

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral
Programa de Pós-graduação em Genética

Meire de Cassia Alves

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *SBMATE*
E ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA GENÉTICA PARA O AUMENTO DA
TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM SORGO**

Belo Horizonte
2021

Meire de Cassia Alves

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *SBMATE*
E ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA GENÉTICA PARA O AUMENTO DA
TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM SORGO**

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Genética.

Orientador: Dr. Jurandir Vieira Magalhães

Coorientadora: Dra. Andréa Almeida
Carneiro

Belo Horizonte
2021

- 043 Alves, Meire de Cassia.
Caracterização funcional da região promotora do gene SbMATE e estratégias de engenharia genética para o aumento da tolerância ao alumínio em sorgo [manuscrito] / Meire de Cassia Alves. – 2021.
94 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Dr. Jurandir Vieira Magalhães. Coorientadora: Dra. Andréa Almeida Carneiro.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.
1. Engenharia Genética. 2. Sorgo. 3. Alumínio. 4. Acidez do Solo. 5. Ácidos Orgânicos. I. Magalhães, Jurandir Vieira. II. Carneiro, Andréa Almeida. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Caracterização funcional da região promotora do gene SbMATE e estratégias de engenharia genética para o aumento da tolerância ao alumínio em sorgo"

Meire de Cassia Alves

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Jurandir Vieira Magalhães
Embrapa Milho e Sorgo

Andréa Almeida Carneiro
Embrapa Milho e Sorgo

Wagner Luiz Araújo
Universidade Federal de Viçosa

Cláudia Teixeira Guimarães
Embrapa Milho e Sorgo

Marcel Giovanni Costa França
UFMG

Ubiraci Gomes de Paula Lana
Embrapa Milho e Sorgo

Vanessa de Almeida Barros
Embrapa Milho e Sorgo

Belo Horizonte, 01 de outubro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Teixeira Guimarães, Usuário Externo**, em 01/10/2021, às 17:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ubiraci Gomes de Paula Lana, Usuário Externo**, em 01/10/2021, às 17:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa de Almeida Barros, Usuário Externo**, em 01/10/2021, às 17:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jurandir Vieira de Magalhaes, Usuário Externo**, em 01/10/2021, às 17:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andréa Almeida Carneiro, Usuário Externo**, em 01/10/2021, às 19:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcel Giovanni Costa Franca, Professor do Magistério Superior**, em 01/10/2021, às 20:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wagner Luiz Araújo, Usuário Externo**, em 04/10/2021, às 13:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0994541** e o código CRC **820479C7**.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos, por todo amor, orações e por estarem sempre presentes, mesmo distantes. Ao meu marido, Thiago e minha filha, Isabella, com todo meu amor e gratidão. Amo muito todos vocês!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade e apoio.

A Embrapa Milho e Sorgo por todo o suporte técnico, científico e financeiro.

Ao meu orientador, Dr. Jurandir Magalhães, muito obrigada pela confiança, paciência, disponibilidade em me orientar e por todo o aprendizado ao longo desses anos.

À Dra. Andréa Carneiro pela coorientação, apoio, amizade e contribuições imprescindíveis para a execução desse trabalho.

Aos membros da banca, Dras. Cláudia Guimarães e Vanessa Barros, Drs. Marcel França, Wagner Araújo e Ubiraci Lana, muito obrigada pela disponibilidade e contribuição com o trabalho.

As meninas do Laboratório de Biologia Celular, que tanto me ajudaram ao longo desses anos, especialmente Rayane e Gleyce pela grande ajuda e dedicação ao projeto.

Aos funcionários da Embrapa que trabalham nas casas de vegetação do NBA, obrigada por todo o apoio e ajuda nos experimentos.

Aos amigos do Núcleo de Biologia Aplicada, pesquisadores, técnicos, analistas e estudantes. Agradeço pelo companheirismo, amizade e apoio desde o início dessa caminhada, por me incentivarem a persistir e não desistir de realizar o sonho do Doutorado.

À Bia, Bira e Marcão, pela amizade, apoio e grande ajuda na realização desse projeto.

Aos meus amigos por todo o carinho e apoio sempre, Carol, Dali, Ticina, Michelle, Fernanda, Tia Sybelli, Gabriel e Roberta. Obrigada por todo o incentivo e amizade!

Ao meu marido Thiago, obrigada por todo o amor, companheirismo, força e por estar sempre ao meu lado, apoiando e incentivando em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis. Amo muito você.

À minha filha, Isabella, apesar de ainda não tê-la em meus braços, sinto todo o seu amor ao longo desses últimos meses. Você me deu tanta força, minha pequena. Te amo demais!

À minha família (meus pais: Nascimento e Divina; meus irmãos: Marco, Márcio e Márcia; meus sobrinhos) pelo apoio, amor e dedicação sempre oferecidos! Obrigada por acreditarem em mim. Amo muito vocês.

A todos aqueles que contribuíram para minha evolução profissional e pessoal nesses cinco anos de doutorado.

Todo o meu amor e gratidão. Muito obrigada!

RESUMO

A toxidez causada pelo alumínio (Al) é uma das principais restrições ao aumento da produtividade agrícola em solos ácidos com $\text{pH} < 5,0$, que representam cerca de 50% das áreas potencialmente agricultáveis do mundo. A exclusão do Al por meio da liberação de ácidos orgânicos pelos ápices radiculares é o principal mecanismo fisiológico de tolerância ao Al em plantas. Os ácidos orgânicos liberados têm a capacidade de quelar o Al, formando complexos estáveis que não são absorvidos pelas raízes, reduzindo ou anulando os efeitos tóxicos do Al nas plantas. O primeiro gene de tolerância ao Al identificado em plantas foi o gene *TaALMT1* (*Triticum aestivum aluminum-activated malate transporter 1*), isolado em trigo. Esse gene codifica um transportador de membrana ativado por Al, ALMT1, que medeia o efluxo de malato através das células do ápice radicular para a rizosfera. A tolerância ao Al em sorgo é conferida por uma proteína transportadora da família *multidrug and toxic compound extrusion* family, *SbMATE*, via liberação de citrato ativada por Al em células do ápice radicular. Polimorfismos localizados na região promotora do gene *SbMATE* contém elementos *cis*-regulatórios que estão envolvidos no seu controle transcricional. Nessa região, polimorfismos do tipo inserção/deleção dão origem a repetições que incluem um transposon MITE e sequências que o flanqueiam. O capítulo 1 desta tese teve como objetivo caracterizar funcionalmente a região promotora do gene *SbMATE* de sorgo e elucidar o papel de elementos regulatórios atuando em *cis* nos mecanismos moleculares envolvidos na modulação da expressão do gene *SbMATE* e na tolerância ao Al. Embriões de milho foram transformados com vetores contendo fusões transcricionais de diferentes alelos da região promotora do gene *SbMATE* dirigindo a expressão do gene repórter, *GUS*. A expressão e a atividade do gene *GUS* foram analisadas por meio de qRT-PCR e ensaio histoquímico. Maior expressão do gene *GUS* foi observada nos transgênicos que contém cinco cópias da região repetitiva, que inclui o transposon MITE (p5MITE), em comparação com as outras construções gênicas. Ensaio histoquímico demonstraram que a construção p5MITE dirigiu a expressão do gene *GUS* para o ápice das raízes principal e laterais e também ao longo do sistema radicular. Também foi verificada a funcionalidade de uma região proximal do promotor, que não contém as inserções MITE. O segundo capítulo teve como objetivo avaliar se a expressão do gene *TaALMT1*, que confere tolerância ao Al em trigo, seria capaz de aumentar a tolerância ao Al em plantas transgênicas de sorgo super expressando o gene *TaALMT1*. Os resultados demonstram que a superexpressão do gene *TaALMT1* em plantas de sorgo transgênicas aumentou o efluxo de malato e a tolerância ao Al, podendo ser usada para alcançar melhorias adicionais na tolerância ao Al em sorgo.

Palavras-chave: Solos ácidos. Elementos *cis*-regulatórios. Tolerância ao Al. Transposon MITE. *SbMATE*. *TaALMT1*.

ABSTRACT

The toxicity caused by aluminum (Al) is one of the main restrictions to agricultural production in acidic soils with pH < 5.0 which represent approximately 50% of the world's potentially arable land. Al exclusion from the root apices mediated by organic acid release is the main physiological mechanism of Al tolerance in plants. Once released into the rhizosphere, organic acids have the ability to chelate Al, forming stable complexes that are not absorbed by the roots, thus conferring Al tolerance. The first Al tolerance gene identified in plants was the wheat Al tolerance gene *TaALMT1* (*Triticum aestivum aluminum-activated malate transporter 1*). This gene encodes an Al-activated membrane transporter, ALMT1, which mediates the efflux of malate through cells from the root apex to the rhizosphere. Al tolerance in sorghum is conferred by the *multidrug and toxic compound extrusion* family protein, *SbMATE*, via Al-induced and Al-activated citrate release from cells in the root apex. Polymorphisms located in the promoter region of *SbMATE*, contain *cis*-regulatory elements that are involved in transcriptional control of *SbMATE*. In this region, insertion/deletion polymorphisms give rise to tandem repeats that include a MITE transposon and its flanking sequences. Chapter 1 of this thesis aimed at functionally characterizing the promoter region of *SbMATE* and elucidating the role of *cis* elements influencing *SbMATE* expression and Al tolerance. Maize embryos were transformed with vectors containing transcriptional fusions of different alleles of the promoter region of *SbMATE* driving expression of the *GUS* reporter gene. Reporter gene expression and *GUS* activity were analyzed by qRT-PCR and histochemical assay. Greater *GUS* expression was observed in events that contain five copies of the repetitive region, which includes the MITE transposon (p5MITE), relative to other gene constructs. The histochemical assay demonstrated that this construct directed *GUS* expression to the apex of the main root and lateral roots and root system. A construct harboring a proximal promoter fragment, which does not contain the MITE inserts, was also shown to be functional. The second chapter aimed at verifying whether overexpression of the *TaALMT1* gene, which confers Al tolerance in wheat, would increase Al tolerance in transgenic sorghum plants. The results demonstrate that overexpression of *TaALMT1* in genetically modified sorghum plants increased malate efflux and Al tolerance. This strategy can thus be used to achieve further improvements in sorghum Al tolerance.

Keywords: Acidic soils. *Cis*-regulatory elements. Al tolerance. MITE transposon. *SbMATE*. *TaALMT1*.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Estrutura da região promotora do gene *SbMATE* de sorgo22

CAPÍTULO 1

Figura 1: Representação esquemática das sete versões da região promotora do gene *SbMATE* de sorgo37

Figura 2: Representação da construção gênica com as sete versões da região promotora do gene *SbMATE* controlando a expressão do gene repórter *GUS*.....38

Figura 3: Representação esquemática das etapas de transformação genética de milho Hill via *Agrobacterium tumefaciens*40

Figura 4: Metodologia de coleta de ápices radiculares após estresse de Al em solução hidropônica para análise de RT-qPCR.....43

Figura 5: Representação esquemática das etapas de fixação dos transgênicos em casa de vegetação.....44

Figura 6: Análise da expressão relativa do gene *GUS* no ápice radicular de transgênicos da geração F2, após 24h em solução nutritiva, pH 4.0, na presença de {39} μM de Al.....48

Figura 7: Número de cópias do transgene após análise de qPCR do gene *GUS* em transgênicos de milho p5MITE e pFm0MITE da geração F3.....50

Figura 8. Análise da expressão relativa do gene *GUS* nos transgênicos pSbMATE fixados para os transgenes, via técnica de RT-qPCR52

Figura 9. Média de expressão do transgene *GUS* nos transgênicos pSbMATE em homozigose por meio de RT-qPCR.....54

Figura 10: Análise histoquímica da expressão do transgene *GUS* em raízes de eventos p5MITE e p0MITE na geração F3.....57

Figura suplementar 1: Análise molecular via PCR de calos embriogênicos pSbMATE

para o gene *bar*.....68

Figura suplementar 2: Análise de PCR realizada em transgênicos pSbMATE na geração F4 utilizando iniciadores específicos para cada construção gênica.....69

CAPÍTULO 2

Figura 1: Mean root growth of sorghum plants after 5 days in nutrient solution in the presence or absence of {27µM} Al⁺³85

Figura 2: Assessment of Al tolerance of sorghum plants harboring the TaALMT1 gene under the control of the ubiquitin maize promoter after 5 days in the presence of {27} µM Al86

Figura 3: Frequency distribution for RRG values in progeny of ALMTI-S1 and ALMTI-S2 sorghum transgenic events cultivated in nutrient solution with {27} µM Al at pH 4.0 for five days.....87

Figura 4: Molecular characterization of the transgenic event ALMT1-S2.....88

Figura 5: HPLC chromatograms of root exudates from ALTM1-S2, non-transgenic CMSXS102B and the Al tolerant line, SC566, cultivated in in the presence of {27} µM Al⁺³89

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Análise de qui-quadrado dos transgênicos pSbMATE após avaliação da segregação em casa de vegetação.....	47
Tabela suplementar 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos experimentos..	66
Tabela suplementar 2: Teste de progênie nos transgênicos pSbMATE selecionados para a geração F4.....	67

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
Toxidez do alumínio em solos ácidos	15
Mecanismos fisiológicos de tolerância ao alumínio	16
Mecanismos genéticos de tolerância ao alumínio	18
Regulação transcricional dos genes de tolerância ao alumínio	20
Elementos <i>cis</i> -regulatórios	21
Transposons MITE (Miniature inverted-repeat transposable elements)	23
REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO 1: Caracterização funcional da região promotora do gene <i>SbMATE</i> de sorgo em plantas geneticamente modificadas de milho.....	39
INTRODUÇÃO	40
MATERIAL E MÉTODOS	41
Síntese de diferentes versões da região promotora do gene <i>SbMATE</i> de sorgo e clonagem no gene repórter <i>GUS</i>	41
Transformação genética de embriões imaturos de milho Hill via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	42
Preparo da <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43
Transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43
Seleção e regeneração das plantas transgênicas	44
Análise dos transgênicos na geração T0	44
Quantificação da expressão do gene repórter <i>GUS</i> nos transgênicos de milho na geração F2.....	45
Fixação dos transgênicos.....	47
Deteção da atividade da enzima β -glucuronidase (<i>GUS</i>)	48
Genotipagem dos transgênicos de milho na geração F4	48

Quantificação da expressão do gene repórter <i>GUS</i> nos transgênicos de milho em homozigose para os transgenes	49
RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
Transformação genética de milho Hill via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	49
Quantificação da expressão do gene repórter <i>GUS</i> nos transgênicos de milho da geração F2	50
Fixação dos transgênicos	53
Análise do número de cópias dos transgenes	53
Genotipagem dos transgênicos de milho na geração F4	54
Quantificação da expressão do gene repórter <i>GUS</i> nos transgênicos em homozigose para os transgenes.....	55
Detecção da atividade da enzima β -glucuronidase (<i>GUS</i>)	60
CONCLUSÕES.....	62
PERSPECTIVAS FUTURAS	63
REFERÊNCIAS	64
MATERIAL SUPLEMENTAR	70
CAPÍTULO 2: Overexpression Of The Wheat Gene <i>TaALMT1</i> Increases Aluminum Resistance In Sorghum	74
ABSTRACT	75
INTRODUCTION	75
MATERIAL AND METHODS	77
Plant material	77
Expression vector	77
Microparticle bombardment	78
DNA isolation and polymerase chain reaction (PCR)	78
Hydroponic analysis of Al tolerance	79
<i>TaALMT1</i> expression analysis and copy number in sorghum transgenic events	80

Root exudates and organic acid determination by HPLC	81
RESULTS AND DISCUSSION	81
ACKNOWLEDGEMENTS	84
REFERENCES	85

INTRODUÇÃO

1. Toxidez do alumínio em solos ácidos

A agricultura em regiões tropicais e subtropicais do planeta é crítica para a segurança alimentar mundial. Entretanto, a produção agrícola nessas áreas é limitada por diferentes fatores que causam estresses abióticos, destacando-se os estresses causados pela seca e pela toxidez por alumínio (Al). A toxidez causada pelo Al é uma das principais restrições ao aumento da produtividade agrícola em solos com $\text{pH} < 5,0$ (i.e. solos ácidos), que representam cerca de metade das áreas potencialmente agricultáveis do mundo. Aproximadamente 38% dessas áreas localizam-se no sudeste da Ásia, 31% estão na América Latina e 20% no Leste Asiático, incluindo também regiões na África sub-saariana e América do Norte (von Uexküll; Mutert, 1995; Schmitt et al., 2016).

O Al é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais comum da crosta terrestre, representando 7% da sua constituição. Sua solubilidade é dependente do pH do solo. Sob condições de pH levemente ácido ou neutro, grande parte do Al é precipitado na forma de óxidos de Al e aluminossilicatos, que não são fitotóxicos às raízes das plantas (Kochian, 1995; Ma et al., 2001; Vardar; Ünal, 2007). Porém, sob condições de pH ácido, o que pode resultar de atividades antrópicas ou processos naturais na formação dos solos, como intemperismo, o Al é solubilizado na rizosfera nas formas iônicas $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, $\text{Al}(\text{OH})_2^{2+}$ e $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, sendo a forma do cátion trivalente (Al^{3+}) a mais fitotóxica (Kinraide et al., 1992; Delhaize; Ryan, 1995; Ma et al., 2001).

Alterações nos processos metabólicos das raízes podem ser observadas após poucos minutos de exposição a concentrações micromolares de Al, inibindo o crescimento radicular das plantas sensíveis e causando efeitos secundários (Kochian, 1995; Ma, 2007; Kochian et al., 2015). A toxidez ocasionada pelo Al ocorre devido a fortes interações entre o metal com alvos presentes no apoplasto, na membrana plasmática e no citosol, levando à restrição de uma ampla gama de processos moleculares e celulares e, como consequência, causando redução da produtividade agrícola (Kochian et al., 2005; Kochian et al., 2015).

Os efeitos da toxidez de Al em plantas incluem a redução do crescimento das raízes e dos pelos radiculares, alterando assim a morfologia da raiz; alterações na estabilidade e na rigidez da parede celular e no transporte da membrana plasmática; modificações nas vias de transdução de sinais; produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) na mitocôndria, cloroplasto e peroxissomos, que podem causar danos nos componentes celulares e induzir o estresse oxidativo; alterações no ciclo de divisão celular; desbalanço nutricional, afetando a absorção de água e nutrientes como Ca^{2+} , P, Mg^{2+} , K^+ , NH_4^+ dentre outros cátions

(Yamamoto et al., 2002; Kochian et al., 2004; Doncheva et al., 2005; Kochian, 2005; Sade et al., 2016).

Nesse sentido, nas últimas décadas, diversos estudos de diversidade genética vem sendo realizados em programas de melhoramento com o objetivo de buscar fontes de tolerância ao Al que possam contribuir com o aumento da tolerância a esse metal e, assim, diminuir os danos causados na produção das principais culturas agrícolas cultivadas em regiões tropicais e subtropicais do planeta (Kochian et al., 2015).

1.1 Mecanismos fisiológicos de tolerância ao alumínio

Os mecanismos genéticos e fisiológicos da tolerância ao Al em plantas são complexos. Esses mecanismos são decorrentes da seleção ao longo do processo evolutivo, e possibilitam que as culturas se desenvolvam em condições de solos ácidos (Huang et al., 2009). Compreender a natureza desses mecanismos de tolerância é fundamental para o progresso das pesquisas na área de fisiologia do estresse (Ma et al., 2001).

As principais estratégias de tolerância ao Al são o mecanismo de detoxificação interna (simplástico) e o mecanismo de exclusão do metal das células vegetais (apoplástico) (Kochian et al., 2004; Hiradate et al., 2007). No mecanismo simplástico, o Al é detoxificado internamente por meio da formação de complexos estáveis, que são sequestrados em compartimentos subcelulares. O mecanismo apoplástico impede que os íons Al^{3+} entrem nas células do ápice radicular por meio da ação de compostos orgânicos que vão quelar o Al na rizosfera (Kochian, 1995; Ma et al., 1997; Kochian et al., 2015).

No mecanismo de detoxificação interna, o Al é quelado no citosol por ácidos orgânicos ou outros compostos orgânicos, formando complexos estáveis, que são compartimentalizados em vacúolos, reduzindo a atividade de Al livre no citosol e impedindo a sua ação tóxica (Ma, 2000; Ma et al., 2001; Kochian, 2005; Ryan; Dehaize, 2010). Este mecanismo é relatado principalmente em espécies endêmicas encontradas em regiões de solos ácidos, onde a capacidade de conviver com a toxidez de Al é um pré-requisito para sua sobrevivência (Ryan; Dehaize, 2010). O mecanismo apoplástico, também denominado de exclusão do Al, inclui a liberação de compostos fenólicos, formação de mucilagem, aumento do pH da rizosfera e exsudação de ácidos orgânicos (Kochian, 1995; Degenhardt et al., 1998; Miyasaka; Hawes, 2001; Ofei-Manu et al., 2001).

A exclusão do íon Al^{3+} por meio da exsudação de ácidos orgânicos pelos ápices radiculares é o principal mecanismo fisiológico de tolerância ao Al em plantas (Kochian et al., 2004). Raízes de diversas plantas liberam ácidos orgânicos em resposta ao estresse de Al, por meio de transportadores específicos presentes na membrana plasmática (Ma, 2000;

Ryan et al., 2001). Os ácidos orgânicos comumente exsudados são o citrato, o malato e o oxalato (Ma et al., 2001).

O malato é liberado pelas raízes de cultivares de trigo (*Triticum aestivum*) (Delhaize et al., 1993) e *Arabidopsis thaliana* (Hoekenga et al., 2003; Liu et al., 2009) tolerantes ao Al. O citrato é exsudado pelas raízes de cultivares tolerantes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) (Miyasaka et al., 1991), milho (*Zea mays*) (Pellet et al., 1995), soja (*Glycine max*) (Yang et al., 2001), sorgo (*Sorghum bicolor*) (Magalhaes et al., 2007) e cevada (*Hordeum vulgare*) (Furukawa et al., 2007; Wang et al., 2007). O oxalato é liberado pelas raízes de *Colocasia esculenta* (Ma; Miyasaka, 1998) e *Fagopyrum esculentum* (Ma et al., 1997), por exemplo. Algumas espécies vegetais tolerantes ao Al têm a capacidade de liberar mais de um ácido orgânico, como triticale (*Triticosecale wittmack*), colza (*Brassica napus*), aveia (*Avena sativa*), rabanete (*Raphanus sativus*), centeio (*Secale cereale*), trigo e *Arabidopsis*, que são capazes de exsudar os ácidos orgânicos malato e citrato (Zheng et al., 1998; Li et al., 2000; Ma et al., 2000).

Estudos realizados na década de 80 e início de 90 relacionados com os mecanismos fisiológicos de tolerância ao Al em feijão e trigo demonstraram uma correlação positiva entre a exsudação de ácidos orgânicos nas raízes (citrato e malato em feijão e malato em trigo) e o aumento da tolerância ao Al (Kitagawa, 1986; Miyasaka et al., 1991; Delhaize et al., 1993). Outros estudos em monocotiledôneas e dicotiledôneas identificaram correlações semelhantes entre a tolerância ao Al e a exsudação radicular de ácidos orgânicos dependente de Al, sugerindo a importância desse mecanismo de tolerância em diversas espécies (Kochian et al., 2015).

Posteriormente, foi demonstrada a existência de proteínas transportadoras presentes na membrana plasmática das células radiculares que são ativadas por íons Al^{3+} , e que são permeáveis a formas aniônicas de ácidos orgânicos (Kollmeier et al., 2001; Piñeros; Kochian, 2001; Sasaki et al., 2004; Kochian et al., 2015). Estes estudos comprovaram que membros de duas famílias de transportadores de membrana, ALMT1 (*Aluminum-activated malate transporter 1*) (Sasaki et al., 2004) e MATE (*Multidrug and toxic compound extrusion*) (Magalhaes et al., 2007; Furukawa et al., 2007) são responsáveis pelo efluxo radicular de malato e citrato, respectivamente, em resposta ao Al.

Os ácidos orgânicos liberados na rizosfera, em resposta ao estresse causado por Al, têm a capacidade de quelar os íons Al^{3+} , formando complexos estáveis, não fitotóxicos e que não são absorvidos pelas raízes, reduzindo ou anulando os efeitos tóxicos do Al nas plantas (Ma et al., 2001; Kochian, 2005).

1.2 Mecanismos genéticos de tolerância ao alumínio

Em genótipos de determinadas espécies, grande parte da variabilidade genotípica no que se refere aos mecanismos de tolerância ao Al é controlada por apenas um ou dois locos genéticos, como em trigo (Ma et al., 2005; Raman et al., 2005; Ryan et al., 2009), cevada (Furukawa et al., 2007; Wang et al., 2007), *Arabidopsis* (Hoekenga et al., 2003), centeio (Collins et al., 2008) e sorgo (Magalhaes et al., 2004). Em outras espécies, como no arroz, essa característica é mais complexa, envolvendo múltiplos genes e mecanismos de detoxificação do Al (Yamaji et al., 2009; Delhaize et al., 2012).

O controle genético da tolerância ao Al baseado na exsudação de malato se deve à ação de genes que codificam transportadores de malato ativados por Al, pertencentes a família ALMT1. Embora a exsudação de ácidos orgânicos em resposta ao Al tenha sido descrita anteriormente (Kitagawa, 1986), Sasaki et al. (2004) identificaram e caracterizaram em trigo o primeiro gene de tolerância ao Al em plantas, o gene *TaALMT1* (*Triticum aestivum aluminum-activated malate transporter 1*). Este gene está localizado no loco de tolerância ao Al denominado *Alt_{BH}* (*Aluminum tolerance*), mapeado no cromossomo 4DL (Riede; Anderson, 1996). A caracterização funcional do gene *TaALMT1* demonstrou que esse gene codifica uma proteína transportadora de membrana ativada por Al, ALMT1, que medeia o efluxo do ácido orgânico malato pelas células do ápice radicular para a rizosfera (Sasaki et al., 2004; Yamaguchi et al., 2005; Delhaize et al., 2007).

