*, previamente descrito por Lineu em 1773 (Hariprasanna & Patil, 2015). Evidências arqueológicas e genéticas apontam para a ocorrência do processo de domesticação de *S. verticilliflorum* no Vale do Nilo, a partir do qual se originou *S. bicolor* há, aproximadamente, 8000 anos (Dahlberg & Wasylkova, 1996; Kimber, 2000; Hariprasanna & Patil, 2015). O gênero *Sorghum* apresenta três subespécies principais: *S. bicolor bicolor*, *S. bicolor arundinaceum* e *S. bicolor drummondii*. Todas as variedades cultivadas estão classificadas na subespécie *Sorghum bicolor bicolor*, da qual se originaram as raças: durra, kafir, caudatum e guinea pelo processo de domesticação da espécie (Deu et al., 2008; De Wet & Harlan, 1971).

Segundo dados do último senso da FAO (*Food and Agriculture Organization*), os Estados Unidos, Nigéria e Sudão figuram em primeiro, segundo e terceiro lugares em produção de sorgo, respectivamente. Os Estados Unidos, maior produtor mundial de sorgo, foi responsável pela produção de, aproximadamente, 12 milhões de toneladas em 2016 e o Brasil, neste mesmo período, produziu pouco mais de 1,1 milhão de toneladas (FAOSTAT, 2016). Segundo a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), a produção de grãos de sorgo no Brasil na safra 2017/2018 é de quase 1,8 milhão de toneladas.

A considerável produtividade de sorgo em países tropicais está relacionada à sua capacidade adaptativa a altas temperaturas e condições de seca (Rosenow et al., 1983; Machado & Paulsen, 2001). Além disso, o sorgo apresenta grande versatilidade comercial, como na produção de bioetanol (Nguyen & Prince, 1996; Prasad et al., 2007), na indústria açucareira e até na produção de cerveja (Paterson et al., 2009; McCormick et al., 2018). Estudos sobre a composição centesimal de grãos de sorgo demonstram consideráveis teores de proteínas (até 18.8%), carboidratos (71%) e gorduras (4%), além de ser rico em vitaminas E, K e D, vitamina B12, ferro, zinco e fósforo, apresentar baixo índice glicêmico e não conter glúten (Rhodes et al., 2017; Ratnavathi & Patil, 2013). Todos estes fatores demonstram a importância do cultivo de sorgo como fonte energética e nutricional com proeminente impacto comercial.

## **1.2. Agricultura em solos ácidos**

A produtividade de muitas culturas, assim como a do sorgo, é comprometida pelo baixo pH do solo. Solos ácidos ( $\text{pH} < 5,5$ ) contabilizam pelo menos 50% das áreas cultivadas no mundo sendo que, aproximadamente, 60% deste total concentra-se em regiões tropicais (Uexküll & Mutert, 1995). A acidez do solo implica na biodisponibilidade de elementos como o alumínio, o ferro e o fósforo, adsorvido por óxidos de ferro e alumínio, caracterizando a “Síndrome de solos ácidos” que impõe uma série de condições fisiológicas que reduzem a absorção de água e nutrientes, comprometendo o crescimento e desenvolvimento vegetal (Marschner, 1991; Rengel, 1992; Mattiello et al., 2010).

O alumínio é o metal mais abundante na crosta terrestre e constitui um dos fatores principais de redução na produtividade de diversas culturas (Hede et al., 2001). Diferentes formas químicas de alumínio com potencial fitotóxico se formam em diferentes faixas de pH. O ânion  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ , por exemplo, se forma em solos extremamente alcalinos. Em solos com pH neutro, íons  $\text{Al}^{3+}$  estão imobilizados em sua forma insolúvel,  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , não tóxica. Sob acidez, ocorre a solubilização de íons metálicos  $\text{Al}^{3+}$  e formação de íons como  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ ,  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ ,  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$  potencialmente tóxicos em níveis micromolares para diversas culturas com importância comercial devido, em especial, ao potencial oxidativo dessas espécies iônicas (Haynes & Mokolabate, 2001; Kinraide, 1991; Ma et al., 2001).

O principal efeito fisiológico da toxidez do alumínio sobre sistemas vegetais é a inibição do crescimento radicular, que está diretamente relacionado à queda da produtividade, uma vez que a aquisição de nutrientes e de água pela planta é comprometida (Samac & Tesfaye, 2003; Delhaize & Rain, 1995). A inibição do crescimento radicular por alumínio dá-se em consequência de severos efeitos fisiológicos derivados da atividade fitotóxica destas formas iônicas sobre células do ápice radicular, a partir do comprometimento de estruturas citoesqueléticas, do comprometimento de processos de alongamento celular, da homeostase de cálcio e da formação de espécies reativas de oxigênio (Rengel, 1992; Kochian et al., 2004; Jones et al., 1998; Xu et al., 2012).

Pelo menos 85% do território sul americano é composto por solos ácidos (Fageria & Stone, 1999). No Brasil, a expansão da agricultura comercial tem levado à utilização de solos antes considerados inapropriados à agricultura devido à baixa disponibilidade de nutrientes e à toxidez de alumínio, como é o caso do cerrado brasileiro. Esses solos são ácidos pela ação do intemperismo intenso, levando à prevalência de óxidos de ferro e de alumínio e aluminossilicatos (Haridasan, 2008; Fageria & Stone, 1999; Buol, 2009). Novas estratégias de manejo têm permitido o uso crescente deste bioma para a produção de importantes *commodities* para a balança comercial brasileira. Além dos estudos de constituição dos solos e suas tecnologias, estudos fisiológicos e genômicos têm permitido a identificação de genes e mecanismos de tolerância a estresses abióticos como a toxidez causada pelo alumínio.

### **1.3. Mecanismos fisiológicos de tolerância ao alumínio rizosférico**

Existem duas classes de mecanismos de tolerância ao alumínio: (1) mecanismo de detoxificação, que ocorre a partir da bioacumulação de alumínio nos vacúolos na forma de complexos estáveis com ácidos orgânicos formados no citoplasma; e (2) exclusão de alumínio, que ocorre a partir da exsudação de ácidos orgânicos e outras moléculas orgânicas que levam à complexação de alumínio em formas não tóxicas (Ma, 2000; Ma et al., 2001; Vardar & Unal, 2007; Kochian et al., 2004).

O mecanismo de detoxificação de alumínio é comumente utilizado em plantas acumuladoras como a hortênsia (*Hydrangea macrophylla*) e até mesmo em plantas utilizadas na confecção de chás, como *Camellia sinensis* (chá preto), capaz de acumular

mais de 1000 mg de alumínio por quilo de massa seca (Matsumoto et al., 1976; Morita et al., 2008). Neste mecanismo, o alumínio é compartimentalizado em vacúolos na forma de complexos orgânicos não tóxicos. O principal ácido orgânico envolvido no processo de carregamento de alumínio para as folhas de trigo sarraceno é o oxalato e o citrato em hortênsia (Ma et al., 1997; Ma et al., 1997).

No mecanismo de exclusão, ácidos orgânicos exsudados pelo sistema radicular quelam os íons tóxicos de alumínio ( $Al^{3+}$ ), formando complexos estáveis na rizosfera (Lee & Foy, 1986; Jones, 1998). Até o momento, a exsudação de ácidos orgânicos é o mecanismo de tolerância ao alumínio melhor caracterizado e com associação clara com produção de grãos sob toxidez de alumínio no solo (Kochian et al., 2015). Inicialmente, diversos estudos associaram a presença de alumínio em solução nutritiva com a liberação de ácidos orgânicos por ápices radiculares em espécies como o trigo (Delhaize et al., 1993) e o feijão (Miyasaka et al., 1991). Estes estudos deram um passo importante na definição do principal mecanismo fisiológico envolvido com a tolerância ao alumínio em plantas cultivadas que, posteriormente, foi caracterizado ao nível molecular em diversas espécies de plantas como o trigo (Sasaki et al., 2004), o milho (Maron et al., 2010), a cevada (Wang et al., 2007) e o sorgo (Magalhães et al., 2007).

Os principais ácidos orgânicos relacionados ao mecanismo de exclusão são o malato e o citrato. O malato é o principal ácido orgânico envolvido com a tolerância ao alumínio em *Arabidopsis thaliana* (Liu et al., 2009) e em trigo (Basu et al., 1994), por exemplo. Por outro lado, em espécies como o milho (Maron et al., 2010) e o sorgo (Magalhães et al., 2007), o citrato desempenha papel primordial na tolerância ao alumínio. Em outras espécies como colza e rabanete (Zheng et al., 1998), o girassol (Saber et al., 1999) e *Arabidopsis* (Liu et al. 2009) ocorre a exudação de ambos. O malato e o citrato apresentam capacidades distintas na formação de complexos químicos dependendo de seus níveis de valência. O citrato, um ânion tricarboxílico, tem capacidade de formação de complexos estáveis 8 vezes maior que o malato, um ânion dicarboxílico (Hue et al., 1986; Delhaize et al., 1993; Ma, 2000).

#### 1.4. Genes que conferem tolerância ao alumínio em vegetais

Seguindo a definição dos mecanismos fisiológicos de tolerância, os primeiros genes relacionados a tolerância ao alumínio que foram clonados codificam transportadores de membrana de ácidos orgânicos de duas importantes famílias multigênicas: transportadores de malato - ALMT (*Aluminum-Activated Malate Transporter*) – e transportadores de citrato - MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*) - (Sasaki et al., 2004; Magalhães et al., 2007). O primeiro gene relacionado ao mecanismo de exclusão de alumínio foi clonado e caracterizado em trigo (*Triticum aestivum*). Dois alelos funcionais do gene *TaALMT1* (*TaALMT1-1* e *TaALMT1-2*) foram identificados com expressão constitutiva no ápice radicular de linhagens tolerantes de trigo, sendo o alelo *TaALMT1-1* mais efetivo na facilitação do transporte de malato e, portanto, na tolerância ao alumínio. A expressão de ambos alelos em células cultivadas de tabaco aumentou a tolerância ao alumínio, com concomitante incremento na exsudação de malato (Sasaki et al., 2004). Um gene homólogo ao gene *TaALMT1* em *Arabidopsis thaliana* é o principal determinante da tolerância ao alumínio em *Arabidopsis*, como identificado por estudos que utilizaram linhagens *knockout* para este gene (Liu et al., 2009). O gene *AtALMT1* medeia a exsudação de malato no ápice radicular de *A. thaliana* e é temporalmente induzido por alumínio, atingindo a maior expressão 24 horas após exposição ao metal, o que é acompanhado pelo aumento na exsudação de malato (Hoekenga et al., 2006; Liu et al., 2009). Outros homólogos ALMT com função na tolerância ao alumínio foram ainda descritos em plantas como o centeio (*Secale cereale*), *ScALMT1* (Collins et al., 2008), e cevada (*Hordeum vulgare*), *HvALMT1* (Gruber et al., 2010).

Os primeiros genes MATE relacionados à tolerância ao alumínio são o gene *SbMATE* em sorgo (Magalhães et al., 2007) e o gene *HvAACT1* (*HvMATE*) em cevada, (Furukawa et al., 2007). O gene *SbMATE* foi isolado a partir de clonagem posicional no loco *Alt<sub>SB</sub>* no cromossomo 3 de sorgo, que é responsável pela maior parte do fenótipo de tolerância ao alumínio em sorgo (Magalhães et al., 2004; Magalhães et al., 2007).

O gene *SbMATE* codifica uma proteína de 600 aminoácidos, localizada na membrana plasmática de células do ápice radicular, e é responsável pela exsudação de citrato dependente do antiporte de íons H<sup>+</sup> (Magalhães et al., 2007). A expressão de *SbMATE* é temporalmente induzida por alumínio no ápice radicular de plântulas de

genótipos tolerantes de sorgo ao longo de 6 dias de exposição ao metal. A expressão de *SbMATE* é induzida, particularmente, em células da zona distal de transição, onde o dano celular e geração de espécies reativas de oxigênio é crítico ao sistema radicular (Sivaguru et al., 2013). Este aumento na expressão gênica é seguido pelo aumento da exsudação de citrato, resultando em uma correlação significativa entre a exsudação deste ácido orgânico e a tolerância ao alumínio. Ainda, a expressão do gene *SbMATE* está relacionada ao número de repetições de um elemento transponível do tipo MITE (*Tourist-like miniature inverted repeat transposable element*) localizado 2010 pb à montante do gene *SbMATE*. Magalhães e colaboradores (2007) demonstraram que a linhagem tolerante SC283 apresenta 5 repetições da unidade básica do MITE ao tempo em que as linhagens sensíveis como BR012, BR007 e Tx430 apresentam 4, 3 e 1 repetições, respectivamente.

Diante da diversidade de acessos de sorgo depositados em bancos de germoplasma, a identificação de variedades que apresentem alta tolerância ao alumínio é uma condição relativamente rara (aproximadamente 5% dos acessos). A partir de um estudo que considerou um painel com 47 acessos de sorgo de diferentes origens geográficas, a tolerância ao alumínio foi encontrada em variedades como SC283, SC566, CMS225 e SC175 (Caniato et al., 2007). Estudos como este indicam que há variação alélica extensiva no loco *Alt<sub>SB</sub>* relacionada à diversificação fenotípica na tolerância ao alumínio nestes diferentes acessos. Ainda, outros possíveis genes podem estar envolvidos na regulação em *trans* da expressão de *SbMATE*, como indicado a partir da introgressão assistida do gene *SbMATE* na linhagem sensível BR012, que resultou em transferência incompleta do fenótipo de tolerância, sugerindo a ocorrência de outros genes, em sorgo, que contribuem com o fenótipo de tolerância ao alumínio (Melo et al., 2013)

*HvAACT1*, localizado no braço longo do cromossomo 4H de cevada, também codifica um transportador MATE expresso na membrana plasmática, porém, constitutivamente expresso nas raízes da linhagem tolerante ao alumínio, Murasakimochi (Furukawa et al., 2007). A superexpressão deste gene em tabaco permitiu identificar uma correlação positiva entre o aumento na exsudação de citrato e a tolerância ao alumínio (Furukawa et al., 2007). Estudos mais recentes demonstram que *HvAACT1* também participa de mecanismos de translocação de ferro pelo sistema vascular. Ocorre que uma inserção de um elemento transponível de 1 kb na região promotora de *HvAACT1*, presente

somente em linhagens de cevada tolerantes ao alumínio, promove uma mudança de expressão deste gene. *HvAACT1*, envolvido na translocação de ferro é expresso nas células do periciclo e, com a inserção, passa a ser expresso nas células do ápice radicular e a desempenhar função na tolerância ao alumínio (Fujii et al., 2012). Outros genes de tolerância ao alumínio, homólogos ao gene *SbMATE*, foram encontrados em centeio, *ScFDRL1* e *ScFDRL2* (Yokosho et al., 2010) e em milho (*Zea mays*), *ZmMATE1* (Maron et al., 2010).

### **1.5. Controle transcricional de genes transportadores relacionados a tolerância ao alumínio**

A identificação de novos genes de tolerância ao alumínio e de seus fatores regulatórios é fundamental para o completo entendimento dos mecanismos fisiológicos que resultam na tolerância ao alumínio. A expressão de genes *MATE* e *ALMT* têm sido estudadas sob a perspectiva da atuação de elementos regulatórios. Como previamente citado, Melo et al. (2013) observaram redução na expressão de alelos *SbMATE* provenientes de genótipos de sorgo com alta tolerância ao alumínio, devido à transferência incompleta de transfatores que regulam a expressão do gene *SbMATE*.

Estudos de associação genômica (*Genome-Wide Association Mapping*, GWAS) têm revelado importantes regiões associadas à tolerância ao alumínio em outras espécies onde esta é uma característica complexa, como o arroz e o trigo, mas os mecanismos e genes subjacentes ainda não foram totalmente resolvidos (Famoso et al., 2011; Navakode et al., 2014). Famoso et al. (2011) identificaram 48 regiões associadas à tolerância ao alumínio em arroz, cereal tido como um dos mais tolerantes ao alumínio. Vários genes associados com a tolerância ao alumínio foram identificados em arroz, como *OsFRDL4*, um gene *MATE* envolvido na exsudação radicular de citrato em arroz, *STAR1* e *STAR2* (*Sensitive to Aluminum Rhizotoxicity 1/2*) que, juntos, codificam um transportador ABC dependente de ATP, *Nrat1* (*Nramp Aluminum Transporter 1*), que condiciona um mecanismo de compartimentalização de alumínio, e *ART1* (*Aluminum Resistance Transcription Factor 1*), que regula a expressão de *OsFRDL4*. Essa intrincada rede de genes contribui para a alta tolerância ao alumínio em arroz (Famoso et al., 2011; Yokosho et al., 2011; Huang et al., 2009; Xia et al., 2010; Tsutsui et al., 2011). Em trigo, duas novas regiões

com associação à tolerância ao alumínio foram identificadas, a partir de estudos de GWAS, nos cromossomos 1D e 3B (Navakode et al., 2014).

