

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



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MORFO-FISIOLOGICA DE  
LINHAGENS E HÍBRIDOS TRANSGÊNICOS DE MILHO  
EXPRESSANDO O GENE *SbMATE* DE SORGO**

ORIENTADA: Letícia Kuster Mitre  
ORIENTADORA: Dra. Claudia Teixeira Guimarães

BELO HORIZONTE  
Julho - 2014

**Letícia Kuster Mitre**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MORFO-FISIOLÓGICA DE  
LINHAGENS E HÍBRIDOS TRANSGÊNICOS DE MILHO  
EXPRESSANDO O GENE *SbMATE* DE SORGO**

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

Área de concentração: Genômica e Bioinformática

Orientadora: Dra. Claudia Teixeira Guimarães  
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte  
2014

## **Agradecimentos**

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e à Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade de formação profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao *Generation Challenge Programme* pelo apoio financeiro.

À Embrapa Milho e Sorgo por proporcionar o desenvolvimento da dissertação.

À minha orientadora Dra. Claudia Teixeira Guimarães pela orientação e confiança em mim depositada.

A todos os professores e pesquisadores pela contribuição técnica e científica fundamentais para a minha formação.

Àqueles que são base dessa conquista: pai, mãe e irmã. Exemplos de vida, que sempre me incentivaram a buscar o melhor.

Ao meu namorado Gustavo por apoiar minhas decisões e incentivar meus objetivos.

Aos funcionários, estagiários e pós-graduandos do Núcleo de Biologia Aplicada pelo convívio harmonioso e pelas amizades sólidas conquistadas. Sou grata a cada um deles, em especial Ilma, Célio, Rafaeli e Emanuelle que me acolheram como família em Sete Lagoas. Também agradeço à Gislene, pelo apoio técnico na Câmara de Crescimento.

À analista Beatriz de Almeida Barros pela convivência direta no Laboratório de Biologia Molecular, que me passou o máximo conhecimento prático e teórico para a realização das minhas atividades diárias.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho.

## Sumário

Lista de Figuras.....	iv
Lista de Tabelas.....	v
Lista de Abreviaturas.....	vi
Resumo.....	8
Abstract.....	9
1 – Introdução.....	10
2 – Revisão Bibliográfica.....	10
2.1 – Solos ácidos.....	10
2.2 – Mecanismos fisiológicos da tolerância ao Al tóxico.....	11
2.3 – Genética da tolerância ao Al.....	12
2.4 – Utilização da transgenia para aumentar a tolerância ao Al em plantas.....	13
2.5 – Plantas transgênicas de milho expressando o gene <i>SbMATE</i> .....	14
2.6 – Aquisição e uso eficiente de fósforo.....	15
3 – Objetivos.....	15
3.1 – Objetivo Geral.....	15
3.2 – Objetivos Específicos.....	16
4 – Material e Métodos.....	16
4.1 – Material genético.....	16
4.2 – Avaliação da tolerância ao Al em solução nutritiva.....	16
4.3 – Análise da expressão dos gene <i>SbMATE</i> e <i>ZmMATE1</i> .....	17
4.4 – Avaliação do sistema radicular em rizobox.....	19
4.5 – Avaliação da morfologia radicular em solução nutritiva.....	20
4.6 – Estimativa do modo de ação gênica do <i>SbMATE</i> quanto a tolerância ao Al.....	21
5 – Resultados.....	21
5.1 – Crescimento radicular em solução nutritiva.....	21
5.2 – Modo de ação do transgene na tolerância ao Al.....	26
5.3 – Expressão do gene <i>SbMATE</i> .....	26
5.4 – Expressão do gene <i>ZmMATE1</i> .....	28
5.5 – Desenvolvimento radicular e acúmulo de biomassa em rizobox.....	29
5.6 – Caracterização do sistema radicular sob níveis contrastantes de P.....	31
6 – Discussão.....	33
7 – Conclusões.....	36
8 – Referências.....	37

## Lista de Figuras

- Figura 1:** Tolerância ao Al em linhagens transgênicas e convencionais de milho. A) Crescimento líquido da raiz seminal (CL, mm) mensurado após cinco dias sem  $Al^{3+}$  em solução nutritiva. B) Tolerância ao Al mensurada pelo crescimento líquido relativo da raiz seminal (CLR%). Letras diferentes representam a existência de diferenças significativa pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, para cada nível de Al, independentemente.....23
- Figura 2:** Perfil de expressão temporal e tecidual do gene *SbMATE* em linhagens transgênicas de milho. A expressão gênica foi determinada no ápice radicular, na raiz e na folha nos tempos 0, 6 e 24 horas após a exposição em {0} e {39}  $\mu M$  de  $Al^{3+}$ . O calibrador utilizado foi raiz a 6 horas com Al da linhagem L3TT A2.22\_8. As barras indicam o desvio padrão da média de três repetições técnicas.....27
- Figura 3:** Expressão relativa do gene *SbMATE* em linhagens e híbridos transgênicos de milho. A expressão gênica foi determinada no ápice radicular após 24 horas de exposição em {39}  $\mu M$  de  $Al^{3+}$ . O híbrido L3TTxL53 foi usado como calibrador. As barras verticais indicam o desvio padrão das médias.....28
- Figura 4:** Expressão relativa do gene *ZmMATE1* em linhagens e híbridos de milho. A expressão gênica foi determinada no ápice radicular após 24 horas de exposição a {39}  $\mu M$  de  $Al^{3+}$ . A linhagem L53 foi usada como calibrador. As barras verticais indicam o desvio padrão das médias.....29
- Figura 5:** Imagens representativas do rizobox contendo na camada superficial 0% de Al e na camada subsuperficial 15% de saturação de Al. A) Linhagens L3 transgênicas (L3TT) e L3 convencional (controle); B) Linhagens semi-isogênicas (NIL05 e NIL13) e L53 (controle).....31

## Lista de Tabelas

- Tabela 1:** Análise química do solo após a adição de macro e micronutrientes e correção com  $\text{CaCO}_3 + \text{MgCO}_3$ .....19
- Tabela 2:** Avaliação dos danos no ápice radicular por meio de nota de injúria radicular visual (IRV) obtida após cinco dias de tratamento com {60}  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ . A escala de notas varia entre 5 (ápice radicular sem injúrias) e 1 (ápice radicular muito danificado).....24
- Tabela 3:** Crescimento líquido da raiz seminal (CL, mm) mensurado após cinco dias sem  $\text{Al}^{3+}$  em solução nutritiva e crescimento líquido relativo da raiz seminal (CLR%) expostas a {39} e {60}  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  em híbridos simples de milho expressando o gene *SbMATE*, híbridos não transgênicos e as respectivas linhagens parentais. Valores em cada coluna com a mesma letra constituem grupos homogêneos pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....26
- Tabela 4:** Acúmulo de massa seca da parte aérea (MS\_PA) e das raízes (MS\_R), conteúdo de P em parte aérea, comprimento total (C) e área de superfície (AS) radicular nas camadas superficial corrigida (0% Al) e subsuperficial com 15% de saturação de Al em linhagens transgênicas, convencionais e semi-isogênicas (NILs) de milho. Médias seguidas da mesma letra em cada coluna, não diferem entre si pelo Teste LSD a 5% de probabilidade.....30
- Tabela 5:** Média e coeficiente de variação das características de morfologia radicular, comprimento total (C), área de superfície (AS), área de superfície de raízes finas (AS2) e diâmetro médio (D), e do peso seco total (PST) para linhagens transgênicas (L3TT) e semi-isogênicas (NILs) de milho. As médias foram obtidas para ambas as concentrações de P, sendo que os valores seguidos da mesma letra em cada coluna não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de probabilidade.....32
- Tabela 6:** Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis: comprimento total (C, cm), área de superfície (AS,  $\text{cm}^2$ ), área de superfície de raízes finas (AS2,  $\text{cm}^2$ ), diâmetro radicular (D, mm) e peso seco total (PST, g).....32

## Lista de Abreviaturas

°C	Graus centígrado
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
nm	Nanômetro
a	Efeito aditivo
Al ou Al <sup>3+</sup>	Alumínio
ALMT	<i>Aluminum-activated malate transporters</i>
<i>Alt<sub>BH</sub></i>	Loco de tolerância ao Al em trigo
<i>Alt<sub>SB</sub></i>	Loco de tolerância ao Al em sorgo
ANOVA	Análise de variância
AS	Área de superfície radicular
AS2	Área de superfície de raízes finas
C	Comprimento total de raiz
C <sub>0d</sub>	Crescimento radicular inicial
C <sub>5d</sub>	Crescimento radicular após cinco dias
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i> (DNA complementar)
CL	Crescimento líquido radicular
CL <sub>+Al</sub>	Crescimento líquido radicular do tratamento com Al
CL <sub>-Al</sub>	Crescimento líquido radicular do tratamento sem Al
CLR	Crescimento líquido relativo
C <sub>T</sub>	<i>Threshold cycle</i>
d	Efeito de dominância
D	Diâmetro radicular
d/a	Grau de dominância
F	<i>Forward primer</i>
ICP	<i>Inductively-coupled argon plasma</i>
IRV	Injúria radicular visual
L3tt	Linhagem L3 transgênica nula
L3TT	Linhagem L3 transgênica
MATE	<i>Multidrug and toxic compound extrusion family</i>
MS_PA	Matéria seca de parte aérea
MS_R	Matéria seca de raiz
NILs	Linhagens semi-isogênicas
mM	Milimolar

QTL	<i>Quantitative trait loci</i> (loco de característica quantitativa)
P	Fósforo
pH	Potencial Hidrogeniônico
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PST	Peso seco total
R	<i>Reverse primer</i> (primer reverso)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RQ	<i>Relative quantification</i> (quantificação relativa)
RT-PCR	<i>Reverse transcription - Polimerase chain reaction</i> (transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase)
s	Alelo não transgênico
S	Alelo transgênico
<i>SbMATE</i>	<i>Sorghum bicolor</i> MATE
<i>TaALMT1</i>	<i>Triticum aestivum</i> ALMT
z	Ausência do alelo do <i>ZmMATE1</i> derivado de Cateto AI237
Z	Alelo do <i>ZmMATE1</i> derivado de Cateto AI237
<i>ZmMATE1</i>	<i>Zea mays</i> MATE
$\Delta\Delta C_T$	Método $C_T$ comparative: $\Delta C_T$ do gene alvo subtraído do $\Delta C_T$ do calibrador



## Resumo

A toxicidade do alumínio (Al) é um fator limitante para a produção agrícola em solos ácidos. Sob essa condição, a forma rizotóxica do Al,  $Al^{3+}$ , é solubilizada no solo e inibe o crescimento radicular, reduzindo a absorção de água e de nutrientes. Um importante mecanismo de tolerância ao Al em plantas é baseado na liberação de ácidos orgânicos (ex: citrato e malato) pelo ápice radicular, que formam complexos não tóxicos com o  $Al^{3+}$ . Genes responsáveis pela tolerância ao Al foram identificados e caracterizados, como é o caso do gene *SbMATE*, o principal gene de tolerância ao Al de sorgo, que codifica um transportador de citrato ativado por Al, e do *ZmMATE1*, o homólogo funcional do *SbMATE* em milho. Considerando que a expressão heteróloga do *SbMATE* aumentou a tolerância ao Al em *Arabidopsis* e cevada, linhagens transgênicas de milho expressando o gene *SbMATE* foram geradas. Os eventos transgênicos de milho foram originalmente obtidos no híbrido temperado Hi II, sendo posteriormente introgridido na linhagem L3, pertencente ao programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a tolerância ao Al, o padrão de expressão do transgene e as características morfológicas do sistema radicular de linhagens e híbridos de milho expressando o gene *SbMATE* sob controle do promotor da ubiquitina. As linhagens L3 transgênicas apresentaram níveis elevados de expressão do gene *SbMATE*, que foi induzido após 24 horas de exposição ao Al nas raízes e nos ápices radiculares. Quando comparada com a L3 convencional, a linhagem transgênica aumentou significativamente a tolerância ao Al em solução nutritiva e apresentou raízes mais desenvolvidas na camada subsuperficial de solo com 15% de saturação de Al. Os híbridos de milho contendo um alelo do transgene *SbMATE*, isto é, em heterozigose, foram mais tolerantes que os híbridos não-transgênicos e que a média das respectivas linhagens parentais. No entanto, os híbridos foram menos tolerantes ao Al que a linhagem parental transgênica, indicando um efeito parcialmente dominante do transgene. O padrão de expressão do transgene nos híbridos foi semelhante ao das linhagens, para grande parte dos genótipos testados, sugerindo que a expressão do transgene não foi influenciada pela dosagem dos seus alelos. Adicionalmente, a presença do transgene *SbMATE* parece não afetar de forma negativa a expressão do gene *ZmMATE1*, nem alterar a morfologia radicular em solução nutritiva. Assim, esses resultados indicam que a transgenia utilizando o *SbMATE* pode ser uma alternativa viável para aumentar a tolerância ao Al em milho e em outras espécies cultivadas, abrindo novos caminhos para garantir a estabilidade da produção agrícola em solos ácidos.