Embora o gene *TaALMT1* seja constitutivamente expresso em linhagens de trigo tolerantes ao Al, a atividade basal do transportador é aumentada na presença de íons Al³⁺, levando a um aumento da tolerância ao Al. Diversos estudos demonstraram que a expressão do gene *TaALMT1* em células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) *in vitro* (Sasaki et al., 2004; Zhang et al. 2008) e em oócitos de *Xenopus* (Piñeros et al., 2008), bem como em arroz (Sasaki et al., 2004), trigo (Pereira et al., 2010) e cevada transgênicos (Delhaize et al., 2004), conferiu um aumento no efluxo de malato e na tolerância ao Al.

Outros genes homólogos pertencentes a família ALMT1 foram posteriormente descritos e relacionados com a exsudação de malato e a tolerância ao Al em *Arabidopsis* (*AtALMT1*) (Hoekenga et al., 2006), colza (*BnALMT1* e *BnALMT2*) (Ligaba et al., 2006), centeio (*ScALMT*) (Collins et al., 2008) e cevada (*HvALMT1*) (Gruber et al., 2010).

A família de proteínas transportadoras MATE corresponde a um grupo diversificado de proteínas presentes em procariotos e eucariotos (Morita et al., 1998), amplamente conservada em diversos organismos, incluindo plantas superiores (Brown et al., 1999). Os transportadores da família MATE em plantas estão envolvidos em uma ampla gama de eventos biológicos, incluindo efluxo de agentes xenobióticos, translocação de ferro no xilema e efluxo de citrato relacionado com a tolerância ao Al (Takanashi et al., 2014).

Os genes que codificam os transportadores da família MATE, responsáveis pela exsudação de citrato pelas raízes em resposta ao estresse causado por íons Al^{3+} , foram primeiramente identificados em sorgo (*SbMATE*) (Magalhaes et al., 2007) e cevada (*HvAACT1-Aluminum-activated citrate transporter 1*) (Furukawa et al., 2007). Posteriormente, homólogos MATE foram caracterizados em *Arabidopsis* (*AtMATE1*) (Liu et al., 2009), milho (*ZmMATE1*) (Maron et al., 2010), trigo (*TaMATE1*) (Ryan; Delhaize, 2010), feijão-arroz (*Vigna umbellata*) (*VuMATE1*) (Yang et al., 2011) e arroz (*OsFRD1*) (Yokosho et al., 2011). Estudos evidenciaram uma correlação positiva entre a expressão desses genes, a exsudação de citrato liberado pelas células radiculares e o crescimento relativo das raízes na presença de Al (Furukawa et al., 2007; Magalhaes et al., 2007; Sivaguru et al., 2013).

Em sorgo, Magalhaes et al. (2004) mapearam na região terminal do cromossomo 3 um loco responsável por 80% da variação fenotípica para tolerância ao Al, em uma população derivada do cruzamento da linhagem tolerante ao Al, SC283, com a linhagem sensível, BR007. Esse loco de tolerância foi denominado *Alt_{SB}*. Posteriormente, por meio da técnica de clonagem posicional em uma região de 24,6 kb do loco *Alt_{SB}*, foi possível isolar um gene de efeito maior envolvido na tolerância ao Al, o gene *SbMATE*, que codifica uma proteína transportadora de membrana pertencente à família multigênica MATE. *SbMATE* é expresso nas raízes de linhagens tolerantes expostas ao Al, com maior expressão localizada no primeiro centímetro da raiz, conferindo tolerância ao Al em sorgo (Magalhaes et al., 2007).

As proteínas das famílias ALMT1 e MATE são distintas, sugerindo que esses transportadores evoluíram de maneira convergente para realizar mecanismos fisiológicos semelhantes de tolerância ao Al (Magalhaes et al., 2007). Ou seja, o mesmo fenótipo (tolerância ao Al) é obtido por mecanismos semelhantes (exsudação de ácidos orgânicos por ápices radiculares), por meio da ação de transportadores de diferentes famílias, podendo, em alguns casos, coexistirem na mesma espécie. Este é um exemplo notável de co-evolução funcional da tolerância ao Al por dois transportadores que são estrutural e funcionalmente distintos e são a base da detoxificação do Al tóxico na rizosfera (Delhaize et al., 2007; Liu et al., 2009; Ryan; Delhaize, 2010; Kochian et al., 2015).

Além dos genes que codificam transportadores de ácidos orgânicos, outros genes também foram associados com a tolerância ao Al em plantas (Kochian et al., 2015). Estudos em arroz demonstraram que o transportador *Nrat1*, pertencente a família de proteínas transportadoras *Nramp* (*Natural resistance-associated macrophage protein*), está localizado na membrana plasmática de células radiculares de arroz e desempenha uma importante função removendo o Al da parede celular, com posterior compartimentalização em vacúolos intracelulares, por intermédio do transportador vacuolar *OsALS1* (transportador ABC - *ATP binding cassette*) (Xia et al., 2010; Huang et al., 2012).

Os genes *STAR1* e *STAR2* (*Sensitive to aluminum rhizotoxicity 1, 2*), pertencentes à família de transportadores ABC, também foram associados com a tolerância ao Al em arroz. O gene *STAR1* codifica uma proteína que contém um domínio de ligação a nucleotídeos, enquanto *STAR2* codifica uma proteína com domínio transmembrana (Huang et al., 2009). Estes genes são expressos principalmente na raiz e induzidos pelo estresse de Al e codificam proteínas que formam um complexo que funciona como um único transportador, que é fundamental para a tolerância ao Al em arroz (Huang et al., 2009).

Em *Arabidopsis thaliana* os genes *ALS1* e *ALS3* codificam proteínas transportadoras de membrana, que também pertencem a família de transportadores ABC, e estão relacionadas com o mecanismo de detoxificação interna de Al. O gene *ALS1* é expresso principalmente nos tecidos vasculares e no ápice radicular e está presente nas membranas vacuolares. O gene *ALS3* é expresso em diferentes órgãos, principalmente nas folhas e floema e está localizado na membrana plasmática (Larsen et al., 2005; Larsen et al., 2007).

1.3 Regulação transcricional dos genes de tolerância ao alumínio

Durante o processo evolutivo, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos para se adaptarem aos solos ácidos, e a maioria das espécies apresenta variabilidade genotípica em relação a tolerância ao Al (Matsumoto, 2000; Hiradate et al., 2007; Kochian et al., 2015).

A regulação da expressão gênica é modulada por diferentes mecanismos e em diferentes níveis, como grau de condensação da cromatina, metilação do DNA, atuação de elementos regulatórios e *splicing* alternativo do RNA (Wray et al., 2003; Fujii et al., 2012). No que se refere à modulação dos genes que têm relação com a tolerância ao Al, diversos mecanismos de regulação transcricional têm sido relatados, destacando-se os estudos de identificação e caracterização de fatores regulatórios.

Pesquisas têm demonstrado a ação de fatores de transcrição e elementos *cis*-regulatórios modulando a expressão de diversos genes de tolerância ao Al (revisado por Delhaize et al., 2012). Fatores de transcrição estão envolvidos nos mecanismos de tolerância ao Al de diversas culturas, e a maioria pertence às famílias de fatores de transcrição WRKY e *zinc finger* (Barros et al., 2020). Os fatores de transcrição STOP1 (*Sensitive to proton rhizotoxicity 1*) em *Arabidopsis* (Iuchi et al., 2007) e ART1 (*Aluminum resistance transcription factor 1*) em arroz (Yamaji et al., 2009), pertencentes à família de fatores de transcrição *zinc finger*, foram identificados em análises de mutantes tolerantes ao estresse de Al e caracterizados como fatores envolvidos na regulação dos genes que conferem tolerância ao Al.

Estudos em *Arabidopsis* evidenciaram que o fator de transcrição STOP1 atua na regulação positiva dos genes de tolerância ao Al *AtMATE1*, *AtALMT1* e *ALS3* (Liu et al.,

2009; Sawaki et al., 2009). A expressão do gene *STOP1* não é induzida por Al, sendo expresso de forma constitutiva, portanto, a via de transdução do sinal provavelmente envolve a ativação pós-traducional de *STOP1* (Iuchi et al., 2007; Kochian et al., 2015).

Em arroz, o fator de transcrição ART1, homólogo ao gene *STOP1* de *Arabidopsis*, é constitutivamente expresso na raiz (Yamaji et al., 2009). ART1 regula a atividade transcricional de aproximadamente 31 genes que estão relacionados com a tolerância ao Al, como os genes *STAR1* e *STAR2* (Yamaji et al., 2009), *Nrat1* (Xia et al., 2010), *OsFRDL4* (Yokosho et al., 2011) e *OsALS1* (Huang et al., 2012). Estudos indicam que ART1 interage com elementos *cis*-regulatórios presentes na região promotora de 29 dentre esses 31 genes (Yamaji et al., 2009; Tsutsui et al., 2011).

Em contrapartida, o fator de transcrição AtWRKY46 em *Arabidopsis* atua como um repressor transcricional do gene *AtALMT1* (Ding et al., 2013). A redução da expressão de *AtWRKY46* foi correlacionada com um aumento da expressão de *AtALMT1*, liberação de malato e tolerância ao Al em *Arabidopsis*.

Sequências regulatórias atuando em *cis*, como polimorfismos dentro de introns e em regiões promotoras, também atuam nos mecanismos de tolerância ao Al em plantas (Shi et al., 2012; Tovkach et al., 2013; Yokosho et al., 2016; Kashino-Fujii et al., 2018; Melo et al., 2019). Elementos *cis*-regulatórios estão envolvidos na regulação de genes de tolerância ao Al em trigo (Sasaki et al., 2006; Ryan; Delhaize, 2010; Tovkach et al., 2013), sorgo (Magalhaes et al., 2007; Melo et al., 2013), cevada (Fujii et al., 2012; Kashino-Fujii et al., 2018), *Holcus lanatus* (Chen et al., 2013) e arroz (Yokosho et al., 2016).

Os promotores de genes responsivos ao Al em genótipos tolerantes de trigo (gene *TaALMT1*), *Holcus lanatus* (*HALMT1*) e arroz (*OsFRDL4*) contém mais sítios de ligação para os fatores de transcrição *STOP1* e ART1 e exibem expressão mais elevada dos genes de tolerância ao Al em comparação com os genótipos sensíveis (Chen et al., 2013; Tokizawa et al., 2015; Yokosho et al., 2016).

1.4 Elementos *cis*-regulatórios

Diversos estudos têm demonstrado mecanismos relacionados com as diferenças genóticas na expressão de genes que conferem tolerância ao Al, destacando-se a atuação de elementos *cis*-regulatórios (Delhaize et al., 2012; Ma et al., 2014). Elementos *cis*-regulatórios estão localizados em regiões não codificantes do DNA e atuam na regulação da expressão de genes próximos ou distantes desses elementos. Mutações em regiões *cis*-regulatórias representam um importante fator evolutivo por modularem a atividade transcricional de vários genes (von Korff et al., 2009).

Em trigo, a região codificante do gene *TaALMT1* é conservada em linhagens tolerantes e sensíveis ao Al (Raman et al., 2005). Entretanto, a expressão constitutivamente maior de *TaALMT1* em linhagens tolerantes do que em linhagens sensíveis depende, em parte, de uma série de mutações *cis*-regulatórias presentes na região promotora de *TaALMT1*. O número de repetições de sequências *cis*-regulatórias foi correlacionado positivamente com o aumento da tolerância ao Al em plantas transgênicas contendo diferentes versões alélicas da região promotora do gene *TaALMT1* (Sasaki et al., 2006; Ryan; Dehaize, 2010).

Em arroz, a tolerância ao Al é uma característica complexa que envolve múltiplos mecanismos (Yamaji et al., 2009). Pelo menos 31 genes regulam esses mecanismos e são modulados pelo fator de transcrição ART1 (Yamaji et al., 2009; Tsutsui et al., 2011). Um importante *cis*-elemento ao qual se liga o fator de transcrição ART1 foi identificado na região promotora do gene *STAR1*, que confere tolerância ao Al em arroz. Da mesma forma, *cis*-elementos reconhecidos pelo fator de transcrição OsWRKY22 foram caracterizados em um transposon inserido na região promotora do gene *OsFRDL4* de arroz (Li et al., 2018).

Tovkach et al. (2013) demonstraram que a inserção de um transposon na região promotora do gene de trigo, *TaMATE1B*, alterou espacialmente a sua expressão, dirigindo-a para o ápice radicular. Este estudo demonstrou que o elemento transponível do tipo Sukkula está associado ao aumento da expressão do gene *TaMATE1B* em linhagens de trigo tolerantes ao Al.

O aumento da expressão do gene *HvAACT1* em ápices radiculares de genótipos de cevada tolerantes ao Al está associado com a inserção de um transposon CACTA de 1023 pb, localizado a 4.6 kb a montante da região codificadora do gene (Fujii et al., 2012). Esse polimorfismo atua aumentando a expressão do gene e, conseqüentemente, conferindo tolerância ao Al nos genótipos de cevada (Fujii et al., 2012; Ferreira et al., 2018). Foi constatado que a inserção do transposon ocorreu apenas em cultivares tolerantes ao Al originados do Japão, Coréia e China, sugerindo que a inserção promoveu adaptação aos solos ácidos dessas regiões (Fujii et al., 2012).

Recentemente, Kashino-Fujii et al. (2018) identificaram um outro mecanismo que regula a expressão do gene *HvAACT1* em acessos europeus de cevada, que é diferente do mecanismo relatado em acessos do Leste Asiático. Uma inserção semelhante a um multi retrotransposon (MRL) de pelo menos 15.3 kb foi detectada a 6.6 kb a montante de *HvAACT1* em acessos de cevada europeus, modulando a tolerância ao Al. Os resultados indicam que eventos adaptativos independentes em cevada ocorreram no Leste Asiático e na Europa para lidar com a toxidez ao Al em solos ácidos (Kashino-Fujii et al., 2018).

Segundo o trabalho de Chen et al. (2013), estudos em acessos de *Holcus lanatus*, espécie adaptada a solos ácidos, demonstraram que um aumento na expressão do gene

HALMT1 foi positivamente correlacionado ao número de elementos *cis*-regulatórios associados com o fator de transcrição ART1 que atua na modulação da expressão do gene e, conseqüentemente, no aumento da tolerância ao Al.

As mutações resultantes da atuação de elementos transponíveis associadas com os mecanismos de tolerância ao Al são eventos relativamente recentes no processo evolutivo dessas espécies e podem ter contribuído com a sua expansão em regiões de solos ácidos (Pereira; Ryan, 2019).

1.5 Transposons MITE (Miniature inverted-repeat transposable elements)

A inserção de um elemento transponível em uma região regulatória pode ocasionar a alteração da expressão de genes específicos (Feschotte, 2008). Nos transportadores de ácidos orgânicos que atuam na detoxificação de Al, a inserção de um transposon pode alterar a localização espacial da expressão gênica e, conseqüentemente, a tolerância ao Al. Transposons podem alterar a expressão gênica devido a vários efeitos, como a introdução de um novo *cis*-elemento e alteração do padrão de metilação do DNA (Sasaki et al., 2006; Fujii et al., 2012; Tovkach et al., 2013; Yokosho et al., 2016; Pereira; Ryan, 2019).

Elementos transponíveis atuando na modulação da expressão de genes relacionados com a tolerância ao Al foram identificados e caracterizados em culturas como sorgo, cevada, trigo, arroz, *Brachypodium distachyon* e centeio (Magalhaes et al., 2007; Fujii et al., 2012; Silva-Navas et al., 2012; Tovkach et al., 2013; Yokosho et al., 2016; Kashino-Fujii et al., 2018)

MITEs são elementos transponíveis não autônomos, caracterizados estruturalmente pelo seu tamanho pequeno, geralmente entre 50-500 pb, alto número de cópias, sequência rica em A/T e incapacidade de sintetizar transposases. Transposons MITE são compostos por um par de repetições terminais invertidas (TIRs, >10nt) que são flanqueadas por um par de sequências repetitivas diretas, denominadas TSDs (*Target site duplications*) que variam de 2 a 10 nucleotídeos. São encontrados, geralmente, em regiões genômicas transcricionalmente ativas ou dentro de regiões codificadoras, onde podem atuar alterando a expressão gênica (Feng, 2003; Yang et al., 2005; Ohmori et al., 2008; Kuang et al., 2009).

Transposons MITE desempenham um importante papel na evolução do genoma. Devido a sua associação com genes ou regiões gênicas específicas, como introns, exons, regiões UTRs e sequências promotoras, os elementos MITE podem alterar a estrutura, a expressão e/ou a função dos genes (Feschotte, 2008; Shirasawa et al., 2012). A localização próxima entre as inserções MITE e os genes adjacentes leva à hipótese de que esses transposons desempenham um importante papel na regulação da expressão gênica (Li et al., 2014).

Elementos MITE são abundantemente distribuídos nos genomas eucarióticos, incluindo plantas e animais. Em batata, um elemento MITE denominado *Stowaway* foi caracterizado como responsável pela variação fenotípica na cor da epiderme devido a uma inserção no primeiro exon do gene flavonóide 3',5'-hydroxylase (Momose et al., 2010). Estudos em *Brassica rapa* e *Brassica oleracea* demonstraram que inserções MITE desempenham papéis dinâmicos na evolução do seu genoma (Sampath et al., 2014).

Em sorgo, o estudo de Magalhaes et al. (2007) evidenciou diferenças na expressão do gene *SbMATE* e na tolerância ao AI entre as linhagens contrastantes SC283 e BR007, tolerante e sensível ao AI, respectivamente. O sequenciamento do loco *Alt_{SB}* demonstrou que a região codificadora do gene *SbMATE* é idêntica entre os alelos parentais, com polimorfismos encontrados apenas dentro de um dos introns. Entretanto, o sequenciamento da região promotora do gene *SbMATE* identificou polimorfismos localizados a 1,4 Kb à montante do TATA box predito do gene *SbMATE*. Nessa região, polimorfismos do tipo inserção/deleção dão origem a repetições que incluem um transposon MITE e as sequências que o flanqueiam.

A inserção MITE é composta pela região “b” (243 pb), a qual é flanqueada pelas regiões “a” (100 pb) e “c” (20 pb). Cada uma das regiões contendo o transposon MITE termina com um elemento imperfeito (“a”) que contém uma deleção de 8 pb ou 12 pb, dependendo do genótipo de sorgo (Figura 1) (Melo et al., 2019).

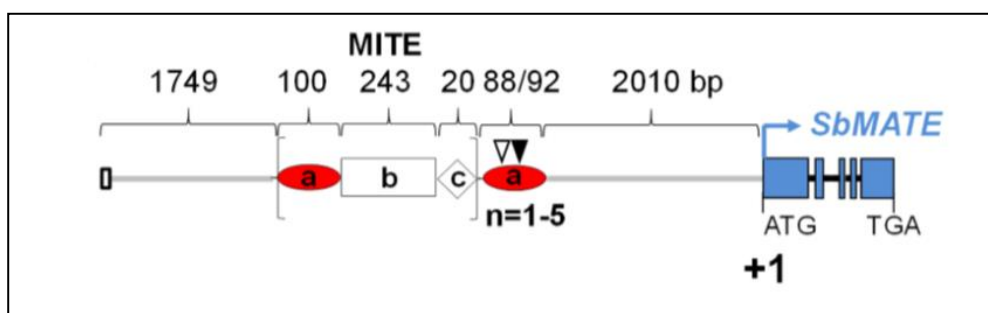


Figura 1. Estrutura da região promotora do gene *SbMATE* de sorgo. O elemento MITE contém 243 pb (unidade “b”), é flanqueado por uma sequência de 100 pb (unidade “a”) e por outra sequência de 20 pb (unidade “c”). A sequência repetitiva é formada pela estrutura a-b-c e é seguida por uma sequência única terminal de 100 pb, também denominada unidade “a” que pode apresentar uma deleção de 8 pb (representado por um triângulo preto invertido, presente nos genótipos SC283 e Tx430) ou uma deleção de 12pb (triângulo branco invertido, presente no genótipo BR012) (Melo et al., 2019).

A região da inserção MITE foi amplificada via PCR e a variação no tamanho desta região foi significativamente e positivamente correlacionada com a tolerância ao AI. Os resultados desse estudo sugerem que os polimorfismos localizados na sequência repetitiva contêm elementos de ação *cis* que podem estar envolvidos com o controle transcricional do gene *SbMATE* de sorgo (Caniato et al., 2007; Magalhaes et al., 2007; Melo et al., 2019).

No entanto, esses MITEs são responsáveis apenas por parte da variação na expressão do gene *SbMATE* (Melo et al., 2013). A introgressão do loco *Alt_{SB}*, onde está localizado o gene *SbMATE*, em linhagens isogênicas de sorgo resultantes do cruzamento entre o parental BR012 (sensível ao AI) e o parental SC566 (tolerante ao AI), contendo alelos tolerantes em homozigose, resultou numa redução da expressão do gene *SbMATE* e na tolerância ao AI nas linhagens introgrididas derivadas quando comparadas com os parentais, sugerindo que a expressão de *SbMATE* é regulada em múltiplos níveis. Embora os efeitos dos elementos *cis*-regulatórios sejam dominantes no controle da expressão do gene *SbMATE*, variação alélica em fatores transcricionais pode levar a alterações fenotípicas, dependendo do alelo do doador, reduzindo a expressão do gene e a tolerância ao AI. Os resultados sugerem que locos adicionais modulam a expressão de genes de tolerância ao AI, podendo se traduzir em interações epistáticas entre locos, convergindo para controlar um único mecanismo fisiológico centralizado (Melo et al., 2013).

No trabalho de Melo et al. (2019), a expressão global e alelo-específica do gene *SbMATE* foi avaliada com o objetivo de verificar os efeitos regulatórios atuando em *cis* e *trans* na expressão gênica. A detecção de um eQTL fora do loco *Alt_{SB}*, no cromossomo 9, levou à identificação de fatores em *trans* que modulam a atividade transcricional do gene *SbMATE*. A análise da região promotora desse gene no genótipo de sorgo SC283 (tolerante ao AI) mostrou que um fragmento se estendendo até a posição -2.102 pb em relação ao códon de início de *SbMATE* foi suficiente para a transativação dos *cis*-elementos pelos fatores de transcrição *SbWRKY1* e *SbZNF1*. Porém, a transativação foi perdida quando a região terminal de 92 pb do elemento MITE foi excluída (subunidade “a” - Figura 1). Foi demonstrado que os fatores de transcrição *SbWRKY1* e *SbZNF1* ligam-se nessa subunidade e na subunidade “a” dentro das repetições MITE, modulando a expressão do gene *SbMATE*.

Dessa forma, pode-se inferir que o número de repetições MITE se correlaciona com o aumento da atividade de transativação dos fatores de transcrição *SbWRKY1* e *SbZNF1*. Os resultados sugerem que quanto maior o número de repetições MITE, maior será o número de sítios de ligação dos fatores de transcrição e, conseqüentemente, maior expressão do gene *SbMATE* (Melo et al., 2019). Assim, sugere-se que as inserções MITE localizadas na região promotora do gene *SbMATE* atuam em conjunto com fatores de transcrição na regulação da expressão desse gene e, conseqüentemente, no aumento da tolerância ao AI em genótipos tolerantes de sorgo.

Embora a função do gene *SbMATE* esteja bem compreendida, os mecanismos transcricionais que envolvem os elementos *cis*-regulatórios e fatores atuando em *trans* não foram completamente elucidados, tornando-se fundamental a identificação e a

caracterização desses elementos presentes na região promotora do gene. A elucidação dos mecanismos envolvidos na regulação transcricional do gene *SbMATE* permitirá o aperfeiçoamento de estratégias biotecnológicas para mitigação das perdas da produção agrícola em condições de solos ácidos.

REFERÊNCIAS

Barros, V. A.; Chandnani, R.; Sousa, S. M.; Maciel, L. S.; Tokizawa, M.; Guimarães, C. T.; Magalhães, J. V.; Kochian, L. V (2020) Root Adaptation via Common Genetic Factors Conditioning Tolerance to Multiple Stresses for Crops Cultivated on Acidic Tropical Soils. **Frontiers in Plant Science 11**: 565339.

Brown, M. H.; Paulsen, I. T.; Skurray, R. A (1999) The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. **Molecular Microbiology 31**: 394-395.

Caniato, F. F.; Guimarães, C. T.; Schaffert, R. E.; Alves, V. M.; Kochian, L. V.; Borém, A.; Klein, P. E.; Magalhães, J. V (2007) Genetic diversity for aluminum tolerance in sorghum. **Theoretical and Applied Genetics 114**: 863-876.

Collins, N. C.; Shirley, N. J.; Saeed, M.; Pallotta, M.; Gustafson, J. P (2008) An ALMT1 gene cluster controlling aluminum tolerance at the Alt4 locus of rye (*Secale cereale* L.). **Genetics 179**: 669682.

Chen, Z. C.; Yokosho, K.; Kashino, M.; Zhao, F. J.; Yamaji, N.; Ma, J. F (2013) Adaptation to acidic soil is achieved by increased cis-acting element numbers regulating ALMT1 expression in *Holcus lanatus*. **Plant Journal 76**: 10-23.

Delhaize, E.; Ryan, P. R.; Randall, P. J (1993) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. **Plant Physiology 103**:695-702.

Delhaize, E.; Ryan, P. R (1995) Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology 107**: 315-321.

Delhaize, E.; Ryan, P. R.; Hebb, D. M.; Yamamoto, Y.; Sasaki, T.; Matsumoto, H (2004) Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences 101**:15249-54.