Em *A. thaliana*, o fator de transcrição STOP1 (*Sensitive to Proton Rhizotoxicity*) é responsável pela regulação da expressão dos genes *AtALMT1* e *AtMATE* (Liu et al., 2009). AtSTOP1 é um fator de transcrição constituído de 499 resíduos de aminoácidos com quatro domínios do tipo *Zinc-finger* C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>. Experimentos de perda de função de *AtSTOP1* evidenciaram sua participação como sinalizador intracelular em vias de estresse, tanto por prótons H<sup>+</sup> quanto por íons Al<sup>3+</sup>, uma vez que estes mutantes do tipo *knockout* se tornaram bastante sensíveis a estes estresses. *AtALMT1* e *AtMATE* tem expressão reduzida em mutantes *knockouts* de *AtSTOP1*, o que demonstra a dependência da expressão destes genes da presença AtSTOP1 (Iuchi et al., 2007; Liu et al., 2009). Ação semelhante a *AtSTOP1* foi identificada em homólogos em tabaco (*Nicotiana tabacum*), *NtSTOP1* (Ohyama et al., 2013), e em *Vigna umbellata*, *VuSTOP1* (Liu et al., 2018).

Um homólogo do gene *STOP1* em arroz, *ART1*, codifica uma proteína *Zinc-finger* C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> em um fragmento proteico de 465 resíduos de aminoácidos (Yamaji et al., 2009). ART1 está relacionado com a regulação de genes envolvidos na tolerância ao alumínio como *STAR1* e *STAR2*, que juntos codificam um transportador do tipo ABC (*ATP Binding Cassette*) dependente de ATP. ART1 também está envolvido na regulação de *OsNrat1*, relacionado a um mecanismo de detoxificação intracelular a partir do transporte de alumínio pela membrana plasmática, facilitando a internalização subsequente nos vacúolos (Huang et al., 2009; Xia et al., 2010). Genes da família gênica *ASR* (*Abscisic acid, Stress and Ripening*), que são amplamente distribuídos no reino vegetal, funcionam como fatores de transcrição responsivos ao ácido abscísico. No mecanismo de tolerância ao alumínio, fatores de transcrição ASR5 interagem com promotores de *STAR1/2* como identificado em arroz (Arenhart et al., 2013; Arenhart et al., 2014).

Famílias gênicas de fatores de transcrição do tipo WRKY caracterizam-se estruturalmente pela ocorrência da sequência de aminoácidos WRKYGQK (W: triptofano; R: arginina; K: lisina; Y: tirosina; G: glicina; Q: Glutamina e K: Lisina) em um elemento proteico de, aproximadamente, 60 resíduos de aminoácidos seguidos de motivos *Zinc-finger*. Estes fatores de transcrição estão relacionados à resposta a estresses bióticos, abióticos e respostas imunes em plantas (Pandey & Somssich, 2009; Wu et al., 2005).

WRKY46, por exemplo, foi identificado como repressor da expressão de *AtALMT1* em *Arabidopsis*. A expressão de *AtWRKY46* é reduzida na presença de alumínio enquanto a expressão de *ALMT1* aumenta (Ding et al., 2013). Em sorgo, pelo menos 68 genes *WRKY* foram identificados e podem estar relacionados à regulação de genes envolvidos à tolerância ao alumínio, assim como ocorre para *WRKY46* em *Arabidopsis* (Pandey & Somssich, 2009).

Outros estudos têm demonstrado a relação de proteínas transdutoras de sinal com potencial papel no fenótipo de tolerância ao alumínio. Proteínas WAK (*Cell Wall-Associated Kinases*), participam de processos de alongamento celular, resposta a patógenos e tem possível papel na manutenção do turgor celular (Kohorn & Kohorn, 2012). Cinco principais proteínas WAK foram identificadas em *A. thaliana* e encontram-se no cromossomo 1, em um cluster gênico de 30 kb (Kohorn & Kohorn, 2012). Estruturalmente, proteínas WAK apresentam três importantes domínios: um domínio GUB (galacturonic acid binding) WAK, de interação com polissacarídeos, um domínio EGF (*Epidermal Growth Factor*) e um domínio intracelular quinase do tipo serina/treonina. Uma possível relação de proteínas WAK com a tolerância ao alumínio foi relatada em *A. thaliana*. *AtWAK1* é induzida por alumínio e, a superexpressando WAK1 aumentou a tolerância ao Al em *Arabidopsis* (Sivaguru et al., 2003).

#### **1.6. Transportadores MATE: estrutura, diversidade taxonômica e funcional**

Cinco grandes famílias de transportadores promovem o efluxo de compostos xenobióticos: *ATP-Binding Cassette Superfamily* (ABC), *Major Facilitator Superfamily* (MFS), *Drug Metabolite Transporter Superfamily* (DMT), *Multidrug and Toxin Extrusion Family* (MATE), *Resistance/Nodulation/Division* (RND). A família MATE foi a última a ser identificada e apresenta ampla distribuição taxonômica e grande diversidade funcional baseada em um mecanismo de antiporte de moléculas orgânicas e cátions monovalentes dependente de um gradiente eletroquímico (Kuroda & Tsuchiya, 2009). Estruturalmente, transportadores do tipo MATE, apresentam, geralmente, 12 domínios transmembrana (TM1 – TM12) em uma disposição simétrica (TM1 – TM6 e TM7 – TM12), sugerindo envolvimento de uma duplicação intragênica na evolução dessas proteínas (Omote et al., 2006). As

proteínas MATE possuem 400 a 700 resíduos de aminoácidos, com extremidades C e N-terminais intracelulares (Omote et al., 2006; Takanashi et al., 2014).

O primeiro gene MATE caracterizado funcionalmente, *NorM*, foi clonado de *Vibrio parahaemolyticus*, e controla um mecanismo de tolerância a antibióticos a partir do antiporte droga/Na<sup>+</sup> (Morita et al., 2000; Nies et al., 2012). Um mecanismo semelhante é controlado pelo gene homólogo, *YdhE*, encontrado em *Escherichia coli* que, assim como *NorM*, confere resistência a diversos antibióticos, como a norflatoxina, ciprofloxacina, canamicina e estreptomicina (Morita et al., 1998). Em *Saccharomyces cerevisiae*, *ERC1* confere resistência a etionina, um composto tóxico que impede a incorporação de aminoácidos durante a síntese proteica (Shiomi et al., 1991). A descoberta de estratégias de bloqueio de transportadores do tipo MATE pode funcionar como uma importante forma de controle do crescimento de microrganismos potencialmente patogênicos, como *Staphylococcus aureus*, no qual a superexpressão do gene MATE, *MepA*, contribuiu com a resistência a tigeciclina (Kaatz et al., 2005; McAleese et al., 2005).

Em plantas, a descoberta de transportadores MATE permitiu elucidar mecanismos fisiológicos de translocação de nutrientes, compartimentalização de metabólitos secundários, tolerância ao alumínio e sinalização hormonal (Takanashi et al., 2014). O genoma de *Arabidopsis*, por exemplo, apresenta 54 genes MATE, geralmente, organizados em clusters. O primeiro gene MATE encontrado em um vegetal, *AtALF5* (*Arabidopsis thaliana* *Aberrant Lateral Root Formation 5*), está envolvido com efluxo de compostos potencialmente tóxicos às raízes de *Arabidopsis* (Diener et al., 2001). Outro gene, *AtFRD3* (*Ferric Reductase Defective 3*), está relacionado ao carregamento de ferro nos valos xilemáticos em *A. thaliana* (Rogers et al., 2002; Durreet et al., 2007). Este gene é essencialmente expresso nas raízes de *Arabidopsis* e codifica uma proteína de membrana responsável pelo transporte de citrato. Estudos com knockouts de *AtFRD3* demonstraram que estas plantas apresentam clorose, fenótipo diretamente relacionado à deficiência de ferro, evidenciando a função de *AtFRD3* na complexação de ferro com citrato e carregamento até as partes aéreas pelo xilema (Rogers & Guerinou, 2002; Green & Rogers, 2004). Homólogos a *AtFRD3*, também relacionados à homeostase de ferro, foram encontrados em arroz, *OsFRDL1* (Yokosho et al., 2009), soja, *GmFRD3a* e *GmFRD3b* (Rogers et al., 2009), centeio, *ScFRDL1* e *ScFRDL2* (Yokosho et

al., 2010), e lócus, *LjMATE*. Neste caso, ocorre a indução da expressão de *LjMATE* a partir da infecção por bactéria fixadoras de nitrogênio, sugerindo que este gene tenha função essencial na nutrição de ferro dos nódulos formados (Takanashi et al., 2013).

Além da homeostase de ferro, transportadores MATE podem estar envolvidos no armazenamento de metabólitos secundários em organelas celulares. O gene *TT12*, por exemplo, foi identificado em *Arabidopsis* como parte do mecanismo de acúmulo vacuolar de precursores de antocianinas nas sementes desta planta (Marinova et al, 2007). Em sorgo, um segundo gene MATE, *SbMATE2*, foi identificado em um cluster gênico no cromossomo 1. A proteína *SbMATE2* localiza-se na membrana de vacúolos e é capaz de transportar durina, um metabólito secundário que confere tolerância à herbivoria (Darbani et al., 2016). Em *Vitis vinífera*, a coloração dos frutos, onde são expressos os genes *anthoMATE1* e *anthoMATE2*, está relacionada ao acúmulo vacuolar de antocianinas transportadas por estes dois genes (Gomez et al., 2009).

Outros genes MATE, como *ADS5* e *DTX50*, desempenham função importante na sinalização hormonal em *Arabidopsis*. O gene *ADS5*, por exemplo, é rapidamente expresso em *Arabidopsis* em resposta a cepas virulentas de *Pseudomonas syringae*, ativando a via de liberação de ácido salicílico, que é uma via de resposta a patógenos. *ADS5*, diferente de muitas proteínas MATE já caracterizadas, apresenta de 9 a 11 domínios transmembrana (Nawrath et al., 2002). Outro gene, também identificado em *Arabidopsis*, *DTX50*, é responsável pelo efluxo de ácido abscísico, especialmente no sistema vascular e em células guarda, e participa dos mecanismos de tolerância à seca (Zhang et al., 2014).

*SbMATE* e *HvAACT1* foram os primeiros genes MATE associados ao fenótipo de tolerância ao alumínio (Magalhães et al, 2007; Furukawa et al., 2007). Posteriormente, outros membros da família com função análoga foram caracterizados, como *AtMATE* (Liu et al., 2009), *ZmMATE1* (Maron et al., 2010), *LaMATE* (Uhde-Stone et al., 2005), *VuMATE1* (Liu et al., 2013), *BoMATE* (Wu et al., 2014), *TaMATE1b* (Garcia-Oliveira et al., 2014), *EcMATE1/3* (Sawaki et al., 2013). Em linhas gerais, o mecanismo de tolerância ao alumínio controlado por esses genes apresenta características semelhantes. São essas: (1) expressão temporal induzida por alumínio em linhagens tolerantes; (2) expressos no ápice radicular; (3) promovem a exsudação de citrato; (4) exsudação de citrato conferida pelas proteínas MATE leva a um aumento da tolerância ao alumínio.

## 2. Objetivos

---

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo principal desse trabalho foi caracterizar funcionalmente dois novos genes MATE, *SbMATE1* e *SbMATE7*, quanto à sua possível função na tolerância ao alumínio em sorgo.

### 2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Caracterizar a variação alélica de *SbMATE1* e *SbMATE7* entre linhagens de sorgo tolerantes e sensíveis ao alumínio de *S. bicolor*, estabelecendo possíveis implicações na funcionalidade proteica;
- 2.2.2. Caracterizar a expressão relativa, temporal e espacial, dos genes *SbMATE1* e *SbMATE7* por qRT-PCR nas linhagens contrastantes;
- 2.2.3. Construir modelos proteicos 3D a partir de modelagem *in silico* de proteínas com base em modelos cristalográficos previamente descritos na literatura;
- 2.2.4. Estabelecer e entender as relações filogenéticas destes genes candidatos entre diferentes taxa;
- 2.2.5. Validar funcionalmente estes genes candidatos por meio de superexpressão em *Arabidopsis thaliana*.

## 3. Material e métodos

---

### 3.1. Identificação de genes candidatos

A identificação de genes candidatos deu-se a partir da combinação de resultados de três abordagens: (1) similaridade de sequências de aminoácidos entre o gene *SbMATE* (Sobic.003G403000.1 - Magalhães et al., 2007) e outras proteínas MATE preditas no genoma de sorgo (genótipo de referência BTx623 versão 3.1.1.) depositadas na base de dados Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>); (2) proximidade física dos genes candidatos com SNPs associados à tolerância ao alumínio com significância mínima (*p-value*) de  $10^{-5}$  identificados em estudos de associação genômica (dados não publicados); e (3) seleção de genes diferencialmente expressos em experimentos de RNA-Seq (experimento previamente executados pelo grupo de pesquisa - dados não publicados). Essa seleção de genes foi feita a partir da comparação dos perfis de expressão gênica entre

linhagens tolerantes (SC283/SC566/IS14351) e sensíveis (BR007/BR012) de sorgo após 2 e 5 dias na presença e na ausência de alumínio. A seleção dos genes realizada de acordo com os seguintes critérios: primeiro foram selecionados os genes com níveis de expressão significativamente maiores nas linhagens tolerantes. Após isso foram identificados genes com expressão induzida por alumínio e, por último, os genes com maior expressão após 5 dias de exposição ao alumínio foram selecionados.

### 3.2. Clonagem e sequenciamento

O desenho de *primers* foi feito com auxílio do programa Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) a partir das sequências codificantes preditas de cada gene candidato. As sequências de primers para clonagem e sequenciamento estão descritas na tabela 1. Para clonagem direcional de *SbMATE1* e *SbMATE7* no vetor pENTR11 (Invitrogen) foram adicionados sítios de restrição *KpnI* e *XhoI* aos primers *forward* e *reverse*, respectivamente. Amostras de cDNA das linhagens SC566 e BR012, tolerante e sensível ao alumínio, respectivamente, após tratamento com Al<sup>3+</sup> por 5 dias, foram utilizadas para a clonagem da sequência codificadora de *SbMATE1* e *SbMATE7*. A síntese de cDNA destinada à amplificação e clonagem das sequências codificantes de cada gene foi realizada com o SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). Reações de amplificação utilizando GoTaq Green Master Mix 1X (Promega) foram procedidas nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por 2 min; 35 ciclos (anelamento: 94°C por 15 s, 50°C (*SbMATE1*) / 59°C (*SbMATE7*) por 20 s; extensão: 72°C por 1:30 min); extensão final 72°C por 5 min. As reações, em volume final de 20 µL, continham 10 µL GoTaq Green Master Mix 1X, 0,5 µM primers, 10 ng de cDNA total e 6 µL de água deionizada. A clonagem dos genes candidatos foi procedida em vetor pENTR11 direcionada pelos sítios de restrição *KpnI* e *XhoI*. Os amplicons obtidos (regiões codificantes dos genes candidatos) foram clonados no vetor Gateway pENTR 11 Dual Selection Vector (Invitrogen) e utilizados para transformação de *E. coli* Mach1™ T1R (Invitrogen) por choque térmico de acordo com Sambrook et al. (1989). Após seleção com canamicina, as colônias recombinantes foram selecionadas para confirmação da presença dos fragmentos de interesse a partir de PCR de colônia contendo 2 µL de DNA (suspensão da colônia bacteriana desnaturada a 95°C por 5 min em 20 µL de água deionizada),

procedido nas mesmas condições descritas acima para o protocolo GoTaq Green Master Mix. Colônias positivas foram inoculadas em meio CircleGrow acrescido de canamicida (50 mg.L<sup>-1</sup>) e o DNA plasmidial foi extraído com o auxílio do kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando-se o BigDye Terminator v1.1 Kit (Applied Biosystems) contendo 300ng de DNA e sequenciadas a partir de sequenciamento de Sanger por eletroforese capilar em ABI 3500xL (ThermoFisher/Hitashi). As sequências resultantes foram analisadas com em *software* Sequencher 4.1(Gene Codes).

**Tabela 1:** Sequências de primers selecionados para sequenciamento.

Gene	Direção	Sequência
<b><i>SbMATE1</i></b>	Reverso	TCCGTGTCGATACCATGCTT
	Direto	ACACCAACAGCGGCAATC
<b><i>SbMATE7</i></b>	Reverso	CGAGCTCGTCCCATCTGAAG
	Direto	CCTCCGGATGTTTGCTGGAT
<b><i>SbMATE</i></b>	Reverso	CCGCAGTACCATTCTCTG
	Direto	ATCTGGGTAGCCCTCACCAT

### 3.3. Análise filogenética

As relações filogenéticas entre os genes estudados foram feitas a partir da construção de árvores baseadas nas sequências de aminoácidos dos genes candidatos e outros genes MATE descritos na literatura. As sequências de aminoácidos selecionadas foram alinhadas a partir do algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004), implementado no programa MEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net/>). As relações entre os genes foram inferidas a partir de máxima verossimilhança, usando o algoritmo *neighbor-joining* (Gascuel, 1997) com aplicação de *bootstrap* de 1000 repetições também e MEGA 7.0. O gene *NorM* foi selecionado como grupo externo.