## Abstract

Aluminum (Al) toxicity is a limiting factor for crop production on acid soils. Under these conditions, the rhizotoxic form of Al,  $Al^{3+}$ , is solubilized into the soil solution inhibiting root growth, thus reducing water and nutrient uptake. An important mechanism of Al tolerance in plants is based on the release of organic acids (e.g. malate and citrate) by the root apex, which forms non-toxic complexes with  $Al^{3+}$ . Genes responsible for Al tolerance have been identified and characterized, such as *SbMATE*, a major Al tolerance gene in sorghum that encodes an Al-activated citrate transporter, and *ZmMATE1*, the functional homolog of *SbMATE* in maize. Considering that heterologous expression of *SbMATE* increased Al tolerance in Arabidopsis and barley, transgenic maize lines expressing *SbMATE* were generated. The transgenic events were generated using the temperate hybrid Hi II, and introgressed into L3, a maize line belonging to the Embrapa Maize and Sorghum breeding program. The objective of this study was to evaluate Al tolerance, transgene expression and root morphology of transgenic inbred lines and hybrids expressing *SbMATE* controlled by the ubiquitin promoter. The transgenic L3 showed high expression levels of *SbMATE* gene, which was induced after 24 hours of Al treatment in roots and root apices. Compared with the non-transgenic line, Al tolerance assessed in hydroponics was also enhanced in the transgenic L3, which had more profused root development in the sub-superficial soil layer with 15% of Al saturation. The maize hybrids containing one allele of *SbMATE* were more tolerant than the non-transgenic hybrids and their Al tolerance exceeded the midparent mean. However, the hybrids were less Al tolerant than the parental transgenic line, indicating a partially dominant effect of the transgene. For most of the genotypes, *SbMATE* expression in the hybrids was similar to the lines, suggesting that transgene expression was not influenced by its allelic dosage. Additionally, the presence of the heterologous *SbMATE* transgene does not seem to reduce the expression of *ZmMATE1*, or to change the root morphology in hydroponics. Thus, our current results indicate that transgenic technology using *SbMATE* can be used to improve Al tolerance in maize and in other crops, opening new avenues to guarantee yield stability on acid soils.

## **1 – Introdução**

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura mundialmente cultivada, utilizada principalmente para alimentação animal e humana. Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, com uma produção em torno de 78.000 toneladas em 2014, sendo superado pelos Estados Unidos e China (CONAB, 2014).

Os solos ácidos estão presentes em quase 50% das terras cultiváveis do mundo e apresentam grandes entraves à produção de alimentos. Esses solos se caracterizam pela alta toxidez de alumínio (Al) e baixos teores de fósforo (P), macronutriente de grande importância para o desenvolvimento das plantas (von Uexkull e Mutert, 1995). Nesse tipo de solo, o pH está abaixo de 5,0 e o alumínio encontra-se na forma solúvel  $Al^{3+}$ , que é a forma fitotóxica. Esse Al tóxico inibe o crescimento radicular e restringe a capacidade da planta em absorver água e nutrientes (Kochian et al., 2004), o que acarreta na diminuição da produtividade das culturas.

A aplicação do calcário é frequentemente utilizada para aumentar o pH dos solos ácidos, visando neutralizar a toxidez do Al solúvel, sem atingir as camadas subsuperficiais. Adicionalmente, o uso intensivo de adubação fosfatada é necessário para a obtenção de altos níveis de produtividade, aumentando significativamente os custos da produção. Assim, além do manejo fitotécnico das culturas, uma alternativa para elevar a produtividade agrícola em solos ácidos seria o desenvolvimento de cultivares tolerantes ao Al e eficientes no uso de P, por meio do melhoramento convencional ou da transgenia.

O principal mecanismo fisiológico de tolerância ao Al em plantas envolve a ativação de transportadores de membrana, responsáveis pela exsudação de ácidos orgânicos no ápice radicular, o sítio primário da fitotoxidez do Al (Ryan et al, 2011). Esses ácidos orgânicos liberados pela raiz quelam o Al tóxico e formam complexos estáveis e não-tóxicos, evitando a absorção do mesmo pela raiz. Em sorgo, foi identificado o gene *SbMATE*, que codifica um transportador de citrato ativado por Al, responsável pela exsudação de citrato, e pela tolerância ao Al nessa espécie. A expressão heteróloga desse gene aumentou a tolerância ao Al em *Arabidopsis* (Magalhães et al., 2007) e cevada (Zhou et al., 2014), sendo estratégico explorar o uso desse gene para aumentar a tolerância ao Al em outras culturas como o milho.

## **2 – Revisão Bibliográfica**

### **2.1 – Solos ácidos**

O pH do solo é uma característica relevante para a produção agrícola. Além de algumas plantas serem sensíveis ao pH alto ou baixo, o pH influencia na disponibilidade de nutrientes, na toxicidade dos minerais e na microbiota presente no solo (Fierer e Jackson, 2006; Osborne et al., 2011).

Os solos ácidos ( $\text{pH} < 5,0$ ) compreendem aproximadamente 30% da área total da terra, das quais 50% são potencialmente aráveis (von Uexkull e Mutert, 1995). No Brasil, estes solos são predominantes na região de Cerrado, que compreende um quarto do território nacional e concentra-se nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí e Tocantins (Ferreira et al., 2006). Além da acidez natural desses solos, eles também se caracterizam pela baixa fertilidade, geralmente ocasionada pela deficiência de fósforo, cálcio, magnésio e potássio, combinada com a toxicidade de outros elementos como o alumínio (von Uexkull e Mutert, 1995).

Em valores de pH neutro, o Al presente no solo encontra-se predominantemente na forma não tóxica  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Entretanto, sob condições de acidez, o Al ocorre como  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ ,  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$  e  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ , sendo este último também denominado  $\text{Al}^{3+}$ , que constitui a sua forma mais fitotóxica (Kinraide, 1991). Potencialmente, a toxicidade ao Al pode resultar em complexa interação do Al com o apoplasto (parede celular), membrana plasmática e alvos no simplasto (citosol) (Kochian et al, 2005).

Enquanto alguns sintomas e respostas ao Al tóxico são detectados após segundos ou minutos de exposição ao Al, outros são perceptíveis depois de horas ou dias de exposição. O sintoma primário da toxicidade ao Al é a rápida inibição do crescimento radicular, restringindo a absorção de água e nutrientes que, conseqüentemente, acarreta na diminuição da produtividade das culturas (Kochian et al., 1995; 2004).

## **2.2 – Mecanismos fisiológicos da tolerância ao Al tóxico**

Os mecanismos de tolerância ao Al são divididos em duas classes: aqueles que impedem o  $\text{Al}^{3+}$  de atravessar a membrana plasmática e penetrar no simplasto (mecanismos de exclusão ou apoplásticos) e aqueles em que o  $\text{Al}^{3+}$  penetra nas células e é imobilizado, compartimentalizado ou destoxificado no citosol (mecanismos de tolerância interna ou simplásticos). Dependendo da espécie, esses dois mecanismos podem operar sozinhos ou de forma combinada, modulando os níveis de tolerância à toxidez de Al (Ryan et al., 2011).

O mecanismo de exclusão é atualmente o mais estudado e bem documentado mecanismo de tolerância ao Al (Delhaize et al., 1993 a, b; Delhaize et al., 2007; Delhaize e Ryan, 1995; Kinraide et al., 2005; Kochian et al., 2004; Ryan et al., 2001). Esse tipo de mecanismo inclui as modificações de pH da rizosfera e a exsudação de agentes quelantes pelas raízes, predominantemente, os ácidos orgânicos. Os ácidos orgânicos liberados pelas células radiculares quelam o Al tóxico presente na rizosfera e formam complexos estáveis e não-tóxicos, evitando a absorção do mesmo pela raiz (Kinraide et al., 2005).

Embora os genótipos tolerantes ao Al de muitas espécies compartilhem do mecanismo de exclusão, existem algumas diferenças espécie-específica em resposta ao estresse causado pelo Al. Em trigo, por exemplo, a exsudação de malato é responsável pela

exclusão do Al (Delhaize et al., 1993 a, b; Ryan et al., 1995). Já outras espécies, incluindo o milho (Pellet et al., 1995), sorgo (Magalhães, 2002), aveia (Zheng et al., 1998), soja (Silva et al., 2001; Yang et al., 2000) e rabanete (Zheng et al., 1998), exsudam citrato, enquanto que o trigo sarraceno e o inhame utilizam a liberação de oxalato pelas raízes. Algumas espécies, tais como centeio e *Arabidopsis*, exsudam citrato e malato (Li et al., 2000; Liu et al., 2009).

O citrato é um ácido orgânico que apresenta três grupos carboxila, quelando de forma mais eficiente o  $Al^{3+}$  em comparação com o malato, que possui apenas dois grupos carboxila. Assim, o citrato é mais eficiente na destoxificação do Al em relação ao malato (Kochian et al., 2004). O efluxo de ácidos orgânicos é, em grande parte, restrito aos ápices radiculares e em quase todos os casos não ocorre de forma constitutiva, mas é ativado após a exposição ao  $Al^{3+}$ . Esse mecanismo tem sido relatado para um grande número de espécies monocotiledôneas e dicotiledôneas (Kochian et al., 2004).

No mecanismo de tolerância interna, algumas espécies podem absorver e armazenar o  $Al^{3+}$  nas suas folhas em concentrações superiores a 3000 mg/kg. Algumas dessas espécies incluem *Camellia sinensis* (Morita et al., 2004), *Hydrangea macrophylla* (Ma et al., 1997) e trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) (Ma et al., 1998; Ma e Hiradate, 2000). A maior parte do Al em *C. sinensis* fica armazenado no apoplasto (Tolra et al., 2011), enquanto que em *H. macrophylla* e trigo sarraceno o Al fica no vacúolo ligado a citrato e oxalato, respectivamente (Takeda et al., 1985).

### 2.3 – Genética da tolerância ao Al

O primeiro gene identificado em planta capaz de explicar a variação fenotípica da tolerância ao Al foi o *TaALMT1* de trigo (*Triticum aestivum*). Esse gene pertence à família gênica *ALMT* (*aluminum-activated malate transporter*) e codifica um transportador de malato ativado por Al, responsável pela exsudação de malato no ápice radicular (Sasaki et al., 2004; Zhang et al., 2008). O *TaALMT1* está presente no loco *Alt<sub>BH</sub>*, o principal loco de tolerância ao Al em trigo, responsável por quase 85% da variação fenotípica da tolerância ao Al em uma população de mapeamento (Riede e Anderson, 1996).

Já em sorgo, a tolerância ao Al é controlada em grande parte pelo loco *Alt<sub>SB</sub>*, que foi mapeado no cromossomo 3 e explica aproximadamente 80% da variação fenotípica da característica em uma população de mapeamento (Magalhães et al., 2004). O gene responsável por esse loco foi caracterizado como *SbMATE*, membro da família gênica *MATE* (*multidrug and toxic compound exudation*) e codifica um transportador de citrato ativado por Al, que media a exsudação de citrato principalmente no ápice radicular de genótipos tolerantes de sorgo (Magalhães et al., 2007).

A partir da identificação desses genes associados com a tolerância ao Al, homólogos funcionais das famílias gênicas *ALMT1* e *MATE* têm sido identificados em outras espécies,

incluindo *Arabidopsis* (Hoekenga et al., 2006; Liu et al., 2009), centeio (Collins et al., 2008; Yokosho et al., 2010), trigo (Ryan et al., 2009), cevada (Zhou et al., 2014), *Brassica napus* (Ligaba et al., 2006) e milho (Maron et al., 2010).

Enquanto a tolerância ao Al em trigo e sorgo é controlada por um loco genético de efeito maior, em outras espécies essa característica é de herança complexa, envolvendo múltiplos genes e mecanismos. Em milho, os estudos de mapeamento de QTL relataram de duas a seis regiões genômicas relacionadas com a tolerância ao Al (Sibov et al., 1999; Ninamango-Cárdenas et al., 2003; Conceição et al., 2009). Um homólogo do gene *SbMATE* foi mapeado no cromossomo 6 de milho e identificado como *ZmMATE1*, sendo co-localizado com um QTL explicando aproximadamente 16% da tolerância ao Al (Maron et al., 2010). O *ZmMATE1* é preferencialmente expresso no ápice radicular, sendo consideravelmente maior nos genótipos tolerantes ao Al em relação aos sensíveis. Sua expressão é regulada positivamente na presença de Al e está diretamente relacionada com o aumento na exsudação de citrato. A expressão desse gene em plantas transgênicas de *Arabidopsis* conferiu um aumento significativo na tolerância ao Al e na exsudação de citrato (Maron et al., 2010). Recentemente, três cópias em tandem do *ZmMATE1*, presentes na linhagem Cateto Al237, foram associadas com a superioridade na expressão desse gene e na tolerância ao Al (Maron et al., 2013). Além disso, foi demonstrado que a triplicata do *ZmMATE1* é uma variação rara em milho, tendo um papel primordial na sua adaptação aos solos ácidos (Maron et al., 2013). A introgressão da região genômica contendo o *ZmMATE1* por meio do retrocruzamento assistido, aumentou significativamente a tolerância ao Al em linhagens semi-isogênicas de milho (Guimarães et al., 2014).