Delhaize, E.; Gruber, B. D.; Ryan, P. R (2007) The roles of organic anion permeases in aluminum resistance and mineral nutrition. **FEBS Letters 581**: 2255-2262.

Delhaize, E.; Ma, J. F.; Ryan, P. R (2012) Transcriptional regulation of aluminum tolerance genes. **Trends in Plant Science** 17: 6.

Degenhardt, J.; Jansen, P. B.; Howell, S. H.; Kochian, L. V (1998) Aluminum resistance in the *Arabidopsis* mutant alr-104 is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. **Plant Physiology** 117:19-27.

Ding ZJ, Yan JY, Xu XY, Li GX, Zheng SJ (2013) WRKY46 functions as a transcriptional repressor of ALMT1, regulating aluminum-induced malate secretion in *Arabidopsis*. **Plant Journal** 76: 825-35.

Doncheva, S.; Amenos, M.; Poschenrieder, C.; Barcelo, J (2005) Root cell patterning: a primary target for aluminum toxicity in maize. **Journal of Experimental Botany** 56: 1213-1220.

Feng, Y (2003) Plant MITEs: useful tools for plant genetics and genomics. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics** 1: 90-9.

Ferreira, J. R.; Minella, E.; Delatorre, C. A.; Delhaize, E.; Ryan, P. R.; Pereira, J. F (2018) Conventional and transgenic strategies to enhance the acid soil tolerance of barley. **Molecular Breeding** 38:12.

Feschotte, C (2008) Transposable elements and the evolution of regulatory networks. **Nature Reviews Genetics** 9: 397-405.

Furukawa, J.; Yamaji, N.; Wang, H.; Mitani, N.; Murata, Y (2007) An aluminum-activated citrate transporter in barley. **Plant Cell Physiology** 48:1081-9.

Fujii, M.; Yokosho, K.; Yamaji, N.; Saisho, D.; Yamane, M.; Takahashi, H.; Sato, K.; Nakazono, M.; Ma, J. F (2012) Acquisition of aluminum tolerance by modification of a single gene in barley. **Nature Communications** 3: 713.

Gruber, B. D.; Ryan, P. R.; Richardson, A. E.; Tyerman, S.D.; Ramesh, S.; Hebb, D. M.; Howitt, S. M.; Delhaize, E (2010) HvALMT1 from barley is involved in the transport of organic anions. **Journal of Experimental Botany** 61: 1455-1467.

Hiradate S, Ma JF, Matsumoto H (2007) Strategies of plants to adapt to mineral stresses in problem soils. **Advances in Agronomy** **96**: 65-132.

Hoekenga, O. A.; Vision, T. J.; Shaff, J. E.; Monforte, A. J.; Lee, G. P.; Howell, S. H.; Kochian, L. V (2003) Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (Landsberg erecta x Columbia) by quantitative trait locus mapping: a physiologically simple but genetically complex trait. **Plant Physiology** **132**: 936-948.

Hoekenga, O. A.; Maron, L. G.; Piñeros, M. A.; Cançado, G. M.; Shaff, J. E.; Kobayashi, Y.; Matsumoto, H (2006) AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **103**: 9738-9743.

Huang, C. F.; Yamaji, N.; Mitani, N.; Yano, M.; Nagamura, Y.; Ma, J. F (2009) A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. **The Plant Cell** **21**: 655-667.

Huang, C. F.; Yamaji, N.; Chen, Z.; Ma, J. F (2012) A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice. **Plant Journal** **69**: 857-867.

Iuchi, S.; Koyama, H.; Iuchi, A.; Kobayashi, Y.; Kitabayashi, S (2007) Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and co regulates a key gene in aluminum tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **104**:9900-5.

Kashino-Fujii, M.; Yokosho, K.; Yamaji, N.; Yamane, M.; Saisho, D.; Sato, K.; Ma, J. F (2018) Retrotransposon insertion and DNA methylation regulate aluminum tolerance in European barley accessions. **Plant Physiology** **178**: 716-727.

Kinraide, T. B.; Ryan, P. R.; Kochian, L. V (1992) Interactive effects of Al and other cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential. **Plant Physiology** **99**: 1461-1468.

Kitagawa, T (1986) Genotypic variations in Al resistance in wheat and organic acid secretion. **Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition** **57**: 352-358.

Kochian, L. V (1995) Mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** **46**: 237-60.

Kochian, L. V.; Hoekenga, O. A.; Pineros, M. A (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology** **55**: 459-493.

Kochian, L.V.; Piñeros, M.A.; Hoekenga, O. A (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminium resistance and toxicity. **Plant Soil** **274**: 175-195.

Kochian, L.V.; Piñeros, M.A.; Liu, J.; Magalhaes, J. V (2015) Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology** **66**: 571-598.

Kollmeier M, Dietrich P, Bauer CS, Horst WJ, Hedrich R (2001) Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. **Plant Physiology** **126**: 397-4.

Kuang, H.; Padmanabhan, C.; Li, F.; Kamei, A.; Bhaskar, P. B.; Ouyang, S (2009) Identification of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) and biogenesis of their siRNAs in the Solanaceae: new functional implications for MITEs. **Genome research** **19**: 42-56.

Larsen, P. B.; Geisler, M. J.; Jones, C. A.; Williams, K. M.; Cancel, J. D (2005) ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Journal** **41**: 353-63.

Larsen, P. B.; Cancel, J.; Rounds, M.; Ochoa, V (2007) Arabidopsis ALS1 encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. **Plant Journal** **225**: 1447.

Li, X. F.; Ma, J. F.; Matsumoto, H (2000) Pattern of Al-induced secretion of organic acids differ between rye and wheat. **Plant Physiology** **123**: 1537-1543.

Li, J.; Wang, Z.; Peng, H.; Liu, Z (2014) A MITE insertion into the 3'-UTR regulates the transcription of TaHSP16.9 in common wheat. **The Crop Journal** **2**: 381-387.

Li, G. Z.; Wang, Z. Q.; Yokosho, K.; Ding, B.; Fan, W.; Gong, Q. Q.; Li, G. X.; Wu, Y. R.; Yang, J. L.; Ma, J. F.; Zheng, S. J (2018) Transcription factor WRKY22 promotes aluminum tolerance via activation of OsFRDL4 expression and enhancement of citrate secretion in rice (*Oryza sativa*). **New Phytologist** **219**: 149-162.

Ligaba, A.; Katsuhara, M.; Ryan, P. R.; Shibasaka, M.; Matsumoto, H (2006) The *BnALMT1* and *BnALMT2* genes from rape encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells. **Plant Physiology** **142**: 1294-303.

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

Ma, J. F.; Hiridate, S.; Nomoto, K.; Iwashita, T.; Matsumoto, H (1997) Internal Detoxification mechanism of Al form in the leaves. **Plant Physiology** **113**: 1033-1039.

Ma, Z.; Miyasaka, S.C (1998) Oxalate exudation by taro in response to Al. **Plant Physiology** **118**: 861-865.

Ma, J. F.; Taketa, S.; Yang, Z. M (2000) Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. **Plant Physiology** **122**: 687-694.

Ma, J. F (2000) Mini Review: Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. **Plant & Cell Physiology** **41**: 383-390.

Ma, J. F.; Ryan, P. R.; Delhaize, E (2001) Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **TRENDS in Plant Science** **6**: 6.

Ma, H. X.; Bai, G. H.; Carver, B.; Zhou, L. L (2005) Molecular mapping of a quantitative trait locus for aluminum tolerance in wheat cultivar Atlas 66. **Theoretical and Applied Genetics** **112**: 51-57.

Ma, J. F (2007) Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. **International Review of Cytology** **264**: 225-252.

Ma, J. F.; Chen, Z. C.; Shen, R. F (2014) Molecular mechanisms of Al tolerance in gramineous plants. **Plant Soil** **381**: 1-12.

Magalhães, J. V.; Liu, J.; Guimares, C. T.; Lana, U. G. P.; Alves, V. M.; Wang, Y-H; Schaffert, R. E.; Hoekenga, O. A.; Piñeros, M. A.; Shaff, J. E.; Klein, P.; Carneiro, N. P.; Coelho, C. M.; Trick, H. N.; Kochian, L. V (2007) A gene in multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature genetics** **39**: 1156-1161.

Magalhães, J. V.; Garvin, D. F.; Wang, Y.; Sorrells, M. E.; Klein, P. E.; Schaffert, R. E.; Li, L.; Kochian, L. V (2004) Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. **Genetics** **167**: 1905-1914.

Maron, L. G.; Pineros, M. A.; Guimaraes, C. T.; Magalhaes, J. V.; Pleiman, J. K.; Mao, C. Z.; Shaff, J.; Belicuas, S. N. J.; Kochian, L. V (2010) Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. *The Plant Journal* **61**: 728-740.

Matsumoto, H (2000) Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *International Review of Cytology* **200**: 1-46.

Melo, J. O.; Martins, L. G. C.; Barros, B. A.; Pimenta, M. R.; Lana, U. G. P.; Duarte, C. E. M.; Pastina, M. M.; Guimarães, C. T.; Schaffert, R. E.; Kochian, L. V.; Fontes, E. P. B.; Magalhães, J. V (2019) Repeat variants for the SbMATE transporter protect sorghum roots from aluminum toxicity by transcriptional interplay in cis and trans. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **116**: 313-318.

Melo, J. O.; Lana, U. G. P.; Piñeros, M. A.; Alves, V. M. C.; Guimarães, C. T.; Liu, J.; Zheng, Y.; Zhong, S.; Fei, Z.; Maron, L. G.; Schaffert, R. E.; Kochian, L. V.; Magalhaes, J. V (2013) Incomplete transfer of accessory loci influencing *SbMATE* expression underlies genetic background effects for aluminum tolerance in sorghum. **Plant Journal** **73**: 276-288.

Miyasaka, S. C.; Buta, J. G.; Howell, R. K.; Foy, C. D (1991) Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans: root exudation of citric acid. **Plant Physiology** **96**: 737-43.

Miyasaka, S.; Hawes, M. C (2001) Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity. **Plant Physiology** **125**:1978-1987.

Momose, M.; Abe, Y.; Ozeki, Y (2010) Miniature Inverted-Repeat Transposable Elements of Stowaway Are Active in Potato. **Genetics** **186**: 59-66.

Morita, Y.; Kodama, K.; Shiota, S.; Mine, T.; Kataoka, A.; Mizushima, T.; Tsuchiya, T (1998) NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother** **42**: 1778-1782.

Ofei-Manu, P.; Watsunga, T.; Ishiwaka, S.; Tawaraya, K (2001) The plasma membrane strength of the root-tip cells and phenolic compounds are correlated with AL tolerance in several common woody plants. **Soil Science and Plant Nutrition** **47**: 359-375.

Ohmori, Y.; Abiko, M.; Horibata, A.; Hirano, H. Y (2008) A transposon, Ping, is integrated into intron 4 of the DROOPING LEAF gene of rice, weakly reducing its expression and causing a mild drooping leaf phenotype. **Plant Cell Physiology** **49**: 1176-1184.

Pellet, D. M.; Grunes, D. L.; Kochian, L. V (1995) Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). **Planta** **196**: 788-795.

Pereira, J. F.; Zhou, G.; Delhaize, E.; Richardson, T.; Zhou, M.; Ryan, P. R (2010) Engineering greater aluminum resistance in wheat by over-expressing *TaALMT1*. **Annals of Botany** **106**: 205-214.

Pereira, J. F.; Ryan, P. R (2019) The role of transposable elements in the evolution of aluminum resistance in plants. **Journal of Experimental Botany** **70**: 41-54.

Piñeros, M. A.; Kochian, L. V (2001) A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al³⁺ - induced anion channels. **Plant Physiology** **125**: 292-305.

Piñeros, M. A.; Conçalo, G. M. A.; Kochian, L. V (2008) Novel properties of the wheat aluminum tolerance organic acid transporter (TaALMT1) revealed by electrophysiological characterization in *Xenopus oocytes*: functional and structural implications. **Plant Physiology** **147**: 2131-2146.

Raman, H.; Zhang, K.; Cakir, M.; et al. (2005) Molecular characterization and mapping of ALMT1, the aluminium-tolerance gene of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Genome** **48**: 781-791.

Riede, C. R.; Anderson, J. A (1996) Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. **Crop Science** **36**: 905-909.

Ryan, P. R.; Delhaize, E.; Jones, D. L (2001) Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** **52**: 527-560.

Ryan, P. R.; Raman, H.; Gupta, S.; Horst, W. J.; Delhaize, E (2009) A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. **Plant Physiology** **149**: 340-351.

Ryan, P, R.; Delhaize, E (2010) The convergent evolution of aluminum resistance in plants exploits a convenient currency. **Functional Plant Biology** **37**: 275-284.

Sade, H.; Meriga, B.; Surapu, V.; Gadi, J.; Sunita, M. S. L.; Suravajhala, P.; Kavi Kishor, P. B (2016) Toxicity and tolerance of aluminum in plants: tailoring plants to suit to acid soils **Biometals** **29**:187-210.

Santos, C.; Silva, S.; Pinto-Carnide, O (2014) Aluminum Phytotoxicity: physiological approaches and tolerance. **Advances in Molecular Toxicology** **8**: 213-236.

Sampath, P.; Murukarthick, J.; Izzah, N. K.; Lee, J.; Choi, H.; Shirasawa, K.; Choi, B. S.; Liu, S.; Nou, S.; Yang, T. J (2014) Genome-Wide Comparative Analysis of 20 Miniature Inverted-Repeat Transposable Element Families in *Brassica rapa* and *B. oleracea*. **PLoS ONE** **9**: e94499.

Schmitt, M.; Watanabe, T.; Jansen, S (2016) The effects of aluminium on plant growth in a temperate and deciduous aluminium accumulating species. **AoB Plants** **8**: plw065.

Sasaki, T.; Yamamoto, Y.; Ezaki, B.; Katsuhara, M.; Ahn, S. J.; Ryan, P. R.; Matsumoto, H (2004) A wheat gene encoding an aluminum activated malate transporter. **The Plant Journal** **37**: 645-653.

Sasaki, T.; Ryan, P. R.; Delhaize, E, Hebb, D. M (2006) Sequence upstream of the wheat (*Triticum aestivum* L.) *ALMT1* gene and its relationship to aluminum resistance. **Plant Cell Physiology** **47**: 1343-1354.

Sawaki, Y.; Iuchi, S.; Kogayashi, Y (2009) STOP1 regulates multiple genes that protect *Arabidopsis* from proton and aluminum toxicities. **Plant Physiology** **150**: 281-294.

Shi, X.; Ng, D.W.-K.; Zhang, C.; Comai, L.; Ye, W.; Chen, J. Z (2012) Cis and trans-regulatory divergence between progenitor species determines gene-expression novelty in *Arabidopsis* allopolyploids. **Nature Communications** **3**: 950.

Silva-Navas, J.; Benito, C.; Téllez-Robledo, B.; El-Moneim, D. A.; Gallego, F. J (2012) The *ScAACT1* gene at the Qalt5 locus as a candidate for increased aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.). **Molecular Breeding** **30**: 845-856.

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

Shirasawa, K.; Hirakawa, H.; Tabata, S.; Hasegawa, M.; Kiyoshima, H (2012) Characterization of active miniature inverted-repeat transposable elements in the peanut genome. **Theoretical and Applied Genetics** **124**: 1429-1438.

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

Tokizawa, M.; Kobayashi, Y.; Saito, T.; Kobayashi, M.; Iuchi, S.; Nomoto, M.; et al (2015) Sensitive to Proton Rhizotoxicity1, calmodulin binding transcription activator2, and other transcription factors are involved in Aluminum-Activated Malate Transporter1 expression. **Plant Physiology** **167**: 991-1003.

Tovkach, A.; Ryan, P. R.; Richardson, A. E.; Lewis, D. C.; Rathjen, T. M (2013) Transposon-mediated alteration of *TaMATE1B* expression in wheat confers constitutive citrate efflux from root apices. **Plant Physiology** **161**: 880-92.

Tsutsui, T.; Yamaji, N.; Huang, C. F.; Motoyama, R.; Nagamura, Y.; Ma, J. F (2012) Comparative genome-wide transcriptional analysis of Al-responsive genes reveals novel Al tolerance mechanisms in rice. **PLoS ONE** **7**: e48197.

Tsutsui, T.; Yamaji, N.; Feng, M. J (2011) Identification of a cis-acting element of ART1, a C2H2-type zinc-finger transcription factor for aluminum tolerance in rice. **Plant Physiology** **156**: 925-931.

Vardar, F.; Unal, M (2007) Aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Advances in Molecular Biology** **1**: 1-12.

von Korff, M.; Radovic, S.; Choumane, W.; Stamati, K (2009) A symmetric allele-specific expression in relation to developmental variation and drought stress in barley hybrids. **Plant Journal** **59**: 14-26.

von Uexküll, H. R.; Mutert, E (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils. In **Plant-Soil Interactions at Low pH: Principles and Management**, eds. RA Date, NJ Grundon, GE Raymet, ME Probert. Kluwer Academic Publishers: 5-19.

Wang, J. P.; Raman, H.; Zhou, M. X.; Rya N. P. R.; Delhaize, E.; Hebb, D. M.; Coombes, N.; Mendham, N (2007) High-resolution mapping of the Alp locus and identification of a candidate gene HvMATE controlling aluminum tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics: international journal of plant breeding research** **115**: 265-276.

Wray, G. A.; Hahn, M. W.; Abouheif, E.; Balhoff, J. P.; Pizer, M.; Rockman, M. V.; Romano, L. A (2003) The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. **Molecular Biology and Evolution** **20**: 1377-1419.

Xia, J.; Yamaji, N.; Kasai, T.; Ma, J. F (2010) Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **107**: 18381-18385.

Yamaguchi, M.; Sasaki, T.; Sivaguru, M.; Yamamoto, Y.; Osawa, H.; Ahn, S. J.; Matsumoto, H (2005) Evidence for the plasma membrane localization of Al-activated malate transporter (ALMT1). **Plant Cell Physiology** **46**: 812-816.

Yamaji, N.; Huang, C. F.; Nagao, S.; Yano, M.; Sato, Y (2009) A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. **Plant Cell** **21**: 3339-49.

Yamamoto, Y.; Kobayashi, Y.; Davi, S. R.; Rikiishi, S.; Matsumoto, H (2002) Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. **Plant Physiology** **128**: 63-72.

Yang, Z. M.; Sivaguru, M.; Horst, W. J.; Matsumoto, H (2001) Aluminum tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum** **110**: 72-74.

Yang, G.; Lee, Y. H.; Jiang, Y.; Shi, X.; Kertbundit, S.; Hall, T. C (2005) A two-edged role for the transposable element Kiddo in the rice ubiquitin2 promoter. **Plant Cell** **17**: 1559-1568.

Yang, X. Y.; Yang, J. L.; Pineros, M. A.; Kochian, L. V.; Li, G. X.; Zheng, S. J (2011) A de novo synthesis citrate transporter, *Vigna umbellata* multidrug and toxic compound extrusion, implicates in Al-activated citrate efflux in rice bean (*Vigna umbellata*) root apex. **Plant, Cell and Environment** **34**: 2138-48.

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

Yokosho, K.; Yamaji, N.; Fujii-Kashino, M. et al., (2016) Retrotransposon-mediated aluminum tolerance through enhanced expression of the citrate transporter OsFRDL4. **Plant Physiology** **172**: 2327-2336.

Zhang, W. H.; Ryan, P. R.; Sasaki, T.; Yamamoto, Y.; Sullivan, W.; Tyerman, S. D (2008) Characterization of the TaALMT1 Protein as an Al^{3+} - activated anion channel in transformed tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells. **Plant Cell Physiology** **49**: 1316-1330.

Zheng, S. J.; Ma, J. F.; Matsumoto, H (1998) Continuous secretion of organic acids is related to aluminum resistance during relatively long-term exposure to aluminum stress.

Physiologia Plantarum **103**: 209-214.

CAPÍTULO 1

Caracterização funcional da região promotora do gene *SbMATE* de sorgo em plantas geneticamente modificadas de milho

1 - INTRODUÇÃO

Os programas de melhoramento genético de importantes culturas produtoras de grãos vêm alcançando avanços significativos com a identificação e a seleção de fontes de tolerância ao Al. Estudos relacionados com a base genética, fisiológica e molecular da tolerância ao Al em plantas têm contribuído para o entendimento dos mecanismos regulatórios envolvidos (Delhaize et al., 2004; Magalhaes et al., 2007; Wang et al., 2007; Li et al., 2014; Kochian et al., 2015).

O gene *SbMATE* de sorgo codifica uma proteína transportadora de citrato, ativada por Al e expressa, principalmente, nos ápices das raízes. No estudo de Magalhaes et al. (2007), diferenças na expressão do gene *SbMATE* entre linhagens contrastantes de sorgo explicaram mais de 80% da variação fenotípica da tolerância ao Al, fornecendo evidências de que a variação na expressão gênica se relaciona com a variação alélica no loco de tolerância ao Al.

Com base no sequenciamento da região promotora do gene *SbMATE* foi possível verificar que as diferenças encontradas no número de repetições contendo o transposon MITE, designadas aqui de repetições MITE, foram significativamente correlacionadas com a tolerância ao Al em sorgo (Magalhaes et al., 2007). O trabalho de Magalhaes et al. (2007) constatou, ainda, que a região repetitiva nas linhagens Tx430, BR007, BR012 e SC283 continha uma, três, quatro e cinco cópias da região MITE, respectivamente. Os resultados do trabalho sugerem uma correlação entre os polimorfismos localizados na região regulatória do gene *SbMATE* e o controle transcricional do gene de tolerância como um fator determinante para a tolerância ao Al conferida pelo gene *SbMATE* (Caniato et al., 2007; Magalhaes et al., 2007; Melo et al., 2019).

Apesar dos inúmeros progressos obtidos, estudos mais detalhados são necessários para a compreensão dessas redes regulatórias, com a identificação e a caracterização de *cis*-elementos e proteínas que atuam na regulação da expressão do gene *SbMATE*. Nesse sentido, compreender a essencialidade das repetições MITE na atividade promotora e na regulação da expressão tecidual e temporal do gene *SbMATE* poderá permitir um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na regulação da expressão de genes transportadores de ácidos orgânicos, relacionados com os mecanismos de tolerância ao Al em plantas.

O capítulo 1 da tese teve como objetivo geral caracterizar funcionalmente a região promotora do gene *SbMATE* de sorgo, avançando no entendimento do papel dos elementos *cis*-regulatórios nos mecanismos moleculares envolvidos na modulação da expressão do gene *SbMATE* e, por conseguinte, na tolerância ao Al condicionada pelo gene *SbMATE*.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Síntese de diferentes versões da região promotora do gene *SbMATE* de sorgo e clonagem no gene repórter *GUS*

Foram sintetizadas (Epoch Life Science) sete versões da região promotora do gene *SbMATE* de sorgo contendo as repetições MITE (Figura 1), conforme descrito por Magalhaes et al. (2007) e por Melo et al. (2019). As descrições e representações esquemáticas das construções sintetizadas estão detalhadas a seguir:

A) Construção gênica com 05 repetições MITE (designada promotor (p) 5MITE+ ou p5MITE+). A sequência começa no marcador flanqueador do loco *Alt_{SB}* contendo 1749 pb (Magalhaes et al., 2007) e vai até o códon de início da tradução (ATG) do gene *SbMATE*.

B) Construção gênica com 05 repetições MITE (p5MITE). A sequência compreende a região que se inicia nas repetições MITE e vai até o ATG.

C) Construção gênica com 04 repetições MITE (p4MITE). A sequência compreende 04 repetições MITE e vai até o ATG.

D) Construção gênica com 03 repetições MITE (p3MITE). A sequência compreende 03 repetições MITE e vai até o ATG.

E) Construção gênica com 01 repetição MITE (p1MITE). A sequência compreende 01 repetição MITE e vai até o ATG.

F) Construção gênica sem a região MITE (p0MITE). Compreende a região que se inicia imediatamente após as repetições MITE e vai até o ATG.

G) Construção gênica sem a região MITE (pFm0MITE). Compreende a região que se inicia no marcador flanqueador do loco *Alt_{SB}* e vai até o início das repetições MITE.

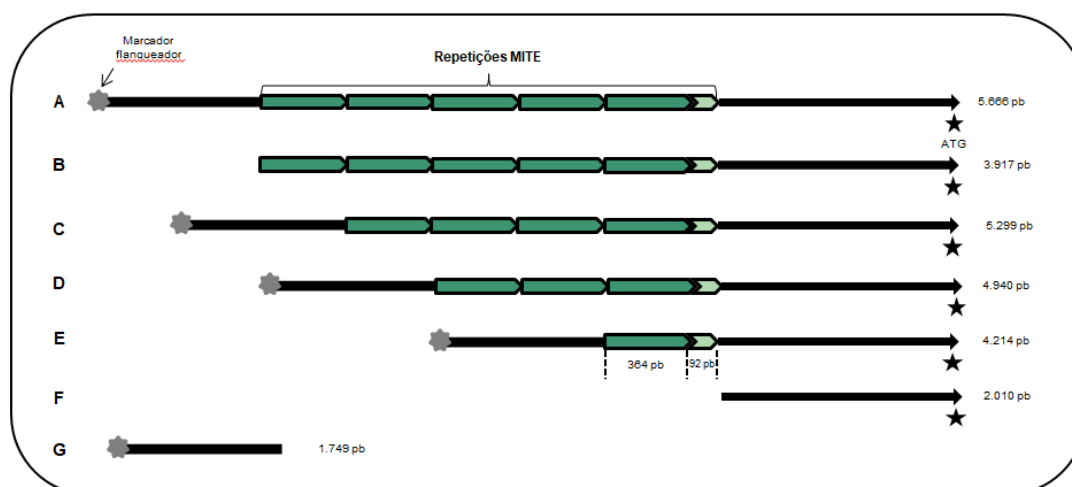


Figura 1: Representação esquemática das sete versões da região promotora do gene *SbMATE* de sorgo. (A) p5MITE+: sequência de 5.666 pb contém 5 repetições da região MITE. (B) p5MITE: sequência de 3.917 pb contém 5 repetições MITE. (C) p4MITE: sequência de 5.299 pb contém 4 repetições MITE. (D) p3MITE: sequência de 4.940 pb contém 3 repetições MITE. (E) p1MITE: sequência de 4.214 pb contém 1 repetição MITE. (F) p0MITE: sequência de 2.010 pb, que não contém a região MITE e está localizada imediatamente a montante do ATG. (G) pFm0MITE: sequência de 1.749 pb, que não contém nenhuma repetição MITE e está localizada a montante das repetições MITE. A estrutura da região repetitiva está detalhada na Figura 1 da Introdução.