### **3.4. Predição topológica e modelagem *in silico* das proteínas SbMATE1 e SbMATE7**

Predições de peptídeo sinal *in silico* foi realizado a partir dos algoritmos SignalP 4.1. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Para a modelagem proteica, utilizou-se o banco de dados Protein Data Bank – PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), utilizando-se o algoritmo BLASTp para a identificação do modelo cristalográfico das proteínas SbMATE1 e SbMATE7. A seleção da proteína molde seguiu os seguintes parâmetros: maior cobertura; menor *expected-value* (*e-value*); maior identidade. Após a definição do modelo cristalográfico, a predição *in silico* da estrutura 3D das proteínas candidatas foi executada com o software, MODELLER 9.17 (<https://salilab.org/modeller/>), baseado na modelagem comparativa entre o modelo cristalográfico e as proteínas candidatas. A escolha do melhor modelo considerou os seguintes parâmetros de qualidade: menor *Root-Mean-Square Deviation* (RMSD), indica o nível similaridade entre o modelo e o molde quando alinhados; GA341 próximo a 1, índice de qualidade de cada modelo gerado, sendo melhor quanto mais próximo de 1; e *Discrete Optimized Protein Energy* (DOPE) score menor que zero, infere a energia relativa ao modelo proposto, sendo melhor quanto mais negativo. A validação dos modelos gerados foi realizada a partir da geração de gráficos de Ramachandran para a identificação da porcentagem de aminoácidos localizados em regiões energeticamente estáveis (R1, maior estabilidade termodinâmica; R2, Estabilidade intermediária; R3, baixa estabilidade energética) em cada modelo gerado (<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/Ramachandran>).

### **3.5. Análise de expressão relativa temporal e espacial por qRT-PCR**

Linhagens de sorgo tolerantes (SC566 e SC283) e sensíveis (BR007 e BR012) ao alumínio foram cultivadas em solução nutritiva com ou sem {27}  $\mu\text{M Al}^{3+}$  por 1, 3 e 5 dias (Caniato et al., 2007). Sementes de sorgo foram desinfectadas em hipoclorito de sódio (0,5%) por 5 minutos sob agitação. Posteriormente, as sementes foram germinadas por 4 dias em rolos de papel de filtro embebidos em água deionizada e depois transferidas para solução nutritiva. Foram transplantadas 7 plântulas por genótipo por tratamento, com três repetições (total de 21 plântulas/genótipo/tratamento), segundo um delineamento totalmente casualizado. Estas plântulas permaneceram em solução nutritiva por 24 horas

para aclimatação e, após este período, foram submetidas ao estresse por alumínio ou mantidas em solução controle, sem alumínio. Amostras do ápice radicular (primeiro centímetro), o sistema radicular remanescente e a parte aérea foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80°C). A extração de RNA total foi realizada com RNEasy Plant Kit (Qiagen). O cDNA utilizado para a análise de expressão foi sintetizado com o High-Capacity cDNA RT Kit (Applied Biosystems) a partir de 350ng de RNA total. Após a síntese de cDNA a expressão relativa dos genes candidatos foi avaliada por PCR em tempo real com o uso do kit KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) (KAPA Biosystems) no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). O desenho dos primers foi realizado seguindo os seguintes parâmetros: produtos de PCR com comprimentos entre 80-120 nucleotídeos; temperatura de dissociação dos primers ( $T_m$ ) de 58-62°C com diferença máxima de 2°C; conteúdo CG entre 40 e 60% e tamanho dos oligonucleotídeos entre 18 e 23 nucleotídeos. Um *pool* das amostras e diluições seriadas (1:10, 1:100 e 1:1000) foram utilizados para verificar a especificidade dos primers e condições de amplificação para os alvos nas seguintes condições (50° C – 95° C com incrementos de 0,5°C por 10 s). As sequências de primers estão descritas na tabela 2. Para a as análises de expressão relativa, as amostras de cDNA foram diluídas 10x para a quantificação da expressão dos genes alvo e 10000x para o gene de referência - rRNA18S. Foram avaliados os perfis de expressão de *SbMATE1* e *SbMATE7* nos ápices radiculares após 1, 3 e 5 dias após a exposição ao alumínio, e o experimento para se estudar tecido-especificidade (raízes e folhas) da expressão gênica foi feito apenas com 5 dias de exposição ao alumínio ou em sem alumínio. As reações (10 µL), conduzidas em três réplicas técnicas, continham 2,5 µL de cDNA diluído, 5 µL de SYBR, 0,25 µL de primers (1µM) e 2 µL de água deionizada e foram procedidas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 50°C por 2 min; 95°C por 2 min, 40 ciclos (95°C por 15 s; 60°C por 1 min). A expressão relativa foi avaliada pelo método  $\Delta\Delta C_t$  (Schmittgen e Livak, 2001). A significância das diferenças de expressão entre as amostras foi verificada a partir do teste de variância ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) seguido de teste de Tukey, para identificação das médias com diferenças significativas, disponível no pacote Agricolae do software RStudio (versão 3.4.3.) (R Core Team, 2018).

**Tabela 2:** Sequências de primers selecionados para os experimentos de expressão de *SbMATE1* e *SbMATE7*. (Tente padronizar as tabelas: espaçamento, cabeçalho, espaços antes e depois do parágrafo. Evite linhas horizontais desnecessárias)

Gene	Direção	Sequência
<i>SbMATE7</i>	Direto	TACTTGGTGGGGTTCTTGGC
	Reverso	ATGCGGGCTTCATCATAGCA
<i>SbMATE1</i>	Direto	GCCGCTGTTGGTGTTCAT
	Reverso	TCCTCCGCGACAAATGATGT

### 3.6. Avaliação da tolerância ao alumínio em eventos transgênicos de *Arabidopsis thaliana* superexpressando *SbMATE7*

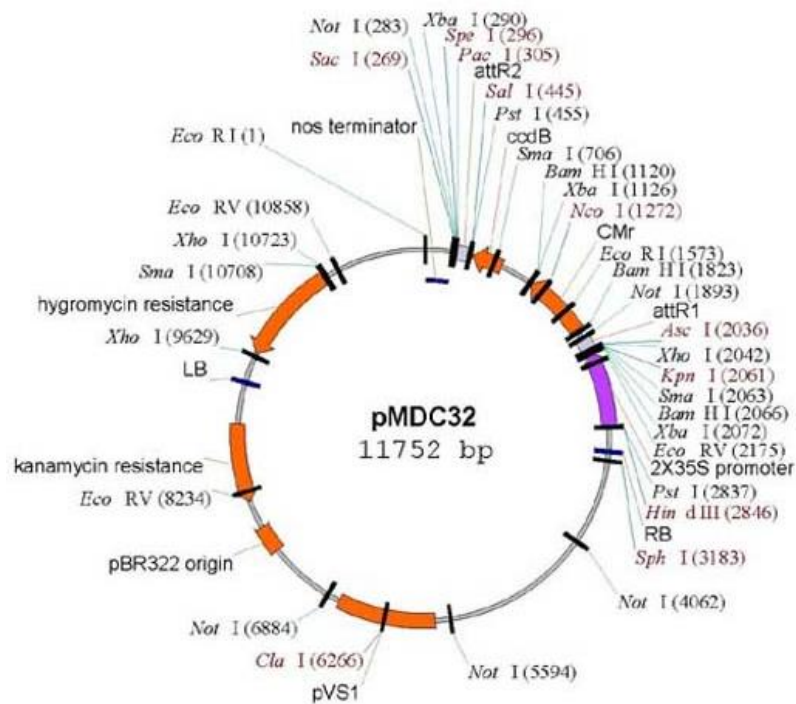
#### 3.6.1. Material biológico

Para os experimentos de superexpressão do alelo de *SbMATE7* presente na linhagem tolerante SC566 em *A. thaliana* foi utilizada a linhagem *AtALMT-Knockout* (SALK\_009629), que contém uma inserção na região codificante do gene que promoveu a perda de função, obtida junto ao Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) (Liu et al., 2009). Sementes de Arabidopsis (*AtALMT-KO*) foram germinadas em papel Germitest úmido a 4°C por três dias para quebra de dormência. Após este período estas sementes foram transferidas para substrato e cultivadas sob fotoperíodo de 18 horas de luz e 8 horas de escuro, em câmara de crescimento (BDR-16, Conviron). A intensidade luminosa foi mantida em 350  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , umidade em torno de 70% e temperatura de 22°C. Seis plantas (indivíduos T0) foram utilizadas para transformação por *Agrobacterium tumefaciens* pelo método de mergulho floral descrito abaixo. As primeiras flores foram podadas para estimular a geração de um maior número de botões florais para então serem transformadas.

#### 3.6.2. Transformação por *Agrobacterium tumefaciens*

Os primers destinados aos experimentos de superexpressão em Arabidopsis, descritos na tabela 3, incluíram sítios de restrição *Ascl* (5') e *Pacl* (3') para inserção direcionada da sequência codificadora de *SbMATE7*(SC566) clonada e direcionalmente ligada ao plasmídeo pMDC32 (Figura 1) (Curtis & Grossniklaus, 2003). Plasmídeos pMDC32 contendo *SbMATE7*(SC566) foram eletroporados em *A. tumefaciens* GV3101. Os botões florais de *A. thaliana*, previamente cultivadas, foram transformados pela técnica de mergulho

floral, em suspensões de *A. tumefaciens* com OD 0,8-1, como descrito por Bent et al. (2006). O procedimento foi repetido utilizando-se as mesmas plantas após um intervalo de 7 dias. Logo após cada transformação estas plantas foram envolvidas em plástico PVC, individualmente, e mantidas a 22°C no escuro por 24 horas. Após este período os plásticos foram removidos e as plantas foram mantidas em câmara de crescimento como descrito no item 3.7.2., individualizadas, até a geração de sementes. As sementes geradas (sementes T1) foram conservadas em câmara fria.



**Figura 1:** Representação esquemática do vetor pMDC32 contendo os sítios de restrição utilizados no procedimento de transformação de *Arabidopsis* para caracterização fenotípica de plantas transgênicas contendo *SbMATE7* derivado do genótipo SC566.

**Tabela 3:** Sequências de primers selecionados para os experimentos de superexpressão em de *SbMATE1*, *SbMATE7* e *SbMATE* em Arabidopsis.

Gene	Sentido	Sequência
SbMATE1	Direto	GATGGCGCGCCATGGAGGACAACGGTGCC
	Reverso	GATTTAATTAATCACTTCCGGAGAAAACCTTC
SbMATE7	Direto	GATGGCGCGCCATGATGCGCGGGGAGAGC
	Reverso	GATTTAATTAATCAGCCGCGAAGATAAGC
SbMATE	Direto	GATGGCGCGCCATGGAGGAACACCGGTCA
	Reverso	GATTTAATTAATCACTGCCGAAGAAACTT

### 3.6.3. Seleção de transgênicos

Sementes T1 foram desinfetadas (2 min. em álcool 70% + 0,1% Triton X100 seguido de 10 minutos em hipoclorito de sódio comercial 2,5% + 0,1% Triton X + 5 lavagens com água estéril) e plaqueadas em meio Murashige & Skoog (MS) contendo 20 µg ml<sup>-1</sup> de higromicina B (Sigma). Estas placas foram incubadas a 4°C por três dias e, após este período, foram expostas à luz por 8-12 horas, para promoção da germinação, seguindo-se 5 dias no escuro. Ao final de 5 dias, estas plântulas foram expostas a luz por 8-12 horas. Plântulas com maior desenvolvimento das raízes e parte aérea esverdeada foram selecionadas, transplantadas para substrato previamente umedecido, cobertas com plástico PVC e mantidas em câmara de crescimento. Ao longo da primeira semana, a cobertura plástica foi removida gradativamente para controle da umidade. A partir do desenvolvimento dos primeiros botões florais, amostras das partes aéreas foram coletadas para extração de DNA total e identificação de plantas transgênicas por PCR (conforme descrito no item 3.4.). As plantas que apresentaram o transgene esperado foram selecionadas e mantidas em câmara de crescimento e autopolinizadas para produção de sementes T2.

### 3.6.4. Análise da tolerância ao alumínio

Foram selecionados dois eventos transgênicos contendo o inserto *SbMATE7* derivado do genótipo SC566. O genótipo de Arabidopsis *AtALMT1 KO*, não transformado, e o evento TG8 (Magalhães et al., 2007) de *SbMATE* no background genético de *AtALMT-KO* (cedido por Jiping Liu, Cornell University, EUA) foram utilizados como controles. A

avaliação da tolerância ao alumínio nos eventos transgênicos selecionados foi realizada em sistema de hidroponia contendo dois tratamentos, sem e com alumínio {1,5  $\mu\text{M}$ }. A solução nutritiva foi composta de 0,25 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3,0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2,0 mM  $\text{KCl}$ , 1,0 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 2,75 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2,0 mM Homopipes (pH 4.2) (Research Organics), 10 g.L<sup>-1</sup> sacarose, 0,18 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 13,6  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ , 0,5 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,1 mM  $\text{MnSO}_4$ , 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , 20  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0,01  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ , 1,0 mM  $\text{CaCl}_2$  (adaptada de Hoekenga et al., 2006 e cedida por Dr. Jiping Liu, Cornell University, EUA). A solução nutritiva foi autoclavada, omitindo-se  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{AlCl}_3$ , cujos estoques foram esterilizados por filtração e posteriormente adicionadas em câmara de fluxo contínuo. Aproximadamente 150 mL de solução nutritiva foram adicionados em magentas, previamente autoclavadas, contendo suporte e uma malha de polipropileno de 250  $\mu\text{m}$ . Sementes dos três eventos selecionados e dos controles, desinfestadas como descritos no item 3.7.3., foram suspensas em solução resfriada de agarose (0.15%). Volumes contendo entre 25-50 sementes foram distribuídos, uniformemente, sobre a malha de polipropileno. Estas magentas foram distribuídas aleatoriamente em câmara de crescimento e mantidas a 50-100  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 20°C por 7 dias. Após 7 dias, 20 raízes foram escaneadas, fotografadas e medidas com o auxílio do software WinRHIZO (Regent) e conservadas em ultrafreezer (-80°C) para análise de expressão (*pool* de 60 plântulas). A expressão relativa foi realizada conforme descrito no item 3.5. A tolerância ao alumínio foi avaliada a partir do cálculo de RNRG% (% *Relative Net Root Growth* – crescimento radicular na presença de alumínio/crescimento radicular na ausência de alumínio x 100). A significância das diferenças de RNRG% entre as amostras foi verificada a partir do teste de variância ANOVA ( $\alpha = 0,1$ ) seguido de teste de Dunnet, para identificação das médias com diferenças significativas, disponível no pacote Multcomp do software RStudio (versão 3.4.3.) (R Core Team, 2018).

## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Modelos gênicos e análise filogenética de *SbMATE1* e *SbMATE7*

#### 4.1.1. Estruturas gênicas

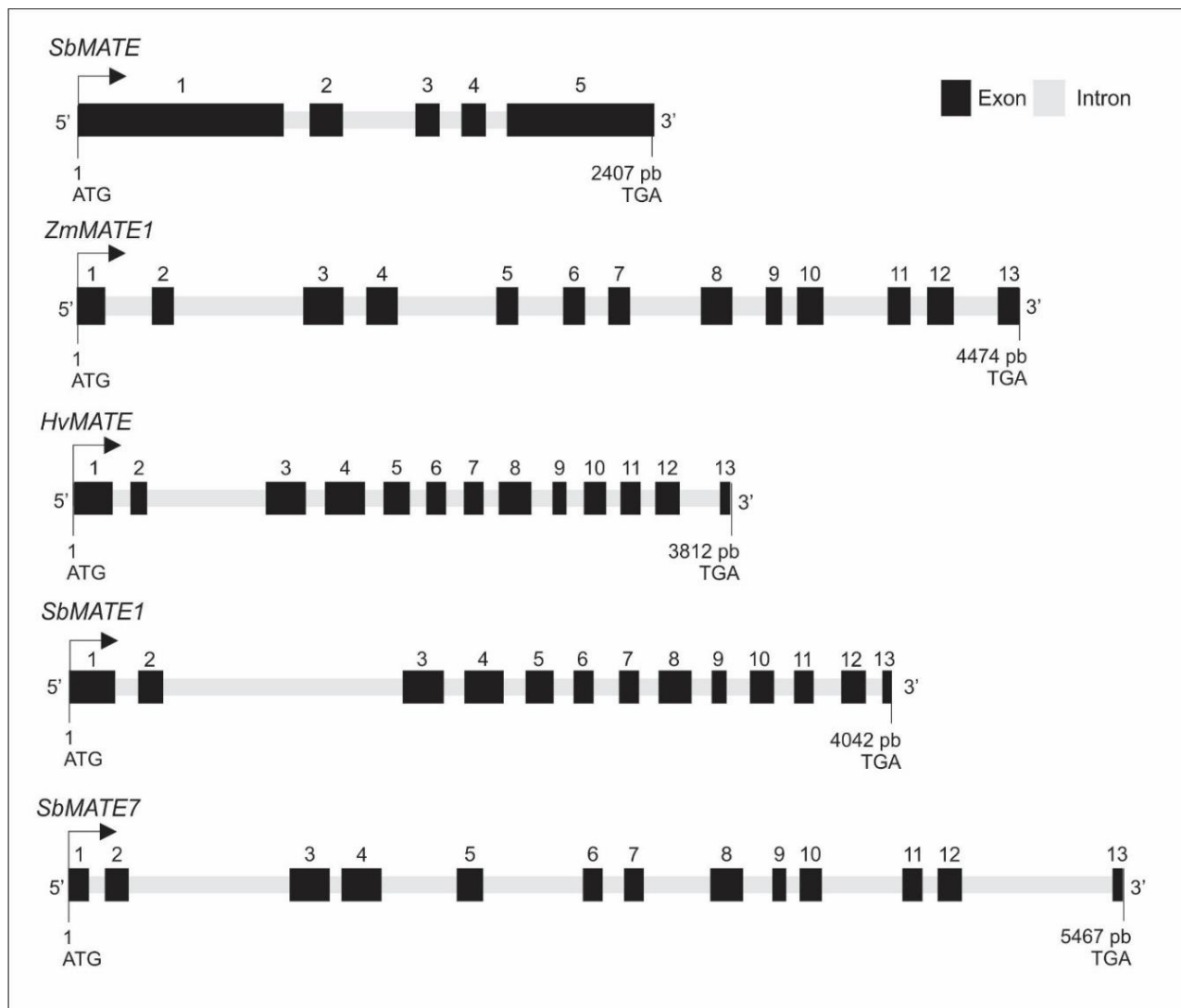
Dois genes candidatos similares a *SbMATE* (Magalhães et al., 2007), localizado no cromossomo 3 (Sobic.003G403000, 600 resíduos de aminoácidos, 1803 pares de base - pb), foram identificados no cromossomo 1, designado *SbMATE1*, e no cromossomo 7, designado *SbMATE7*, de sorgo. *SbMATE7* apresenta 56% de similaridade aminoacídica com *SbMATE*, enquanto que *SbMATE1* apresenta 68% de similaridade (Tabela 4).