#### **2.4 – Utilização da transgenia para aumentar a tolerância ao Al em plantas**

Considerando o papel dos ácidos orgânicos no aumento da tolerância ao Al em plantas, duas abordagens foram testadas via transgenia: aumento da síntese interna dos ácidos orgânicos e do seu transporte por meio da membrana plasmática. O primeiro estudo reportou que plantas de tabaco transformadas com o gene da citrato sintase de *Pseudomonas aeruginosa* tiveram um aumento no efluxo de citrato e na tolerância ao Al (Fuente et al., 1997). A partir desse estudo, vários trabalhos demonstraram o aumento da tolerância ao Al com o uso desse mesmo gene em *Arabidopsis* (Koyama et al., 2000), *Brassica napus* (Anoop et al., 2003) e alfafa (Barone et al., 2008). No entanto, Delhaize et al. (2001) não foram capazes de repetir o resultado positivo em tabaco obtido por Fuente et al. (1997). Mesmo quando os resultados foram positivos, os ganhos na tolerância ao Al em plantas transformadas com genes envolvidos na síntese de ácidos orgânicos foram relativamente modestos.

A expressão heteróloga do gene *TaALMT1* de trigo foi efetiva em aumentar o efluxo de malato na raiz e a tolerância ao Al em plantas transgênicas de cevada (Delhaize et al., 2004), trigo (Pereira et al., 2010) e *Arabidopsis* (Ryan et al., 2011). Essas plantas mostraram aumento no crescimento relativo da raiz de 20, oito e quatro vezes, respectivamente. A única exceção foi em arroz, onde houve o efluxo de malato, mas não o aumento da tolerância ao Al (Sasaki et al., 2004). A incapacidade desse gene em aumentar a tolerância ao Al, neste caso, foi atribuída ao elevado nível endógeno de tolerância presente em arroz.

Apesar da tolerância ao Al em cevada ser baseada no efluxo de citrato nas raízes, mediada pelo transportador *HvAACT*, plantas transgênicas que expressam o gene *TaALMT1* também exsudam malato, indicando que a cevada é capaz de sintetizar e libertar malato por meio de uma via de transporte que já está presente (Delhaize et al., 2004). Isso mostra que o transporte de ácidos orgânicos através da membrana plasmática é uma etapa fundamental na tolerância ao Al em plantas, até mais do que a síntese dos mesmos.

O gene *SbMATE* por sua vez, também aumentou a tolerância ao Al em plantas transgênicas de *Arabidopsis* (Magalhães et al., 2007) e de cevada (Zhou et al., 2014) em relação as plantas não transgênicas. Em ambos os casos, a tolerância ao Al aumentou proporcionalmente com a expressão do gene *SbMATE* e com a exsudação de citrato.

## **2.5 – Plantas transgênicas de milho expressando o gene *SbMATE***

Eventos de milho expressando o gene *SbMATE* foram gerados na Embrapa Milho e Sorgo. O genótipo utilizado foi o híbrido de milho Hi II, que foi transformado por *Agrobacterium tumefaciens* com a construção gênica contendo o gene *SbMATE* sob o controle do promotor constitutivo da ubiquitina de milho e do terminador NOS (*Ubiquitina::SbMATE::NOS*) (Pôssa, 2010). Os eventos T0 contendo o gene *SbMATE* foram autofecundados, gerando as sementes T1, que foram selecionadas em função dos altos níveis de tolerância ao Al em solução nutritiva e da expressão do transgene (Pôssa, 2010). A estimativa do número de inserções do transgene foi feita por PCR quantitativo e foi confirmada que as plantas transgênicas selecionadas apresentaram apenas uma cópia do gene inserida em seu genoma (Barros et al., 2011).

Os eventos transgênicos de milho são normalmente gerados no híbrido Hi II, que tem uma excelente capacidade para regeneração de calos friáveis em cultura de tecidos (Armstrong et al., 1991). Entretanto, Hi II é um híbrido temperado e para uma validação dos transgênicos em condições de campo, seria desejável que o transgene fosse avaliado em linhagens tropicais. Para isso, a Embrapa Milho e Sorgo conduziu experimentos para a introgressão do transgene em uma linhagem elite do programa de melhoramento, denominada L3. O transgene foi introgridido por ciclos de retrocruzamento assistido por marcadores moleculares, visando acelerar a recuperação do genoma recorrente.

## **2.6 – Aquisição e uso eficiente do fósforo**

O fósforo (P) é um dos nutrientes mais importantes para o crescimento e desenvolvimentos das plantas, sendo o segundo mais limitante para a produção de grãos, depois do nitrogênio (Amtmann et al., 2005; Vance e Chiou, 2011). Em solos tropicais, a concentração de P é frequentemente baixa e sua disponibilidade é limitada porque forma complexos insolúveis com cátions, particularmente com o alumínio e o ferro (Marschner, 1995). A aplicação de fertilizantes fosfatados é a prática agronômica recomendada para aumentar a disponibilidade de P no solo e garantir a produção agrícola, prática que onera os custos da produção.

A eficiência na utilização de P pelas plantas é uma característica complexa e ainda pouco conhecida, podendo ser dividida em dois componentes: a aquisição de P e a eficiência na utilização interna do P. Em milho, a eficiência no uso de P em condições de campo está mais associada com a capacidade da planta em adquirir P do solo do que com a sua capacidade em utilizar mais eficientemente o P no interior da planta (Parentoni e Souza, 2008). Dentre os mecanismos associados com a eficiência na aquisição de P podemos citar mudanças na morfologia e arquitetura da raiz, associação entre as raízes das plantas e microorganismos (ex: micorrizas e bactérias), mobilização do P via exsudação de ácidos orgânicos e outros compostos orgânicos de baixo peso molecular na rizosfera (Baligar e Fageria, 1997; Lynch, 2011).

As modificações na morfologia do sistema radicular são particularmente importantes para a eficiência na aquisição de P em plantas devido à baixa mobilidade do P no solo (Zhu et al., 2005). Como estratégia para aumentar a aquisição de P, as plantas eficientes tendem a ter maior relação entre massa seca da raiz e da parte aérea e maior comprimento de raiz, além de raízes mais finas, obtendo assim uma maior área superficial do sistema radicular (Marschner, 1995; Zhu et al., 2006). Como resposta adaptativa, a morfologia do sistema radicular alterada aumenta a aquisição de P com um custo metabólico mínimo (Lynch e Brown, 2001; Lynch e Ho, 2005; Lynch, 2011). Nesse sentido, o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas às condições de deficiência nutricional e/ou que utilizem o fertilizante aplicado de forma mais eficiente tem recebido atenção nos programas de melhoramento em regiões tropicais, sendo outra importante estratégia para aumentar a produção agrícola em solos ácidos.

## **3 – Objetivos**

### **3.1 – Objetivo Geral**

Realizar a caracterização genética e morfo-fisiológica de linhagens e híbridos transgênicos de milho expressando o gene *SbMATE* de sorgo.



### 3.2 – Objetivos específicos

- Caracterizar linhagens e híbridos transgênicos de milho quanto à tolerância ao Al em solução nutritiva;
- Avaliar o padrão de expressão dos genes *SbMATE* e *ZmMATE1* em linhagens e híbridos transgênicos e semi-isogênicos de milho;
- Avaliar o modo de ação do transgene *SbMATE* em linhagens e híbridos transgênicos de milho;
- Analisar características morfológicas do sistema radicular de linhagens e híbridos transgênicos e semi-isogênicos de milho em solução nutritiva e em rizobox.

## 4 – Material e Métodos

### 4.1 – Material genético

Foram usadas linhagens previamente caracterizadas para a tolerância ao Al e utilizadas como parentais de linhagens semi-isogênicas e transgênicas: Cateto AI237 (tolerante), L3 (média tolerância) e L53 (sensível) (Maron et al., 2013; Guimarães et al., 2014). Duas linhagens semi-isogênicas (NILs) possuindo o *background* genético da linhagem L53 e a região do *qALT6* derivada do Cateto AI237, QTL que contém o gene *ZmMATE1* que confere tolerância ao Al (Guimarães et al., 2014). Essas NILs foram geradas por meio de retrocruzamento assistido por marcadores moleculares (Tinoco et al., 2010).

As linhagens transgênicas foram geradas a partir dos eventos transgênicos em T1 como maiores níveis de tolerância ao Al, A2.17 e A2.22 (Pôssa, 2010). Esses eventos foram introgrididos na linhagem elite L3 por meio do retrocruzamento assistido por marcadores, seguindo a metodologia descrita por Tinoco et al. (2010). Na geração RC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>, as linhagens L3 transgênicas (L3TT) e transgênicas nulas (L3tt) foram selecionadas em função da presença e ausência do transgene *SbMATE*, respectivamente. As plantas foram autofecundadas para multiplicação das sementes, gerando as progênies RC<sub>2</sub>F<sub>3</sub> e RC<sub>2</sub>F<sub>4</sub>.

As linhagens L3 transgênicas e a L3 convencional foram cruzadas com a L53 e com as NILs, para serem avaliadas todas as combinações dos genes de tolerância ao Al nativo de milho (*ZmMATE1*) e do transgene de sorgo (*SbMATE*). O híbrido comercial da Embrapa Milho e Sorgo, BRS1010, que possui tolerância intermediária ao Al e é derivado do cruzamento com a L3, foi usado como testemunha no ensaio de tolerância ao Al de híbridos.

### 4.2 – Avaliação da tolerância ao Al em solução nutritiva

Os genótipos foram avaliados quanto ao crescimento da raiz seminal em solução nutritiva contendo Al nas concentrações de 0, 222 e 360 µM que correspondem à {0}, {39} e {60} µM de atividade de Al<sup>3+</sup> em pH 4,0, respectivamente. As chaves indicam a atividade livre de Al<sup>3+</sup> estimada com o software de especiação GEOCHEM-EZ (Shaff et al., 2010).

As sementes de milho foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 0,5% por 5 minutos e germinadas em rolos de papel de germinação, que foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura diurna média de  $27\pm 3^{\circ}\text{C}$ , noturna de  $20\pm 3^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas. Após três dias, as plântulas foram transferidas para copos plásticos perfurados, acomodados em placas de PVC dentro de bandejas plásticas com capacidade para 8 litros de solução nutritiva completa (Magnavaca et al., 1987), por um período de 24 horas de aclimatação, com pH 4,0 e sob aeração constante. O experimento foi mantido em câmara de crescimento, sob as mesmas condições utilizadas para a germinação, conforme descrito por Guimarães et al. (2014).

Após as 24 horas de aclimatação, foi mensurado o crescimento radicular inicial ( $C_{0d}$ ) de todas as plântulas e a solução nutritiva foi então trocada por solução nutritiva contendo Al nas atividades de {0}, {39} e {60}  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ , fornecido por  $\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . O crescimento radicular foi novamente obtido após cinco dias ( $C_{5d}$ ) nas respectivas soluções nutritivas. Com os valores de  $C_{0d}$  e  $C_{5d}$ , foi possível calcular o crescimento líquido das raízes (CL), pela diferença entre o comprimento final e o inicial para cada tratamento, ou seja,  $\text{CL} = C_{5d} - C_{0d}$ .

Em cada tratamento foram avaliadas três repetições com sete plantas em delineamento inteiramente casualizado. A média do crescimento líquido radicular do tratamento com Al ( $\text{CL}_{+Al}$ ) de cada repetição foi dividida pela média geral do crescimento líquido radicular do tratamento sem Al ( $\text{CL}_{-Al}$ ), gerando um valor percentual do crescimento líquido relativo da raiz seminal (CLR).

Notas para Injúria Radicular Visual (IRV) foram atribuídas após cinco dias de exposição ao Al de acordo com uma escala que varia de 1 a 5, sendo: 1) ausência de raízes secundárias, raiz principal escurecida, ápice radicular translúcido, ligeiramente curvada e muito danificada; 2) ausência de raízes secundárias, ápice radicular inchado, danificado e ligeiramente amarronzado; 3) ausência de raízes secundárias, ápice radicular branco, ligeiramente inchado e danificado; 4) ausência de raízes secundárias, raiz principal branca, ápice radicular não danificado; 5) presença abundante de raízes secundárias, raiz principal branca, ápice radicular não danificado. As notas foram baseadas nas avaliações visuais realizadas para sorgo (Caniato et al., 2011).

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para os valores de CLR em porcentagem, e as médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa SAS (SAS Institute, 1999).