Com o objetivo de caracterizar funcionalmente a região promotora do gene *SbMATE*, as diferentes construções foram fusionadas ao gene repórter *uid A* (*GUS*) do vetor binário pTF102 (Paz et al., 2004), em substituição ao promotor CaMV35S (*Cauliflower mosaic virus*). O marcador de seleção para plantas contido nesse vetor binário é o gene *bar*, que está sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S e confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio. Os vetores de expressão contendo as diferentes construções gênicas da região promotora do gene *SbMATE* foram inseridos em *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe EHA 101, por meio da técnica de eletroporação (Figura 2) (Lin, 1995).

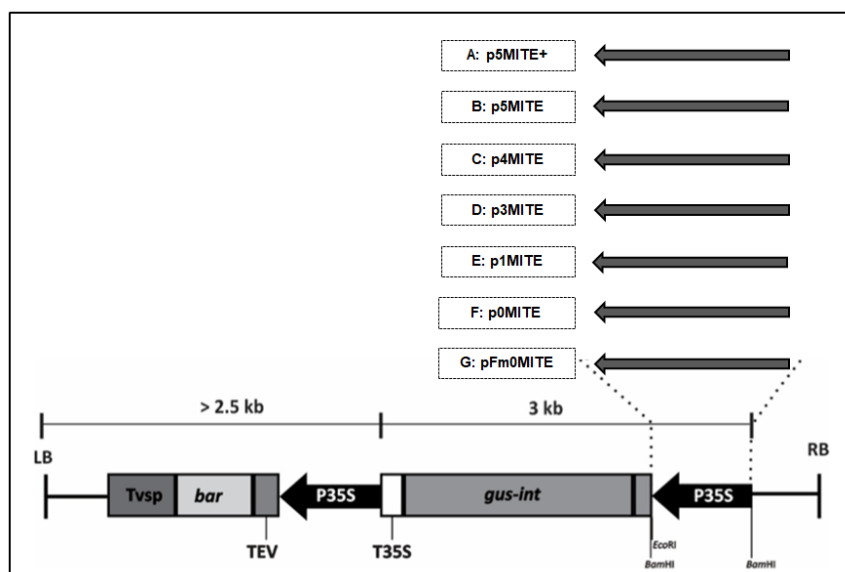


Figura 2: Representação da construção gênica com as sete versões da região promotora do gene *SbMATE* controlando a expressão do gene repórter *GUS*. LB: borda esquerda do T-DNA; RB: borda direita do T-DNA; P35S: promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV); *gus-int*: gene *GUS* contendo um íntron; T35S: terminador do promotor 35S; TEV: transcripcional enhancer para *Tocacco etch virus*; *bar*: gene de resistência ao herbicida glufosinato de amônio. Tvsp: terminador do gene de reserva vegetativo de soja.

2.2 - Transformação genética de embriões imaturos de milho Hill via *Agrobacterium tumefaciens*

A etapa seguinte consistiu no processo de transformação genética de embriões imaturos do genótipo de milho Hill, via *Agrobacterium tumefaciens* EHA101, com as sete versões da região promotora do gene *SbMATE*. É importante destacar que o milho híbrido temperado Hill é utilizado no processo de transformação genética via *Agrobacterium* por ser menos recalcitrante à infecção e por apresentar ótimo desempenho na produção de calos embriogênicos friáveis do tipo II, considerados os mais adequados para a regeneração de plântulas em cultura de tecidos (Armstrong; Green, 1991; Frame et al., 2002).

Inicialmente, sementes do milho Hill foram plantadas em casa de vegetação em períodos escalonados para obtenção do material vegetal para a transformação genética. Os

embriões imaturos de milho foram colhidos entre 10 e 12 dias após a polinização, com aproximadamente 1,5 a 2,0 mm. Para a assepsia dos explantes, as palhas das espigas de milho foram retiradas e as espigas foram lavadas com álcool 70% (v/v) e, posteriormente, mergulhadas em uma solução de hipoclorito de sódio comercial e água destilada (1:1), com cinco gotas de detergente comercial. A solução de hipoclorito contendo as espigas de milho foi colocada sob agitação constante por 30 minutos. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, as espigas passaram por lavagem tríplice com água deionizada autoclavada e, logo após, os embriões zigóticos foram excisados com auxílio de bisturi e espátula. A transformação genética de milho foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Frame e colaboradores (2002) com modificações.

Preparo da *Agrobacterium tumefaciens*

A bactéria *A. tumefaciens* utilizada para a transformação dos embriões imaturos foi mantida em meio YEP (5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g L⁻¹ de peptona, 5 g L⁻¹ de NaCl, 15 g L⁻¹ de Bacto-agar), contendo 100 g L⁻¹ do antibiótico espectinomicina, por até 4 semanas, a 4°C. Os estoques de culturas de longa duração foram mantidos em freezer - 80°C, em solução de glicerol.

Três dias antes da transformação, as culturas de *A. tumefaciens* mantidas a 4°C, contendo as construções gênicas em estudo, foram estriadas em meio YEP suplementado com espectinomicina e incubadas à 20°C. Para a transformação, foram distribuídos 10 mL de meio de infecção suplementado com 100 µM de acetoseringona (AS) em tubos de 50 mL. Em seguida, inoculou-se a *A. tumefaciens* até obter uma densidade ótica a 550 nm entre 0,3 e 0,4. Posteriormente, o meio de infecção contendo a *Agrobacterium* foi incubado horizontalmente em agitador, sob temperatura de 22°C a 100 rpm por 2 horas.

Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

Os embriões excisados de milho foram acondicionados em tubos de 2,0 mL contendo 1,5 mL de meio de infecção suplementado com 100 µM de AS, inicialmente sem *A. tumefaciens*. Em seguida, o meio de infecção foi retirado, os embriões lavados com 1,0 mL deste mesmo meio e então foi adicionado 1,5 mL da suspensão de *A. tumefaciens* contendo as construções gênicas clonadas no vetor pTF102. Os tubos foram gentilmente invertidos e incubados por cinco minutos no escuro. Após a infecção, os embriões foram transferidos para o meio de co-cultivo. Os embriões foram orientados de maneira que o eixo embrionário ficasse em contato com o meio de cultura. As placas foram fechadas com fita micropore e incubadas no escuro a 20°C, durante cinco dias.

Foram realizados vinte e um experimentos de transformação genética utilizando as sete construções gênicas correspondentes a região promotora do gene *SbMATE*. As transformações foram realizadas separadamente para cada construção gênica, para evitar contaminação entre os experimentos. Em cada experimento de transformação genética, 300 embriões imaturos de milho foram infectados.

Seleção e regeneração das plantas transgênicas

Para a seleção das células transformadas, os calos embriogênicos regenerados a partir dos embriões imaturos foram subcultivados a cada 15 dias em diferentes meios de seleção contendo o agente seletivo Bialaphos® (GoldBio) em diferentes concentrações e incubados a 26°C no escuro. Calos que sobreviveram à seleção com o herbicida foram transferidos para o meio de regeneração/maturação por 20 dias e, após essa etapa, foram transferidos para o meio de germinação, sendo mantidos por cerca de 15 dias. Plântulas com aproximadamente 8 cm de comprimento foram aclimatadas em casa de vegetação. As plantas T0 obtidas foram tratadas em casa de vegetação com o herbicida Finale® (Bayer) para confirmação dos transformantes (Figura 3).

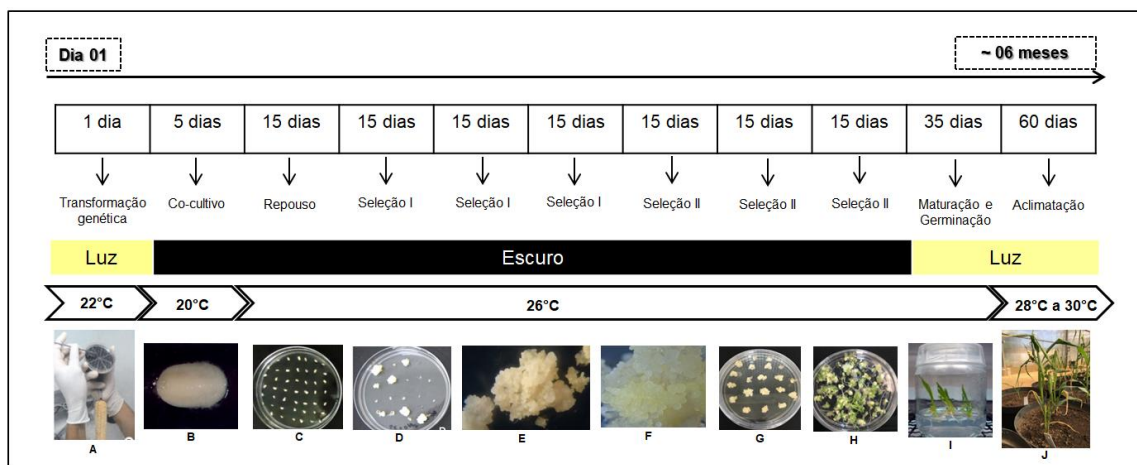


Figura 3: Representação esquemática das etapas de transformação genética de milho Hill via *Agrobacterium tumefaciens*. (A-B) Embriões de milho Hill excisados; (C) embriões em meio de repouso; (D-F) seleção dos calos transformados em cultura de tecidos; (G) calo embriogênico selecionado em cultura de tecidos; (H-I) germinação das plântulas transgênicas (T0) em cultura de tecidos; (J) aclimação das plantas T0 em casa de vegetação e produção de sementes.

Análise dos transgênicos na geração T0

A inserção dos transgenes nos calos embriogênicos contendo as regiões do promotor do gene *SbMATE* fusionadas com *GUS* (pSbMATE) foi confirmada, inicialmente, por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o gene marcador de seleção *bar* como referência. Foi realizada a extração de DNA genômico dos calos embriogênicos que se desenvolveram após o período de seleção II (Figura 3). Para a extração do DNA, aproximadamente 500 mg da massa embriogênica foi acondicionada em microtubo de 1,5

mL contendo 400 μ L de tampão de extração CTAB 2% (m/v) com 0,4% (v/v) de β -mercaptoetanol. O material foi cuidadosamente macerado com o auxílio de um pistilo. Em seguida, o material foi homogeneizado por 15 segundos e incubado à 60°C por 20 minutos. Posteriormente, os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 10 minutos. Ao final da incubação, foram adicionados 300 μ L de clorofórmio-octanol (24:1) e os tubos foram novamente homogeneizados por 15 segundos. Após essa etapa, realizou-se a centrifugação a 14.000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,5 mL e foram então adicionados 300 μ L de isopropanol gelado em cada amostra, seguindo-se um período de incubação a -80°C por 20 minutos. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 14.000 rpm, lavagem do precipitado com 200 μ L de etanol 70% (v/v) e secagem em estufa a 65°C, por 25 minutos. Finalmente, o precipitado foi tratado com 100 μ L de TE + 0,2 μ L de RNAse e armazenado em freezer a -20°C. A integridade e a concentração do DNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) e por quantificação do DNA no espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific), respectivamente. Para confirmação dos eventos transgênicos, foi realizada a técnica de PCR, usando oligonucleotídeos iniciadores para o gene *bar* (Tabela 1 do material suplementar - S1). Cada 20 μ L de reação de PCR continha tampão 10X, 2 mM de $MgCl_2$, 100 μ M de cada dNTP, 1,0 μ L de cada primer na concentração de 10 μ M, 30 ng de DNA e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As reações foram feitas utilizando-se um termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) programado para uma etapa de desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos a 94°C por 20 segundos, 20 segundos a 60°C, 30 segundos a 72°C e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Os produtos gerados foram analisados em gel de agarose 1%, com GelRed[®] (Biotium) mais corante.

2.3 - Quantificação da expressão do gene repórter *GUS* nos transgênicos de milho na geração F2

As plantas transgênicas T0 selecionadas em casa de vegetação após a aplicação do herbicida Finale[®] foram polinizadas utilizando pólen da linhagem tropical, L3, pertencente à Embrapa Milho e Sorgo, que apresenta excelente desempenho agrônomo. As sementes transgênicas produzidas na primeira geração, denominada F1, foram novamente plantadas em casa de vegetação e realizou-se a autopolinização das plantas para produzir a segunda geração (F2). Com o objetivo de realizar uma pré-seleção nos transgênicos produzidos, foi realizada análise de segregação dos transgenes na geração F2, utilizando o herbicida Finale[®] para seleção dos indivíduos com cópia única do inserto. Os transgênicos que apresentaram segregação mendeliana 3 (resistência ao herbicida Finale) : 1 (sensibilidade), confirmada após teste de qui-quadrado (χ^2) a 5% de probabilidade, foram avançados para a

análise molecular de expressão do gene repórter *GUS*, por meio da técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR).

A análise de expressão foi realizada nos transgênicos selecionados tratados com Al em solução hidropônica pH 4,0, como descrito por Caniato et al. (2014), com modificações. Como as sementes F2 estavam segregando para os transgenes, foi necessário submetê-las ao tratamento com uma solução contendo o herbicida Finale[®] na concentração de 0,2% (v/v), por 6 horas, para eliminação das sementes nulas para os transgenes. Após o tratamento com herbicida, as sementes foram germinadas em rolos de papel de germinação umedecidos em água deionizada por um período de quatro dias, em câmara de crescimento, com temperatura diurna média de 27±3°C, temperatura noturna de 20±3°C, e fotoperíodo de 16 horas. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para copos plásticos perfurados, acomodados em placas de PVC dentro de bandejas plásticas contendo 8,0 litros de solução nutritiva. As plântulas foram mantidas por 24 horas em solução nutritiva completa sem Al. Após esse período, para imposição do estresse de Al, a solução nutritiva foi substituída por solução com a mesma constituição anterior, porém com a adição de {39} µM de atividade de Al (os valores entre chaves indicam a atividade de Al estimada com o software GEOCHEM-PC) (Parker et al., 1995). A solução foi continuamente aerada durante todo o período experimental. Os experimentos foram conduzidos em câmara de crescimento, com temperatura diurna média de 27±3°C, temperatura noturna de 20±3°C e fotoperíodo de 12 horas. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso e cada parcela experimental foi constituída de sete plântulas, com três repetições biológicas, totalizando 21 plântulas por tratamento.

Após o período de 24 horas de estresse de Al, os ápices radiculares (1,0 cm) foram coletados para a realização dos ensaios de quantificação da expressão relativa do gene *GUS*, por RT-qPCR (Figura 4). O RNA total dos ápices radiculares foi extraído utilizando RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). A síntese de cDNA foi realizada com 2,0 µg de RNA total com o auxílio do kit High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems). As reações de RT-qPCR foram realizadas em triplicata, contendo cDNA (5 ng para o gene alvo e 0,005 ng para o gene de referência), 2,5 µM de cada iniciador e Fast SYBR Green Master Mix 1X (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. Os ensaios foram realizados segundo o método de quantificação relativa por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ proposto por Livak; Schmittgen (2001). Para a correção de possíveis variações na quantidade de RNA utilizada em cada reação, a normalização dos experimentos foi realizada utilizando-se o gene de referência 18S *rRNA*. As análises foram conduzidas no equipamento 7500 Fast-Real Time PCR System (Applied Biosystems). Além das condições de amplificação padrão, todos os procedimentos utilizando kits foram realizados conforme as recomendações do fabricante.

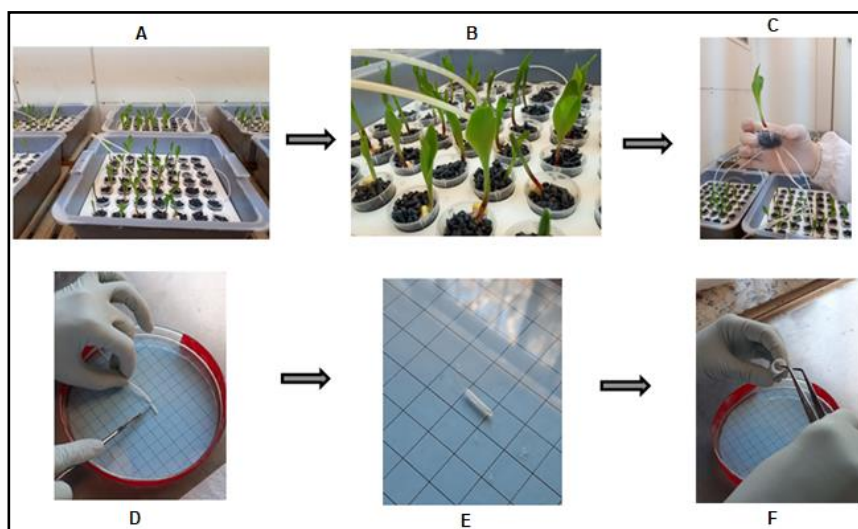


Figura 4: Metodologia de coleta de ápices radiculares após estresse de Al em solução hidropônica para análise de RT-qPCR. (A-B) Transgênicos em solução hidropônica; (C) plântula de milho transgênica após 01 dia de estresse de Al; (D-E) excisão do ápice radicular (1,0 cm); (F) armazenamento do ápice radicular coletado em criotubos.

2.4 - Fixação dos transgênicos

Após as análises preliminares da expressão do gene *GUS* nos transgênicos da geração F2, 7 a 10 transgênicos correspondentes a cada construção gênica foram selecionados. Subsequentemente, os indivíduos F2 selecionados foram autofecundados para geração das famílias F3. A seleção dos indivíduos com os transgenes em homozigose foi realizada por meio de teste de progênie nas respectivas famílias F3. Para isso, realizou-se novo tratamento com o herbicida Finale[®] para identificação dos indivíduos transgênicos nulos, que são sensíveis ao glufosinato de amônio. As famílias tolerantes ao herbicida e que não apresentaram segregação gênica, indicando que os transgenes encontravam-se fixados, foram selecionadas para a produção das sementes da geração F4 e posterior análise molecular (Figura 5).

Nos transgênicos de milho correspondentes as construções p5MITE e pFm0MITE, diversas famílias F3 estavam segregando após análise do teste de progênie, indicando descendência de plantas heterozigotas para os transgenes. Nesse sentido, foi necessário realizar análise do número de cópias do transgene com o objetivo de identificar as plantas homozigotas, por meio da técnica de RT-qPCR. Para isso, o DNA genômico das folhas dos indivíduos F3 foi extraído pelo método CTAB descrito por Saghai-Marrof et al. (1984) e, em seguida, quantificado em equipamento NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). As reações foram preparadas nas mesmas condições descritas anteriormente para análise de expressão gênica, substituindo-se o cDNA por 25 ng de DNA genômico (seção 2.3). Para a correção de possíveis variações na quantidade de DNA utilizada em cada reação, a normalização dos experimentos foi realizada utilizando o gene actina como referência. A

quantificação do número de inserções foi obtida utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak; Schmittgen, 2001). As plantas p5MITE e pFm0MITE com os transgenes em homozigose também foram avançadas para a produção de sementes na geração F4.

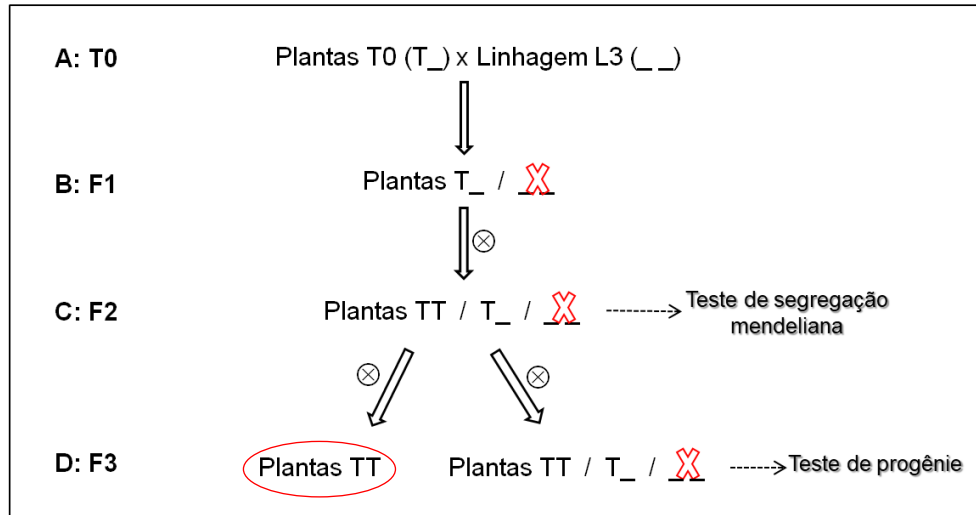


Figura 5: Representação esquemática das etapas de fixação dos transgênicos em casa de vegetação. (A) Primeira geração dos transgênicos (T0) polinizados com pólen proveniente da linhagem L3; (B) segunda geração dos transgênicos (F1); (C) geração F2 dos transgênicos produzida a partir de autopolinização. Foi realizado nessa geração o teste de segregação mendeliana para selecionar os transgênicos com cópia única dos insertos; (D) geração F3 dos transgênicos produzida a partir de autopolinização, onde foi realizado o teste de progênie para seleção dos transgênicos fixados (plantas TT que não segregaram). O símbolo X representa os indivíduos transgênicos nulos que foram descartados após aplicação do herbicida Finale.

2.5 - Detecção da atividade da enzima β -glucuronidase (GUS)

Com o objetivo de detectar espacialmente a atividade da enzima β -glucuronidase (GUS), plantas transgênicas de milho p5MITE e p0MITE na geração F3 foram analisadas por meio do ensaio histoquímico GUS. Para realizar essa análise, as plantas foram expostas ou não ao estresse de AI segundo Caniato et al. (2014), com modificações conforme descrito na seção 2.3. O protocolo do ensaio GUS foi utilizado conforme descrito por Jefferson et al. (1987). O resultado do ensaio histoquímico foi avaliado utilizando um estereoscópio Axio Zoom V16 (Zeiss).

2.6 - Genotipagem dos transgênicos de milho na geração F4

Após a produção e plantio das sementes transgênicas da geração F4 em casa de vegetação, foi realizada a genotipagem das plantas utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela S1) para confirmar a identidade dos transgênicos com relação a cada fusão transcricional. Os iniciadores utilizados foram desenhados com o auxílio do programa Primer3Plus (Untergasser et al., 2007). O DNA genômico foi isolado utilizando-se o método de Saghai-Marouf et al. (1984). Após a extração e quantificação do DNA genômico dos

eventos, foi realizada a técnica de PCR. Cada 20 µl de reação de PCR continha tampão 10X, 2 mM de MgCl₂, 100 µM de cada dNTP, 1,0 µL de cada primer a 10 µM, 30 ng de DNA e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As reações foram feitas utilizando-se um termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) programado para uma desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos de 10 segundos a 94°C, 15 segundos a 59°C, 2 minutos e 30 segundos a 72°C e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Os produtos gerados foram analisados em gel de agarose 1%, com GelRed® mais corante.

2.7 - Quantificação da expressão do gene repórter *GUS* nos transgênicos de milho em homozigose para os transgenes

Cinco transgênicos de cada construção da geração F4 (exceto a construção pFm0MITE, que tinha apenas quatro transgênicos nessa geração) foram selecionados para realizar a técnica de RT-qPCR para o gene repórter, *GUS*. A linhagem não transgênica L3 foi utilizada como controle negativo. A expressão gênica foi quantificada com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak; Schmittgen, 2001), conforme descrito na seção 2.3.

Os transgênicos foram submetidos à solução hidropônica sem Al e com {39} µM de Al durante seis dias (Caniato et al., 2014). O experimento foi conduzido em câmara de crescimento e cada parcela experimental foi constituída de sete plântulas por tratamento e uma repetição biológica. Após o período de seis dias, os ápices radiculares da raiz principal (1,0 cm), o restante do sistema radicular e a parte aérea das sete plântulas de cada tratamento foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C para realização dos ensaios de quantificação da expressão do gene *GUS*, conforme descrito na seção 2.3. Para a correção de possíveis variações na quantidade de RNA utilizada em cada reação de RT-qPCR, a normalização dos experimentos foi realizada utilizando-se os genes de referência actina e tubulina.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Transformação genética de milho Hill via *Agrobacterium tumefaciens*

Foram realizadas 21 transformações genéticas via *A. tumefaciens*, gerando um total de 151 transgênicos (pSbMATE) com diferentes regiões promotoras do gene *SbMATE*. A porcentagem de transformação dos embriões imaturos foi de 2,39% (número de transgênicos gerados / número de embriões infectados) x 100. Somente a transformação com a construção gênica A: p5MITE+, que corresponde a região que começa no marcador flanqueador do loco *Alt_{SB}* e vai até o ATG não produziu nenhum transgênico. Plantas

transgênicas de milho foram produzidas com todas as outras fusões transcricionais. Foram observadas variações na eficiência de transformação genética dos embriões de milho Hill entre as construções gênicas utilizadas. As construções gênicas p5MITE, p4MITE, p3MITE, p1MITE, p0MITE e pFm0MITE produziram 30, 16, 27, 51, 9 e 18 transgênicos, respectivamente. Essas variações são esperadas visto que muitos fatores influenciam o processo de transformação genética dos embriões de milho, como o período de coleta dos embriões imaturos e a qualidade dos explantes, bem como a construção gênica utilizada, dentre outros (Ishida et al., 1996; Frame et al., 2002; Zhang et al., 2013). Portanto, várias transformações genéticas devem ser realizadas para garantir que as variações sejam minimizadas e que assim seja possível obter plantas transformadas.