**Tabela 4:** Detalhes dos genes *SbMATE1* e *SbMATE7*. Posição física de *SbMATE1* e *SbMATE7* no genoma de sorgo (Phytozome, v3.1, <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). A análise de similaridade ao nível proteico em relação à proteína *SbMATE* (*query*). Score e e-value (expected value) obtidos a partir BLASTp (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>).

Gene	Posição gênica	Similaridade proteica	Número de aminoácidos	Score	E-value
<i>SbMATE1</i> (Sobic.001G454900)	73110347	68%	565	610.1	0.0
<i>SbMATE7</i> (Sobic.007G020600)	1950751	56%	525	445.7	3.4E-149

De acordo com dados de experimentos de GWAS (dados não publicados), *SbMATE1* localiza-se a 2945,88 kb de distância de um SNP associado com a tolerância ao alumínio (70164467 pb, E-value:  $3.27E^{-06}$ ). *SbMATE7* está mais próximo, 216,94 kb de distância, de um outro SNP (posição 2167693 pb) com alta probabilidade de associação com a tolerância ao alumínio (E-value:  $9.13E^{-10}$ ).

*SbMATE1* (1698 pb) e *SbMATE7* (1578 pb) codificam proteínas de 565 e 525 resíduos de aminoácidos (Phytozome, v3.1), respectivamente (Figura 2). Ambos possuem 13 éxons e 12 íntrons, e diferem significativamente do gene *SbMATE*, que possui 5 éxons e 4 íntrons (Magalhães et al., 2007). Entretanto, o modelo gênico de *SbMATE1* e *SbMATE7* é similar a outros genes MATE com função no mecanismo de exclusão de alumínio, como *ZmMATE1*, (Maron et al., 2010) e *HvMATE* (Furakawa et al., 2007) que também apresentam 13 éxons e 12 íntrons, o que pode implicar na conservação da função.



**Figura 2:** Estrutura gênica de *SbMATE*, *ZmMATE1* e *HvMATE* e predição das estruturas gênicas de *SbMATE1* e *SbMATE7* com base na identificação de íntrons (caixas em cinza) e éxons (caixas em preto). *SbMATE1* e *SbMATE7* apresentam ORFs maiores que *SbMATE* (ORF de 2407 pb org organizada em 5 éxons e 4 íntrons). *SbMATE1* apresenta uma ORF predita de 4042 pb enquanto a de *SbMATE7* é de 5467 pb. *SbMATE 1* e *7* estão organizadas em uma estrutura gênica de 13 éxons e 12 íntrons, assim como *ZmMATE1* (ORF de 4474 pb) e *HvMATE* (ORF de 3812 pb). Análise realizada em Gene Structure Display Server (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>). ORF: Open Reading Frame. *Sb*: *Sorghum bicolor*; *Zm*: *Zea mays*; *Hv*: *Hordeum vulgare*

#### 4.1.2. Análise filogenética de *SbMATE1* e *SbMATE7*

Para entender a relação filogenética entre *SbMATE1* e *SbMATE7* e proteínas MATE descritas na literatura foi realizado o alinhamento das sequências de aminoácidos destas

proteínas e de 39 outras proteínas MATE funcionalmente caracterizadas e descritas na literatura para representar a diversidade funcional e taxonômica descrita para a família de transportadores MATE em plantas (Tabela 5).

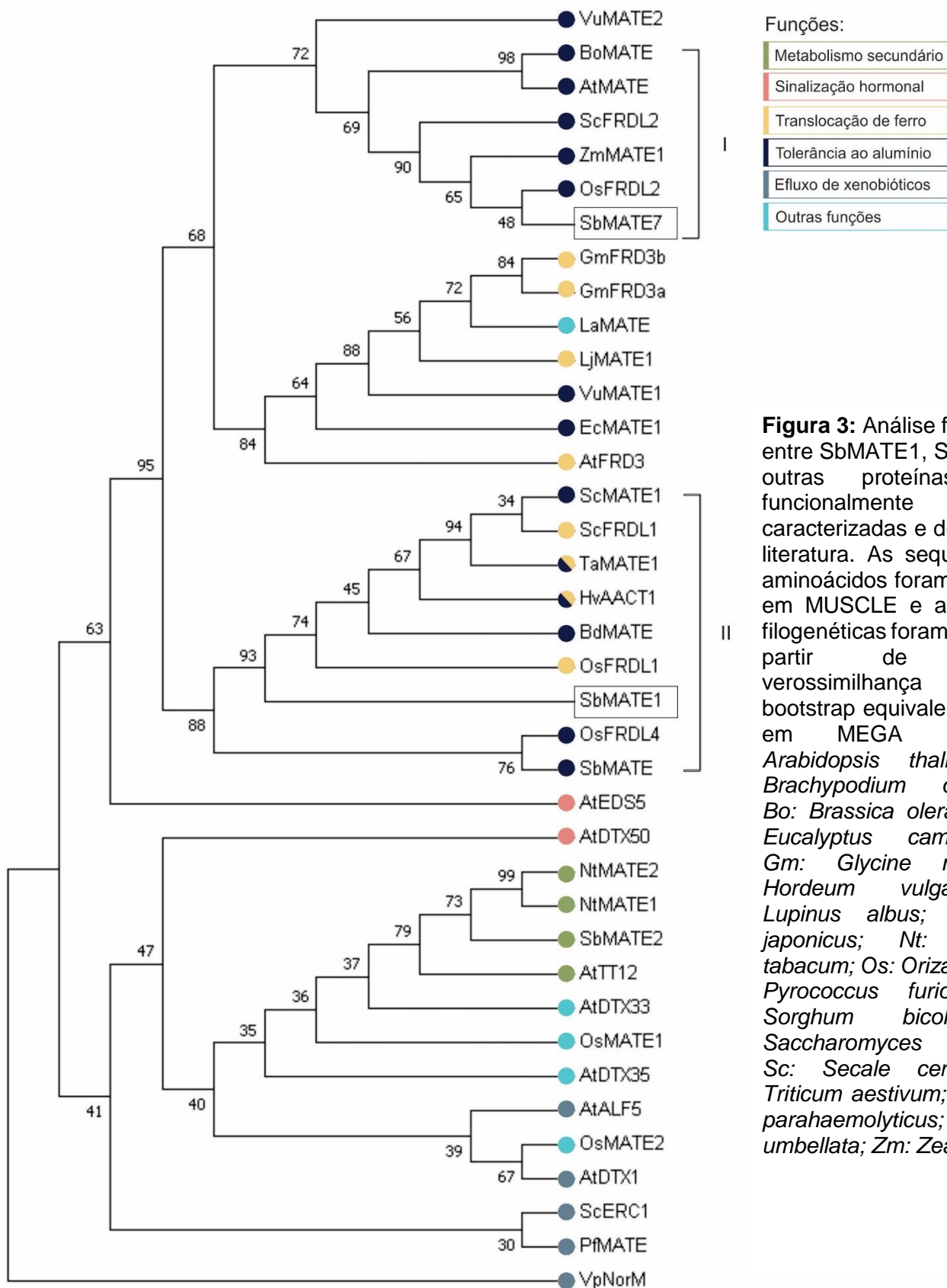
Desde a descoberta dos primeiros genes MATE em bactérias, diversos outros genes foram identificados com ampla distribuição entre diferentes taxa. Genes MATE são encontrados entre microrganismos procariotos, conferindo resistência a drogas (Morita et al, 1998); em fungos, promovendo o transporte de xenobióticos (Schlunk et al., 2015); em plantas, relacionados a mecanismos de tolerância ao alumínio e até tolerância a patógenos (Nawrath et al., 2002); e mamíferos, conferindo o efluxo de fármacos antitumorais (Minematsu et al., 2011) e na excreção de compostos biliares (Hillgren et al., 2013). Hvorup et al. (2003), que classifica a família MATE como parte da superfamília de transportadores MOP (*Multidrug Oligosaccharidyl-lipid Polysaccharide*), categoriza 3 famílias principais de genes MATE: a família 1, compreende genes *MATE* bacterianos; a família 2, abrange genes eucariotos, e a família 3, corresponde a genes identificados em arqueias.

**Tabela 5:** Relação de proteínas utilizadas para a construção da árvore filogenética (Figura 3). Proteínas MATE descritas na literatura e suas respectivas funções.

Organismo	Proteína	Função	Referência
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	NorM	Efluxo de drogas	Morita et al., 1998 e 2000
<i>Pyrococcus furiosus</i>	PfMATE	Efluxo de drogas	Tanaka et al., 2013
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ScERC1	Resistência a etionina	Shiomi et al., 1991
<i>Glycine max</i>	GmFRD3a GmFRD3b	Translocação de ferro	Rogers et al., 2009
<i>Vigna umbellata</i>	VuMATE1	Tolerância ao alumínio	Fan et al., 2014 Yang et al., 2011
<i>Lupinus albus</i>	LaMATE	Homeostase de fósforo	Uhde-Stone et al., 2005
<i>Lotus japonicus</i>	LjMATE	Translocação de ferro	Takanashi et al., 2013
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	EcMATE1	Tolerância ao alumínio	Sawaki et al., 2013
<i>Zea mays</i>	ZmMATE1	Tolerância ao alumínio	Maron et al., 2010
<i>Secale cereale</i>	ScFRDL1	Translocação de ferro	Yokosho et al., 2010
	ScFRDL2	Tolerância ao alumínio	
	ScMATE1	Tolerância ao alumínio	Silva-Navas et al., 2012
<i>Oryza sativa</i>	OsFRDL1	Translocação de ferro	Yokosho et al., 2009
	OsFRDL2	Tolerância ao alumínio	Yokosho et al., 2016
	OsFRDL4	Tolerância ao alumínio	Yokosho et al., 2011
	OsMATE1	Resistência a patógenos	Tiwari et al., 2014
	OsMATE2		
<i>Nicotiana tabacum</i>	NtMATE1	Acúmulo de nicotina	Shoji et al., 2009
	NtMATE2		
<i>Sorghum bicolor</i>	SbMATE	Tolerância ao alumínio	Magalhães et al., 2007
	SbMATE2	Transporte de durina	Darbani et al., 2016
<i>Brassica oleracea</i>	BoMATE	Tolerância ao alumínio	Wu et al., 2014
<i>Brachypodium distachyon</i>	BdMATE	Tolerância ao alumínio	Ribeiro et al., 2017
<i>Hordeum vulgare</i>	HvAACT1 (HvMATE)	Tolerância ao alumínio/ Translocação de ferro	Furukawa et al., 2007 Fujii et al., 2012
<i>Triticum aestivum</i>	TaMATE1	Tolerância ao alumínio	Garcia-Oliveira et al., 2014
	AtFRD3	Translocação de ferro	Rogers et al., 2002 Durret et al., 2007
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtTT12	Acúmulo de flavonoides	Debeaujon et al., 2001 Marinova et al., 2007
	AtDTX35	Canais de cloreto/Controle do turgor	Zhang et al., 2017
	AtDTX33		
	AtDTX1	Detoxificação de xenobióticos	Li et al., 2002
	AtALF5	Tolerância a toxinas	Diener et al., 2001
	AtDTX50	Transporte de ácido abscísico	Zhang et al., 2014
	AtEDS5	Resistência a patógenos	Nawrath et al., 2002
	AtMATE	Tolerância ao alumínio	Liu et al., 2009

A árvore resultante do método de máxima verossimilhança está apresentada na Figura 3. A proteína MATE de *V. parahaemolyticus*, NormM, foi utilizada como grupo externo. SbMATE1 e SbMATE7 integram dois diferentes cladogramas, arbitrariamente nomeados clado I e clado II. SbMATE7 está incluída no clado I que compreende proteínas MATE relacionadas com a tolerância ao alumínio em monocotiledôneas como milho, centeio e arroz, e nas dicotiledôneas, *Brassica oleracea* e *Arabidopsis*. Estas proteínas apresentam similaridade de sequência de aminoácidos equivalente a 95% para ZmMATE1 (Maron et al., 2010), 83% para OsFRDL2 (Yokosho et al., 2016), 78% para ScFRDL2 (Yokosho et al., 2010), 65% para BoMATE (Wu et al., 2014) e AtMATE (Liu et al., 2009), em relação a SbMATE7. Estes resultados estão compatíveis com as relações filogenéticas apresentadas na Figura 3. O compartilhamento da funcionalidade na tolerância ao alumínio nestas proteínas MATE entre monocotiledôneas e dicotiledôneas sugere que a especialização destes genes na tolerância ao alumínio tenha se dado anteriormente à diferenciação destes dois grupos de plantas.

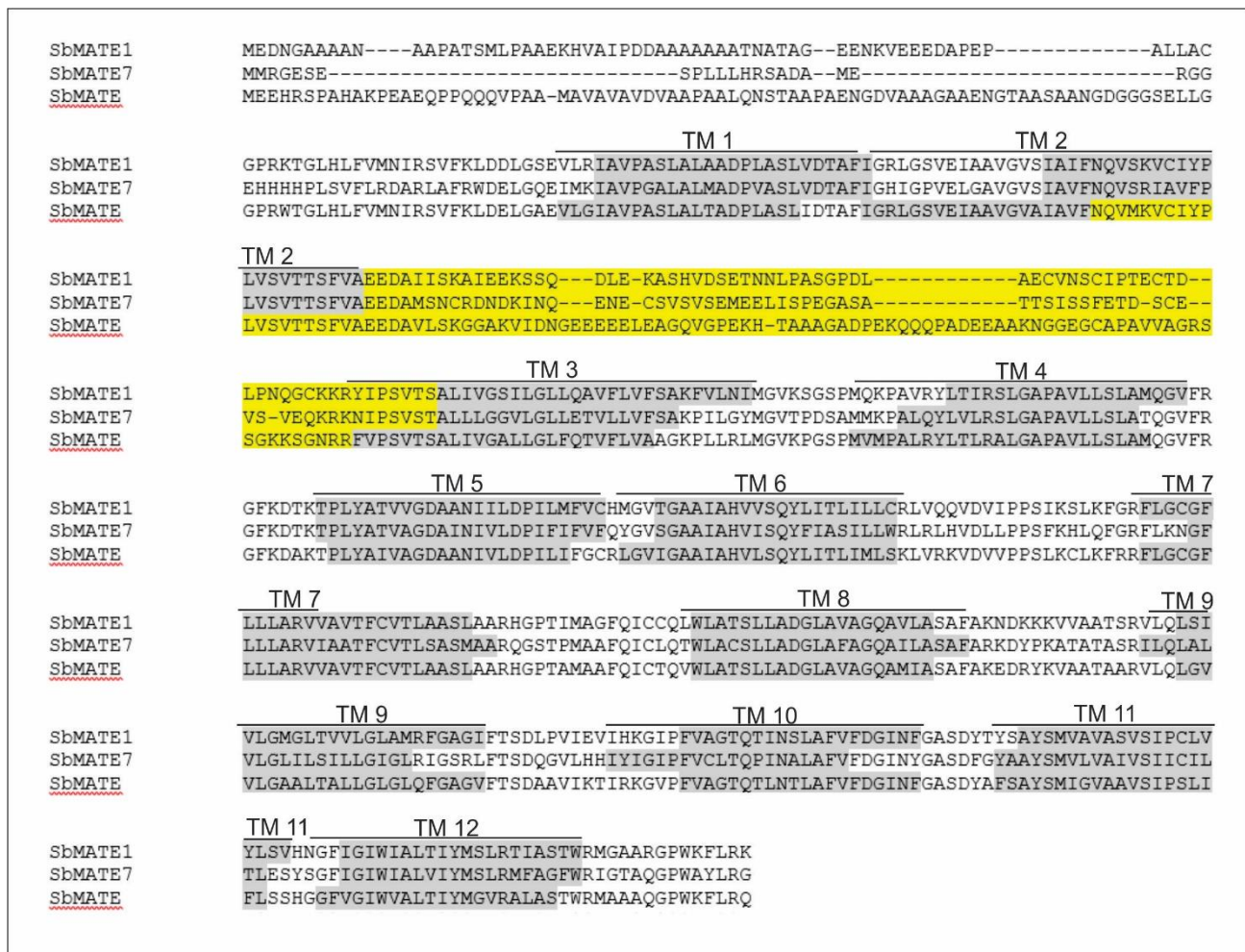
SbMATE1 está presente no clado II, junto com SbMATE e genes relacionados à homeostase de ferro e à tolerância ao alumínio. SbMATE1 compartilha 91% de similaridade a OsFRDL1 (Yokosho et al., 2009), 89% a HvAACT1 (Furukawa et al., 2007), 84% a BdMATE (Ribeiro et al., 2017), ScFRDL1 (Yokosho et al., 2010) e ScMATE1 (Silva-Navas et al., 2012), 83% a TaMATE1 e 70% a OsFRDL4. ScMATE1 e ScFRDL1 (clado II), apresentam 99% de similaridade proteica e são um bom exemplo da diversificação funcional apesar da similaridade de sequência. ScMATE1 está relacionado à tolerância ao alumínio em centeio, com maior expressão no ápice radicular, enquanto ScFRDL1 está relacionado à resposta à deficiência de ferro, com maior expressão no restante das raízes (Silva-Navas et al., 2012; Yokosho et al., 2010). Em relação à funcionalidade, a homeostase de ferro aparenta ser uma condição apomórfica em relação à tolerância ao alumínio. A ocorrência, em grande número, de genes MATE parálogos em espécies como *Medicago truncatula*, 40 genes MATE, *Arabidopsis*, 56 genes MATE, e soja, 117 genes MATE, abre precedente para a seleção e diversificação funcional destes genes (Zhao & Dixon, 2009; Liu et al., 2016).