#### **4.3 – Análise da expressão dos genes *SbMATE* e *ZmMATE1***

Inicialmente foi analisado o perfil de expressão do gene *SbMATE* nas linhagens transgênicas. A tecido-especificidade foi avaliada utilizando o primeiro centímetro do ápice radicular, a raiz e a folha. A expressão ao longo do tempo foi testada antes dos tratamentos,

sendo considerado o tempo 0, e após 6 e 24 horas de exposição a {0} e {39}  $\mu\text{M}$  de atividade de  $\text{Al}^{3+}$ . A partir desse teste inicial nas linhagens, foram definidas as condições para a análise da expressão do gene *SbMATE* nos híbridos, que foi realizada apenas no ápice radicular após 24 horas de tratamento com {39}  $\mu\text{M}$  de atividade de  $\text{Al}^{3+}$ . O perfil de expressão do gene *ZmMATE1* utilizou as mesmas condições empregadas para avaliar a expressão do gene *SbMATE* nos híbridos.

As sementes foram germinadas seguindo o mesmo método utilizado para avaliar a tolerância ao Al em solução nutritiva. A coleta dos tecidos foi realizada com auxílio de um bisturi, sendo congelados imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Cada amostra biológica foi representada por um conjunto de sete plântulas.

A extração do RNA total foi feita utilizando o kit de extração RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante e tratados com DNase I por 15 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram quantificadas e a pureza do RNA verificada por meio da leitura a 260 e 280 nm utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 3000 (Thermo Fisher Scientific, Worcester, MA). A verificação da integridade do RNA foi feita por eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1 mM), corados com GelRed Nucleic Acid Stain na diluição de 1:100 (Biotium). A eletroforese foi realizada a 200 volts por 15 minutos e o gel visualizado no sistema de fotodocumentação Kodak Gel Logic 200 Imaging System (Carestream, Health, New Haven, CT).

Para a obtenção do cDNA, foi utilizado o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA). A reação de síntese do cDNA foi efetuada para um volume final de 10  $\mu\text{L}$ , utilizando 2  $\mu\text{g}$  de RNA total, 2X tampão RT, 0,8 mM dos dNTPs, 2X de primers RT random, 4,2  $\mu\text{L}$  de água nuclease-free e 1  $\mu\text{L}$  de transcriptase reversa. As condições de amplificação foram  $25^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos,  $37^{\circ}\text{C}$  por duas horas e  $85^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. A expressão dos genes *SbMATE* e *ZmMATE1* foi avaliada por meio de RT-PCR quantitativo no equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) e os primers F: 5'-GCCATTGCCATGTTCTTTC-3' e R: 5'-TCGACCTTCCTCACCAGCTT-3' para *SbMATE* e F: 5'-TGTGAGTTTGCGGATGTGT-3' e R: 5'-TCACAATCTAGGCCAGTACAACAGA-3' para *ZmMATE1*. A expressão endógena foi quantificada com o controle interno 18S RNA (F: 5'-CGTCCTAGTCTCAACCATAAACG-3' e R: 5'-CCCCGGAACCCAAAGACT-3') para o gene *SbMATE* e Actina (F: 5'-TCCTGACACTGAAGTACCCGATTG-3' e R: 5'-CGTTGTAGAAGGTGTGATGCCAGTT-3') para o *ZmMATE1*. A quantificação relativa dos genes foi calculada usando o método  $C_T$

comparativo, denominado  $\Delta\Delta C_T$  (Schmittgen e Livak, 2008), sendo adotadas três repetições técnicas para cada amostra.

#### 4.4 – Avaliação do sistema radicular em rizobox

O solo foi coletado nas áreas da Embrapa Milho e Sorgo com saturação de Al de 34%. Todo o solo recebeu um suplemento de macro e micronutrientes e uma parte dele foi corrigida com  $\text{CaCO}_3 + \text{MgCO}_3$  para aumentar o pH e diminuir a saturação de Al. O resultado da correção pode ser vista na Tabela 1, onde uma porção do solo teve sua saturação de Al corrigida para próximo a 0% e a outra porção do solo ficou com aproximadamente 15% de saturação de Al.

**Tabela 1:** Análise química do solo após a adição de macro e micronutrientes e correção com  $\text{CaCO}_3 + \text{MgCO}_3$ .

	Solo corrigido	Solo não-corrigido
pH ( $\text{H}_2\text{O}$ )	5,30	5,20
Cu ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ )	1,39	1,28
Fe ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ )	40,93	31,39
Mn ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ )	11,34	9,64
Zm ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ )	2,64	1,80
P ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ )	26,14	28,43
C (%)	2,49	2,54
Al ( $\text{cmolc}/\text{dm}^3$ )	0,02	0,34
Ca ( $\text{cmolc}/\text{dm}^3$ )	3,31	1,58
K ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ )	1,00	**
Mg ( $\text{cmolc}/\text{dm}^3$ )	0,53	0,11
Saturação de Al (%)	0,52	16,75

\*\* amostra de solo que não apresentou valor significativo para o elemento.

O experimento foi montado em caixas de acrílico, denominadas rizobox, com dimensões de 45 x 20 x 2,5 cm. Cada caixa foi preenchida com 500 g de solo corrigido na camada superficial com aproximadamente 15 cm, enquanto a camada subsuperficial recebeu 1,5 Kg de solo com 15% de Al. As sementes foram germinadas seguindo o mesmo método para avaliar a tolerância ao Al. Para cada genótipo foram escolhidas seis plântulas uniformes, que foram plantadas duas a duas em cada rizobox, em três repetições.

O experimento foi mantido em câmara de crescimento, nas mesmas condições utilizadas para avaliar a tolerância ao Al. As caixas foram mantidas com inclinação de 45°, com a tampa de abertura virada para baixo. Após o período de 18 dias, o sistema radicular das plantas foi dividido entre as raízes da camada superficial e da camada subsuperficial, sendo então lavadas, escaneadas e analisadas, separadamente, com o auxílio do software

Winrhizo v. 4.0 (Regent Systems, Quebec, Canadá), conforme descrito por de Sousa et al. (2012). Assim, foram quantificadas duas características da morfologia radicular: comprimento total (cm) e área de superfície (cm<sup>2</sup>). A parte aérea e as raízes foram secas em estufa a 65°C até atingirem peso constante, para determinação da massa seca de cada uma delas. A concentração de P na parte aérea foi quantificada utilizando digestão nitro-perclórica e leitura espectrofotométrica em ICP (*inductively-coupled argon plasma*) (da Silva, 2009) no laboratório de análises de nutrientes da Campo - Centro de Tecnologia Agrícola e Ambiental. Para o cálculo de conteúdo de P na parte aérea, a concentração de P foi multiplicada pela matéria seca da parte aérea.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e a análise de variância (ANOVA) foi realizada para todas as características avaliadas, sendo as médias comparadas pelo teste LSD ( $p < 0,05$ ) usando o programa Sisvar (Ferreira, 2000). Foi feita análise de correlação com o método de Pearson pelo pacote Agricolae do R (R Development Core Team, 2012).

#### **4.5 – Avaliação da morfologia radicular em solução nutritiva**

As sementes de milho foram germinadas como descrito anteriormente, mas durante quatro dias. O endosperma das sementes foi retirado com auxílio de um bisturi, visando eliminar as reservas nutricionais da planta. Utilizou-se a solução nutritiva de Magnavaca modificada (pH 5,65) (Magnavaca et al., 1987) com duas concentrações de fósforo (2,5 µM para baixo P e 250 µM para alto P) em um sistema composto de pastas de arquivo forradas com papel de germinação, conforme descrito por de Sousa et al. (2012). Cada pasta continha três plântulas e para cada genótipo foram feitas três repetições. A solução nutritiva ficou em contato com aproximadamente 3 cm das pastas, sendo trocada a cada três dias. Os experimentos foram mantidos em câmara de crescimento com as mesmas condições utilizadas para a análise de tolerância ao Al.

Após 13 dias, o sistema radicular foi fotografado com uma câmera digital (Nikon D300S SLR). As imagens obtidas foram analisadas com o auxílio dos softwares RootReader2D e Winrhizo v. 4.0 (Regent Systems, Quebec, Canadá), sendo quantificadas quatro características de morfologia radicular: comprimento total (cm), área de superfície (cm<sup>2</sup>), área de superfície de raízes finas (cm<sup>2</sup>) e diâmetro médio (mm) (de Sousa et al., 2012). A parte aérea e a raiz foram mantidas em estufa a 65°C até atingirem peso constante para determinar a massa seca.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada característica avaliada, e as médias foram comparadas por meio do teste LSD ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa Sisvar (Ferreira, 2000).

#### 4.6 – Estimativa do modo de ação gênica do *SbMATE* quanto a tolerância ao Al

A estimativa do modo de ação gênica do *SbMATE* foi feita utilizando o crescimento líquido relativo obtido nas linhagens e nos híbridos. O grau médio de dominância ( $d/a$ ) do gene *SbMATE* foi obtido pela razão entre os efeitos da dominância ( $d$ ) e aditivo ( $a$ ), onde  $d = Ss - [(SS+ss)/2]$  e  $a = (SS-ss)/2$ .  $SS$  denota o valor do CLR do parental que possui o alelo do transgene *SbMATE* em homozigose, enquanto que  $ss$  denota o valor do CLR do parental que não possui o transgene e  $Ss$  denota o valor de CLR para cada híbrido que possui apenas um alelo do transgene. Um valor de  $d/a$  igual a -1 indica que o CLR do híbrido ( $Ss$ ) é igual à do parental homozigoto  $ss$ , o que denota um padrão recessivo. Um valor de  $d/a$  igual a +1 indica que o CLR do híbrido é igual ao do parental homozigoto  $SS$ , apresentando assim, dominância completa. Valores de  $d/a$  iguais ou próximos a 0 indicam que o CLR no híbrido é igual à média do CLR estimado para os dois parentais, caracterizando ação gênica aditiva.

Neste estudo, nós adotamos a seguinte convenção para os modos de ação gênica: recessivo ( $d/a \leq -0,7$ ), parcialmente recessivo ( $-0,7 < d/a < -0,3$ ), aditivo ( $-0,3 \leq d/a \leq 0,3$ ), parcialmente dominante ( $0,3 < d/a < 0,7$ ), dominante ( $d/a \geq 0,7$ ).

### 5 – Resultados

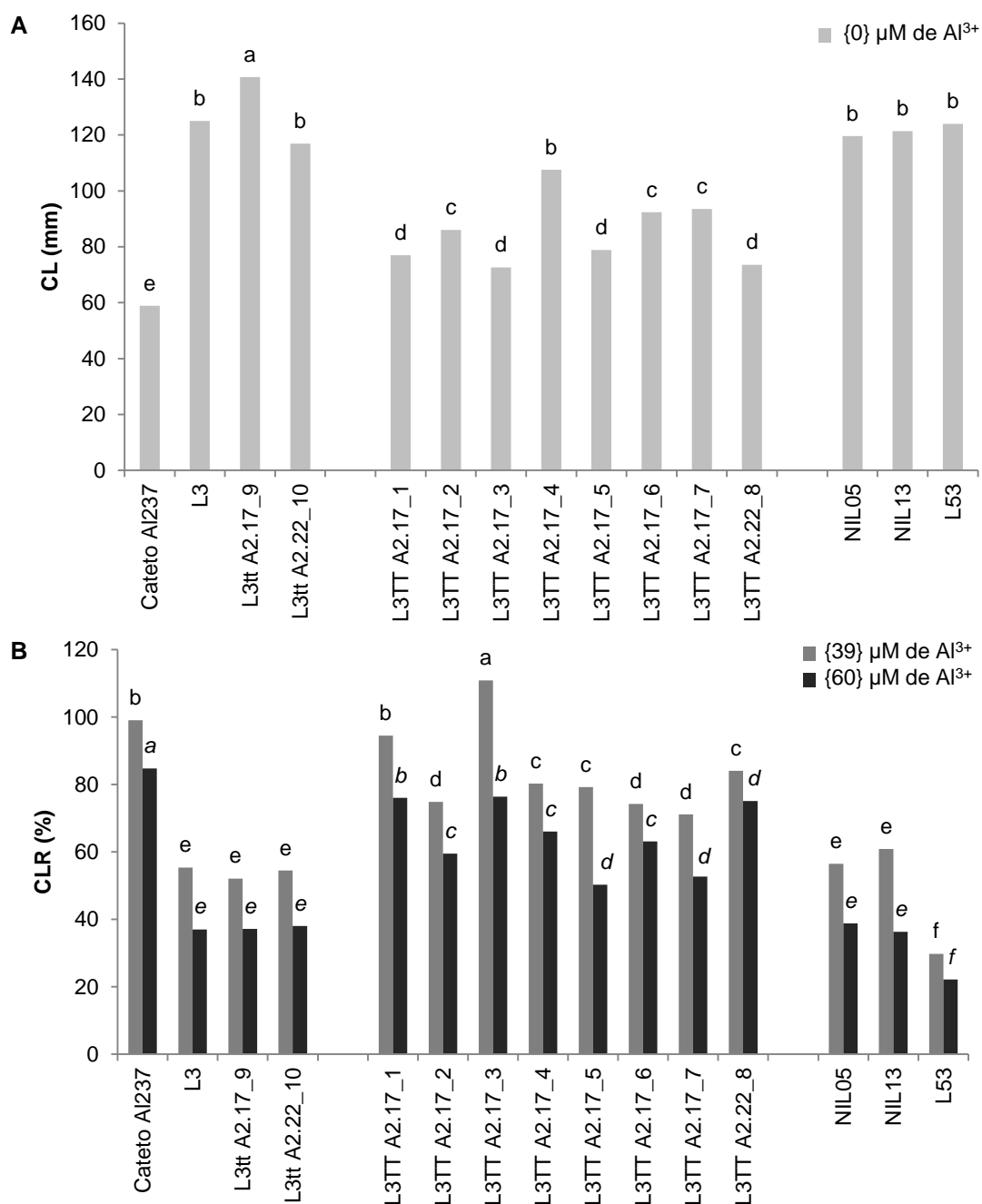
#### 5.1 – Crescimento radicular em solução nutritiva

Inicialmente, oito linhagens transgênicas e duas transgênicas nulas foram derivadas na geração  $RC_2F_3$  de dois eventos independentes, A2.17 e A2.22, e avançadas para a  $RC_2F_4$ , sendo caracterizadas quanto a tolerância ao Al, juntamente com as linhagens convencionais. As linhagens convencionais de milho (Cateto Al237, L3 e L53) são padrões de tolerância ao Al e já foram amplamente caracterizadas, sendo utilizadas como controle para avaliar o crescimento relativo da raiz seminal das linhagens transgênicas em solução nutritiva sem Al e contendo as atividades de {39} e {60}  $\mu M$  de  $Al^{3+}$ .