Após a seleção dos calos transgênicos em cultura de tecidos, a inserção dos transgenes no genoma foi confirmada por PCR, utilizando o gene *bar* como referência (Figura S1).

3.2 - Quantificação da expressão do gene repórter *GUS* nos transgênicos de milho da geração F2

Na geração F2, foram selecionados transgênicos com cópia única dos insertos. Entre os transgênicos pSbMATE analisados, 79,6% segregaram na proporção mendeliana esperada de 3 (resistência ao herbicida Finale) : 1 (sensibilidade ao herbicida Finale), consistente com a presença de um transgene dominante, indicando inserção de uma única cópia do gene exógeno (Tabela 1).

Os resultados da análise de segregação são condizentes com a metodologia de transformação genética utilizada. No método de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, frequentemente, um baixo número de cópias do gene de interesse é inserido no genoma hospedeiro (Zambryski et al., 1989; Enriquez-Obregon et al., 1998), influenciando o perfil de expressão gênica. Assim, a inserção de uma cópia do transgene é um fator importante, pois transgênicos com cópia única são geneticamente estáveis e normalmente seguem padrões de segregação Mendeliana, reduzindo a possibilidade de silenciamento gênico (Gadaleta et al., 2011).

Na primeira geração dos transgênicos produzidos (T0) é esperado que a integração do transgene no genoma ocorra apenas em um dos cromossomos homólogos, estando assim em hemizigose (T₋, sendo que T indica o transgene). Após o processo de autofecundação dos eventos e seguindo as leis de segregação mendeliana, espera-se que, na geração F2, 25% das plantas sejam homozigotas (TT), 50% sejam heterozigotas (Tt) e 25% das plantas não contenham o transgene.

Tabela 01 - Análise de qui-quadrado dos transgênicos pSbMATE após avaliação da segregação em casa de vegetação¹

Transgênico ²	Número de plantas vivas	Número de plantas mortas	χ^2 calculado
p5MITE			
Transgênico 01	14	06	0,26
Transgênico 02	14	06	0,26
Transgênico 03	15	04	0,05
Transgênico 04	07	03	0,02
Transgênico 05	11	09	4,26 ³
p4MITE			
Transgênico 01	08	04	0,44
Transgênico 02	13	07	1,06
Transgênico 03	18	02	2,4
Transgênico 04	16	04	0,26
Transgênico 05	12	06	0,66
p1MITE			
Transgênico 01	12	06	0,66
Transgênico 02	13	06	0,43
Transgênico 03	11	02	0,64
Transgênico 04	16	02	1,85
Transgênico 05	17	03	1,06
p0MITE			
Transgênico 01	10	02	0,44
Transgênico 02	10	01	1,48
Transgênico 03	16	02	1,85
Transgênico 04	15	05	0
Transgênico 05	15	05	0
pFm0MITE			
Transgênico 01	12	04	0
Transgênico 02	12	04	0
Transgênico 03	11	0	3,66
Transgênico 04	10	03	0,02

¹ χ^2 (1 grau de liberdade) = 3,841 (*p*-valor = 0,05).

H₀: segregação 3 (resistência ao herbicida) :1 (sensibilidade).

²Os transgênicos apresentados correspondem aos transgênicos selecionados da geração F4.

³O valor de χ^2 foi significativo.

Na análise de expressão do gene *GUS*, transgênicos de milho da geração F2 foram comparados com a linhagem L3 não transgênica e com um evento transgênico de milho contendo o gene *GUS* controlado pelo promotor constitutivo 35S (35S::*GUS*), o qual confere alta expressão relativa (Figura 6). Os resultados demonstram que os transgênicos referentes as construções p5MITE, p4MITE, p1MITE e p0MITE apresentaram, de forma geral, expressão relativa do gene repórter *GUS* superior quando comparados com os transgênicos p3MITE e pFm0MITE.

A análise de expressão indica também expressão diferencial de um mesmo transgene entre os diferentes indivíduos transformados (Figura 6). A variação na expressão do gene *GUS* entre os diferentes transgênicos de uma mesma construção gênica pode estar relacionada com a interação com outros genes ou com o efeito de posição da integração do

transgene no genoma hospedeiro (Joyce et al. 2014). Na técnica de transformação genética via *Agrobacterium* a inserção do DNA exógeno no genoma da planta hospedeira ocorre preferencialmente em regiões transcricionalmente ativas (Koncs et al., 1992; Bourras et al., 2015), podendo ocorrer em diferentes regiões do genoma e de forma aleatória (Gelvin; Kim, 2007).

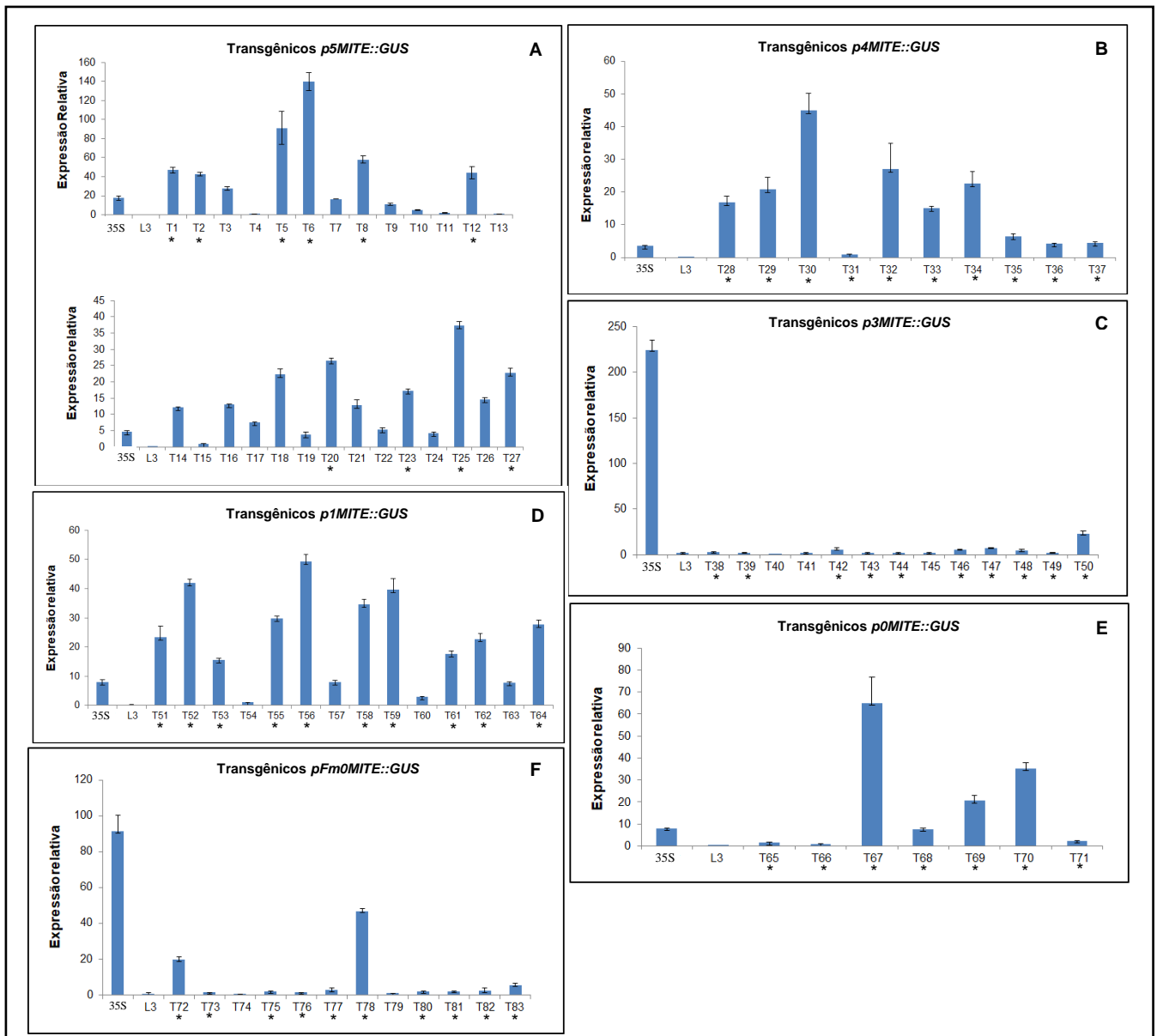


Figura 6. Análise da expressão relativa do gene *GUS* no ápice radicular de transgênicos da geração F2, após 24 h em solução nutritiva, pH 4,0, na presença de 39 μ M de Al. (A) Transgênicos *p5MITE::GUS*: 35S: transgênico 35S::*gus*; L3: controle negativo - linhagem não transgênica; T1 a T27; amostras calibradoras: T13 e T15; (B) transgênicos *p4MITE::GUS*: T28 a T37; amostra calibradora: T31; (C) transgênicos *p3MITE::GUS*: T38 a T50; amostra calibradora: T40; (D) transgênicos *p1MITE::GUS*: T51 a T64; amostra calibradora: T54; (E) transgênicos *p0MITE::GUS*: T65 a T71; amostra calibradora: T66; (F) transgênicos *pFm0MITE::GUS*: T72 a T83; amostra calibradora: T79. A letra T no eixo X designa os transgênicos avaliados. Os transgênicos marcados com asterisco

Os transgênicos pertencentes às construções pFm0MITE e p3MITE apresentaram baixa expressão relativa do transgene *GUS* entre todos os indivíduos avaliados (Figura 6). Os transgênicos pFm0MITE não possuem as inserções MITE, sugerindo que a ausência das repetições da região promotora e de outros elementos *cis*-regulatórios presentes nessa região afetaram a atividade transcricional do gene repórter *GUS*. A baixa expressão relativa dos transgênicos p3MITE pode estar associada com o silenciamento do transgene, rearranjos ou deleções no DNA inserido, fazendo com que o gene *GUS* possa estar presente, mas diferencialmente ou não expresso (Gelvin, 2017; Jupe et al., 2018).

Entre 7 e 10 transgênicos de cada construção gênica avaliada que apresentaram maior expressão do gene *GUS* (marcados com asterisco) foram selecionados para avançarem para a geração F3, onde foi realizado o teste de progênie.

3.3 - Fixação dos transgênicos

Os resultados da seleção dos transgênicos fixados após o teste de progênie estão sumarizados na Tabela S2. A identificação das plantas homozigotas é uma etapa importante, pois esses indivíduos mantêm um alto grau de consistência para características determinadas por um gene nas gerações subsequentes, possuindo estabilidade de integração e de herança do transgene (Passricha et al., 2016). Após a seleção das famílias com os transgenes em homozigose, entre quatro e cinco transgênicos de cada construção gênica foram avançados para a geração F4.

3.4 - Análise do número de cópias dos transgenes

A análise do número de cópias dos transgenes via RT-qPCR nos transgênicos p5MITE identificou indivíduos com 1, 2, 3 e 4 cópias do transgene. Em relação aos transgênicos pFm0MITE, foram identificados indivíduos com 1, 2 e 3 cópias do transgene. Foram selecionadas três plantas transgênicas p5MITE e três plantas transgênicas pFm0MITE que apresentaram 2 cópias do transgene (Figura 7). As plantas transgênicas selecionadas foram avançadas para a produção de sementes da geração F4. Os resultados da análise do número de cópias para esses transgênicos também são consistentes com a metodologia de transformação genética via *A. tumefaciens*, que permite a integração de uma ou poucas cópias do transgene no genoma hospedeiro (Zambryski et al., 1989; Enriquez-Obregon et al., 1998).

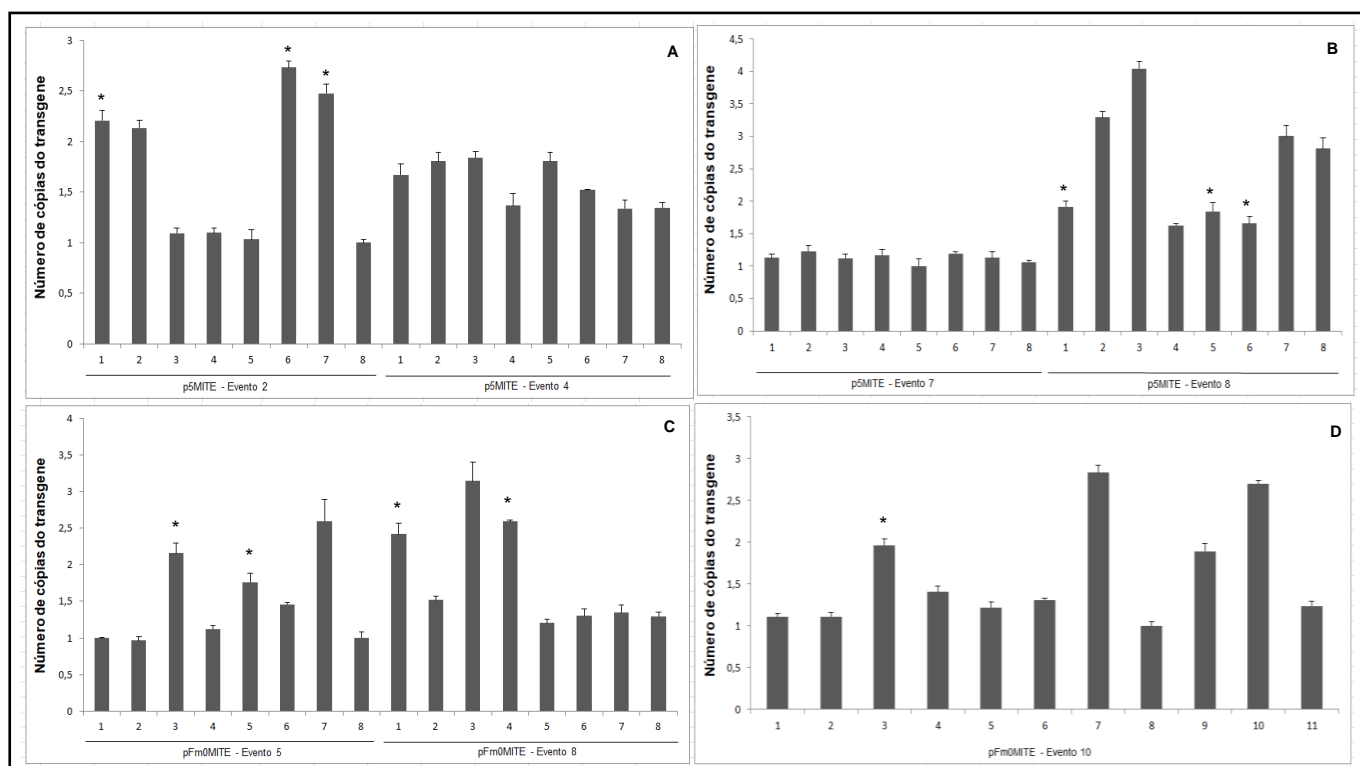


Figura 7. Número de cópias do transgene após análise de qPCR do gene *GUS* em transgênicos de milho p5MITE e pFm0MITE da geração F3. (A) p5MITE: transgênicos 2 e 4; (B) p5MITE: transgênicos 07 e 08; (C) pFm0MITE: transgênicos 05 e 08; (D) pFm0MITE: transgênico 10. Os números presentes no eixo X indicam os indivíduos analisados. Os indivíduos transgênicos marcados com asterisco foram selecionados para avançarem para a geração F4. As barras de erro denotam o desvio padrão.

3.5 - Genotipagem dos transgênicos de milho na geração F4

Foi realizada a genotipagem dos transgênicos pSbMATE da geração F4, por meio de PCR, utilizando iniciadores específicos para uma confirmação final das plantas transgênicas. A análise molecular confirmou a inserção dos transgenes nos indivíduos p5MITE, p4MITE, p1MITE, p0MITE e pFm0MITE avaliados. Os tamanhos dos fragmentos resultantes da amplificação correspondem aos tamanhos esperados. Para os transgênicos da construção p5MITE, os iniciadores utilizados alinharam-se dentro da região MITE, gerando cinco fragmentos (414 pb, 854 pb, 1.217 pb, 1.580 pb e 1.943 pb). Os transgênicos da construção p4MITE geraram um fragmento de 2.086 pb. Para a construção p1MITE, o fragmento gerado foi de 1.000 pb. O tamanho do fragmento gerado para a construção p0MITE foi de 2.000 pb. Os transgênicos da construção pFm0MITE geraram um fragmento de 500 pb. Entretanto, para os transgênicos p3MITE, apesar de ter ocorrido amplificação para o gene de referência *bar*, não foi verificada amplificação do transgene com a utilização dos iniciadores específicos (Figura S2). É importante ressaltar que os resultados da análise de expressão da geração F2 (Figura 6: painel C) para os eventos p3MITE também indicaram uma expressão gênica baixa, semelhante a linhagem L3 não transgênica. Diante desses

resultados, os eventos p3MITE não avançaram para as análises de RT-qPCR da geração F4.

3.6 - Quantificação da expressão do gene repórter *GUS* nos transgênicos em homozigose para os transgenes

Foram selecionados transgênicos em homozigose para cada construção gênica, para as análises finais de expressão do gene *GUS*. Os resultados da análise de RT-qPCR demonstraram que os transgênicos correspondentes às construções p5MITE, p4MITE, p1MITE e p0MITE, apresentaram expressão do gene repórter *GUS* no ápice radicular, no restante do sistema radicular e na parte aérea (Figura 8). Os transgênicos da construção pFm0MITE não apresentaram expressão gênica no ápice da raiz e no restante do sistema radicular. Porém, na parte aérea foi constatada uma baixa expressão do gene repórter nesses transgênicos (Figura 8).

Os resultados indicaram relação entre o aumento da expressão gênica em resposta ao tratamento com AI em 13 indivíduos transgênicos avaliados. Nos transgênicos com cinco repetições MITE essa relação foi identificada em todos os tecidos avaliados. No ápice radicular foi constatada indução da expressão do gene *GUS* na presença de AI para dois transgênicos da construção p5MITE (Figura 8: painel A). No restante do sistema radicular foi observada indução da expressão gênica em um transgênico da construção p0MITE e em três transgênicos da construção p5MITE (Figura 8: painel B). Em relação a parte aérea, o aumento da expressão gênica na presença de AI foi verificado nos transgênicos pFm0MITE (três transgênicos), p1MITE (três transgênicos), p4MITE (dois transgênicos) e p5MITE (três transgênicos) (Figura 8: painel C). Em sorgo, a presença de fatores regulatórios atuando em *trans* e elementos *cis* são fundamentais para a indução da expressão do gene *SbMATE* na presença de AI (Melo et al., 2013; Melo et al., 2019).

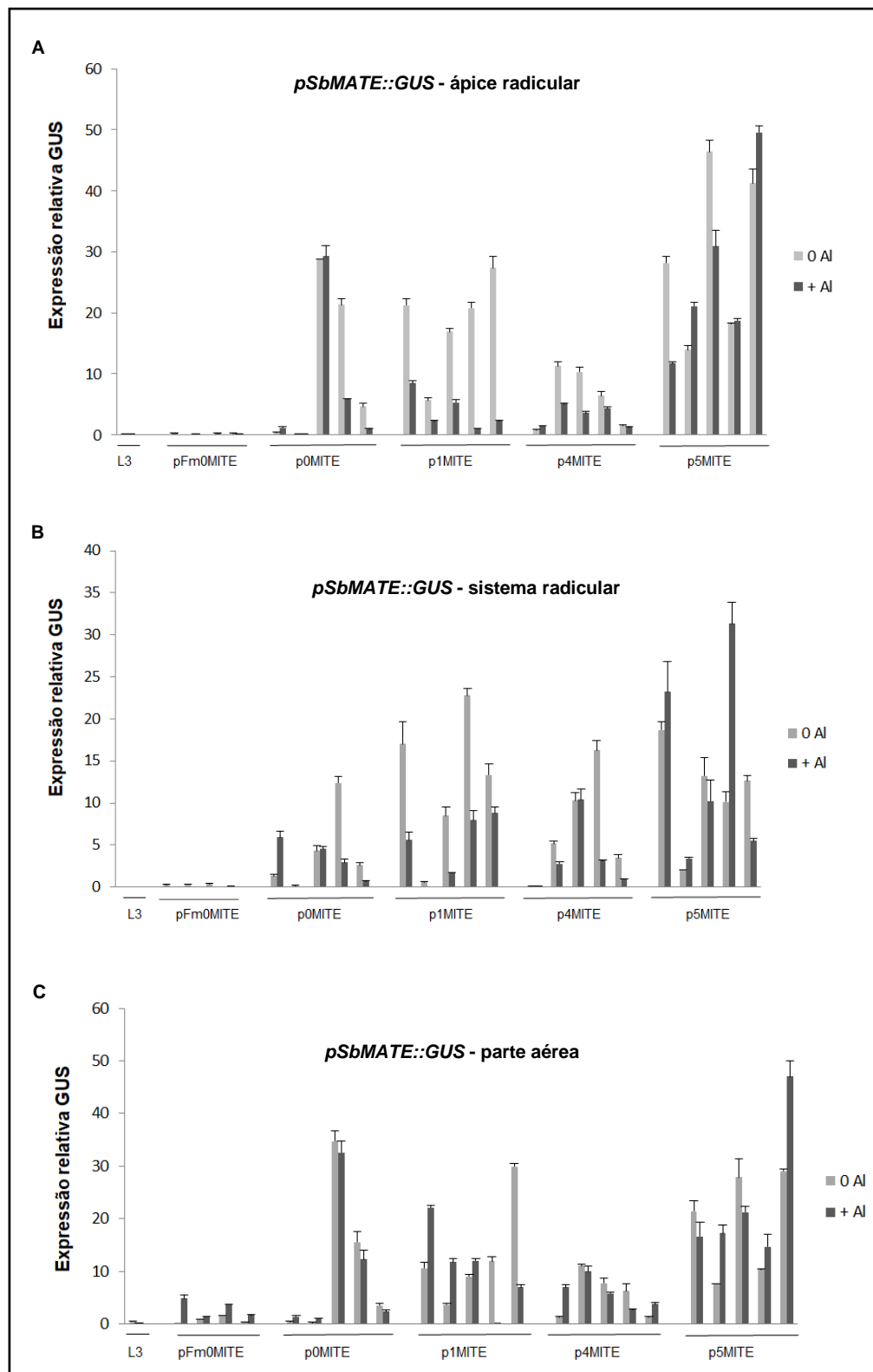


Figura 8: Análise da expressão relativa do gene *GUS* nos transgênicos *pSbMATE* fixados para os transgenes, via técnica de RT-qPCR. As avaliações foram realizadas após seis dias em solução nutritiva, pH 4,0, na ausência de AI e na presença de $\{39\}$ μM de AI. (A) Expressão relativa do gene *GUS* no ápice radicular; (B) expressão relativa do gene *GUS* no restante do sistema radicular; (C) expressão relativa do gene *GUS* na parte aérea. São mostradas as médias de três repetições técnicas e as respectivas barras de desvio padrão.

A figura 9 apresenta a média de expressão do gene *GUS* nos transgênicos pSbMATE após análise de RT-qPCR. Os resultados indicam maior média de expressão relativa do gene *GUS* nos transgênicos que contém cinco inserções MITE, tanto na presença quanto na ausência de AI, em todos os tecidos avaliados. Foi verificada maior expressão gênica no ápice radicular dos transgênicos com as cinco repetições MITE, que é o sítio primário de toxidez do AI (Kochian, 1995). Nos demais transgênicos avaliados não foi observada uma relação direta entre o número de inserções MITE e a expressão gênica (Figura 9).

O perfil de expressão gênica *GUS* foi semelhante entre os tecidos avaliados (ápice da raiz, sistema radicular e parte aérea) para as construções p4MITE, p1MITE, p0MITE e pFm0MITE. Portanto, não foi verificada tecido-especificidade para essas construções gênicas no sistema heterólogo de milho, diferentemente do padrão de expressão de *SbMATE* relatado em sorgo por Magalhaes et al. (2007).

Os resultados das análises indicaram também que os eventos p0MITE, que não contém o transposon MITE, apresentaram expressão do gene *GUS* na ausência e na presença de AI nos tecidos avaliados (Figura 9). Portanto, esses resultados sugerem que o promotor *SbMATE* de sorgo é funcional na ausência das repetições MITE, sugerindo ainda a presença de elementos *cis*-regulatórios localizados na região de 2010 pb atuando na regulação da transcrição gênica. Recentemente, análises *in silico* da sequência nucleotídica da região promotora do gene *SbMATE*, utilizando o software MatInspector da plataforma Genomatix (<http://www.genomatix.de/matinspector.html>), resultou na identificação de 494 elementos regulatórios presentes na região de 2010 pb, que foram relacionados com diferentes estresses bióticos e abióticos. Após análise dos elementos identificados, foram selecionados 56 *cis*-elementos relacionados com a regulação de diversos genes responsivos a estresses abióticos e a fatores gerais de transcrição. Foram identificadas regiões com maior e menor densidade de *cis*-elementos, regiões com a presença de elementos específicos de raiz e regiões com a presença de elementos gerais, como o TATA Box (dados não apresentados). Estudos mais detalhados são necessários com o objetivo de avaliar e caracterizar funcionalmente a presença desses elementos *cis*-regulatórios na região promotora de 2010 pb e o papel dos elementos regulatórios na modulação da expressão do gene *SbMATE* de sorgo.