**Figura 3:** Análise filogenética entre SbMATE1, SbMATE7 e outras proteínas MATE funcionalmente caracterizadas e descritas na literatura. As sequências de aminoácidos foram alinhadas em MUSCLE e as relações filogenéticas foram inferidas a partir de máxima verossimilhança com bootstrap equivalente a 1000 em MEGA 7.0. At: *Arabidopsis thaliana*; Bd: *Brachypodium distachyon*; Bo: *Brassica oleraceae*; Ec: *Eucalyptus camaldulensis*; Gm: *Glycine max*; Hv: *Hordeum vulgare*; La: *Lupinus albus*; Lj: *Lotus japonicus*; Nt: *Nicotiana tabacum*; Os: *Oriza sativa*; Pf: *Pyrococcus furiosus*; Sb: *Sorghum bicolor*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Sc: *Secale cereale*; Ta: *Triticum aestivum*; Vp: *Vibrio parahaemolyticus*; Vu: *Vigna umbellata*; Zm: *Zea mays*.

#### 4.2. Predição e modelagem *in silico* das estruturas proteicas de SbMATE1 e SbMATE7

A predição de 12 domínios transmembrana (TM) e conservação de uma região de aproximadamente 100 aminoácidos, onde é predita a formação da alça intracelular entre TM2 e TM3, é consistente entre SbMATE, SbMATE1 e SbMATE7 (Detalhe em amarelo, Figura 4).



**Figura 4:** Alinhamento das sequências de aminoácidos preditas para SbMATE, SbMATE1 e SbMATE7. Alinhamento realizado e adaptado utilizando-se o Toffee Server (<http://tcoffee.org.cat/apps/tcoffee/do:tmcoffee>). Os domínios transmembrana (TM1 – TM12) conservados estão representados em cinza. Detalhe, em amarelo, dado à região entre TM2 e TM3 designada na formação de uma alça intracelular.

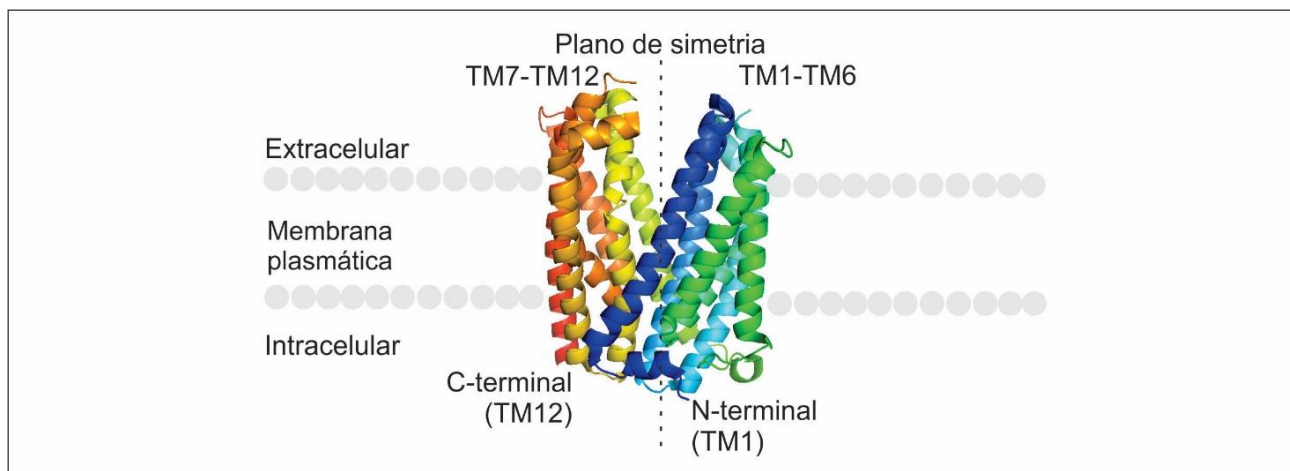
Não foram identificadas regiões similares a peptídeos sinal, tanto em SbMATE1 quanto em SbMATE7, utilizando-se a ferramenta computacional SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

As estruturas das proteínas SbMATE1, SbMATE7 e SbMATE foram comparadas entre si e ao modelo cristalográfico da proteína MATE, PfMATE, derivada de *Pyrococcus furiosus* (Tanaka et al., 2013) de modo a predizer as possíveis estruturas que estas proteínas possam apresentar uma vez que a função proteica pode estar relacionada à sua estrutura conformacional. Este modelo (PfMATE, 3VVN), construído por difração de raio X, foi escolhido devido à maior identidade e cobertura em relação às proteínas em análise (Tabela 6), o que permite a construção de modelos com maior acurácia. O modelo de SbMATE também foi gerado para fins de comparação.

**Tabela 6:** Resultados de cobertura, identidade e E-value em relação ao modelo cristalográfico 3VVN. A sequência de aminoácidos de SbMATE1, SbMATE7 e SbMATE foram confrontadas com a base de dados PDB. Para as três proteínas o modelo cristalográfico com maior resolução, cobertura e similaridade foi 3VVN (PfMATE). E-value: expected value.

Gene	Cobertura	Identidade	E-value
SbMATE1 (Sobic.001G454900)	15%	31%	3e-05
SbMATE7 (Sobic.007G020600)	25%	30%	4e-08
SbMATE (Sobic.003G403000.1)	22%	34%	6e-09

Transportadores de membrana do tipo MATE, geralmente, apresentam 12 domínios transmembrana, simetricamente dispostos em dois blocos de 6 hélices com extremidades C e N-terminais intracelulares (Omote et al., 2006). O esquema de organização básica de proteínas da família MATE está esquematizado na Figura 5.



**Figura 5:** Esquema de organização geral de proteínas MATE. Está representado o plano de simetria organizado em dois blocos contendo 6 domínios transmembrana TM1-TM6 e TM7-TM12 com um canal central de transporte. Extremidades C e N-terminais intracelulares.

A construção dos modelos proteicos 3D foi realizada por curadoria manual no *software* MODELLER (versão 9.17). Este *software* leva em consideração as relações mais prováveis de termodinâmica e estereoquímica estabelecidas entre os átomos dos resíduos de aminoácidos da cadeia primária das proteínas candidatas (SbMATE1, SbMATE7 e SbMATE) em relação à estrutura definida pelo molde cristalográfico (PfMATE). Apesar da baixa cobertura apresentada entre o molde cristalográfico e as proteínas em análise como apresentado na tabela 6, foram observados bons parâmetros de qualidade na predição das estruturas proteicas.

A partir desta consideração, foram gerados 100 possíveis conformações termodinâmicas para cada proteína candidata. Os modelos gerados com maior estabilidade termodinâmica estão indicados na Tabela 7 e foram validados e definidos de acordo com os seguintes parâmetros de qualidade: RMSD (*Root-Mean-Square Deviation*), que aponta a similaridade entre o modelo cristalográfico e as proteínas candidatas quando sobrepostos, sendo melhor quanto menor o valor de RMSD, representando uma menor diferença entre os modelos; DOPE Score (*Discrete Optimized Protein Energy*), que infere a energia relativa ao modelo proposto, sendo melhor quanto mais negativo, representando uma menor energia de repulsão interatômica; e GA341, que reflete o índice de qualidade de cada modelo gerado, sendo que quanto mais próximo de 1, maior será a acurácia do modelo

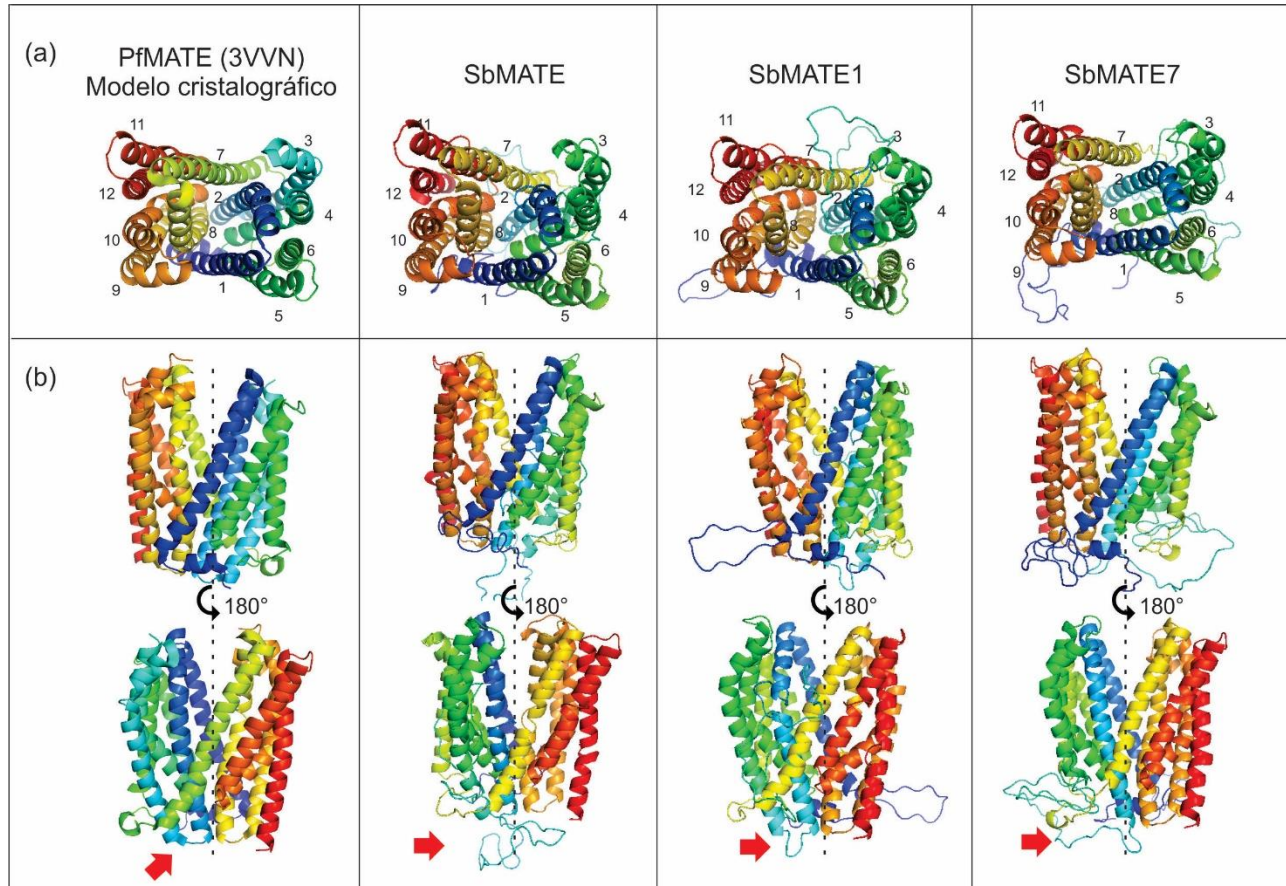
gerado. Por último, os modelos gerados foram validados a partir da geração de gráficos de Ramachandra para a identificação da porcentagem de resíduos em regiões termodinamicamente estáveis denominadas R1, R2 e R3. A região R1 é termodinamicamente mais estável (menor energia) e, portanto, deve conter a maior porcentagem de resíduos de aminoácidos para refletir a qualidade dos modelos gerados. R2 e R3 são regiões de maior entropia e devem conter, gradativamente, uma menor porcentagem de resíduos de aminoácidos para refletir maior estabilidade termodinâmica.

**Tabela 7:** Parâmetros de qualidade identificados para a definição dos modelos proteicos 3D gerados em MODELLER 9.17. A similaridade entre os modelos, RMSD; a energia relativa de cada modelo, DOPE Score; e a acurácia dos modelos gerados, GA341, estão indicados na tabela. R1, R2 e R3 identificam regiões termodinamicamente favoráveis. Mais de 90% dos aminoácidos dos três modelos escolhidos estão na região R1, com maior estabilidade termodinâmica.

Modelo	RMSD	Dope Score	GA341	Ramachandra		
				R1	R2	R3
SbMATE1	0.688	- 57015.496	0.87654	93,2%	5,2%	1.6%
SbMATE7	0.582	- 59924.555	0.99985	93.7%	4.8%	1.5%
SbMATE	0.656	- 55340.066	0.97614	92.3%	5.4%	2.3%

A partir desta metodologia, SbMATE1, SbMATE7 e SbMATE apresentam 12 TMs (TM1 – TM12) bem definidos (Figura 6a) em uma disposição dividida por um plano de simetria identificado na Figura 6b entre grupos formados de TM1 a TM6 e de TM7 a TM12, seguindo a estrutura que sugere uma duplicação intragênica como, geralmente, observado proteínas MATE (CITAÇÃO). As estruturas modeladas apresentam conservadas a alça intracelular de 100 aminoácidos entre TM2 e TM3 (indicadas pelas setas vermelhas na Figura 6b), relatada em MATEs com função no transporte de citrato como AtMATE, SbMATE e HvMATE Liu et al. (2009). Genes MATE em Arabidopsis, além dos já caracterizados AtMATE e AtFRD3, não apresentam este *loop* intracelular de aproximadamente 100 aminoácidos, que pode estar relacionado à capacidade de interação e transporte destas proteínas ao citrato, mas investigações estruturais mais profundas ainda não foram estabelecidas (Magalhães, 2010;

Liu et al., 2009). Ainda, em todos os modelos gerados são observadas extremidades C e N-terminais intracelulares.



**Figura 6:** Predição da estrutura proteica das proteínas SbMATE, SbMATE1 e SbMATE7 geradas a partir de MODELLER 9.17. (a) Visão da superfície extracelular de PfMATE, SbMATE, SbMATE1 e SBMATE7. Os domínios transmembrana estão numerados de 1 a 12 e identificados por cores únicas. (b) Apresentação das superfícies laterais evidenciando o plano de simetria descrito. Setas vermelhas indicam as alças intracelulares.

#### 4.3. Identificação da variação alélica de *SbMATE1* e *SbMATE7* entre linhagens tolerantes e sensíveis de sorgo ao alumínio

*SbMATE1* e *SbMATE7* foram clonados a partir de amostras de RNA de duas linhagens de sorgo, SC566 (tolerante ao alumínio) e BR012 (sensível ao alumínio). Foram sequenciados 11 clones de cDNA para *SbMATE1* (SC566), 8 clones para *SbMATE1* (BR012), 9 clones para *SbMATE7* (SC566) e 6 clones para *SbMATE7* (BR012). As linhagens contrastantes em relação ao fenótipo de tolerância BR012 e SC566 são sensíveis

e tolerantes ao alumínio, respectivamente, como descrito por Caniato e colaboradores (2007), com crescimento radicular líquido relativo (*Relative Net Root Growth*, RNRG%) em 27  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  de 35% e 105%, respectivamente. As sequências nucleotídicas consenso foram comparadas ao genótipo de referência de sorgo, BTx623, que é sensível ao alumínio (Caniato et al., 2007).

Para *SbMATE1*, a região codificante sequenciada é idêntica entre SC566 e BR012, apresentando um polimorfismo na posição 435 em relação a BTx623, C (SC566 e BR012) /T (BTx623). Esse polimorfismo promove uma mutação sinônima, sem potencial comprometimento da função proteica.

Para *SbMATE7*, não foram observados polimorfismos entre as linhagens sensíveis BTx623 e BR012. Por outro lado, o alelo de SC566 apresentou quatro mutações silenciosas e uma mutação que acarreta uma substituição de uma valina (aminoácido 193) por uma leucina, devido à substituição de guanina por uma citosina na posição 577 (Tabela 8). Ambos aminoácidos são alifáticos e apolares e, apesar do maior número de carbonos na cadeia lateral da leucina, a mutação conservativa, pode não afetar a função proteica.