Após cinco dias em solução nutritiva sem Al, de maneira geral, as linhagens transgênicas cresceram de 80 a 100 mm, enquanto a L3 convencional e a transgênica nula, bem como a L53 e as NILs, cresceram entre 120 e 140 mm (Figura 1A). Já a linhagem Cateto Al237 cresceu em torno de 60 mm, seguindo a taxa de crescimento esperada. Na presença do Al, o crescimento das raízes foi diferencialmente inibido, onde as linhagens transgênicas, apesar de apresentarem uma variabilidade para a tolerância ao Al, foram significativamente mais tolerantes que as L3 transgênicas nulas e que a L3 convencional (Figura 1B). Já na presença de {60}  $\mu M$  de  $Al^{3+}$ , algumas das linhagens transgênicas (L3TT A2.17\_1 e L3TT A2.17\_3) foram tão tolerantes quanto ao Cateto Al237, considerado como uma linhagem altamente tolerante ao Al em milho (Maron et al., 2013; Guimarães et al., 2014).

A atividade de {39}  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  é o nível de toxidez definido para a avaliação fenotípica da tolerância ao Al em milho (Alves et al., 2004). No entanto, com {60}  $\mu\text{M}$  de atividade de  $\text{Al}^{3+}$ , as linhagens L3 transgênicas tiveram o crescimento líquido relativo de raiz (CLR de 50,3 a 76,46%) significativamente reduzido em relação ao Cateto Al237 (84,8%), mas superiores às linhagens L3 transgênicas nulas e convencional, cujo CLR variou de 37,0 a 38,0% (Figura 1B).

A tolerância ao Al da L53 e das suas linhagens semi-isogênicas já haviam sido descritas em {39}  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  (Guimarães et al., 2014). No entanto, nossos resultados confirmaram os dados anteriores e acrescentaram que, a introgressão do *qALT6* e, conseqüentemente do *ZmMATE1*, aumentou a tolerância ao Al na L53, mesmo em altos níveis de toxidez de Al (Figura 1B).



**Figura 1:** Tolerância ao Al em linhagens transgênicas e convencionais de milho. A) Crescimento líquido da raiz seminal (CL, mm) mensurado após cinco dias sem  $\text{Al}^{3+}$  em solução nutritiva. B) Tolerância ao Al mensurada pelo crescimento líquido relativo da raiz seminal (CLR%). Letras diferentes representam a existência de diferenças significativa pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, para cada nível de Al, independentemente.

Como avaliação complementar da tolerância ao Al, além do crescimento radicular em solução nutritiva, os ápices foram avaliados visualmente quanto aos danos causados pelo Al em solução nutritiva contendo {60}  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ , uma vez que essa foi a concentração que



permitiu distinguir os genótipos tolerantes. Assim, as linhagens transgênicas L3TT A2.17\_1 e L3TT A2.22\_8 foram selecionadas para os próximos experimentos por apresentarem conjuntamente IRV de 5 (Tabela 2) e elevado crescimento relativo da raiz. Apesar da linhagem L3TT A2.17\_3 ter apresentado o maior crescimento radicular, ela obteve IRV = 4 (Tabela 2), indicando que o Al causou injúrias no ápice radicular, mesmo sem afetar o seu desenvolvimento.

**Tabela 2:** Avaliação dos danos no ápice radicular por meio de nota de injúria radicular visual (IRV) obtida após cinco dias de tratamento com {60}  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ . A escala de notas varia entre 5 (ápice radicular sem injúrias) e 1 (ápice radicular muito danificado).

Genótipo	IRV
Cateto Al237	5
L3TT A2.17_1	5
L3TT A2.17_2	3,5
L3TT A2.17_3	4
L3TT A2.17_4	4
L3TT A2.17_5	3,5
L3TT A2.17_6	4
L3TT A2.17_7	4
L3TT A2.22_8	5
L3tt A2.17_9	3,5
L3tt A2.22_10	3,5
L3	4
NIL05	3,5
NIL13	3,5
L53	1

Dentre as linhagens transgênicas selecionadas como altamente tolerantes ao Al, apenas a L3TT A2.17\_1 foi utilizada para gerar os híbridos simples semi-isogênicos com a L53 e as NILs introgrididas com o QTL de tolerância ao Al (*qALT6*), que também foram caracterizados quanto a tolerância ao Al. Assim, foram geradas diferentes combinações alélicas dos genes *SbMATE* e *ZmMATE1* que estão explicitadas na Tabela 3, considerando S/s para a presença e ausência do transgene *SbMATE* e Z/z para os alelos do *ZmMATE1* derivados de Cateto Al237 e L53, respectivamente.

Na presença de {39}  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ , os híbridos transgênicos apresentaram tolerância ao Al inferior à linhagem parental transgênica, mas superior às médias das respectivas linhagens parentais. Todos os híbridos transgênicos foram estatisticamente similares em termos da tolerância ao Al, quando cruzados com linhagens moderadamente tolerantes (NILs) ou com uma linhagem altamente sensível ao Al (L53), sendo mais tolerantes que o

híbrido comercial da Embrapa usado como testemunha (Tabela 3). Mesmo com o transgene em heterozigose, os híbridos transgênicos mantiveram um alto crescimento líquido radicular no tratamento sem Al e reduziu muito menos do que seus respectivos genótipos não transgênicos na presença de Al, o que garantiu um nível consideravelmente alto de tolerância ao Al (Tabela 3).

Vale ressaltar que o crescimento líquido das raízes dos híbridos transgênicos, no tratamento sem Al, apresentou uma redução de 15-30% em relação aos respectivos híbridos não transgênicos, diferente da redução ocorrida no crescimento líquido da linhagem transgênica em relação à linhagem L3 convencional, que chegou a ser maior que 50% (Tabela 3).

O gene nativo *ZmMATE1*, introgradido nas NILs, também contribuiu significativamente para o aumento da tolerância ao Al nos híbridos semi-isogênicos em comparação com o híbrido L3xL53. Entretanto, a presença do gene *ZmMATE1* das NILs nos híbridos transgênicos não apresentou diferenças significativas em relação ao híbrido L3TTxL53. Como a média do crescimento relativo das raízes (CLR) a {39}  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  foi semelhante entre as linhagens parentais L3 e NILs e os seus respectivos híbridos, não foi possível concluir sobre o modo de ação do gene *ZmMATE1*.

Já na concentração de {60}  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ , houve uma redução acentuada da tolerância ao Al em todos os genótipos avaliados, exceto nas linhagens Cateto Al237 e na L3 transgênica, que apesar de terem reduzido o CLR em relação à atividade de {39}  $\mu\text{M}$ , mantiveram níveis de tolerância superiores aos seus híbridos (Tabela 3).

**Tabela 3:** Crescimento líquido da raiz seminal (CL, mm) mensurado após cinco dias sem  $Al^{3+}$  em solução nutritiva e crescimento líquido relativo da raiz (CLR%) expostas a {39} e {60}  $\mu M$  de  $Al^{3+}$  em híbridos simples de milho expressando o gene *SbMATE*, híbridos não transgênicos e as respectivas linhagens parentais. Valores em cada coluna com a mesma letra constituem grupos homogêneos pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Genótipos	<i>SbMATE</i> (S)	CL (mm)		CLR (%)	
	<i>ZmMATE1</i> (Z) <sup>1</sup>	{0} $\mu M$ de $Al^{3+}$	{39} $\mu M$ de $Al^{3+}$	{60} $\mu M$ de $Al^{3+}$	
Cateto AI237	ss ZZ	46,46 c	97,77 a	82,99 a	
L3TT A2.17_1	SS zz	61,31 c	89,42 a	83,28 a	
L3TTxNIL13	Ss Zz	125,17 b	82,42 b	69,26 b	
L3TTxNIL05	Ss Zz	137,67 b	80,17 b	58,47 c	
L3TTxL53	Ss zz	141,15 b	77,99 b	52,16 d	
L3xNIL05	ss Zz	163,76 a	47,33 d	27,32 f	
L3xNIL13	ss Zz	176,78 a	45,96 d	29,08 f	
L3xL53	ss zz	180,10 a	37,96 e	26,56 f	
BRS1010	ss zz	126,93 b	64,49 c	53,32 d	
NIL05	ss ZZ	121,24 b	52,33 d	37,61 e	
NIL13	ss ZZ	123,05 b	56,74 d	35,12 e	
L3	ss zz	126,70 b	50,07 d	36,59 e	
L53	ss zz	125,69 b	26,74 f	20,18 g	

<sup>1</sup> Combinações dos alelos S/s para presença e ausência do transgene *SbMATE* e Z/z para os alelos do *ZmMATE1* derivados de Cateto AI237 e L53, respectivamente.

## 5.2 – Modo de ação do transgene na tolerância ao Al

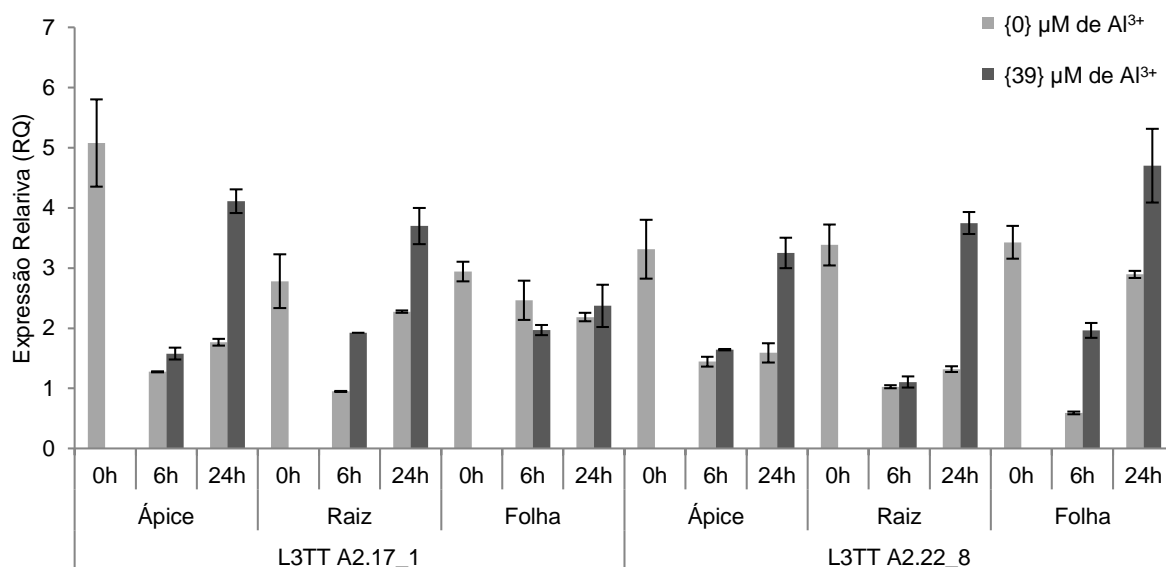
O modo de ação gênica do *SbMATE* para a tolerância ao Al foi calculado com base nos valores de CLR do híbrido L3TTxL53 e das suas respectivas linhagens parentais. Como as linhagens L3 e L53 possuem *background* genético diferente, podemos considerar que a L53 seria o padrão de sensibilidade ao Al e que na L3, além do transgene, podem existir outros genes menores influenciando a tolerância ao Al, exceto o *ZmMATE1*, uma vez que a L3 possui baixa expressão desse gene (Guimarães et al., 2014). Assim, o valor de d/a calculado foi igual a 0,57, indicando que o efeito do transgene na tolerância ao Al pode ser caracterizado com parcialmente dominante.