A capacidade de alguns elementos *cis*-regulatórios de modular a expressão gênica está relacionada com o fato de conterem sítios de início da transcrição gênica ou sítios de ligação para fatores de transcrição (Thornburg et al., 2006; Fujii et al., 2012). Diversos elementos *cis*-regulatórios já foram identificados dentro ou próximo a genes que codificam para transportadores de ácidos orgânicos associados com os mecanismos de tolerância ao AI (Ferreira; Ryan, 2019). Embora as regiões codificadoras sejam conhecidas para a maioria

desses genes, um número restrito de sequências que flanqueiam as regiões a montante do códon de início da transcrição foi caracterizado (Ferreira; Ryan, 2019).

Os elementos regulatórios são um fator importante na domesticação dos cereais (Ferreira; Ryan et al., 2019). Sua atividade nos genes transportadores de ácidos orgânicos parece ter tido um grande impacto na evolução da tolerância ao Al em muitas espécies cultivadas em solos ácidos (Ferreira; Ryan, 2019). Estes estudos demonstram a importância em compreender os mecanismos subjacentes à atuação de elementos *cis*-regulatórios e fatores de transcrição na regulação da expressão de genes transportadores de ácidos orgânicos e nos mecanismos de tolerância ao Al.

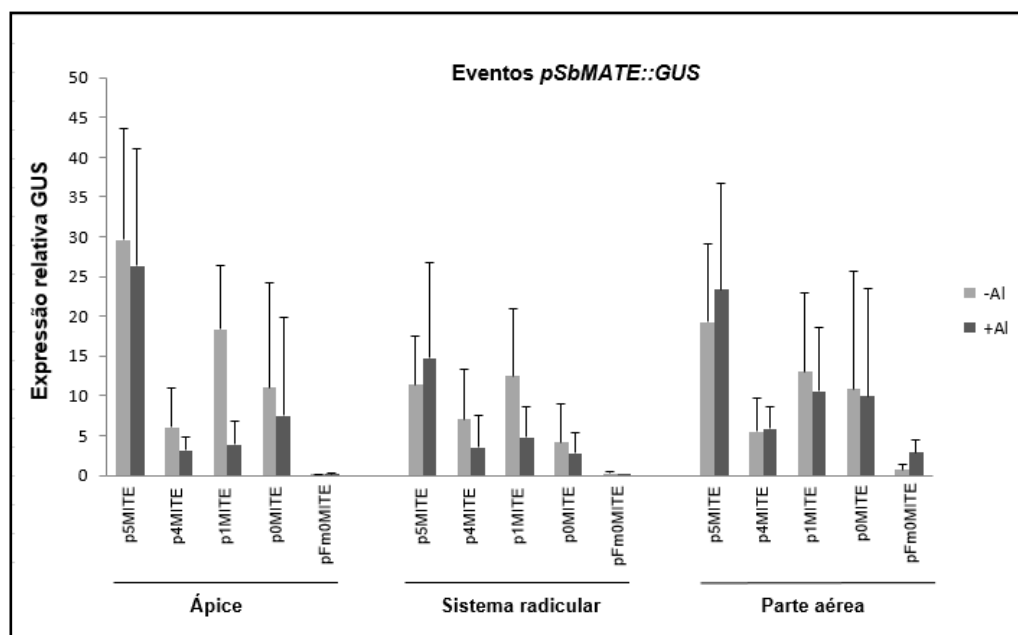


Figura 9: Média de expressão do transgene *GUS* nos transgênicos pSbMATE em homozigose por meio de RT-qPCR. As avaliações foram realizadas após seis dias de cultivo em solução nutritiva, pH 4,0, na ausência e na presença de {39} μ M de Al. Os valores indicam a média da expressão relativa do gene *GUS* para os cinco transgênicos avaliados por construção. São mostradas as barras de desvio padrão das médias de RQ.

A relação entre o número de inserções MITE na região promotora do gene *SbMATE* de sorgo e o aumento da expressão gênica, identificada por Magalhaes et al. (2007), correlacionou positivamente o aumento da tolerância ao Al com o aumento no número de elementos de ação *cis*-regulatória dentro das repetições MITE.

Posteriormente, Melo et al. (2019) avaliaram a expressão do gene *SbMATE* de sorgo com o objetivo de verificar os efeitos regulatórios atuando em *cis* e *trans* na modulação da expressão gênica. Estudos em protoplastos de *Arabidopsis* associaram positivamente a atividade de transativação dos fatores de transcrição SbWRKY1 e SbZNF1 e o número de repetições MITE presentes no promotor de *SbMATE*, sugerindo uma dependência de

dosagem, ou seja, quanto maior o número de repetições MITE, maior o número de sítios de ligação para os fatores de transcrição e, conseqüentemente, maior expressão do gene *SbMATE* (Melo et al., 2019).

Entretanto, no presente estudo foram identificados diferentes padrões de expressão do gene *GUS* sob controle do promotor do gene *SbMATE* quando comparado com os trabalhos de Magalhaes et al. (2007) e Melo et al. (2019). Foi constatada uma relação direta entre os transgênicos com cinco cópias da região repetitiva (p5MITE) e o aumento da expressão do gene repórter. Porém, não foi verificada uma relação direta nas outras construções gênicas avaliadas, entre a dosagem alélica e o aumento da expressão gênica.

O trabalho de Magalhaes et al. (2007) também verificou indução da expressão gênica na presença de AI e relação de tecido-especificidade do gene *SbMATE*. No presente estudo, foi verificada relação entre o aumento da expressão gênica e a presença de AI extracelular em 13 transgênicos avaliados, destacando os transgênicos p5MITE que apresentaram aumento de expressão em todos os tecidos avaliados. Foi verificada associação entre a tecido-especificidade e os padrões de expressão gênica nos transgênicos p5MITE, que apresentaram maior expressão relativa do gene *GUS* no ápice radicular (Figura 9). Não foi verificada associação entre o perfil de expressão e a tecido-especificidade para as outras construções gênicas analisadas. As diferenças nos resultados obtidas nesse estudo e os trabalhos descritos por Magalhaes et al. (2007) e Melo et al. (2019) podem ser explicadas, em parte, pelo sistema de expressão utilizado.

Por se tratar de um sistema de expressão heterólogo, variações nos fatores de transcrição em milho modulados pela presença de AI extracelular podem ter levado a diferenças na indução da expressão gênica e tecido-especificidade nos transgênicos avaliados quando comparados com os resultados observados em sorgo. Diferentes mecanismos regulatórios em milho modulando a região promotora do gene *SbMATE* de sorgo podem ter resultado nos diferentes padrões de resposta obtidos nesse estudo, em comparação com os estudos anteriores em sorgo (Magalhaes et al., 2007; Melo et al., 2019). Entretanto, os resultados da análise de expressão gênica obtidos nesse estudo para as construções p5MITE, p1MITE, p0MITE e pFm0MITE sugerem que pelo menos parte da maquinaria necessária para a ativação da região promotora do gene *SbMATE* de sorgo está presente em milho.

É importante destacar que a tolerância ao AI em milho é uma característica complexa, com regiões genômicas identificadas (QTLs) explicando entre 5 e 30% da variância fenotípica dessa característica em diferentes populações (Sibov et al., 1999; Ninamango-Cárdenas et al., 2003; Guimarães et al., 2014). O gene *ZmMATE1*, homólogo do gene *SbMATE* de sorgo, foi associado com a tolerância ao AI em milho (Maron et al., 2010). A

rápida regulação da expressão do gene *ZmMATE1* e a exsudação de citrato ativada por Al é diferente do mecanismo observado em sorgo (Maron et al., 2010). A expressão do gene *ZmMATE1* e a exsudação de citrato em milho podem variar de 2 a 6 horas após o estresse de Al. Diferentemente, a ativação da exsudação de citrato nas raízes de sorgo também ocorre gradualmente, porém, ao longo de 4 a 6 dias de exposição ao Al (Magalhaes et al., 2007). Essas diferenças sugerem que a liberação de citrato nessas duas espécies de plantas é modulada por mecanismos regulatórios que apresentam diferenças (Maron et al., 2010). Nesse sentido, a utilização do milho como sistema heterólogo para a caracterização da região promotora do gene *SbMATE* de sorgo pode ocasionar diferenças no padrão de expressão gênica, quando comparado com o perfil de expressão descrito por Magalhaes et al. (2007) e Melo et al. (2019) em sorgo.

3.7 - Detecção da atividade da enzima β -glucuronidase (GUS)

O ensaio histoquímico de GUS foi realizado em quatro eventos p5MITE (Figura 6: painel A - eventos 01, 08, 12 e 20) e quatro eventos p0MITE (Figura 6: painel E - eventos 65, 67, 69 e 71). Essa análise foi realizada apenas em alguns eventos, de forma preliminar, para testar a eficácia do ensaio GUS na detecção da atividade da enzima β -glucuronidase nos eventos MITE. Na presença da enzima β -glucuronidase, o substrato X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo cicloexil amina) é clivado e o produto desta reação, na presença de oxigênio, forma dímeros resultando em um precipitado insolúvel de cor azul (Jefferson, 1987).

Dos quatro eventos p5MITE analisados, foi possível verificar atividade da enzima β -glucuronidase em três eventos, na presença e na ausência de Al. Os resultados do ensaio indicam que o gene *GUS* sob controle do promotor pSbMATE contendo as cinco inserções MITE é preferencialmente expresso no ápice da raiz principal e das raízes laterais (Figura 10: painel A), como verificado na análise de expressão gênica (Figura 9). Entretanto, também foi verificada expressão do gene repórter ao longo das raízes, aparentemente no feixe vascular (Figura 10: painel B e C). Os resultados do ensaio histoquímico indicam que a expressão do gene *GUS* ocorreu no ápice da raiz, conforme anteriormente relatado por Magalhaes et al. (2007) em sorgo, com o gene *SbMATE* sob o controle do promotor nativo. Entretanto, o padrão de expressão demonstrado no ápice das raízes laterais e ao longo da raiz não foi relatado em trabalhos anteriores com sorgo.

Curiosamente, em genótipos de cevada sensíveis ao Al, o gene *HvAACT1* é expresso no sistema vascular das raízes, atuando na translocação de ferro (Fe) para a parte aérea. No entanto, em genótipos de cevada tolerantes ao Al, a inserção de um transposon na região promotora do gene *HvAACT1* alterou a expressão desse gene para o ápice da raiz,

resultando na tolerância ao Al (Fujii et al., 2012). Da mesma forma, o gene *TaMATE1B* em trigo é expresso no sistema vascular das raízes e induzido pela deficiência de Fe. No entanto, genótipos de trigo tolerantes ao Al têm a inserção de um transposon no promotor do gene *TaMATE1B* que altera sua expressão para o ápice radicular (Tovkach et al., 2013). Nesse sentido, diferenças no perfil de expressão tecidual do gene *GUS* fusionado ao promotor do gene *SbMATE* de sorgo, indicando expressão no sistema vascular das raízes, também podem ser associadas com o sistema heterólogo utilizado e os diferentes mecanismos regulatórios presentes em milho quando comparado com o sorgo.

Nos eventos p0MITE não foi visualizada atividade da enzima β -glucuronidase nos ápices das raízes e no restante do sistema radicular (Figura 10: painel D e E), na presença e na ausência de Al. Esses resultados indicam que a ausência das inserções MITE na região promotora resultou em uma redução de expressão gênica, e conseqüentemente, redução da atividade da enzima β -glucuronidase que é responsável por formar o precipitado azul.

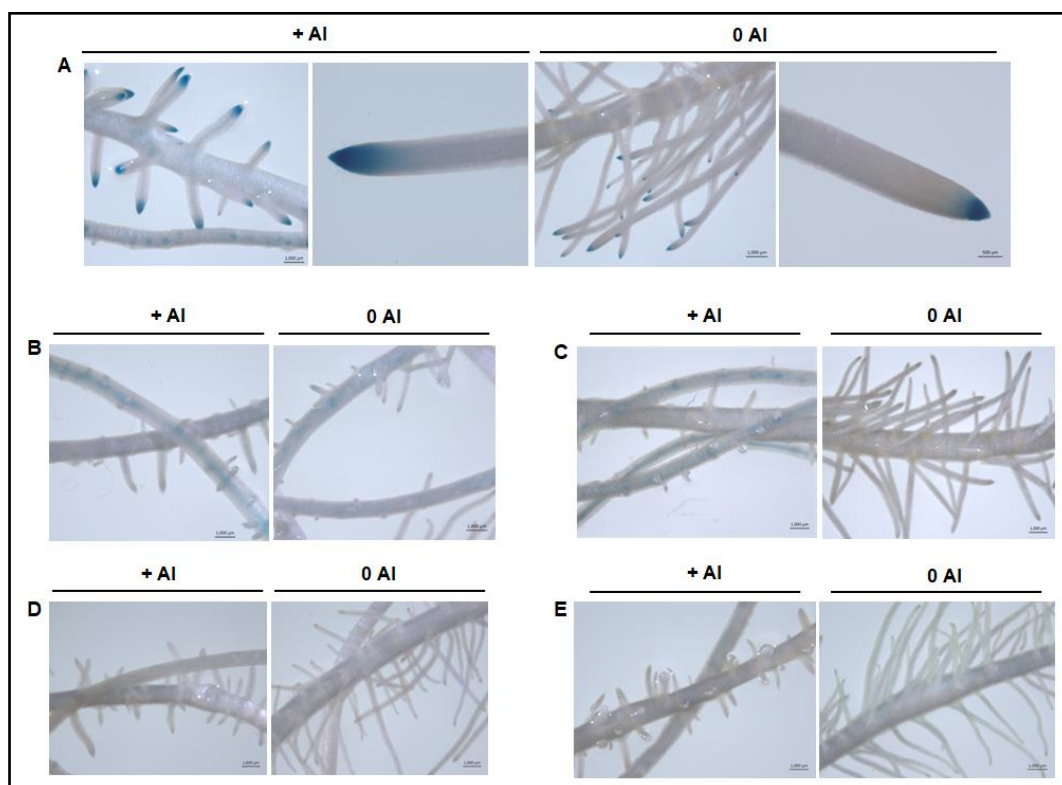


Figura 10. Análise histoquímica da expressão do transgene *GUS* em raízes de eventos p5MITE e p0MITE na geração F3. Os transgênicos foram cultivados em solução nutritiva durante cinco dias, pH 4,0, na ausência e na presença de {39} μ M de Al. (A): *p5MITE::GUS*: transgênico 8; (B): *p5MITE::GUS*: transgênico 12; (C) *p5MITE::GUS*: transgênico 20; (D) *p0MITE::GUS*: transgênico 67; (E) *p0MITE::GUS*: transgênico 69. A identificação dos transgênicos corresponde a numeração dos tratamentos da Figura 7.

Os resultados apresentados indicam que a escolha do sistema heterólogo de milho para avaliar o papel dos *cis*-elementos do promotor do gene *SbMATE* de sorgo na regulação da

expressão gênica levou a diferentes respostas no padrão de expressão do gene *GUS*, quando comparado com o perfil de expressão do gene *SbMATE* relatado em sorgo.

Os resultados desse trabalho implicam também na importância dos fatores regulatórios atuando na modulação da expressão gênica. A integração de informações sobre genes e mecanismos genéticos envolvidos na tolerância ao Al permite uma ampla compreensão dessa característica em diferentes espécies de plantas e pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de cultivares altamente tolerantes ao Al, e conseqüentemente ao aumento da produtividade agrícola em regiões de solos ácidos.

4 - CONCLUSÕES

- Os resultados do trabalho confirmam que os transgênicos pSbMATE contendo as cinco inserções do transposon MITE (p5MITE) apresentaram maior expressão do gene repórter *GUS*.
- O promotor do gene *SbMATE* é funcional na ausência das inserções MITE, sugerindo a presença de outros elementos *cis*-regulatórios presentes na região de 2010 pb a montante da região codificadora do gene que atuam na modulação da expressão gênica.
- O sistema de expressão heteróloga em milho forneceu respostas sobre a funcionalidade da região promotora do gene *SbMATE* de sorgo. Entretanto, esse sistema deve ser utilizado em associação com outros estudos, pois foram observadas diferenças no padrão de expressão do gene repórter sob controle do promotor do gene *SbMATE* quando comparado com o sistema nativo, em sorgo. Outros sistemas heterólogos, como *Setaria viridis*, podem ser associados na caracterização funcional da região promotora do gene *SbMATE* de sorgo.
- Foi verificada indução por Al no sistema de expressão heteróloga em 13 transgênicos avaliados, destacando-se transgênicos p5MITE que apresentaram essa relação em todos os tecidos avaliados. A associação entre tecido-especificidade e a expressão gênica foi constatada apenas nos transgênicos da construção p5MITE. Esse resultado sugere que outros mecanismos regulatórios presentes em sorgo e ausentes em milho, também possam estar atuando na indução por Al, como acentuadores e fatores de transcrição que não foram caracterizados.

5 - PERSPECTIVAS FUTURAS

- *Transformação genética de raízes de sorgo com as construções gênicas em estudo*

Para caracterizar o papel conjunto dos elementos *cis*-regulatórios e os fatores atuando em *trans*, raízes de sorgo de genótipos tolerantes e sensíveis ao AI serão geneticamente modificadas com as construções gênicas p5MITE, p4MITE, p1MITE, p0MITE e pFm0MITE. Assim, ao utilizar o sistema de expressão “nativo” dos fatores de transcrição SbWRKY1 e SbZNF1, permitirá uma análise mais precisa da correlação entre esses fatores regulatórios e os *cis*-elementos presentes na região promotora de *SbMATE*.

- *Ensaio histoquímico do gene GUS nos eventos de milho da geração F4*

Com o objetivo de avaliar espacialmente a atividade da enzima β -glucuronidase (GUS), os eventos selecionados da geração F4 serão submetidos ao ensaio histoquímico do gene *GUS*. Para realizar essa análise, os eventos serão submetidos ao estresse de AI, segundo Caniato et al. (2014). Também serão utilizados eventos não submetidos à condição de estresse.

- *Caracterização funcional da região promotora de 2010 pb do gene SbMATE*

Com o objetivo de avaliar e caracterizar funcionalmente a presença de elementos *cis*-regulatórios na região de 2010 pb do promotor do gene *SbMATE* e o papel dos elementos na modulação da expressão gênica, raízes de *Setaria viridis* serão transformadas com a construção p0MITE.

6 - REFERÊNCIAS

- Armstrong, C. L.; Green, C. E (1991) Developmental and availability of germplasm with high Type II culture formation response. **Maize Genetics Cooperation Newsletter 65**: 92-93.
- Bednarek, P. T.; Orłowska, R.; Niedziela, A (2017) A relative quantitative Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) method for the analysis of abiotic stress. **BMC Plant Biology 17**: 1-13.
- Bourras, S.; Rouxel, T.; Meyer, M (2015) *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer: How a plant pathogen hacks the nuclei of plant and nonplant organisms. **Phytopathology 105**: 1288-1301.
- Caniato, F. F.; Guimarães, C. T.; Schaffert, R. E.; Alves, V. M.; Kochian, L. V.; Borém, A.; Klein, P. E.; Magalhães, J. V (2007) Genetic diversity for aluminum tolerance in sorghum. **Theoretical and Applied Genetics 114**: 863-876.
- Delhaize, E.; Ryan, P. R.; Hebb, D. M.; Yamamoto, Y.; Sasaki, T.; Matsumoto, H (2004) Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences 101**:15249-54.
- Delhaize, E.; Ma, J. F.; Ryan, P. R (2012) Transcriptional regulation of aluminum tolerance genes. **Trends in Plant Science 17**: 6.
- Enriquez-Obregon, G.A.; Vazquez-Padron, R.I.; Prieto-Samsonov, D.L.; Riva, G.A. de la.; Selman-Housein, G (1998) Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Planta 206**: 20-27.
- Ferreira, J. R.; Ryan, P. R (2019) The role of transposable elements in the evolution of aluminium resistance in plant. **Journal of Experimental Botany 70**: 41-54.
- Frame, B. R.; Shou, H.; Chikwamba. R. K.; Zhang, Z.; Xiang, C.; Fonger, T. M.; Pegg, E. K.; Li, B.; Nettleton, D. S.; Pei, D.; Wang, K (2002) *Agrobacterium tumefaciens*: mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. **Plant Physiology 129**: 13-22.

Fujii, M.; Yokosho, K.; Yamaji, N.; Saisho, D.; Yamane, M.; Takahashi, H.; Sato, K.; Nakazono, M.; Ma, J. F (2012) Acquisition of aluminum tolerance by modification of a single gene in barley. **Nature Communications 3**: 713.

Furukawa, J.; Yamaji, N.; Wang, H.; Mitani, N.; Murata, Y.; Sato, K.; Katsuhara, M.; Takeda, K.; Ma, J.F (2007) An aluminum-activated citrate transporter in barley. **Plant Cell Physiology 48**: 1081-1091.

Gadaleta, A.; Giancaspro, A.; Cardone, M. F.; Blanco, A (2011) Real time PCR for detection of precise transgene copy number in durum wheat. **Cellular & Molecular Biology Letters 16**: 652.

Gallo-Franco, J.J.; Sosa, C. C.; Ghneim-Herrera, T.; Quimbaya, M (2020) Epigenetic Control of Plant Response to Heavy Metal Stress: A New View on Aluminum Tolerance. **Frontiers in Plant Science 11**: 602625.

Gelvin, S. B.; Kim, S. I (2007) Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration and transgene expression. **Biochimica et Biophysica Acta 1769**: 410-421.

Gelvin, S. B (2017) Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the plant genome. **Annual Review of Genetics 51**: 195-217.

Guimarães, C. T.; Simões, C. C.; Pastina, M. M.; Maron, L. G.; Magalhães, J. V.; Vasconcellos, R. C. C.; Guimarães, L. J. M.; Lana, U. G. P.; Tinoco, C. F. S.; Noda, R, W.; Jardim-Belicuas, S. N.; Kochian, L. V.; Alves, V. M. C.; Parentoni, S. N (2014) Genetic dissection of Al tolerance QTLs in the maize genome by high density SNP scan. **BMC genomics 15**: 153.

Ishida, Y.; Saito, H.; Ohta, S. H.; Hiei, Y.; Komari, T.; Kumashiro, T (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology 14**: 745-750.

Joyce, P.; Hermann, S.; O'Connell, A.; Dinh, Q.; Shumbe, L.; Lakshmanan, P (2014) Field performance of transgenic sugarcane produced using *Agrobacterium* and biolistics methods. **Plant Biotechnology Journal 12**: 411-424.

Jupe, F.; Rivkin, A. C.; Michael, T. P.; Zander, M.; Motley, T. S.; Sandoval, J. P.; Slotkin, K. R.; Chen, H.; Castagnon, R.; Nery, J. R.; Ecker, J. R (2018) The complex architecture of plant transgene insertions. **bioRxiv** 282772.

Kashino-Fujii, M.; Yokosho, K.; Yamaji, N.; Yamane, M.; Saisho, D.; Sato, K.; Ma, J. F (2018) Retrotransposon insertion and DNA methylation regulate aluminum tolerance in European barley accessions. **Plant Physiology** **178**: 716-727.

Kochian, L.V.; Piñeros, M.A.; Hoekenga, O. A (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminium resistance and toxicity. **Plant Soil** **274**: 175-195.

Kochian, L.V.; Piñeros, M.A.; Liu, J.; Magalhaes, J. V (2015) Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology** **66**: 571-598.

Koncz, C.; Németh, K.; Rédei, G. P.; Schell, J (1992) T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis. **Plant Molecular Biology** **20**: 963-976.

Li, J.; Wang, Z.; Peng, H.; Liu, Z (2014) A MITE insertion into the 3'-UTR regulates the transcription of TaHSP16.9 in common wheat. **The Crop Journal** **2**: 381-387.

Li, G.Z.; Wang, Z. Q.; Yokosho, K.; Ding, B.; Fan, W.; Gong, Q. Q.; Li, G. X.; Wu, Y. R.; Yang, J. L.; Ma, J. F.; Zheng, S. J (2018) Transcription factor WRKY22 promotes aluminum tolerance via activation of OsFRDL4 expression and enhancement of citrate secretion in rice (*Oryza sativa*). **New Phytologist** **219**: 149-162.

Lin, J. J (1995) Electrotransformation of *Agrobacterium*. **Methods Molecular Biology** **47**:171-178.

Livak, K.; Schmittgen, T. D (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$. **Methods** **25**: 402-408.

Ma, Y.; Li, C.; Ryan, P.R.; Shabala, S.; You, J.; Liu, J.; Liu, C.; Zhou, M (2016) A new allele for aluminium tolerance gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). **BMC Genomics** **17**: 186.

Magalhães, J. V.; Liu, J.; Guimares, C. T.; Lana, U. G. P.; Alves, V. M.; Wang, Y-H; Schaffert, R. E.; Hoekenga, O. A.; Piñeros, M. A.; Shaff, J. E.; Klein, P.; Carneiro, N. P.; Coelho, C. M.; Trick, H. N.; Kochian, L. V (2007) A gene in multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature genetics** **39**: 1156-1161.

Maron, L. G.; Piñeros, M. A.; Guimarães, C. T.; Magalhaes, J. V.; Pleiman, J. K.; Mao, C.; Shaff, J.; Belicuas, S. N. J.; Kochian, L. V (2010) Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. **The Plant Journal** **61**: 728-740.

Melo, J. O.; Martins, L. G. C.; Barros, B. A.; Pimenta, M. R.; Lana, U. G. P.; Duarte, C. E. M.; Pastina, M. M.; Guimarães, C. T.; Schaffert, R. E.; Kochian, L. V.; Fontes, E. P. B.; Magalhães, J. V (2019) Repeat variants for the SbMATE transporter protect sorghum roots from aluminum toxicity by transcriptional interplay in cis and trans. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **116**: 313-318.