**Tabela 8:** Polimorfismos observados no gene *SbMATE7* entre os genótipos sensíveis ao alumínio, BR012 e BTx623 e a linhagem tolerante SC566. As posições estão indicadas em relação ao ATG predito para cada gene MATE. S: sensível ao alumínio. T: tolerante ao alumínio.

Posição SNP (pb)	BTx623 (S) /BR012 (S)	SC566 (T)	Aminoácido	Mutação
318	Timina	Citosina	Serina	Sinônima
507	Adenina	Guanina	Glutamina	Sinônima
577	Guanina	Citosina	Valina → Leucina	Conservativa
996	Adenina	Timina	Alanina	Sinônima
1470	Guanina	Timina	Glicina	Sinônima

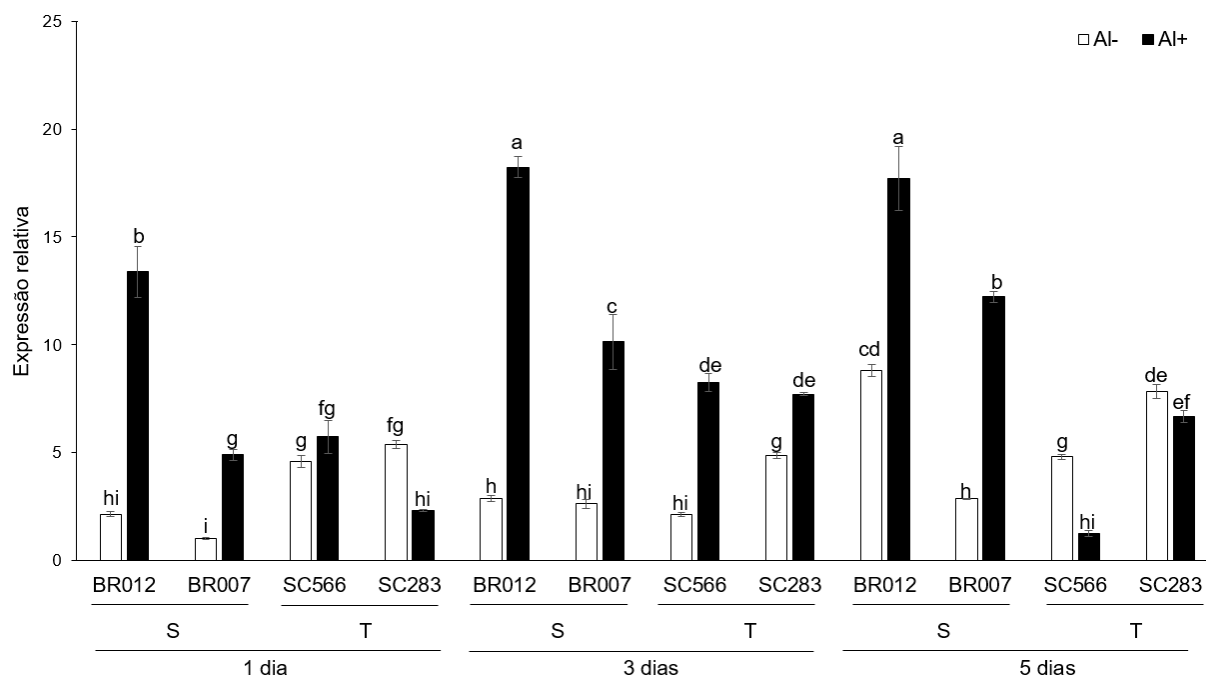
#### 4.4. Perfil de expressão relativa, temporal e espacial de *SbMATE1* e *SbMATE7*

##### 4.4.1. Perfil de expressão de *SbMATE1*

*SbMATE1* apresentou um padrão de expressão temporalmente induzida por alumínio nos ápices radiculares das linhagens sensíveis, BR007 e BR012, com aumento significativo da expressão no terceiro e quinto dia após a exposição ao metal para ambas linhagens. Para BR012 ocorre uma estabilização na indução por alumínio entre o terceiro e quinto dia e um aumento temporal estatisticamente significativo para BR007 também entre o terceiro

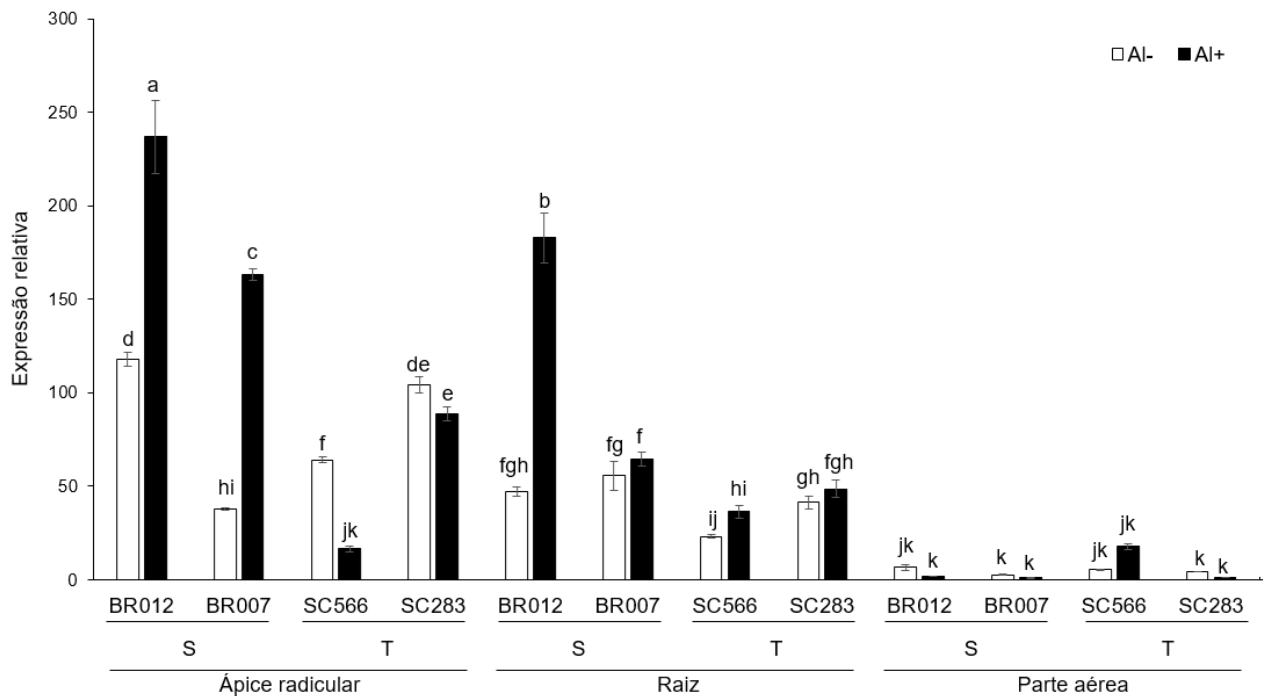
e quinto dia (Figura 7). Nas linhagens tolerantes, SC566 e SC283, observa-se a indução da expressão de *SbMATE1* somente entre o 1º e o 3º dias de exposição ao alumínio.

A expressão relativa dos genes *SbMATE1* e *SbMATE7* foi avaliada no ápice radicular após 1, 3 e 5 dias de exposição ao alumínio. A tecido especificidade em raízes e folhas foi avaliada somente após 5 dias de exposição. Além das evidências de similaridade de sequências entre os genes candidatos e *SbMATE*, a análise dos dados de RNASeq foi uma estratégia importante para a identificação de *SbMATE7* com perfil de expressão compatível com uma possível funcionalidade na tolerância ao alumínio. Nestes experimentos, foram comparados os transcriptomas de três linhagens tolerantes, SC283, SC566 e IS14351, e de duas linhagens sensíveis ao alumínio, BR007e BR012. A seleção foi feita buscando genes com expressão induzida por alumínio e maior aos 5 dias de exposição ao metal em relação a 3 dias de exposição. Este modelo de indução de expressão por alumínio não é apenas observado em *SbMATE*, mas também em outros genes como *AtMATE*, *ZmMATE1*, *OsFRDL4*, que estão envolvidos com a tolerância ao alumínio em Arabidopsis (Liu et al., 2009), milho (Maron et al., 2010) e arroz (Yokosho et al., 2001). A expressão de *OsFRDL4*, por exemplo, é rapidamente induzida após 2 horas de exposição de linhagens de arroz ao alumínio, com um aumento progressivo ao longo de 6 horas de exposição (Yokosho et al., 2011). Ainda, a expressão destes genes é tecido-específica, sendo relativamente mais expressos no sistema radicular (Magalhães et al., 2007; Liu et al, 2009). Portanto, os resultados de expressão temporal no ápice radicular de sorgo, induzido por alumínio entre 1 e 5 dias de exposição em linhagens sensíveis, é distinto do modelo previamente descrito para genes potencialmente relacionados à tolerância ao alumínio, uma vez que nestes casos a indução ocorre em linhagens tolerantes ao alumínio.



**Figura 7:** Análise de expressão temporal do gene *SbMATE1* no ápice radicular de sorgo. Quantificação relativa foi analisada a partir de ápices radiculares (primeiro centímetro) de plântulas cultivadas sem (barras brancas) e com  $27 \mu\text{M Al}^{3+}$  (barras pretas) por 1, 3 e 5 dias. (S) sensível; (T) tolerante. As barras indicam a expressão relativa média acompanhadas de seus desvios padrão. A significância das diferenças de expressão entre as amostras foi verificada pelo Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Letras distintas indicam diferenças estatísticas significativas.

O perfil de expressão de *SbMATE1* se repete no restante das raízes, com expressão significativamente induzida por alumínio em BR012 e há também uma tendência de indução por alumínio em BR007. Nas folhas a expressão de *SbMATE1* é baixa e não há diferença significativa entre os genótipos analisados na presença e na ausência de alumínio, evidenciando uma resposta de indução tecido-específica no sistema radicular quando exposto ao alumínio em linhagens sensíveis ao alumínio (Figura 8). Apesar do perfil de indução e da maior similaridade proteica entre *SbMATE1* e *SbMATE*, o fato de *SbMATE1* ser mais expresso em linhagens sensíveis ao alumínio sugere que este gene não esteja envolvido no mecanismo de tolerância ao alumínio ou que apresente um efeito reduzido para esta característica nestes genótipos sensíveis ou, ainda, que esteja reprimido em linhagens tolerantes.

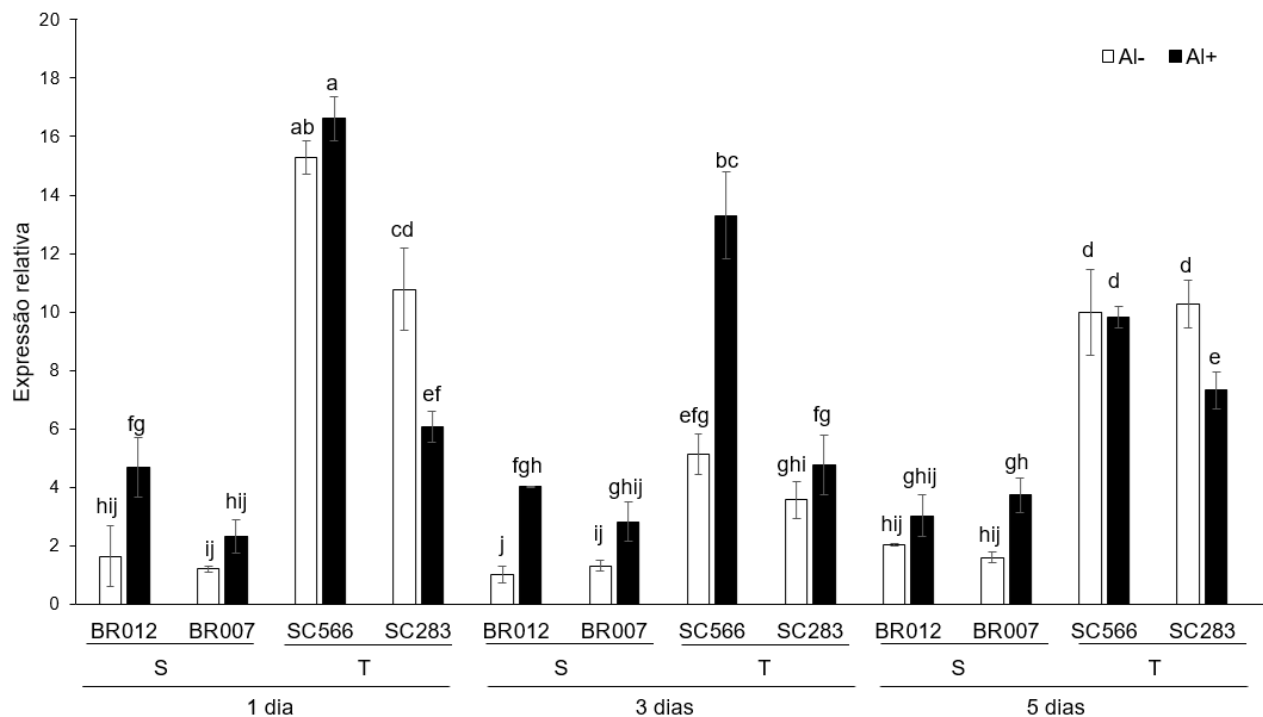


**Figura 8:** Análise de expressão espacial de *SbMATE1* nos ápices radiculares (primeiro centímetro), raízes e folhas de sorgo. A quantificação relativa foi analisada nos ápices radiculares, raízes (excluído os ápices radiculares) e partes aéreas de plântulas cultivadas sem (barras brancas) e com  $27 \mu\text{M Al}^{3+}$  (barras pretas) por 5 dias. (S) sensível; (T) tolerante. As barras indicam a expressão relativa média acompanhadas de seus desvios padrão. A significância das diferenças de expressão entre as amostras foi verificada pelo Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Letras distintas indicam diferenças estatísticas significativas.

#### 4.4.2. Perfil de expressão de *SbMATE7*

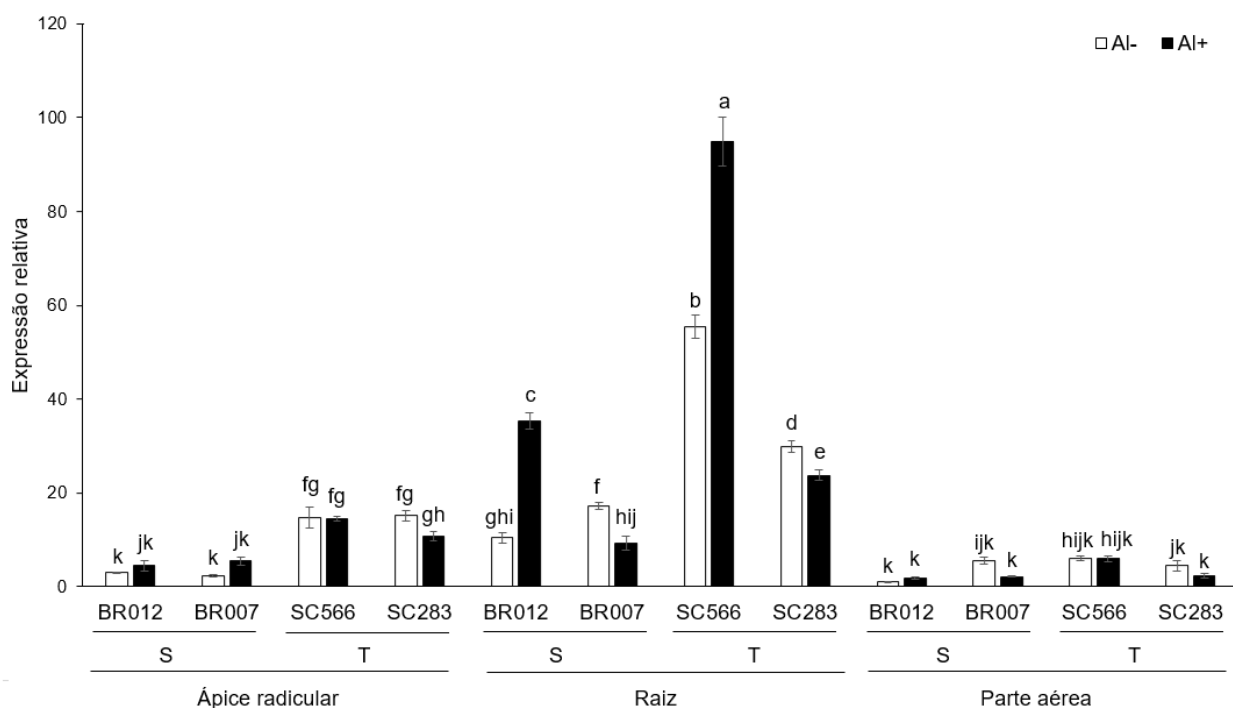
Para o gene *SbMATE7* há uma tendência de repressão temporal da expressão na linhagem tolerante SC566 (Figura 9). O perfil de expressão de *SbMATE7* é distinto do indicado pelos experimentos de RNA-Seq. A expressão deste gene é maior nas linhagens tolerantes, SC566 e SC283, em relação às linhagens sensíveis. Há a indução da expressão por alumínio em 1 e 3 dias de estresse para o genótipo SC566 em relação aos tratamentos sem alumínio e, para o genótipo SC283, a expressão é induzida por alumínio apenas ao terceiro dia de estresse. Para as linhagens sensíveis a expressão relativa de *SbMATE7* é significativamente menor em relação às linhagens tolerantes, tanto nos tratamentos com alumínio quanto nos tratamentos sem alumínio. Portanto, *SbMATE7* apresenta uma

tendência de redução temporal da expressão na linhagem tolerante SC566, com expressão relativa mais alta no primeiro dia de exposição ao alumínio.