## 5.3 – Expressão do gene *SbMATE*

O perfil da expressão do gene *SbMATE* foi avaliado por RT-PCR quantitativo para as duas melhores linhagens transgênicas (L3TT A2.17\_1 e L3TT A2.22\_8) na presença de {0} e {39}  $\mu M$  de  $Al^{3+}$ . Essas linhagens mostraram uma alta expressão do transgene *SbMATE*

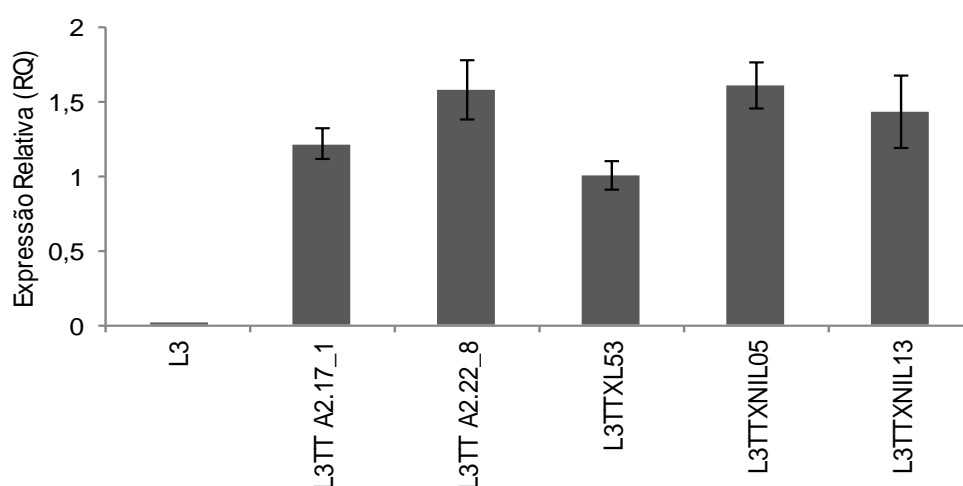
no ápice radicular, na raiz e na folha, com e sem AI (Figura 2). Foi observada uma diminuição da expressão gênica 6 horas após o início dos tratamentos com e sem AI, seguida de uma recuperação dos níveis de expressão após 24 horas, em todos os tecidos avaliados das duas linhagens transgênicas (Figura 2). O tempo zero consistiu na troca da solução nutritiva com ou sem AI, após as plantas já terem sido aclimatadas por 24 horas. Assim, pode ser sugerido que essa mudança tenha alterado temporariamente a expressão gênica, que foi recuperada após 24 horas.

Adicionalmente, houve uma tendência consistente em ambos os eventos, indicando que a expressão do transgene foi induzida pelo AI no ápice radicular e na raiz após 24 horas de exposição ao AI, padrão que não seria esperado para um promotor constitutivo como o da ubiquitina. No entanto, variações na expressão temporal e tecidual também foram observadas na expressão de dois genes (*Os03g01700* e *Os02g37190*) sob controle de três promotores constitutivos, incluindo o da ubiquitina (Li et al., 2013). A expressão de ambos os genes sob controle do promotor *OsUbi1* foi amplamente variável em oito tecidos e em diferentes fases de crescimento da planta de arroz (Li et al., 2013), indicando que variações no padrão de expressão são esperados para promotores constitutivos.



**Figura 2:** Perfil de expressão temporal e tecidual do gene *SbMATE* em linhagens transgênicas de milho. A expressão gênica foi determinada no ápice radicular, na raiz e na folha nos tempos 0, 6 e 24 horas após a exposição em {0} e {39} μM de Al<sup>3+</sup>. O calibrador utilizado foi raiz a 6 horas com AI da linhagem L3TT A2.22\_8. As barras indicam o desvio padrão da média de três repetições técnicas.

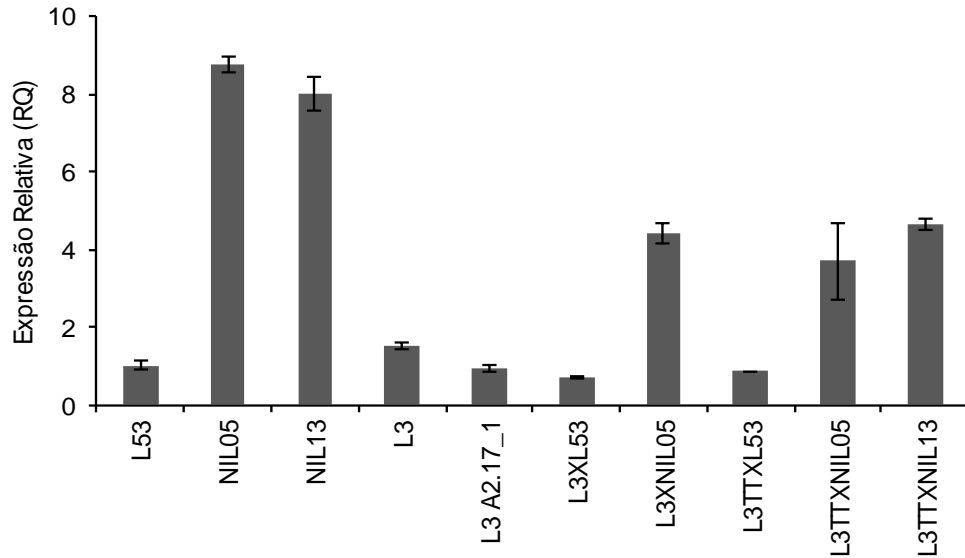
Considerando a análise da expressão temporal e tecidual nas linhagens, a expressão do *SbMATE* nos híbridos foi avaliada no ápice radicular após 24 horas de exposição a {39}  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ . Os resultados indicam que o nível de transcritos nos híbridos transgênicos foi similar ao obtido nas linhagens transgênicas, pelo menos na maioria dos genótipos testados (Figura 3), sugerindo que a presença do transgene em heterozigose nos híbridos não afetou a quantidade de transcritos. Houve uma redução significativa, mas de baixa magnitude, na expressão do transgene no híbrido L3TTxL53, que não foi consistente com os dois híbridos de L3TT com as NILs em comparação com a expressão nas duas linhagens transgênicas.



**Figura 3:** Expressão relativa do gene *SbMATE* em linhagens e híbridos transgênicos de milho. A expressão gênica foi determinada no ápice radicular após 24 horas de exposição em {39}  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ . O híbrido L3TTxL53 foi usado como calibrador. As barras verticais indicam o desvio padrão das médias.

#### 5.4 – Expressão do gene *ZmMATE1*

O gene *ZmMATE1* é o principal gene de tolerância ao Al descrito em milho, sendo altamente expresso nas NILs em relação a L53 em presença de Al (Guimarães et al., 2014). A expressão do *ZmMATE1* foi reduzida pela metade nos híbridos em relação às respectivas linhagens semi-isogênicas parentais (Figura 4), sendo compatível com a presença de uma única dose do alelo superior nos híbridos. Adicionalmente, a presença do transgene *SbMATE* parece não afetar de forma negativa a expressão do *ZmMATE1*.



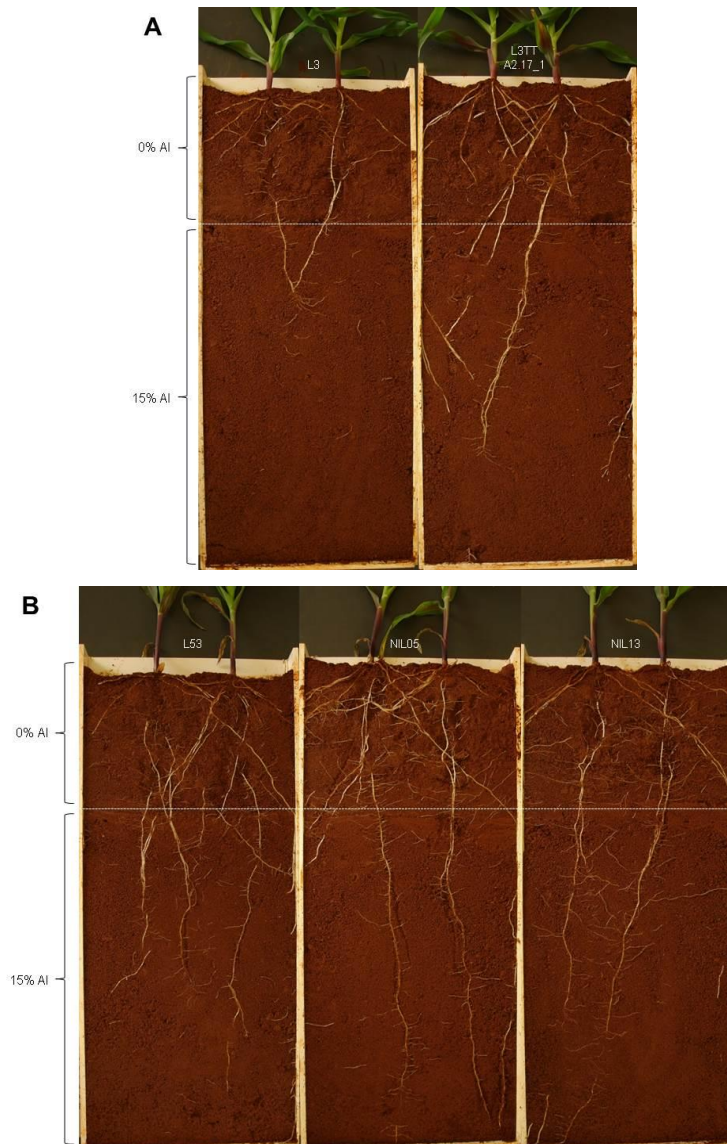
**Figura 4:** Expressão relativa do gene *ZmMATE1* em linhagens e híbridos de milho. A expressão gênica foi determinada no ápice radicular após 24 horas de exposição a {39}  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ . A linhagem L53 foi usada como calibrador. As barras verticais indicam o desvio padrão das médias.

### 5.5 – Desenvolvimento radicular e acúmulo de biomassa em rizobox

Após 18 dias de crescimento em rizobox contendo uma camada superficial de solo corrigido e outra subsuperficial com 15% de saturação de Al, a linhagem transgênica L3TT A2.17\_1 apresentou um ganho significativo no acúmulo de massa seca e no conteúdo de P na parte aérea, em relação à L3 convencional. Adicionalmente, a massa seca das raízes na camada de solo não-corrigida na L3 transgênica dobrou em relação à L3 não transgênica, revelando um aumento significativo no comprimento total e na área superficial das raízes (Tabela 4 e Figura 5A). Por outro lado, não houve diferença significativa entre essas linhagens para os parâmetros radiculares avaliados em solo corrigido. Já as NILs, não apresentaram diferenças significativas para massa seca da parte aérea e das raízes e para as características radiculares avaliadas em relação à L53.

**Tabela 4:** Acúmulo de massa seca da parte aérea (MS\_PA) e das raízes (MS\_R), conteúdo de P em parte aérea, comprimento total (C) e área de superfície (AS) radicular nas camadas superficial corrigida (0% Al) e subsuperficial com 15% de saturação de Al em linhagens transgênicas, convencionais e semi-isogênicas (NILs) de milho. Médias seguidas da mesma letra em cada coluna, não diferem entre si pelo Teste LSD a 5% de probabilidade.

Genótipos	Conteúdo de P		Camada superficial (0% Al)			Camada subsuperficial (15% Al)		
	MS_PA (g)	na PA (mg/g)	MS_R (g)	C (cm)	AS (cm <sup>2</sup> )	MS_R (g)	C (cm)	AS (cm <sup>2</sup> )
L3	0,22 b	0,00039 b	0,08 a	626,33 b	88,10 a	0,02 b	274,18 b	36,61 b
L3TT A2.17_1	0,28 ab	0,00103 a	0,11 a	605,52 b	96,88 a	0,04 a	589,69 ab	74,36 a
L53	0,31 a	0,00076 ab	0,11 a	923,07 a	113,57 a	0,03 ab	570,02 ab	66,33 ab
NIL05	0,34 a	0,00082 a	0,10 a	907,00 a	105,33 a	0,03 ab	608,15 ab	64,94 ab
NIL13	0,37 a	0,00087 a	0,10 a	906,60 a	103,81 a	0,04 a	767,55 a	76,58 a
CV (%)	15,37	29,02	18,1	14,89	15,92	29,47	34,2	30,43



**Figura 5:** Imagens representativas do rizobox contendo na camada superficial 0% de Al e na camada subsuperficial 15% de saturação de Al. A) Linhagens L3 transgênicas (L3TT) e L3 convencional (controle); B) Linhagens semi-isogênicas (NIL05 e NIL13) e L53 (controle).