Melo, J. O.; Lana, U. G. P.; Piñeros, M. A.; Alves, V. M. C.; Guimarães, C. T.; Liu, J.; Zheng, Y.; Zhong, S.; Fei, Z.; Maron, L. G.; Schaffert, R. E.; Kochian, L. V.; Magalhaes, J. V (2013) Incomplete transfer of accessory loci influencing *SbMATE* expression underlies genetic background effects for aluminum tolerance in sorghum. **Plant Journal** **73**: 276-288.

Morgante, M.; De Paoli, E.; Radovic, S (2007) Transposable elements and the plant pan-genomes. **Current Opinion in Plant Biology** **10**: 149-155.

Muotri, A. R.; Marchetto, M. C.; Coufal, N. G.; Gage, F. H (2007) The necessary junk: new functions for transposable elements. **Human Molecular Genetics** **16**: R159-R167.

Ninamango-Cardenas, F.; Guimarães, C.T.; Martins, P.; Parentoni, S. N.; Carneiro, N. P., et al. (2003) Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize. **Euphytica** **130**: 223-232.

Parker, D. R.; Norvell, W. A.; Chaney, R. L (1995) GEOCHEM-PC: a chemical speciation program for IBM and compatible computers. In: Loeppert RH, Schwab AP, Goldberg S (ed.) Chemical equilibrium and reaction models. **Soil Science Society of America**: 253-269.

Passricha, N.; Saifi, S., Khatodia, S.; Tuteja, N (2016) Assessing zygosity in progeny of transgenic plants: current methods and perspectives. **Journal of Biological Methods** **3**: 1-13.

Paz, M. M.; Shou, H.; Guo, Z.; Zhang, Z.; Banerjee, A. K.; Wang, K (2004) Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. **Euphytica** **136**: 167-179.

Pour, A. H.; Özkan, G.; Nalci, ÖB.; Haliloğlu, K (2019) Estimation of genomic instability and DNA methylation due to aluminum (Al) stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) using iPBS and CRED-iPBS analyses. **Turkish Journal of Botany** **43**: 27-37.

Ryan, P. R.; Delhaize, E (2010) The convergent evolution of aluminum resistance in plants exploits a convenient currency. **Functional Plant Biology** **37**: 275-284.

Saghai-Marouf, M. A.; Sloman, K. M.; Jorgensen, R. A.; Allard, R. W (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **81**: 8014-8018.

Sasaki, T.; Ryan, P. R.; Delhaize, E, Hebb, D. M (2006) Sequence upstream of the wheat (*Triticum aestivum* L.) *ALMT1* gene and its relationship to aluminum resistance. **Plant Cell Physiology** **47**: 1343-1354.

Sibov, S. T.; Gaspar, M. J.; Ottoboni, L. M. M.; Arruda, P.; Souza, A. P (1999) Two genes controlling aluminum tolerance in maize: genetic and molecular mapping analyses. **Genome** **42**: 475-482.

Taspinar, M. S.; Aydin, M.; Sigmaz, B.; Yagci, S.; Arslan, E.; Agar, G (2018) Aluminum-Induced Changes on DNA Damage, DNA Methylation and LTR Retrotransposon Polymorphism in Maize. **Arabian Journal for Science and Engineering** **43**: 123-131.

Thornburg, B. G.; Gotea, V.; Makalowski, W (2006) Transposable elements as a significant source of transcription regulating signals. **Gene** **365**: 104-110.

Tovkach, A.; Ryan, P. R.; Richardson, A. E.; Lewis, D. C.; Rathjen, T. M (2013) Transposon-mediated alteration of TaMATE1B expression in wheat confers constitutive citrate efflux from root apices. **Plant Physiology** **161**: 880-92.

Untergasser, A.; Nijveen, H.; Rao, X.; Bisseling, T.; Geurts, R.; Leunissen, J. A. M (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research** **35**: 71-74.

Wang, J. P.; Raman, H.; Zhou, M. X.; Rya N, P. R.; Delhaize, E.; Hebb, D. M.; Coombes, N.; Mendham, N (2007) High-resolution mapping of the Alp locus and identification of a candidate gene *HvMATE* controlling aluminum tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics: international journal of plant breeding research** **115**: 265-276.

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

Yokosho, K.; Yamaji, N.; Fujii-Kashino, M.; Ma, J. F (2016) Retrotransposon mediated aluminum tolerance through enhanced expression of the citrate transporter OsFRDL4. **Plant Physiology** **172**: 2327-2336.

Zambryski, P.; Tempe, J.; Schell, J (1989) Transfer and Function of T-DNA Genes from *Agrobacterium* Ti and Ri Plasmids in Plants. **Cell** **56**: 193-201.

Zhang, W.-J.; Dewey, R. E.; Boss, W.; Phillippy, B. Q.; Qu, R (2013) Enhanced *Agrobacterium*-mediated transformation efficiencies in monocot cells is associated with attenuated defense responses. **Plant Molecular Biology** **81**: 273-286.

Zhou, G.; Delhaize, E.; Zhou, M.; Ryan, P. R (2013) The barley MATE gene, *HvAACT1*, increases citrate efflux and Al³⁺ tolerance when expressed in wheat and barley. **Annals of Botany** **112**: 603-612.

7 - MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela suplementar 1 - Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos

Iniciadores / Número de acesso	Sequência dos iniciadores (5´ - 3´) Sequência senso/anti-senso	Aplicação
Bar	TGCACCATCGTCAACCAC AGAAACCACGTCATGCC	Confirmação dos transgênicos - gene de referência
p5MITE-F1	AGACTCAAAAGATTCGTCTCGT	Confirmação dos transgênicos - p5MITE
SC283_4-R	GGGGACTGCTTTTTGTACAAACTTGTTTTAT CTCAGTACAAATCAGCGAAT	
SC283_3-F	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGACGTATG CCTCACGTTTTCG	Confirmação dos transgênicos - p4MITE, p3MITE e p1MITE
SC283_4-R	GGGGACTGCTTTTTGTACAAACTTGTTTTAT CTCAGTACAAATCAGCGAAT	
p0MITE	GTTGGCGTTTGCTGCTTTAT CGGCCTAGCTACAAACCTTG	Confirmação dos transgênicos - p0MITE
pFm0MITE	TTTGAAGGAGAGGGACGGA GAGGTACATGGGAACGCGAT	Confirmação dos transgênicos - pFm0MITE
ACT/ZmB84.08G123500*	GTCATCACCATTGGGTCAGAAAG CAACAAGAGATGGCTGGAACAG	Análise do número de cópias
18S/ZmPHJ40.05G180100*	AATCCCTTAACGAGGATCCATTG CGCTATTGGAGCTGGAATTACC	Análise de expressão gênica
ATUB/NM001111970.1*	CCTTCAGCACCTTCTTCAGC TTGTTAGCGGCATCCTCCTT	
ACT/Zm00001d010159*	GATGATGCGCCAAGAGCTG GCCTCATCACCTACGTAGGCAT	
GUS	GAACTGAACTGGCAGACTATC TGGATTCCGGCATAGTTAAAG	

* Sequência obtida no National Center for Information Technology (NCBI, EUA - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Tabela suplementar 02 - Teste de progênie nos transgênicos pSbMATE selecionados para a geração F4

Descrição do transgênico¹	Número de sementes plantadas	Número de plantas germinadas	Número de plantas mortas após herbicida
p5MITE			
<u>Transgênico 01</u>			
Família 1	20	20	0
<u>Transgênico 05</u>			
Família 1	20	19	0
<u>Transgênico 08</u>			
Família 2	20	20	0
<u>Transgênico 12</u>			
Família 4	20	19	0
<u>Transgênico 20</u>			
Família 4	20	20	0
p4MITE			
<u>Transgênico 28</u>			
Família 8	20	20	0
<u>Transgênico 31</u>			
Família 2	20	20	0
<u>Transgênico 34</u>			
Família 5	20	20	0
<u>Transgênico 35</u>			
Família 2	20	19	0
<u>Transgênico 37</u>			
Família 1	20	20	0
p3MITE			
<u>Transgênico 39</u>			
Família 1	20	19	0
<u>Transgênico 43</u>			
Família 1	20	20	0
<u>Transgênico 44</u>			
Família 1	20	19	0
<u>Transgênico 46</u>			
Família 5	20	20	0
<u>Transgênico 48</u>			
Família 4	20	20	0
p1MITE			
<u>Transgênico 51</u>			
Família 5	20	20	0
<u>Transgênico 52</u>			
Família 1	20	20	0
<u>Transgênico 56</u>			
Família 3	20	20	0
<u>Transgênico 58</u>			
Família 2	20	20	0
<u>Transgênico 59</u>			
Família 2	20	19	0

¹A numeração do transgênico corresponde a numeração na Figura 7.

Tabela suplementar 02 - Teste de progênie nos transgênicos pSbMATE selecionados para a geração F4 (continuação)

Descrição do transgênico ¹	Número de sementes plantadas	Número de plantas germinadas	Número de plantas mortas após herbicida
p0MITE			
Transgênico 65 Família 6	20	20	0
Transgênico 66 Família 3	20	19	0
Transgênico 67 Família 6	20	20	0
Transgênico 69 Família 5	20	20	0
Transgênico 71 Família 1	20	19	0
pFm0MITE			
Transgênico 80 Família 3	20	19	0
Transgênico 82 Família 2	20	20	0

¹A numeração do transgênico corresponde a numeração na Figura 7.

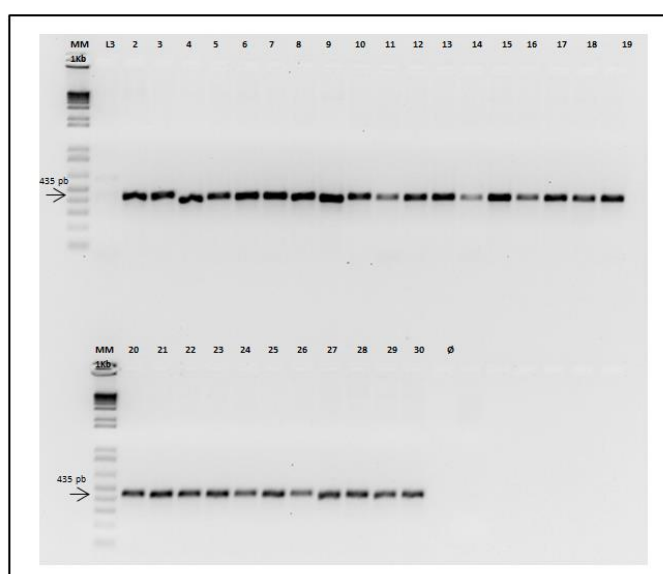


Figura suplementar 1: Análise molecular via PCR de calos embriogênicos pSbMATE para o gene *bar*. MM: 1Kb Plus Lader (Invitrogen®); L3: Controle negativo - linhagem não transgênica; 2-6: calos *p5MITE::GUS*; 7-11: calos *p4MITE::GUS*; 12-16: calos *p3MITE::GUS*; 17-21: calos *p1MITE::GUS*; 22-26: calos *p0MITE::GUS*; 27-30: calos *pFm0MITE::GUS*; Ø: Controle negativo da PCR - adição de H₂O na PCR em substituição ao DNA genômico.

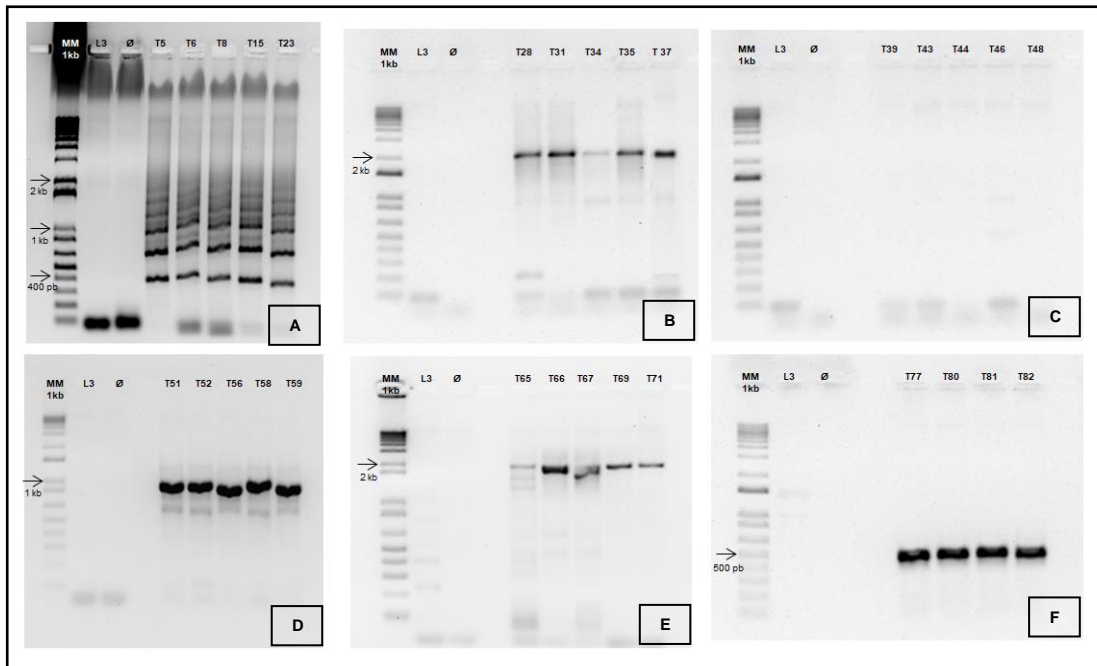


Figura suplementar 2: Análise de PCR realizada em transgênicos pSbMATE na geração F4 utilizando iniciadores específicos para cada construção gênica. MM: 1Kb Plus Lader (Invitrogen[®]); L3: Controle negativo - linhagem não transgênica; Ø: branco da reação; (A) *p5MITE::GUS*: T5 a T23; (B) *p4MITE::GUS*: T28 a T37; (C) *p3MITE::GUS*: T39 a T48; (D) *p1MITE::GUS*: T51 a T59; (E) *p0MITE::GUS*: T65 a T71; (F) *pFm0MITE::GUS*: T77 a T82.

CAPÍTULO 2

Overexpression of the Wheat Aluminum Tolerance Gene *TaALMT1* Increases Aluminum Tolerance in Sorghum¹

¹O artigo foi submetido à revista Crop Breeding and Applied Biotechnology.

Overexpression of the Wheat Aluminum Tolerance Gene *TaALMT1* Increases Aluminum Tolerance in Sorghum

ABSTRACT

Aluminum (Al^{3+}) toxicity is a limiting factor for agricultural production on acidic soils. The root cells of several Al tolerant plant species release organic acids in response to Al^{3+} . *TaALMT1*, an Al tolerance gene first identified in wheat, encodes a plasma membrane transporter responsible for Al-activated malate efflux. The present research aimed at studying the role of *TaALMT1* in enhancing sorghum Al tolerance via heterologous overexpression in an Al sensitive genetic background. Embryogenic calli obtained from immature inflorescences of *S. bicolor* were used as explants for transformation of *TaALMT1*. *TaALMT1* overexpression increased malate efflux and tolerance to Al^{3+} in transgenic sorghum. These results demonstrate the potential of using the *TaALMT1* to enhance the sorghum yields on acidic, Al toxic soils, via genetic engineering approaches.

Keywords: *Sorghum bicolor*, microprojectile bombardment, real-time PCR, transgene.

INTRODUCTION

Aluminum (Al) toxicity is one of the major factors limiting crop production in acidic soil regions, which represent about 50% of the world's potentially arable land (von Uexküll and Mutert 1995). Under low-pH conditions ($\text{pH} < 5.0$), Al is solubilized in the rhizosphere releasing the trivalent cation Al^{3+} that can interact with a series of intra and extracellular components, causing cell wall changes, disruption and depolarization of the plasma membrane, changes in signal transduction pathways, production of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress (Kochian 2004). The effects of Al toxicity also include root damage, inhibition of root growth and reduction in the development of root hairs, thus altering root morphology and impairing nutrient and water absorption (Kochian et al. 2015). Hence, Al toxicity results in severe yield losses. Some plant species have Al tolerance mechanisms

allowing for root development in the presence of toxic forms of Al in the soil. Internal detoxification and metal exclusion mechanisms from plant cells are the two main strategies plants use to tolerate ionic Al (Kochian 2004). In internal detoxification mechanisms, Al³⁺ is chelated in the cytosol by organic acids or other organic components, forming complexes that are compartmentalized into vacuoles. Al exclusion mechanisms include the release of phenolic compounds, mucilage formation, increase rhizosphere pH and exudation of organic acids. Al exclusion via exudation of organic acids in the root apex is the main physiological mechanism of Al tolerance in plants (Kochian et al. 2015), occurring in several species such as maize (*Zea mays*) (Piñeros et al. 2002), sorghum (*Sorghum bicolor*) (Magalhaes et al. 2007), wheat (*Triticum aestivum*) (Delhaize et al. 1993) and *Arabidopsis thaliana* (Hoekenga et al. 2003), among others. Organic acids released in the rhizosphere in response to Al lead to the formation of stable, Al/organic acid non-toxic complexes, which leads to Al tolerance. Organic acids commonly involved in Al tolerance mechanisms are citrate, malate and oxalate (Kochian et al. 2015). The first Al tolerance gene identified in plants was the wheat Al tolerance gene, *Triticum aestivum* aluminum-activated malate transporter 1 (*TaALMT1*) (Sasaki et al. 2004). Molecular and functional characterization of *TaALMT1* demonstrated that this gene is constitutively expressed in wheat root tips, encoding a protein with five to seven membrane-spanning regions in the N-terminal half of the protein and a long C-terminal tail (Delhaize et al. 2007). *TaALMT1* functions as an Al³⁺-activated transporter, which is permeable to malate anions (Zhang et al. 2008). Although the gene is functional in the absence of Al³⁺, there is an increase in basal activity of the ALMT1 transporter in the presence of extracellular Al (Delhaize et al. 2007, Kochian et al. 2015). Most of the genetically modified organisms expressing *AtALMT1* or its homologs have shown an increase in organic acid exudation from the roots and, consequently, an increase in Al tolerance. The expression of the *TaALMT1* gene in barley (*H. vulgare*), wheat (*T. aestivum*) and *A. thaliana* (Delhaize et al. 2004, Pereira et al. 2010, Ryan et al. 2011) resulted in malate efflux and increased Al tolerance. Also, the expression of *B. napus* *BnALMT1* and *BnALMT2*

in tobacco cells (Ligaba et al. 2006), *B. oleracea* *BoALMT1* (Zhang et al. 2018) and *Glycine max* *GmALMT1* in *A. thaliana* (Liang et al. 2013), in addition to and *M. sativa* *MsALMT1* in tobacco (Chen et al. 2013), led to increased malate exudation and Al tolerance. However, in rice (*Oryza sativa*) plants expressing *TaALMT1*, malate efflux was not correlated with Al tolerance (Sasaki et al. 2004, Kikui et al. 2007). Similarly, rice plants expressing the *H. lanatus* *HiALMT1*, showed a significant increase in malate exudation but not Al tolerance (Chen et al. 2013). These results might have been influenced by the high basal Al tolerance in rice (Sasaki et al. 2004).

To investigate whether the expression of the *TaALMT1* gene in sorghum may increase Al tolerance, transgenic plants expressing *TaALMT1* were generated and characterized. We demonstrate that the expression of the *TaALMT1* gene in the Al³⁺ sensitive sorghum genotype, CMSXS102, was able to confer an increase in malate efflux and Al tolerance. These results demonstrate the potential of using the wheat Al tolerance gene, *TaALMT1*, to increase the productivity of sorghum cultivars grown on acidic, Al toxic soils.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

The *Sorghum bicolor* line, CMSXS102B, was used for *TaALMT1*. Embryogenic calli derived of immature inflorescences (3 to 5 cm) harvested from CMSXS102B were used as explants for genetic transformation via microprojectile bombardment. The procedures for embryogenic calli production and selection and plant regeneration were as described in Brandao et al. (2012).

Expression vector

The expression cassette used in this work has the maize ubiquitin promoter driving *TaALMT1-1* expression and the NOS terminator inserted in the pCambia 3301 vector (Cambia, Canberra, Australia). The coding region of the *TaALMT1* gene (GenBank n°

AB081803) cloned in the pUC18 vector, was amplified using the ALMT1-F (AAA GGA TCC ATG GAT ATT GAT CAC GGC AG) and ALMT1-R (AAA GGA TCC TTA CAA AAT AAC CAC GTC AG) primers, designed to introduce *Bam*HI restriction sites for cloning purposes. The 25 µl amplification reaction contained 10X PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 100 µM each dNTP, 10 µM each of forward and reverse primers, 25 ng DNA and 1 unit Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen/SP-Brazil). The reactions were performed in a 9600 thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) programmed for an initial hot start of 2 minutes at 94°C, followed by 30 cycles at 94°C for 30 seconds, 60°C for 40 seconds and 72°C for 90 seconds, and a final extension step at 72°C for 5 minutes. The amplified PCR fragment was cloned into the pCambia 3301 expression vector. Cloning directionality and the complete sequence of the *TaALMT1* were confirmed by sequencing.

Microparticle bombardment

Embryogenic calli were bombarded with tungsten microprojectiles using a biolistics particle helium acceleration device (Biomics-Brasília/Brazil) as described by Brandao et al. (2012). For stable transformation, 5 µL of pCAMBIA3301 *TaALMT1-1* expression vector at 1 µg/µL were used. For bombardment, embryogenic calli were positioned at 3 cm from the microcarrier release platform and shot using 1000 psi of helium accelerating pressure. The distance between the high-pressure chamber and the membrane macrocarrier and the retention screen were 8 mm and 17 mm, respectively, and the vacuum pressure used was 27 mmHg.

DNA isolation and polymerase chain reaction (PCR)

Genomic DNA was isolated from 10 regenerated sorghum plants after microprojectile bombardment as described in Saghai-Maroo et al. (1984). The presence of the gene constructs in the regenerated plants was confirmed by PCR using the primers *ALMT1-F1* (AAA GGA TCC ATG GAT ATT GAT ACG GCA GAG AG) and *ALMT1-R1* (AAA GGA TCC

CTA CAA AAT AAC CAC GTC AGG CAA AGG) for *TaALMT1* and *Bar-F* (TGC ACC ATC GTC AAC CAC) and *Bar-R* (AGA AAC CAC GTC ATG CC) for the *bar* selection marker gene, generating fragments of 1380 bp and 407 bp, respectively. The PCR reactions (25 μ l) contained 10X PCR buffer, 2 mM $MgCl_2$, 100 μ M each dNTP, 10 μ M each of the primers, 25 ng DNA and 1 unit Taq DNA polymerase (Invitrogen). Reactions were performed using a model 9600 thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) programmed for an initial denaturation step of 15 seconds at 94°C, followed by 30 cycles of 15 seconds at 94°C, 15 seconds at 55°C, 15 seconds at 72°C, and a final extension of 4 minutes at 72°C. Amplification products were confirmed by electrophoresis.

Hydroponic analysis of Al tolerance

Inhibition of seminal root growth elicited by Al in a nutrient solution was used to quantify Al tolerance in transgenic sorghum, using the basal nutrient solution described in Magnavaca et al. (1987) to pH 4.0. Hydroponic assessment of Al tolerance was done according to Caniato et al (2007). In T1 progeny segregating for the transgene, the adoption of an independent - Al control is not possible since each individual in the population represents a distinct genotype. Hence, Al tolerance was measured in a single plant basis (Magalhaes et al. 2004). For that, the initial length of the seminal root of each seedling of cultivars SC566 (Al tolerant control, Caniato et al. 2007) and CMSXS102B and of the transgenic progeny growing in control solution (ILC_0) was measured and final lengths in control solution for the same roots were recorded 24 h later (ILC_{24}) without Al to obtain the control length ($CL = ILC_{24} - ILC_0$). The solution was then replaced by nutrient solution of identical composition but containing either no Al or {27} μ M Al^{3+} (values inside brackets indicate Al^{3+} activity estimated with the speciation software, GEOCHEMPC) (Parker et al. 1995) supplied as $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$. Final root lengths under Al treatment (FL_{Al5d}) were obtained after five days of Al exposure. Percentage relative net root growth (RRG) was used to assess Al tolerance in T1 progeny, with $RRG = [(FL_{Al5d} - ILC_{24})/CL \times 5] \times 100$. The control length values were multiplied by five,

assuming that growth rates in the absence of AI are uniform across genotypes during the five-day exposure period or that rate variations are uniform across genotypes. For inbred lines, where it is possible to adopt an independent control without AI, *relative net root growth* (RRG) was calculated as described in Caniato et al. (2007), by dividing net growth measured after five days of exposure to AI by the net growth obtained from independent seedlings grown under the same experimental conditions but without AI (control). Seedling's roots were also qualitatively evaluated for visual damage caused by AI, receiving a damage score from 1 (heavily damaged) to 6 (absence of visual root damage). The seedlings were transferred to soil in a greenhouse after hydroponic assessment of AI tolerance. PCR was then used to confirm the presence of *TaALMT1*. The χ^2 test was used to assess goodness-of-fit to a dominant monogenic model for AI tolerance control in segregating T1 progeny using the GQMOL software (Cruz and Schuster, 2001).