**Figura 9:** Análise de expressão temporal de *SbMATE7* no ápice radicular de sorgo. Quantificação relativa foi analisada a partir de ápices radiculares (primeiro centímetro) de plântulas cultivadas sem (barras brancas) e com alumínio {27}  $\mu\text{M}$  (barras pretas) por 1, 3 e 5 dias. (S) sensível; (T) tolerante. As barras indicam a expressão relativa média acompanhadas de seus desvios padrão. A significância das diferenças de expressão entre as amostras foi verificada pelo Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Letras distintas indicam diferenças estatísticas significativas.

A expressão relativa de *SbMATE7* após 5 dias de exposição ao alumínio é significativamente maior nas raízes do que nos ápices radiculares das linhagens SC566 e BR012 (Figura 10). Padrão de expressão semelhante a este é observado para *OsFRDL2*, um transportador de citrato, também expresso nos ápices radiculares de arroz, mas que apresenta maior expressão nas raízes (Yokosho et al., 2016). Yokosho et al. (2016), ressalta que este transportador, *OsFRDL2*, contribui com a tolerância ao alumínio em arroz, mas com efeito menor sobre a tolerância em relação a *OsFRDL1*. Ainda, assim como para *SbMATE1*, a expressão de *SbMATE7* é maior no sistema radicular do que na parte aérea.



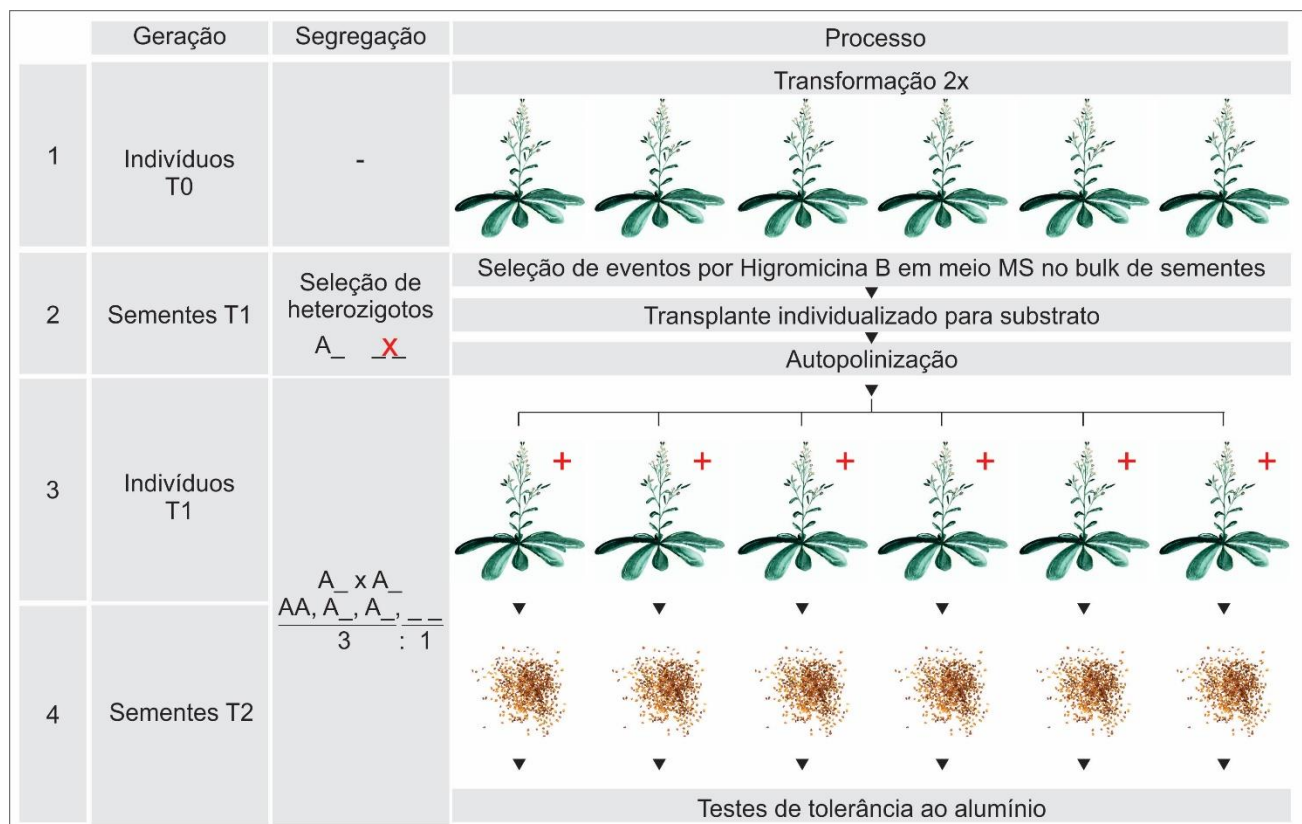
**Figura 10:** Análise de expressão temporal de *SbMATE7* nos ápices radiculares (primeiro centímetro), raízes e folhas de sorgo. A quantificação relativa foi analisada nos ápices radiculares, raízes (excluído os ápices radiculares) e partes aéreas de plântulas cultivadas sem (barras brancas) e com alumínio {27}  $\mu\text{M}$  (barras pretas) por 5 dias. (S) sensível; (T) tolerante. As barras indicam a expressão relativa média acompanhadas de seus desvios padrão. A significância das diferenças de expressão entre as amostras foi verificada pelo Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Letras distintas indicam diferenças estatísticas significativas.

O perfil de expressão de *SbMATE7* nos ápices radiculares abre uma nova perspectiva para entender a tolerância ao alumínio em sorgo, em especial, quando se faz um paralelo com o que tem sido descrito para genes como *VuMATE1* e *VuMATE2* de *Vigna umbellata* (Liu et al., 2018). A expressão de *VuMATE2* é rapidamente induzida por alumínio em 30 minutos de exposição ao metal, enquanto *VuMATE1* apresenta uma expressão tardia, com aumento a partir de 3 horas de estresse e concomitante redução na expressão de *VuMATE2*. Esta coordenação nos perfis de expressão e de exsudação de citrato nestes genes MATE demonstra uma complementação na resposta ao estresse por alumínio e um controle fino na eficiência do uso de citrato. Este controle estaria ainda relacionado à transcrição coordenada de *VuMATE1* e *VuMATE2* por diferentes fatores de transcrição, ainda não definidos, que controlariam a expressão destes genes (Liu et al., 2018). Este

exemplo pode elucidar uma potencial coordenação na ativação da expressão entre *SbMATE7* e *SbMATE*.

#### 4.5. Efeitos da superexpressão de *SbMATE7* em *Arabidopsis thaliana*

Sementes transgênicas T2 (Figura 11), segregantes para o gene *SbMATE7*, derivado da linhagem tolerante ao alumínio SC566, com expressão controlada pelo promotor 2x35S CaMV (*Cauliflower Mosaic Virus*), foram germinadas e fenotipadas para da tolerância ao alumínio em hidroponia. Não foram obtidas linhagens transgênicas para *SbMATE1*.

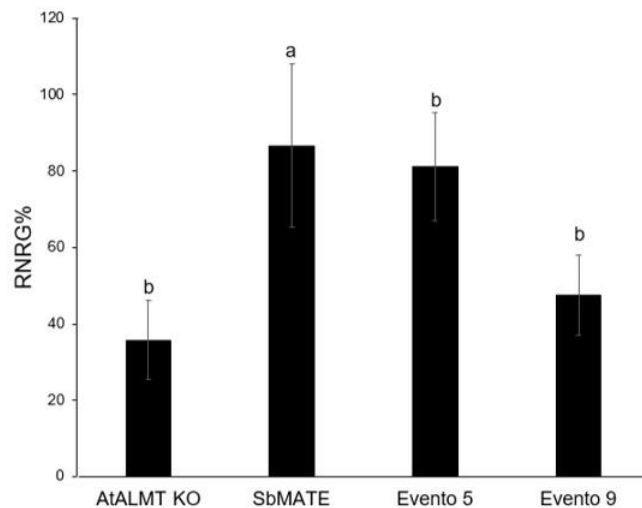


**Figura 11:** Representação esquemática dos procedimentos de seleção de transgênicos T2, utilizadas nos experimentos de fenotipagem para tolerância ao alumínio em *A. thaliana* superexpressando 2x35S::*SbMATE7*. (1) Indivíduos T0 – Plantas não transformadas de *A. thaliana* knockout para *ALMT1*. (2) Após transformação por *A. tumefaciens*, os possíveis transformantes foram selecionados com tratamento de Higromicina B (marcador de seleção). A ocorrência do gene de interesse foi confirmada por PCR e os (3) eventos positivos (Indivíduos T1 - hemizigotos) foram autopolinizados. (4) As sementes segregantes derivadas dos indivíduos T1, identificadas como sementes T2, foram utilizadas para os testes de fenotipagem.

Uma linhagem *knockout* de *A. thaliana* para o gene *AtALMT1* sensível ao alumínio (Liu et al., 2009), foi transformada com o gene *SbMATE7*. A tolerância ao alumínio foi avaliada após sete dias de cultivo em hidroponia a partir do cálculo de RNRG% (*Relative Net Root Growth*), que é calculado pela razão entre o comprimento radicular total no tratamento com alumínio e no tratamento controle.

Observa-se que, em números absolutos, os eventos 5 e 9 promovem um efeito positivo, conferindo níveis superiores de tolerância ao alumínio em relação à linhagem *AtALMT1-KO*, apesar de não haver significância estatística ( $\alpha = 0,1$ ). A linhagem *AtALMT1-KO* apresentou 35,75% de RNRG%. A linhagem transgênica para *SbMATE* apresentou um aumento de tolerância ao alumínio estatisticamente significativo, com RNRG% equivalente a 86,69%. Este aumento de tolerância também foi verificado para os eventos 5 e 9, com valores de RNRG de 81,21% e 47,54%, respectivamente (Figura 12), porém, não significativos, resultado possivelmente relacionado à variação experimental. A linhagem *knockout AtALMT* expressando o gene *SbMATE* (TG8 – Magalhães et al. 2007) e o próprio *knockout AtALMT1*, utilizados como controles, apresentaram aproximadamente 20% e 50% de crescimento radicular em 1,5  $\mu\text{M}$  de alumínio como descrito por Magalhães et al. (2007) e Liu et al. (2009), respectivamente. A exsudação de malato em *AtALMT-KO* é praticamente nula, mas a tolerância ao alumínio é conferida por *AtMATE*, com menor efeito em *Arabidopsis* (Magalhães et al., 2007; Liu et al., 2009). Dois eventos transgênicos de *AtALMT1-KO* para *SbMATE7*, identificados como 5 e 9 (Figura 12) foram selecionados para estes experimentos. Pode-se apontar dois fatores que possam ter promovido esta variação. O primeiro, relacionado à variabilidade genética dos indivíduos T2, que segregam para o gene *SbMATE7*(), levando a um efeito de variabilidade relacionado ao número de cópias entre indivíduos homocigotos (AA) e hemizigotos (A<sub>-</sub>). Ainda, a ocorrência de crescimento de fungos e bactérias nos cultivos em solução nutritiva rica em sacarose, que seria um segundo fator que causou esta variação experimental. No entanto, apesar destas fontes de variação, os dados sugerem que a superexpressão de *SbMATE7* em *Arabidopsis* confere tolerância ao alumínio, mas a confirmação deste efeito depende da obtenção de linhagens homocigotas para o inserto referido e do controle de agentes microbianos nas soluções de cultivo. Quando estes resultados são comparados a outros genes MATE, nota-se o potencial efeito do gene *SbMATE7* na tolerância ao alumínio apresentado de 44% (Evento 5) de

aumento de tolerância em relação ao controle *AtALMT-KO*. O gene *BoMATE*, por exemplo, que é 65% similar ao gene *SbMATE7*, quando superexpresso em um *background* genético selvagem de *Arabidopsis*, observou-se um aumento na tolerância em aproximadamente 25% em dois eventos transgênicos não segregantes submetidos a 400  $\mu\text{M}$  de alumínio (Wu et al., 2014). Já o gene *AtMATE*, também 65% similar a *SbMATE7*, analisado nas mesmas condições fisiológicas praticadas neste trabalho em concentração de 1,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  contribui com tolerância de 20% (Liu et al., 2009).



**Figura 12:** Tolerância ao alumínio (Relative Net Root Growth %) foi avaliada em solução nutritiva pH 4.2, contendo 1,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ . *AtALMT1 KO* e a linhagem transgênica homocigota para o gene *SbMATE* foram utilizadas como controle. *AtALMT1 KO* apresenta alta sensibilidade ao alumínio. As médias de RNRG% (n=20) para os eventos 5 e 9, segregantes para *SbMATE7* e para *SbMATE* (controle) são apresentadas com seus respectivos erros padrão. A significância das diferenças de expressão entre as amostras foi verificada a partir do teste de variância, ANOVA ( $\alpha = 0,1$ ) seguido de teste de Dunnet, para identificação das médias com diferenças significativas, em relação à média de *AtALMT KO*, indicada pelas diferentes letras.

## 5. Conclusão

---

Os resultados apresentados neste trabalho indicam a similaridade estrutural nos níveis gênico e proteico de *SbMATE1* e *SbMATE7*, em comparação a outras proteínas MATE relacionadas à tolerância ao alumínio. O perfil de expressão do gene *SbMATE7*, suas relações filogenéticas mais próximo a outras proteínas exclusivamente relacionadas à tolerância ao alumínio, e a tendência de aumento na tolerância ao alumínio demonstrada nos experimentos de superexpressão sugerem que este gene desempenhe função na tolerância ao alumínio em sorgo.

Cabe, ainda, para completa elucidação funcional de *SbMATE1* e *SbMATE7*, a identificação do compartimento subcelular em que estas proteínas se expressam, e a identificação das propriedades de transporte dessas proteínas MATE. Além disso, faz-se necessária a otimização dos experimentos de superexpressão com a obtenção de linhagens homozigotas, controle de agentes microbianos e testes de complementação também para *SbMATE1*. Estes resultados abrem perspectivas para aumentar a produtividade de sorgo em solos ácidos, expandindo o que já para é obtido via gene *SbMATE*.

## 6. Referências bibliográficas

---

Arenhart RA, Lima JC, Pedron M, et al. Involvement of ASR genes in aluminum tolerance mechanisms in rice. *Plant, Cell Environ.* 2013;36(1):52-67.

Arenhart RA, Bai Y, Valter De Oliveira LF, et al. New insights into aluminum tolerance in rice: The ASR5 protein binds the STAR1 promoter and other aluminum-responsive genes. *Mol Plant.* 2014;7(4):709-721.

Basu U, Godbold D, Taylor GJ. Aluminum resistance in *Triticum aestivum* associated with enhanced exudation of malate. *J Plant Physiol.* 1994;144(6):747-753.

Bent A. *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. *Methods Mol Biol.* 2006;343(1):87-103.

Buol SW. Soils and agriculture in central-west and north Brazil. *Sci Agric.* 2009;66(5):697-707.

Caniato FF, Guimarães CT, Schaffert RE, et al. Genetic diversity for aluminum tolerance in sorghum. *Theor Appl Genet.* 2007;114(5):863-876.

Collins NC, Shirley NJ, Saeed M, Pallotta M, Gustafson JP. An *ALMT1* gene cluster controlling aluminum tolerance at the *Alt<sub>4</sub>* Locus of Rye (*Secale cereale* L.). *Genetics.* 2008;179(1):669-682.

Curtis MD & Grossniklaus U. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* 2003;133(2): 462–469.

Dahlberg JA, Wasylikowa K. Image and statistical analyses of early sorghum remains (8000 B.P.) from the Nabta Playa archaeological site in the Western Desert, southern Egypt. *Veg History Archaeobotany.* 1996;5(4):293-299.

Darbani B, Motawia MS, Olsen CE, Nour-Eldin HH, Møller BL, Rook F. The biosynthetic gene cluster for the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* contains its co-expressed vacuolar MATE transporter. *Sci Rep.* 2016;6:37079.

De Wet JMJ, Harlan JR. The origin and domestication of *Sorghum bicolor*. *Econ Bot.* 1971;25(2):128-135.

Delhaize E, Ryan PR, Randall PJ. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol.* 1993;103(3):695-702.

Delhaize E, Ryan PR. Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* 1995;107:315-321.

Deu M, Sagnard F, Chanterreau J, et al. Niger-wide assessment of in situ sorghum genetic diversity with microsatellite markers. *Theor Appl Genet.* 2008;116(7):903-913.

Diener AC, Gaxiola RA, Fink GR. Arabidopsis *ALF5*, a multidrug efflux transporter gene family member, confers resistance to toxins. *Plant Cell.* 2001;13(7):1625-1638.