### 5.6 – Caracterização do sistema radicular sob níveis contrastantes de P

A morfologia radicular das linhagens transgênicas e semi-isogênicas foi analisada no sistema de pastas em solução nutritiva completa (250  $\mu\text{M}$  de P) e sob deficiência de P (2,5  $\mu\text{M}$  de P). Foram avaliadas quatro características da morfologia radicular (comprimento total, área de superfície, área de superfície de raízes finas e diâmetro médio) e o peso seco total. Tais características foram selecionadas de acordo com de Sousa et al. (2012), por representarem variabilidade fenotípica em um conjunto de 32 linhagens de milho tropical.

A morfologia radicular dos genótipos avaliados não foi significativamente alterada sob alto e baixo P ( $p > 0,05$ ), sendo então avaliadas conjuntamente. A análise conjunta não



revelou diferenças nos parâmetros radiculares entre as linhagens transgênica e não-transgênica, exceto o diâmetro (Tabela 5). O diâmetro médio da raiz foi a única diferença significativa, onde a L3 transgênica foi mais fina que a convencional.

**Tabela 5:** Média e coeficiente de variação das características de morfologia radicular, comprimento total (C), área de superfície (AS), área de superfície de raízes finas (AS2) e diâmetro médio (D), e do peso seco total (PST) para linhagens transgênicas (L3TT) e semi-isogênicas (NILs) de milho. As médias foram obtidas para ambas as concentrações de P, sendo que os valores seguidos da mesma letra em cada coluna não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de probabilidade.

Genótipos	C (cm)	AS (cm <sup>2</sup> )	AS2 (cm <sup>2</sup> )	D (mm)	PST (g)
L3	187,28 a	80,44 a	38,74 a	1,42 a	0,07 a
L3TT A2.17_1	264,27 a	107,34 a	52,16 a	1,32 b	0,09 a
L53	249,51 a	94,36 a	48,63 a	1,22 c	0,09 a
NIL05	244,20 a	93,94 a	51,31 a	1,23 c	0,09 a
NIL13	210,03 a	82,16 a	40,37 a	1,27 bc	0,09 a
Média Geral	231,06	91,65	46,24	1,29	0,08
CV (%)	29,88	27,84	28,47	4,93	24,99

O comprimento total, a área de superfície, a área de superfície de raízes finas e o peso seco total foram altamente correlacionados entre si, sendo que o diâmetro radicular teve correlação negativa com as demais características morfológicas (Tabela 6). Esses dados concordam com de Sousa et al. (2012) e Negri et al. (2012), onde mostraram que o diâmetro radicular apresenta uma correlação negativa com as demais características da morfologia radicular em um painel de linhagens de ampla variabilidade.

**Tabela 6:** Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis: comprimento total (C, cm), área de superfície (AS, cm<sup>2</sup>), área de superfície de raízes finas (AS2, cm<sup>2</sup>), diâmetro radicular (D, mm) e peso seco total (PST, g).

	C	AS	AS2	D
<b>AS</b>	0,99			
<b>AS2</b>	0,96	0,98		
<b>D</b>	-0,70	-0,60	-0,60	
<b>PST</b>	0,95	0,95	0,94	-0,60

## 6 – Discussão

Neste trabalho, linhagens e híbridos de milho contendo o gene *SbMATE* de sorgo foram avaliadas em relação a tolerância ao Al, expressão do transgene e morfologia radicular em solução nutritiva e em solo ácido.

Nas linhagens transgênicas, a tolerância ao Al avaliada em solução nutritiva foi superior às suas respectivas transgênicas nulas, sendo que alguns genótipos transgênicos (L3TT A2.17\_1 e L3TT A2.17\_3) tiveram tolerância igual ou superior a Cateto Al237, linhagem de milho tolerante ao Al. Apesar dos altos níveis de tolerância das linhagens transgênicas, o crescimento líquido das raízes seminais na ausência de Al foi reduzido, em relação às linhagens transgênicas nulas e à L3 convencional. Plantas de cevada expressando o gene *SbMATE* foram mais tolerantes ao Al em relação aos seus respectivos transgênicos nulos, e, ao contrário dos nossos resultados, o crescimento líquido das raízes foi similar na ausência de Al entre as linhagens transgênicas e as transgênicas nulas (Zhou et al., 2014).

Adicionalmente, a linhagem transgênica apresentou um sistema radicular mais desenvolvido, isto é, com maior massa seca, comprimento e área superficial, na camada de solo com 15% de saturação de Al em rizobox. A superioridade no sistema radicular, provavelmente, foi responsável pelo aumento significativo na massa seca e no conteúdo de fósforo na parte aérea, em relação à linhagem L3 convencional, por favorecer uma melhor exploração dos nutrientes do solo. Assim, o menor comprimento da raiz seminal em solução nutritiva aos cinco dias, não comprometeu o desenvolvimento do sistema radicular em solo.

As linhagens transgênicas tiveram o *SbMATE* expresso em todos os tecidos vegetativos avaliados (raiz e parte aérea), tendo sua expressão induzida por Al nas raízes e no ápice radicular. Esses resultados sugerem que, pelo menos, parte da maquinaria necessária para a ativação do gene *SbMATE* pelo Al está presente em milho. Isso não é surpreendente, visto que o milho também utiliza a liberação de citrato como um mecanismo de tolerância ao Al, mediado pelo gene *ZmMATE1*, que é um homólogo funcional do gene *SbMATE* (Maron et al., 2010). A indução da expressão gênica por Al também foi evidenciada em plantas transgênica de *Arabidopsis* expressando o gene *ZmMATE1* sob controle do promotor constitutivo 35S (Maron et al., 2010), onde foi demonstrado um aumento na exsudação de citrato após a exposição ao Al em eventos transgênicos, em relação aos não-transgênicos.

Como as linhagens transgênicas e a L3 convencional diferem basicamente na presença do transgene, podemos considerar que o aumento na tolerância ao Al, verificado em solução nutritiva e em solo, foi devido a expressão heteróloga do gene *SbMATE* de sorgo. Uma linhagem transgênica com um sistema radicular mais bem desenvolvido beneficiaria a planta aumentando a absorção de água e de nutrientes em solos ácidos.

Embora o presente estudo tenha gerado resultados concordantes em hidroponia e em solo, ensaios de campo serão necessários para avaliar a eficácia desse transgene na produtividade e produção de grãos.

Eventos transgênicos expressando o gene *SbMATE* também foram obtidos em outras espécies vegetais. Um deles foi realizado em *Arabidopsis*, onde linhagens expressando o transgene foram significativamente mais tolerantes que as linhagens não-transgênicas, tolerância essa que aumentou proporcionalmente com o nível da expressão do gene *SbMATE* (Magalhães et al., 2007). Outro trabalho transformou o gene *SbMATE* em uma linhagem de cevada sensível ao Al, que apresentou maior efluxo de citrato e tolerância ao Al, quando comparada com a linhagem não transformada ou com os transgênicos nulos (Zhou et al., 2014). Apesar dessa superioridade, as linhagens transgênicas não foram mais tolerantes ao Al do que a cultivar Dayton, utilizada como controle nos experimentos. Neste trabalho, o efluxo de citrato em eventos transgênicos independentes foi semelhante, apesar de existirem diferenças no nível de expressão do gene, sugerindo que existe um limite para o efluxo de citrato e para a tolerância de Al, além de um determinado nível de expressão do transgene. Ainda neste mesmo trabalho, foi feita uma comparação da linhagem transgênica de cevada expressando o gene *SbMATE* com linhagens de cevada previamente desenvolvidas por Zhou et al. (2013) superexpressando o seu gene endógeno *HvAACT1* e expressando o gene *TaALMT1* de trigo. Os resultados obtidos indicaram que a expressão do gene *TaALMT1* conferiu maior tolerância ao Al do que os outros dois genes. Isso é um indicativo de que combinar genes das famílias *MATE* e *ALMT1* pode ser uma melhor estratégia do que combinar vários genes da mesma família.

Outra boa estratégia para aumentar a tolerância ao Al foi testada em *Arabidopsis* por Liu et al. (2012). Nessa espécie a exsudação de malato, conferida pelo gene *AtALMT1*, é responsável por 70% da tolerância ao Al, enquanto que a exsudação de citrato, conferida pelo gene *AtMATE*, é responsável pelos outros 30% (Liu et al., 2009). Tendo isso em mente e considerando que citrato tem sido demonstrado quelar mais eficientemente o Al do que malato (Delhaize et al., 1993b; Ryan et al., 1995; Ma, 2000; Ryan et al., 2001), os promotores desses genes foram trocado para avaliar a regulação transcricional da exsudação de malato e citrato. Os resultados indicaram que o promotor do gene *AtALMT* é mais forte e direciona a expressão do gene para o ápice radicular, enquanto o promotor do gene *AtMATE* direciona a expressão do gene para regiões maduras da raiz. Ou seja, a combinação de um promotor forte com o gene alvo adequado poderá desempenhar um papel fundamental para determinar o nível de tolerância ao Al conferida pela exsudação de ácidos orgânicos.

O transgene *SbMATE* não conferiu diferenças significativas quanto ao comprimento total, área de superfície e área superficial de raízes finas na linhagem transgênica em

relação a linhagem não-transgênica sob condições de hidroponia. Tais alterações na morfologia não seriam esperadas considerando que o gene *SbMATE* já foi caracterizado como um transportador de citrato (Magalhães et al., 2007), sem funções específicas nessas características radiculares. Outro ponto a ser considerado é o número reduzido de genótipos avaliados e o período de crescimento da plântula por 13 dias, cujas diferenças podem realmente não serem efetivas em fases posteriores das plantas.

Apesar de não termos avaliado o efluxo de citrato no presente trabalho, o gene *SbMATE* já foi amplamente caracterizado em sorgo, onde a tolerância ao Al foi altamente correlacionada com a sua expressão gênica e com a exsudação de citrato nos ápices radiculares (Magalhães et al., 2007). Assim, outro mecanismo que o transgene *SbMATE* poderá contribuir para o aumento da produção agrícola em solo ácido, seria quanto ao aumento da disponibilidade de P para as plantas. Em solo ácido, o P se encontra fortemente adsorvido às argilas do solo, formando complexos insolúveis com cátions, como o  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . Os ácidos orgânicos presentes no solo podem contribuir para quelar esses cátions, disponibilizando o P para ser absorvido pelo sistema radicular (Gerke, 1994; Jones, 1998; Hinsinger, 2001; Ryan et al., 2001). Dessa forma, pode-se esperar que o transgene, além de aumentar efetivamente a tolerância ao Al, contribua para aumentar a disponibilidade de P no solo para as plantas. Assim, experimentos em condições de campo serão necessários para avaliar o efeito do transgene na produtividade dos genótipos de milho sob deficiência de P.

Como o híbrido simples é o genótipo comercial da cultura do milho, avaliamos o efeito do transgene *SbMATE* combinado com o gene nativo *ZmMATE1* em híbridos, também caracterizado previamente com um gene de efeito maior para a tolerância ao Al em milho (Maron et al., 2010; 2013; Guimarães et al., 2014). Apesar dos híbridos transgênicos terem apresentado níveis de tolerância superiores em relação aos híbridos semi-isogênicos não transgênicos e ao híbrido comercial da Embrapa, a tolerância ao Al foi inferior a da linhagem parental transgênica, corroborando com o efeito parcialmente dominante do transgene para a tolerância ao Al. No entanto, essa inferioridade na tolerância não pode ser atribuída a uma queda na expressão do *SbMATE* nos híbridos, cujos níveis dos transcritos foram comparáveis aos da linhagem L3 transgênica. Devemos destacar que o comprimento líquido dos híbridos no tratamento sem Al não foi reduzido como nas linhagens transgênicas. Verificamos que apenas uma dose do transgene *SbMATE* em homozigose contribui com elevados níveis de tolerância ao Al, que superam a tolerância do híbrido comercial da Embrapa. Assim, é possível sugerir que híbridos podem ser gerados com o transgene derivado apenas de um dos parentais. Adicionalmente, a tolerância do híbrido com o transgene em heterozigose independe do nível de tolerância da outra linhagem parental, uma vez que os híbridos transgênicos tiveram a mesma tolerância quando cruzados com a L53, que é altamente sensível, ou com as NILs, que possuem tolerância intermediária ao Al.

No entanto, um programa de melhoramento de milho baseado na transgenia com o *SbMATE* ainda requer testes em campo e todo um processo de desregulamentação de Biossegurança para ser submetido à aprovação pela CTNBio e por órgãos internacionais, que é oneroso em termos de recurso e de tempo.

Outra estratégia de melhoramento que independe da transgenia seria o melhoramento convencional baseado na introgressão do gene nativo de milho para a tolerância ao AI, o *ZmMATE1*. Esse gene foi capaz de dobrar a tolerância ao AI nas linhagens semi-isogênicas em comparação com a L53 (Guimarães et al., 2014), contribuindo também com um aumento significativo na tolerância nos híbridos semi-isogênicos. No entanto, a expressão do *ZmMATE1* foi reduzida pela metade quando em combinações híbridas, corroborando com um possível efeito aditivo, em função da presença de apenas uma dose do alelo superior. Assim, para se atingir níveis mais elevados de tolerância ao AI, seria necessário que ambas as linhagens parentais dos híbridos fossem introgridas com o *ZmMATE1*.