***TaALMT1* expression analysis and copy number in sorghum transgenic events**

For analysis of gene expression, total RNA was isolated from leaf samples of six T2 progeny (designated ALMT1-S2) derived from selfing a single *TaALMT1* transgenic T1 plant, using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). cDNA synthesis was performed with 2.0 μ g of total RNA with the High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems). Each reaction contained 2.5 μ L of cDNA (10X diluted), 5 pmol of each primer - *qALMT1 F1* (GGT GCC ACG CTG AGT AAA GG) and *qALMT1 R1*(ATG CAG CCA GCC ACC AA) - 1X, Fast SYBR Green Master Mix, and enough water for a final volume of 10 μ L. An actin encoding gene (Sobic.009G153000) amplified with primers *qSbACT F* (GTC ATC ACC ATT GGG TCA GAA AG) and *qSbACT R* (CAA CAA GAG ATG GCT GGA ACAG), was used as the endogenous control to assess relative expression using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). Genomic DNA from the same samples used for gene expression were used to confirm the number of transgene insertions. The reactions were set up under the same conditions described above for gene expression analysis, replacing the cDNA with 50

ng of genomic DNA. The *SbMATE* gene (Magalhaes et al. 2007), amplified with primers *SbMATE 3F* (GCC ATT GCC CAT GTT CTT TC) and *SbMATE 3R* (TCG ACC TTC CTC ACC AGC TT), was used as a single copy control and quantification was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). All analyzes were performed on a 7500 Fast-Real Time PCR System (Applied Biosystems) with two biological and three technical replicates. All procedures using kits were performed according to the manufacturer's recommendations except for the details specified above.

Root exudates and organic acid determination by HPLC

Transgenic sorghum seeds were sterilized and germinated as described in the hydroponic analysis of Al tolerance section. Seven seedlings were inserted through the mesh bottoms of polyethylene cups placed on top of a plastic centrifuge tube containing 50 mL of aerated 4.3 mM CaCl₂ solution at pH 4.5. Root exudate samples were prepared as described by Piñeros et al. (2002). For organic acid quantification, samples were analyzed by HPLC (Waters, 2695 system, Alliance, MA, USA) using a Shodex KC-811 column (8.0 mm id × 30 cm × 10 μm, Showa Denko KK, Kawasaki, Japan). The analysis was performed with 0.1% (v/v) phosphoric acid as the mobile phase at an isocratic flow rate of 0.7 mL/min at 60°C. Organic acid peaks were identified by comparing sample retention times with that from a malic acid Reagent Plus® ≥99% supplied by Sigma-Aldrich at a detection wave length of 210 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

The *TaALMT1* gene isolated from wheat encodes an Al-activated membrane transporter protein, which confers Al tolerance by mediating malate release by root apical cells (Sasaki et al. 2004). PCR analysis confirmed the insertion of the *bar* selection marker gene in the genome of nine regenerated sorghum plants. Among these, four were positive for *TaALMT1* gene, confirmed by PCR amplification of the expected 407 bp and 1380 bp fragments of *bar* and *TaALMT1*, respectively. Positive events for the *TaALMT1* gene were designated ALMT1-

S1, ALMT1-S2, ALMT1-S3 and ALMT1-S4. Of the four transgenic events that had the *TaALMT1* gene, only two, ALMT1-S1 and ALMT1-S2, produced seeds. As expected, no amplification was observed in genomic DNA from untransformed plants (data not shown). The tungsten microparticles used for sorghum transformation can result in random fragmentation of cellular and plasmid DNA (Krysiak et al. 1999). This was a likely outcome here as five events had the *bar* gene but not *TaALMT1*. Progeny of transgenic sorghum (ALMT1-S1 and ALMT1-S2) and control plants (non-transformed CMSXS102B), in addition to the Al tolerant sorghum line, SC566, were subjected to Al stress in nutrient solution. The transgenic events and CMSXS102B showed similar mean root length in the absence of Al in nutrient solution, which was higher than SC566 (Figure 1). However, in the presence of {27} μM Al, the final root length of the transgenic events was approximately 3-fold higher than in non-transgenic CMSXS102B. Also, root growth in ALMT1-S1 and ALMT1-S2 + Al was similar to that in the Al tolerant line, SC566. Roots of transgenic plants harboring *TaALMT1* were not damaged by Al, resembling those of the Al tolerant line, SC566 (Figure 2). This contrasts with the root system of the Al sensitive parent, CSMXS102B, which were severely damaged by Al. In addition, development of lateral roots in T1 transgenic events expressing *TaALMT1* was enhanced compared to SC566 (Figure 2). Both the parental line CMSXS102B (Al sensitive) and non-transgenic T1 progeny showed thickening and damage of the root apex (Figure 2), a symptom also reported by Delhaize and Ryan (1995) and by Sasaki et al. (1996) in wheat under Al stress. Thickening is apparently caused by inhibition of cell elongation and increased enlargement of some cell layers, in particular cortical cells (Sasaki et al. 1996). According to Grabski and Schindler (1995), stiffening of the actin filament network elicited by Al^{3+} interferes with cell division, which contributes to root thickening. Root damage induced by Al exposure limit nutrient uptake by the plants leading to mineral nutrient deficiencies (Kochian et al. 2015). Root damage caused by Al has been reported in different plant species including wheat (Li et al. 2008), maize (Doncheva et al. 2005) and oat (Marienfeld et al. 2005). Similar to our results with transgenic sorghum lines expressing

TaALMT1, Delhaize et al. (2004) reported that root apices of transgenic barley plants expressing *TaALMT1* gene did not show root damage in nutrient solution with Al, whereas non-transgenic controls showed the root damage phenotype. We used here the same criteria adopted by Magalhaes et al. (2004) to classify sorghum genotypes with regards to Al tolerance and sensitivity based on relative net root growth (RRG) assessed in nutrient solution with {27} μM Al. Accordingly, genotypes with RRG between 10% and 30% were considered Al sensitive, while those RRG between 60% and 120% were deemed Al tolerant. In the presence of Al, the SC566 cultivar and transgenic T1 progeny positive for *TaALMT1* gene for both ALMT1-S1 and ALMT1-S2 had mean RRG above 60% (68%, 89% and 108%, respectively) and healthy roots (Figure 3). Plants of non-transgenic CMSXS102B showed 21% RRG and roots with morphological damage caused by Al. The Al sensitive parent, CMSXS102B, showed marked inhibition of root growth, which was similar to Al sensitive progeny derived from both ALMT1-S1 and ALMT1-S2 (RRG between 12 and 21% and 15 and 30%) (Figure 3). Figure 3 shows that the frequency distribution of mean RRG was bimodal, with clear break points between 30 - 50% (ALMT1-S1) and 40 - 60% (ALMT1-S2) RRG. Considering those break-points, a χ^2 analysis of goodness-of-fit to a 3 (Al tolerant):1 (Al sensitive) segregation ratio supported the influence of a single dominant Al tolerance gene for both ALMT1-S1 ($P[\chi^2 \geq 2,57] = 0.11$ and $P[\chi^2 \geq 0.098] = 0.32$ and ALMT1-S2. The results show that transgenic plants are more tolerant to aluminum than the non-transgenic parent, confirming what was observed by Sasaki et al. (2004) and Delhaize et al. (2004) when studying the expression of the *TaALMT1* gene in tobacco and barley, respectively. Expression of *TaALMT1* in tobacco (*Nicotiana tabacum*) suspension cells increased both malate efflux and Al tolerance (Zhang et al. 2008). In addition, transgenic wheat lines overexpressing *TaALMT1* showed increased malate efflux and Al tolerance (Pereira et al. 2010). Another clear phenotype observed in Al sensitive genotypes (non-transgenic progeny and CMSXS102B) exposed to Al was decreased shoot biomass accumulation, root darkening and damage, and reduced proliferation of lateral roots. Similar results were

observed in barley by Delhaize et al. (2004). In turn, Al tolerant plants had undamaged roots and higher root and shoot growth. Real-time PCR of six T2 plants derived from ALMT-S2 confirmed integration of a single copy of *TaALMT1* (Figure 4). Quantification of relative gene expression by RT-qPCR in transgenic plants of the ALMT-S2 event indicated that the *TaALMT1* gene was expressed in the transgenic lines but not in CMSXS102B as expected (Figure 4). The presence of *TaALMT1* in the progeny of families segregating for the transgene was confirmed by PCR. The amplification of the 1380 bp fragment, corresponding to the *TaALMT1*, was associated with undamaged root systems (visual score ranging from 4 to 6) whereas progeny lacking *TaALMT1* showed severe root damage caused by Al (visual score from 1 to 1.5) (data not shown). Malate efflux was analyzed in T3 progeny derived from ALMT1-S2. In plants of the sensitive parent, CMSXS102B, malic acid was not detected. Malate was detected in root exudates of both ALMT1-S2 and SC566, but malate concentration was much higher in ALMT1-S2 (4.5678 $\mu\text{mols/apex/hour}$) compared to SC566 (0.3078 $\mu\text{mols/apex/hour}$) (Figure 5). Therefore, malate release in the transgenic plants expressing the *TaALMT1* was approximately 15-fold higher compared to SC566. Although Al tolerance in sorghum is mainly derived from citrate exudation from root tips mediated by the Al-activated citrate transporter, SbMATE (Magalhaes et al. 2007), we show here that overexpression of the wheat Al tolerance gene, *TaALMT1*, can be used to achieve further improvements in sorghum Al tolerance. Hence, these results offer additional options for improving sorghum productivity on acidic soils, which should help to expand food production to marginal lands.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA), the McKnight Foundation Collaborative Crop Research Program, the Generation Challenge Programme (GCP) and the Foundation for Research Assistance of the Minas Gerais State (FAPEMIG). RLBB received financial support from the National Council for Scientific and

Technological Development - CNPq / Brazil. We thank Dr. Leon Kochian from Cornell University for kindly providing the pUC18 vector.

REFERENCES

BRANDAO RL, CARNEIRO NP, OLIVEIRA AC de, COELHO GTCP, CARNEIRO AA (2012) Genetic transformation of immature sorghum inflorescence via microprojectile bombardment. In: ÇIFTÇI, YO (ed) **Transgenic plants: advances and limitations 6**: 133-148.

CANIATO FF, GUIMARAES CT, SCHAFFERT RE, ALVES VMC, KOCHIAN LV, BOREM A, KLEIN PE, MAGALHAES JV (2007) Genetic diversity for aluminum tolerance in sorghum. **Theory Applied Genetic 114**: 863-876.

CHEN Q, WU KH, WANG P, YI J, LI KZ, YX, CHEN LM (2013) Overexpression of MsALMT1, from the aluminum-sensitive *Medicago sativa*, enhances malate exudation and aluminum resistance in tobacco. **Plant Molecular Biology Reporter 31**: 769-774.

CRUZ CD and SCHUSTER I (2001) GQMOL: program for molecular quantitative genetic analysis. Federal University of Viçosa. Available: <http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>.

DELHAIZE E, CRAIG S, BEATON C, BENNET R, JAGADISH V, RANDALL P (1993) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) Uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiology 103**: 685-693.

DELHAIZE E and RYAN P (1995) Uptake on environmental stress: aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology 107**: 315-321.

DELHAIZE E, RYAN PR, HEBB DM, YAMAMOTO Y, SASAKI T, MATSUMOTO H (2004) Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the *ALMT1* gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **101**: 15249-15254.

DELHAIZE E, GRUBER BD, RYAN PR (2007) The roles of organic anion permeases in aluminum resistance and mineral nutrition. **FEBS Letters** **581**: 2255-2262.

DONCHEVA S, AMENOS M, POSCHENRIEDER C, BARCELO J (2005) Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. **Journal of Experimental Botany** **56**: 1213-1220.

GRABSKI S and SCHINDLER M (1995) Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. **Plant Physiology** **108**: 897-901.

HOEKENGA OA, VISION TJ, SHAFF JE, MONFORTE AJ, LEE GP, HOWELL SH, KOCHIAN LV (2003) Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (*Landsberg erecta* x *Columbia*) by quantitative trait locus mapping: a physiologically simple but genetically complex trait. **Plant Physiology** **132**: 936-948.

KIKUI S, SASAKI T, OSAWA H, MATSUMOTO H, YAMAMOTO Y (2007) Malate enhances recovery from aluminum-caused inhibition of root elongation in wheat. **Plant soil** **290**: 1-15.

KOCHIAN LV, HOEKENGA OA, PINEROS MA (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review Plant Biology** **55**: 459-493.

KOCHIAN LV, PIÑEROS MA, JIPING L, MAGALHAES JV (2015) Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review Plant Biology** **66**: 571-598.

KRYSIAK C, MAZUS B, BUCHOWICZ J (1999) Generation of DNA double-strand breaks and inhibition of somatic embryogenesis by tungsten microparticles in wheat. **Plant Cellular Tissue Organics Culture** **58**: 163-170.

LI Y, YANG GX, LUO LT, KE T, ZHANG JR, LI KX, HE GY (2008) Aluminium sensitivity and tolerance in model and elite wheat varieties. **Cereal Research Communications** **36**: 257-267.

LIANG C, PIÑEROS MA, TIAN J, YAO Z, SUN L, LIU J, SHAFF J, COLUCCIO A, KOCHIAN LV, LIAO H (2013) Low pH, aluminum, and phosphorus coordinately regulate malate exudation through GmALMT1 to improve soybean adaptation to acid soils. **Plant Physiology** **161**:1347-1361.

LIGABA A, KATSUHARA M, RYAN PR, SHIBASAKA M, MATSUMOTO H (2006) The *BnALMT1* and *BnALMT2* genes from rape encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells. **Plant Physiology** **142**: 1249-1303.

LIVAK K, SCHMITTGEN TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$. **Methods** **25**: 402-408.

MAGALHAES JV, LIU J, GUIMARAES CT, LANA UGP, ALVES VMC, WANG YH, SCHAFFERT RE, HOEKENGA OA, PIÑEROS MA, SHAFF JE, KLEIN PE, CARNEIRO NP, COELHO CM, TRICK HN, KOCHIAN LV (2007) A gene in the multidrug and toxic compound

extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics** **39**:1156-1161.

MAGALHAES JV, GARVIN DF, WANG Y, SORRELLS ME, KLEIN PE, SCHAFFERT RE, LI L, KOCHIAN LV (2004) Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. **Genetics** **167**: 1905-1914.

MAGNAVACA R, GARDNER COE, CLARK RB (1987) Inheritance of aluminum tolerance in maize. In: GABELMAN HW, LOUGHMAN BC (ed.) **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Martinus Nijhoff: 201- 212.

MARIENFELD S, LEHMANN H, STELZER R (2005) Ultrastructural investigations and edx-analyses of Al-treated oat (*Avena sativa*) roots. **Plant Soil** **171**: 167-173.

PARKER DR, NORVELL WA, CHANEY RL (1995) GEOCHEM-PC: a chemical speciation program for IBM and compatible computers. In: Loeppert RH, Schwab AP, Goldberg S (ed.) **Chemical equilibrium and reaction models**. **Soil Science Society of America**: 253-269.

PEREIRA JF, ZHOU G, DELHAIZE E, RICHARDSON T, ZHOU M, RYAN PR (2010) Engineering greater aluminum resistance in wheat by over-expressing *TaALMT1*. **Annals of Botany** **106**: 205-214.

PIÑEROS MA, MAGALHAES JV, CARVALHO ALVES VM, KOCHIAN LV (2002) The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. **Plant Physiology** **129**: 1194-1206.

RYAN PR, TYERMAN SD, SASAKI T, FURUICHI T, YAMAMOTO Y, ZHANG WH, DELHAIZE E (2011) The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. **Journal of Experimental Botany** **62**: 9-20.

SASAKI T, YAMAMOTO Y, EZAKI B, KATSUHARA M, AHN SJ, RYAN PR, DELHAIZE E, MATSUMOTO H (2004) A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **Plant Journal** **37**: 645-653.

SASAKI M, YAMAMOTO Y, MATSUMOTO H (1996) Lignin deposition induced by aluminium in wheat (*Triticum aestivum*) roots. **Physiologia Plantarum** **96**: 93-198.

SAGHAI-MAROOF MA, SOLIMAN KM, JORGENSEN RA, ALLARD RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **81**: 8014-8019.

VON UEXKÜLL HR and MUTERT E (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant and Soil** **171**: 1-15.

ZHANG WH, RYAN PR, SASAKI T, YAMAMOTO Y, SULLIVAN W, TYERMAN SD (2008) Characterization of the TaALMT1 protein as an Al³⁺-activated anion channel in transformed tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells. **Plant Cell Physiology** **49**: 1316-1330.

ZHANG L, WU X, WANG J, QI C, WANG X, WANG G, LI M, LI X, GUO Y (2018) BoALMT1, an Al-induced malate transporter in cabbage, enhances aluminum tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Frontiers in Plant Science** **8**: 2156.

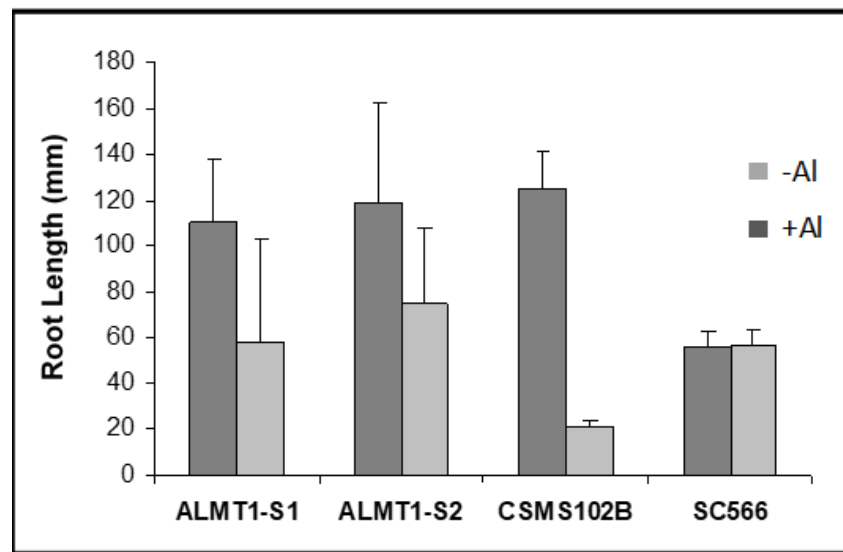


FIGURE 1: Mean root growth of sorghum plants after 5 days in nutrient solution in the presence or absence of $\{27\mu\text{M}\}$ Al^{+3} . ALMT1-S1 and ALMT1-S2: Transgenic events harboring *TaALMT1*; CMSXS102B: Al sensitive parent; SC566: Al tolerant genotype.



FIGURE 2: Assessment of Al tolerance of sorghum plants harboring the *TaALMT1* gene under the control of the ubiquitin maize promoter after 5 days in the presence of {27} μM Al. A) Transgenic event ALMT1-S2; B) Non-transgenic parent, CMSXS102B (Al sensitive); C1) Al tolerant genotype, SC566; C2) Non-transgenic CMSXS102B; C3) transgenic ALMT1-S2; D1) Root apices of the transgenic event ALMT-S2; D2) Root apices of the Al sensitive, non-transgenic parent CMSXS102B.

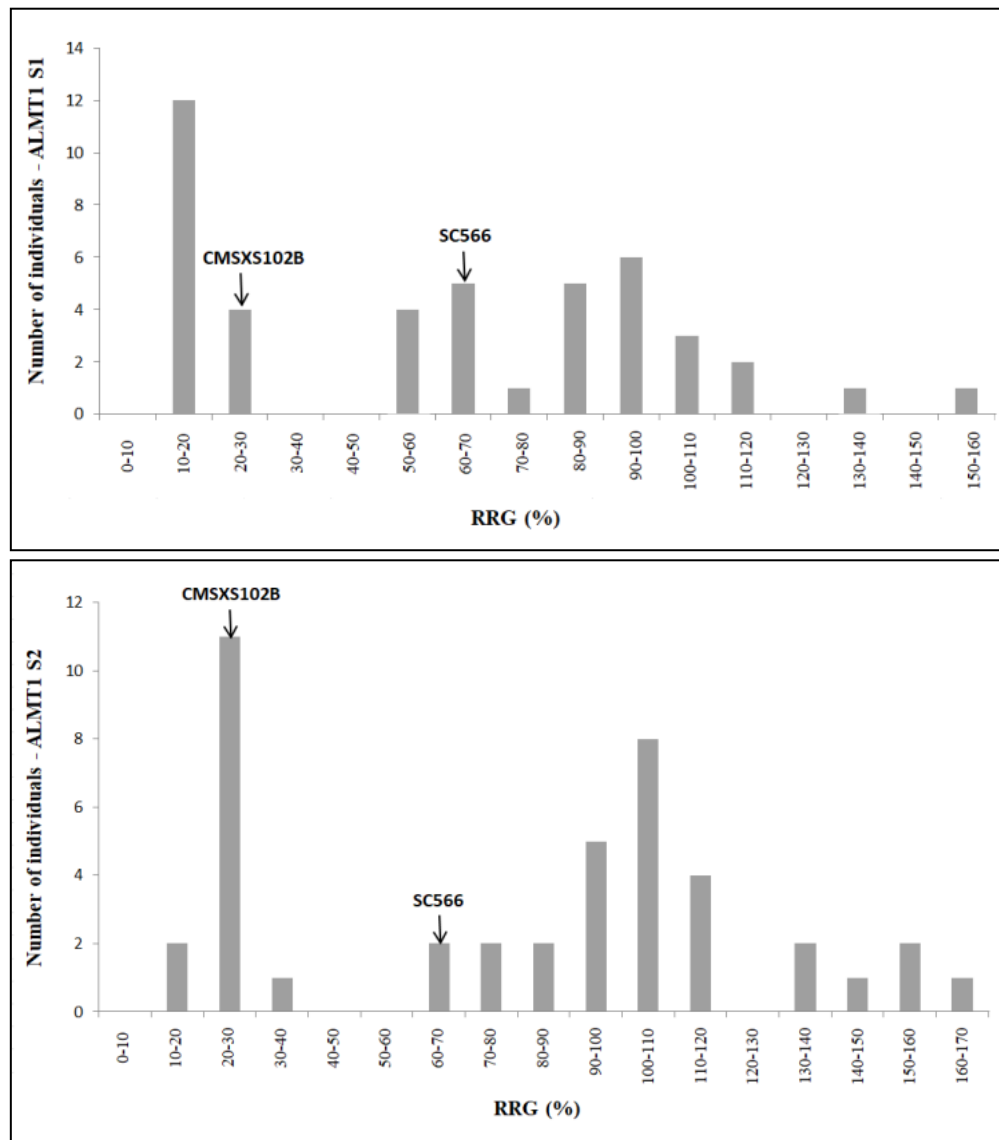


FIGURE 3: Frequency distribution for RRG values in progeny of ALMTI-S1 and ALMTI-S2 sorghum transgenic events cultivated in nutrient solution with $\{27\}$ μM Al at pH 4.0 for five days. RRG for the non-transgenic Al sensitive parent, CMSXS102B, and the Al tolerant genotype SC566, are indicated by arrows above the respective classes.

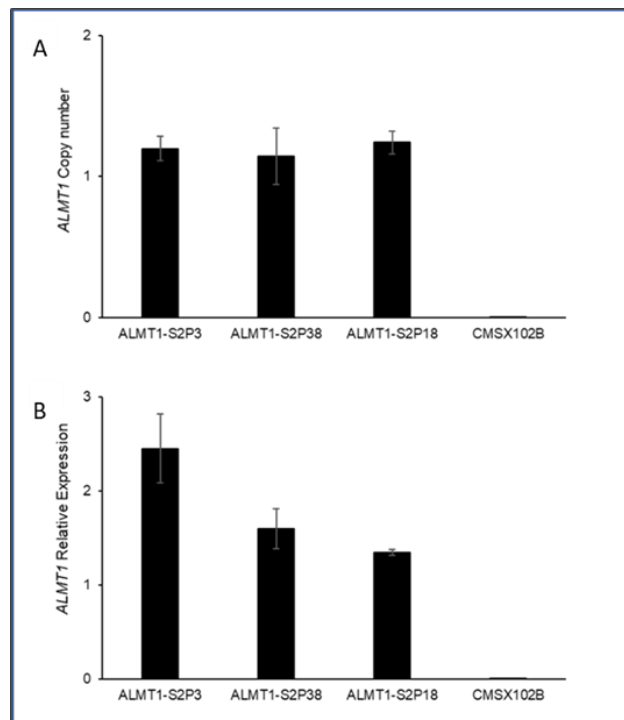


FIGURE 4: Molecular characterization of the transgenic event ALMT1-S2. A) Transgene copy number assessment by qPCR; B) Expression of *TaALMT1* gene in transgenic sorghum assessed by qRT-PCR. Standard deviation bars of two replicates are shown (n = 2). Quantification was done using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

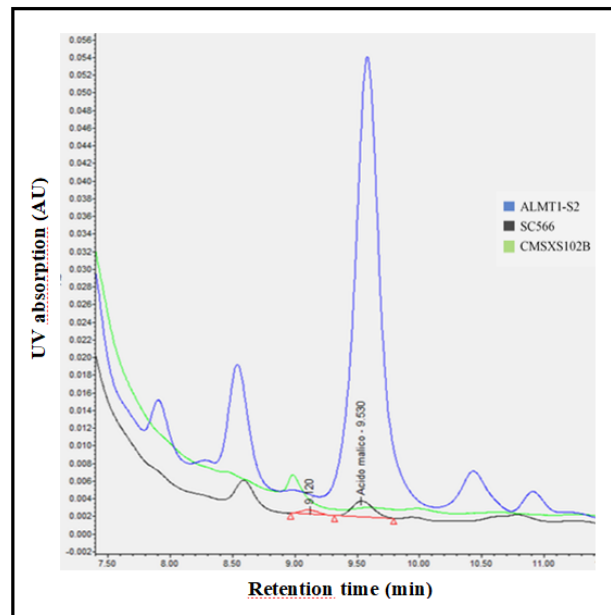


FIGURE 5: HPLC chromatograms of root exudates from ALMT1-S2, non-transgenic CMSXS102B and the Al tolerant line, SC566, cultivated in the presence of $27 \mu\text{M Al}^{+3}$.