Ding ZJ, Yan JY, Xu XY, Li GX, Zheng SJ. WRKY46 functions as a transcriptional repressor of *ALMT1*, regulating aluminum-induced malate secretion in Arabidopsis. *Plant J.* 2013;76(5):825-835.

Durrett TP, Gassmann W, Rogers EE. The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol.* 2007;144(1), 197–205.

Edgar RC. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(5):1792-1797.

Fageria NK, Stone LF. Manejo da acidez de solos de cerrado e de várzea do Brasil. 1999:42.

Famoso AN, Zhao K, Clark RT, Tung CW, Wright MH, McCouch SR. Genetic architecture of aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa*) determined through genome-wide association analysis and QTL mapping. PLoS Genetics, 2011;7(8), e1002221.

Fujii M, Yokosho K, Yamaji N, Saisho D, et al. Acquisition of aluminium tolerance by modification of a single gene in barley. Nature Communications, 2012;3(1), 713.

Furukawa J, Yamaji N, Wang H, et al. An aluminum-activated citrate transporter in barley. Plant Cell Physiol. 2007;48(8):1081-1091.

Garcia-Oliveira AL, Martins-Lopes P, Tolrá R, et al. Molecular characterization of the citrate transporter gene *TaMATE1* and expression analysis of upstream genes involved in organic acid transport under Al stress in bread wheat (*Triticum aestivum*). Physiol Plant. 2014;152(3):441-452.

Gascuel O. BIONJ: An improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. Mol Biol Evol. 1997;14(7):685-695.

Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, et al. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. Science. 2010;327(5967):812-818.

Gomez C, Terrier N, Torregrosa L, et al. Grapevine MATE-Type Proteins Act as Vacuolar H<sup>+</sup>-Dependent Acylated Anthocyanin Transporters. PLANT Physiol. 2009;150(1):402-415.

Green LS. *FRD3* Controls Iron Localization in Arabidopsis. PLANT Physiol. 2004;136(1):2523-2531.

Gruber BD, Ryan PR, Richardson AE, et al. *HvALMT1* from barley is involved in the transport of organic anions. J Exp Bot. 2010;61(5):1455-1467.

Hammer GL, Muchow RC. Assessing climatic risk in water-limited subtropical environments. Development and testing of a simulation model. F Crop Res. 1994;36:221-234.

Haridasan M. Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. Brazilian J Plant Physiol. 2008;20(3):183-195.

Hariprasanna K, Patil J V. Sorghum: Origin, Classification, Biology and Improvement. Springer India; 2015:3-20.

Haynes RJ, Mokolobate MS. Amelioration of Al toxicity and P deficiency in acid soils by additions of organic residues: A critical review of the phenomenon and the mechanisms involved. Nutr Cycl Agroecosystems. 2001;59(1):47-63.

Hede AR, Skovmand B, López-Cesati J. Acid soils and aluminum toxicity. Appl Physiol. 2001:172-182.

Hillgren KM, Keppler D, Zur AA, Giacomini KM, Stiege B, Cass CE, Zhang L. Emerging transporters of clinical importance: An update from the international transporter consortium. *Clinical Pharm Therap*. 2013;94(1), 52–63.

Hoekenga OA, Maron LG, Pineros MA, et al. *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(25):9738-9743.

Huang CF, Yamaji N, Mitani N, Yano M, Nagamura Y, Ma JF. A Bacterial-Type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell Online*. 2009;21(2):655-667.

Hue N V., Craddock GR, Adams F. Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. *Soil Sci Soc Am J*. 1986;50:28-34.

Hvorup RN, Winnen ., Chang AB, Jiang Y, Zhou XF, Saier MH. The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. *Euro J Biochem*. 2003; 270(5):799-813

Iuchi S, Koyama H, Iuchi A, et al. Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(23):9900-9905.

Jones DL. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant and Soil*. 1998;205(1):25-44.

Jones DL, Gilroy S, Larsen PB, Howell SH, Kochian L V. Effect of aluminum on cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> homeostasis in root hairs of Arabidopsis thaliana (L.). *Planta*. 1998;206(3):378-387.

Kaatz GW, McAleese F, Seo SM. Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(5):1857-1864.

Kinraide TB. Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Plant Soil*. 1991;134(1):167-178.

Kochian L V., Hoekenga OA, Pineros MA. How do crop plants tolerate acid soils? - Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu Rev Plant Biol*. 2004;55(1):459-493.

Kochian L V., Piñeros MA, Liu J, Magalhaes J V. Plant adaptation to acid soils: The molecular basis for crop aluminum resistance. *Annu Rev Plant Biol*. 2015; 1-28.

Kohorn BD, Kohorn SL. The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin receptors. *Front Plant Sci*. 2012;3:88.

Kuroda T, Tsuchiya T. Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2009;1794(5):763-768.

Lee EH, Foy CD. Aluminum tolerances of two snapbean cultivars related to organic acid content evaluated by high - performance liquid chromatography. 1986:37-41.

Liu J, Magalhaes J V., Shaff J, Kochian L V. Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. Plant J. 2009;57(3):389-399.

Liu MY, Chen WW, Xu JM, Fan W, Yang JL, Zheng SJ. The role of *VuMATE1* expression in aluminium-inducible citrate secretion in rice bean (*Vigna umbellata*) roots. J Exp Bot. 2013;64(7):1795-1804.

Liu J, Li Y, Wang W, Gai J, Li Y. Genome-wide analysis of MATE transporters and expression patterns of a subgroup of MATE genes in response to aluminum toxicity in soybean. BMC Genomics, 2016; 17, 223.

Liu MY, Lou HQ, Chen WW, et al. Two citrate transporters coordinately regulate citrate secretion from rice bean root tip under aluminum stress. Plant Cell Environ. 2018;41(4):809-822.

Ma JF, Zheng SJ, Matsumoto H, Hiradate S. Detoxifying aluminium with buckwheat. Nature. 1997;390(6660):569-570.

Ma JF, Hiradate S, Nomoto K, Iwashita T, Matsumoto H. Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea - Identification of Al form in the leaves. Plant Physiol. 1997;113(4):1033-1039.

Ma JF. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. Plant Cell Physiol. 2000;41(4):383-390.

Ma JF, Ryan PR, Delhaize E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. Trends Plant Sci. 2001;6(6):273-278.

Machado S, Paulsen GM. Combined effects of drought and high temperature on water relations of wheat and sorghum. Plant Soil. 2001;233(2):179-187.

Magalhaes J V, Garvin DF, Wang Y, et al. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. Genetics. 2004;167(4):1905-1914.

Magalhaes J V, Liu J, Guimarães CT, et al. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. Nat Genet. 2007;39(9):1156-1161.

Marinova K, Pourcel L, Weder B, 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. Plant Cell. 2007;19(6):2023-2038.

Maron LG, Piñeros MA, Guimarães CT, 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 J.* 2010;61(5):728-740.

Marschner H. Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. *Plant Soil.* 1991;134(1):1-20.

Matsumoto H, Hirasawa E, Morimura S, Takahashi E. Localization of aluminium in tea leaves. 1976;631:627-631.

Mattiello L, Kirst M, da Silva FR, Jorge RA, Menossi M. Transcriptional profile of maize roots under acid soil growth. *BMC Plant Biol.* 2010;10(1):196.

McAleese F, Petersen P, Ruzin A, et al. A Novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(5):1865-1871.

McCormick RF, Truong SK, Sreedasyam A, et al. The *Sorghum bicolor* reference genome: improved assembly, gene annotations, a transcriptome atlas, and signatures of genome organization. *Plant J.* 2018;93(2):338-354.

Melo JO, Lana UGP, Piñeros MA, et al. Incomplete transfer of accessory loci influencing SbMATE expression underlies genetic background effects for aluminum tolerance in sorghum. *Plant J.* 2013; 73(2):276-288.

Minematsu T, Giacomini KM. (2011). Interactions of tyrosine kinase inhibitors with organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion proteins. *Mol C Therap*, 2011; 10(3), 531–9.

Miyasaka SC, Buta JG, Howell RK, Foy CD. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans root exudation of citric acid. *Plant Physiol.* 1991;96(3):737-743.

Morita Y, Kodama K, Shiota S, et al. NorM, putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(7):1778-1782.

Morita Y, Kataoka A, Shiota S, Mizushima T, Tsuchiya T. Multidrug Efflux Pump. *J Bacteriol.* 2000;182(23):6694-6697.

Morita A, Yanagisawa O, Takatsu S, Maeda S, Hiradate S. Mechanism for the detoxification of aluminum in roots of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). *Phytochemistry.* 2008;69(1):147-153.

Navakode S, Neumann K, Kobiljski B, Lohwasser U, Börner A. Genome wide association mapping to identify aluminium tolerance loci in bread wheat. *Euphytica.* 2014;198(3):401-411.

Nawrath C. EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell Online*. 2002;14(1):275-286.

Nguyen MH, Prince RGH. A simple rule for bioenergy conversion plant size optimization: Bioethanol from sugar cane and sweet sorghum. *Biomass and Bioenergy*. 1996;10(5-6):361-365.

Nies AT, Damme K, Schaeffeler E, Schwab M. Multidrug and toxin extrusion proteins as transporters of antimicrobial drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2012;8(12):1565-1577.

Ohyama Y, Ito H, Kobayashi Y, et al. Characterization of *AtSTOP1* orthologous genes in tobacco and other plant species. *Plant Physiol*. 2013;162(4):1937-1946.

Omote H, Hiasa M, Matsumoto T, Otsuka M, Moriyama Y. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27(11):587-593.

Pandey S., Somssich IE. The Role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol*. 2009;150:1648-1655.

Parry MAJ, Hawkesford MJ. Food security: Increasing yield and improving resource use efficiency. *Proc Nutr Soc*. 2010;69(4):592-600.

Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, et al. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature*. 2009;457(7229):551-556.

Prasad S, Singh A, Joshi HC. Ethanol production from sweet sorghum syrup for utilization as automotive fuel in India. *Energy and Fuels*. 2007;21(4):2415-2420.

Price HJ, Dillon SL, Hodnett G, Rooney WL, Ross L, Johnston JS. Genome evolution in the genus *Sorghum* (Poaceae). *Ann Bot*. 2005;95(1):219-227.

Proietti I, Frazzoli C, Mantovani A. Exploiting nutritional value of staple foods in the world's semi-arid areas: risks, benefits, challenges and opportunities of sorghum. *Healthcare*. 2015;3(2):172-193.

Ratnavathi CV, Patil JV. Sorghum utilization as food. *J Nutr Food Sci*. 2013;04(01).

R Core Team RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>. 2018.

Rengel Z. Disturbance of cell Ca<sup>2+</sup>homeostasis as a primary trigger of Al toxicity syndrome. *Plant Cell Environ*. 1992;15(8):931-938.

Rhodes DH, Hoffmann L, Rooney WL, et al. Genetic architecture of kernel composition in global sorghum germplasm. *BMC Genomics*. 2017;18(1):1-8.

Ribeiro AP, Souza WR, Martins PK, Vinecky F, Duarte KE, Basso, MF, et al. Overexpression of BdMATE Gene Improves Aluminum Tolerance in *Setaria viridis*. *Frontiers in Plant Science*, 2017;8, 865.

Rogers EE. FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online*. 2002;14(8):1787-1799.

Rogers EE, Wu X, Stacey G, Nguyen HT. Two MATE proteins play a role in iron efficiency in soybean. *J Plant Physiol*. 2009;166(13):1453-1459.

Rosenow DT, Quisenberry JE, Wendt CW, Clark LE. Drought tolerant sorghum and cotton germplasm. *Agric Water Manag*. 1983;7(1-3):207-222.

Saber NE, Abdel-Moneim AM, Barakat SY. Role of organic acids in sunflower tolerance to heavy metals. *Biol Plant*. 1999;42(1):65-73.

Sambrook J, Fritsch E. F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Ed. 2). 1989.

Samac D a, Tesfaye M. Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils - a review. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2003;75:189-207.

Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, et al. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J*. 2004;37(5):645-653.

Sawaki Y, Kihara-Doi T, Kobayashi Y, et al. Characterization of Al-responsive citrate excretion and citrate-transporting MATEs in *Eucalyptus camaldulensis*. *Planta*. 2013;237(4):979-989.

Schlunk, I., Krause, K., Wirth, S., & Kothe, E. (2015). A transporter for abiotic stress and plant metabolite resistance in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma vaccinum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), 19384–19393. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-4044-8>

Schmidhuber J, Tubiello FN. Global food security under climate change. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(50):19703-19708.

Schmittgen T D., Livak K J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 2001;25(4), 402–408.

Shiomi N, Fukuda H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A. Nucleotide sequence and characterization of a gene conferring resistance to ethionine in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ferment Bioeng*. 1991;71(4):211-215.

Shoji T, Inai K, Yazaki Y, Sato Y, Takase H, et al. Multidrug and toxic compound extrusion-type transporters implicated in vacuolar sequestration of nicotine in tobacco roots. *Plant Physiology*, 2008;149(2), 708–718.

Silva-Navas J, Benito C, Téllez-Robledo B, Abd El-Moneim D, Gallego FJ. The ScAACT1 gene at the Q Alt5 locus as a candidate for increased aluminum tolerance in rye (*Secale cereale L.*). *Molecular Breeding*, 2012;30(2), 845–856.

Sivaguru M, Ezaki B, He Z-H, et al. Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2003;132:2256–2266.

Sivaguru M, Liu J, Kochian L V. Targeted expression of *SbMATE* in the root distal transition zone is responsible for sorghum aluminum resistance. *Plant J.* 2013;76(2):297-307.

Takanashi K, Yokosho K, Saeki K, et al. *LjMATE1*: A citrate transporter responsible for iron supply to the nodule infection zone of *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.* 2013;54(4):585-594.

Takanashi K, Shitan N, Yazaki K. The multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family in plants. *Plant Biotechnol.* 2014;31(5):417-430.

Tanaka Y, Hipolito CJ, Maturana AD, et al. Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. *Nature.* 2013;496(7444):247-251.

Tiwari M, Sharma D, Singh M, Tripathi RD, Trivedi PK. Expression of OsMATE1 and OsMATE2 alters development, stress responses and pathogen susceptibility in Arabidopsis. *Scientific Reports*, 2015;4(1), 3964.

Tsutsui T, Yamaji N, Feng Ma J. Identification of a Cis-Acting Element of ART1, a C2H2-Type Zinc-Finger Transcription Factor for Aluminum Tolerance in Rice. *Plant Physiol.* 2011;156(2):925-931.

Uexküll HR, Mutert E. Global Extent, Development and economic-impact of acid soils. *Plant Soil.* 1995;171:1-15.

Uhde-Stone C, Liu J, Zinn KE, Allan DL, Vance CP. Transgenic proteoid roots of white lupin: A vehicle for characterizing and silencing root genes involved in adaptation to P stress. *Plant J.* 2005;44(5):840-853.

Vardar F, Ünal M. Aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Adv Mol Biol.* 2007;1(1):1-12.

Wang J, Raman H, Zhou M, et al. High-resolution mapping of the Alp locus and identification of a candidate gene HvMATE controlling aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare L.*). *Theor Appl Genet.* 2007;115(2):265-276.

Wu KL, Wu KL, Guo ZJ, et al. The WRKY family of transcription factors in rice. *Gene.* 2005;26:9-26.

Wu X, Li R, Shi J, et al. *Brassica oleracea* MATE encodes a citrate transporter and enhances aluminum tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 2014;55(8):1426-1436.

Xia J, Yamaji N, Kasai T, Ma JF. Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(43):18381-18385.

Xu FJ, Li G, Jin CW, et al. Aluminum-induced changes in reactive oxygen species accumulation, lipid peroxidation and antioxidant capacity in wheat root tips. *Biol Plant*. 2012;56(1):89-96.

Yamaji N, Huang CF, Nagao S, et al. A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell*. 2009;21(10):3339-3349.

Yokosho K, Yamaji N, Ueno D, Mitani N, Ma JF. *OsFRDL1* is a citrate transporter required for efficient translocation of iron in rice. *Plant Physiol*. 2009;149(1):297-305.

Yokosho K, Yamaji N, Ma JF. Isolation and characterization of two MATE genes in rye. *Funct Plant Biol*. 2010;37(4):296-303.

Yokosho K, Yamaji N, Ma JF. An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. *Plant J*. 2011;68(6):1061-1069.

Yokosho K, Yamaji N, Fujii-Kashino M, Ma, JF. Functional analysis of a mate gene *OsFRDL2* revealed its involvement in al-induced secretion of citrate, but a lower contribution to al tolerance in rice. *Plant and Cell Physiology*, 2016;57(5), 976–985.

Zhao J, Dixon RA. (2009). MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-o-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*. *Plant Cell online*, 2009;21(8): 2323–2340.

Zhang H, Zhu H, Pan Y, Yu Y, Luan S, Li L. A DTX/MATE-type transporter facilitates abscisic acid efflux and modulates ABA sensitivity and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Mol Plant*. 2014;7(10):1522-1532.

Zheng SJ, Ma JF, Matsumoto H. Continuous secretion of organic acids is related to aluminum resistance during relatively long-term exposure to aluminium stress. *Physiol Plant*. 1998;103(2):209-214.