## **7 – Conclusões**

As linhagens L3 transgênicas expressando o gene *SbMATE* de sorgo foram significativamente mais tolerantes que a L3 convencional e que as transgênicas nulas, sendo que alguns eventos apresentaram tolerância igual ao Cateto AI237, que é considerado como padrão altamente tolerante ao AI em milho. Os híbridos transgênicos apresentaram tolerância ao AI inferior à linhagem parental transgênica, mas superior às médias das respectivas linhagens parentais, o que nos permite dizer que o modo de ação do transgene é parcialmente dominante.

A expressão do transgene nas linhagens foi elevada nos tecidos avaliados, com tendência a ser induzida após 24 horas de tratamento com AI em raiz e ápice radicular. O nível de transcritos nas linhagens transgênicas foi similar ao obtido nos híbridos transgênicos, pelo menos na maioria dos genótipos avaliados. Por outro lado, a expressão do gene nativo de milho, o *ZmMATE1*, foi reduzida pela metade nos híbridos em relação às respectivas linhagens semi-isogênicas parentais, compatível com a presença de uma única dose do alelo superior. Adicionalmente, a presença do gene *SbMATE* parece não afetar de forma negativa a expressão do gene nativo *ZmMATE1*.

Finalmente, os resultados do presente trabalho possibilitam delinear estratégias de melhoramento por meio da transgenia e da introgressão assistida por marcadores para aumentar a tolerância ao AI em híbridos de milho, com grandes expectativas para que os novos cultivares tenham uma melhor adaptabilidade e produtividade de grãos em solos ácidos.

## 8 – Referências

- Alves, V. M. C.; Pitta, G. V. E.; Parentoni, S. N.; Schaffert, R. E.; Coelho, A. M.; Magalhães, J. V. Toxidez por alumínio e hidrogênio no crescimento de raízes de milho. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 3, p. 311-318, 2004.
- Amtmann, A.; Hammond, J. P.; Armengaud, P.; White, P. J. Nutrient sensing and signaling in plants: potassium and phosphorus. *Advances in Botanical Research*, v.43, p. 209-257, 2005.
- Anoop, V. M.; Basu, U.; Mc Cammon, M. T.; Mc Alister-Henn, L.; Taylor, G. J. Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiology*, v. 132, p. 2205-2217, 2003.
- Armstrong, C. L.; Green, C. E.; Phillips, R. L. Development and availability of germplasm with high type II culture formation response. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, v. 65, p. 92-93, 1991.
- Baligar, V. C.; Fageria, N. K. Nutrient use efficiency in acid soils: nutrient management and plant use efficiency. In: Moniz, A. C.; Furlani, A. M. C.; Schaffert, R. E.; Fageria, N. K.; Rosolem, C. A.; Cantarella, H. (Ed.). *Plant-soil interactions at low pH: sustainable agriculture and forestry production*. Campinas: Brazilian Soil Science Society, 1997. p. 75-95.
- Barone, P.; Rosellini, D.; La Fayette, P.; Bouton, J.; Veronesi, F.; Parrott, W. Bacterial citrate synthase expression and soil aluminum tolerance in transgenic alfalfa. *Plant Cell Reports*, v. 27, p. 893-901, 2008.
- Barros, B. A.; Guimarães, C. T. Estimativa do número de inserções de transgene em milho por PCR quantitativo (qPCR). *Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo*, 2011. 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 164).
- Caniato, F. F.; Guimarães, C. T.; Hamblin, M.; Billot, C.; Rami, J. F.; Hufnagel, B.; Kochian, V.; Liu, J.; Garcia, A. A. F.; Hash, T.; Ramu, P.; Mitchell, S.; Kresovich, S.; Oliveira, A. C.; de Avellar, G.; Borém, A.; Glaszmann, J. C.; Schaffert, R. E.; Magalhães, J. V. The relationship between population structure and aluminum tolerance in cultivated sorghum. *Plos One*, v. 6, 2011.
- Collins, N. C.; Shirley, N. J.; Saeed, M.; Pallotta, M.; Gustafson, J. P. An *ALMT1* gene cluster controlling aluminum tolerance at the *Alt4* locus of rye (*Secale cereal* L.). *Genetics*, v. 179, p. 669-682, 2008.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira. Grãos. Disponível em [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_06\\_10\\_12\\_12\\_37\\_boletim\\_graos\\_junho\\_2014.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_06_10_12_12_37_boletim_graos_junho_2014.pdf). Acesso em: 10 jun. de 2013.
- Conceição, L. D. H. C. S.; Tessele, C.; Barbosa Neto, J. F. Diallel analysis and mapping of aluminum tolerance in corn inbred lines. *Maydica*, v. 54, p. 55-61, 2009.
- da Silva, F. C. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2nd ed. 627, 2009.
- Delhaize, E.; Craig, S.; Beaton, C. D.; Bennet, R. J.; Jagadish, V. C.; Randall, P. J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) (I. Uptake and distribution of aluminum in root apices). *Plant Physiology*, v. 103, p. 685-693, 1993a.

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

Delhaize, E.; Hebb, D. M.; Ryan, P. R. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiology*, v. 125, p. 2059-2067, 2001.

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

Delhaize, E.; Ryan, P. R.; Hebb, D. M.; Yamamoto, Y.; Sasaki, T.; Matsumoto, H. Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the *ALMT1* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, p. 15249-15254, 2004.

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

de Sousa, S. M.; Clark, R. T.; Mendes, F. F.; Oliveira, A. C.; Vasconcelos, M. J. V.; Parentoni, S. N.; Kochian, L. V.; Guimarães, C. T.; Magalhães, J. V. A role for root morphology and related candidate genes in P acquisition efficiency in maize. *Functional Plant Biology*, v. 39, p. 925-935, 2012.

Ferreira, D. F. Análise estatística por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: 45<sup>o</sup> Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria. UFScar, São Carlos, SP, p. 225-258, 2000.

Ferreira, R. P.; Moreira, A.; Rassini, J. B. Toxidez de alumínio em culturas anuais. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 35 p, 2006.

Fierer, N.; Jackson, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, p. 626-63, 2006.

Fuente, J. M.; Ramirez-Rodríguez, V.; Cabrera-Ponce, J. L.; Herrera-Estrella, L. Aluminum tolerance in transgenic plant by alteration of citrate synthesis. *Science*, v. 276, p. 1566-1568, 1997.

Gerke, J. Kinetics of soil phosphate desorption as affected by citric acid. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, v. 157, p. 17-22, 1994.

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. Genetic dissection of Al tolerance QTLs in the maize genome by high density SNP scan. *BMC Genomics*, v. 15, p. 153, 2014.

Hinsinger, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil*, v. 237, p.173-195, 2001.

Hoekenga, O. A.; Maron, L. G.; Piñeros, M. A.; Caçado, G. M. A.; Shaff, J.; Kobayashi, Y.; Ryan, P. R.; Dong, B.; Delhaize, E.; Sasaki, T.; Matsumoto, H.; Yamamoto, Y.; Koyama, H.; Kochian, L. V. *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. *PNAS*, v. 103, p. 9738-9743, 2006.

- Jones, D. L. Organic acids in the rhizosphere: a critical review. *Plant and Soil*, v. 205, p. 25-44, 1998.
- Kinraide, T. B. Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Plant and Soil*, v. 134, p. 167-178, 1991.
- Kinraide, T. B.; Parker, D. R.; Zobel, R. W. Organic acid secretion as a mechanism of aluminium resistance: a model incorporating the root cortex, epidermis, and the external unstirred layer. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, p. 1853-1865, 2005.
- Kochian, L. V. Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. *Plant Physiology*, v. 46, p. 237-260, 1995.
- Kochian, L. V.; Hoekenga, A. O.; Piñeros, M. A. How do plants tolerate acid soils? Mechanism of aluminum tolerance and phosphorus efficiency. *Annual Reviews Plant Molecular Biology*, v. 55, p. 459-493, 2004.
- Kochian, L. V.; Piñeros, M. A.; Hoekenga, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil*, v. 274, p. 175-195, 2005.
- Koyama, H.; Kawamura, A.; Kihara, T.; Hara, T.; Takita, E.; Shibata, D. Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil. *Plant and Cell Physiology*, v. 41, p. 1030-1037, 2000.
- Li, Y.; Liu, S.; Yu, Z.; Liu, Y.; Wu, P. Isolation and characterization of two novel root specific promoters in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, v. 207, p. 37-44, 2013.
- Li, X. F.; Ma, J. F.; Matsumoto, H. Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiology*, v. 123, p.1537-44, 2000.
- Ligaba, A.; Katsuhara, M.; Ryan, P. R.; Shibusaka, M.; Matsumoto, H. The *BnALMT1* and *BnALMT2* genes from rape encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells. *Plant Physiology*, v. 142, p. 1294-1303, 2006.
- Liu, J.; Magalhães, J. V.; Shaff, J.; Kochian, L. V. Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. *Plant Journal*, v. 57, p. 389-399, 2009.
- Lynch, J. P. Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops. *Plant Physiology*, v. 156, p. 1041-1049, 2011.
- Lynch, J. P.; Ho, M. D. Rhizoeconomics: carbon costs of phosphorus acquisition. *Plant and Soil*, v. 269, p. 45- 56, 2005.
- Lynch, J. P.; Brown, K. M. Topsoil foraging: an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant and Soil*, v. 237, p. 225-237, 2001.
- Ma, J.; Hiradate, S. Form of aluminium for uptake and trans-location in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Planta*, v. 211, p. 355-360, 2000.
- Ma, J.; Hiradate, S.; Matsumoto, H. High aluminum resistance in buckwheat: II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiology*, v. 117, p. 753-759, 1998.



- Ma, J. F.; Hiradate, S.; Nomoto, K.; Iwashita, T.; Matsumoto, H. Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea: Identification of Al form in the leaves. *Plant Physiology*, v. 113, p. 1033-1039, 1997.
- Magalhães, J. V. Molecular genetic and physiological investigations of aluminum tolerance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). PhD thesis. Cornell Univ. 192 pp. 2002.
- Magalhães, J. V.; Garvin, D. F.; Wang, Y.; Sorrells, M. E.; Klein, P. E.; Schaffert, R. E.; Li, L.; Kochian, L. V. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. *Genetics*, v. 167, p. 1905-1914, 2004.
- Magalhães, J. V.; Liu, J.; Guimarães, C. T.; Lana, U. G.; Alves, V. M. C.; Wang, Y. H.; Schaffert, R. E.; Hoekenga, O. A.; Piñeros, M. A.; Shaff, J. E.; Klein, P. E.; Carneiro, N. P.; Coelho, C. M.; Trick, H. N.; Kochian, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature Genetics*, v. 39, p. 1156-1161, 2007.
- Magnavaca, R.; Gardner, C.; Clark, R. Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition, eds Gabelman HW, Loughman BC (Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands), p. 255-265, 1987.
- Marschener, H. Mineral nutritional of higher plants. 2. ed. Boston: Academic Press, 1995.
- Maron, L. G.; Guimarães, C. T.; Kirst, M.; Albert, P. S.; Birchler, J. A.; Bradbury, P. J.; Buckler, E. S.; Coluccio, A. E.; Danilova, T. V.; Kudrna, D.; Magalhães, J. V.; Piñeros, M. A.; Schatz, M. C.; Wing, R. A.; Kochian, L. V. Aluminum tolerance in maize is associated with higher *MATE1* gene copy number. *PNAS*, v. 110, p. 5241-5246, 2013.
- Maron, L. G.; Piñeros, M. A.; Guimarães, C. T.; Magalhães, J. V.; Pleiman, J. K.; Mao, C.; Shaff, J.; Belicuas, S. N. J.; Kochian, L. V. 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*, v. 61, p. 728-740, 2010.
- Morita, A.; Horie, H.; Fujii, Y.; Takatsu, S.; Watanabe, N.; Yagi, A.; Yokota, H. Chemical forms of aluminum in xylem sap of tea plants (*Camellia sinensis* L.). *Phytochemistry*, v. 65, p. 2775-2780, 2004.
- Negri, B. F.; Azevedo, G. C.; Matos, F. M.; Guimarães, C. T.; de Sousa, S. M. Morfologia do sistema radicular de linhagens recombinantes endogâmicas de milho sob baixo nível de fósforo. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012. Embrapa Milho e Sorgo. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 50).
- Ninamango-Cárdenas, F. E.; Guimarães, C. T.; Martins, P. R.; Parentoni, S. N.; Carneiro, N. P.; Lopes, M. A.; Moro, J. R.; Paiva, E. Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize. *Euphytica*, v. 130, p. 223-232, 2003.
- Osborne, C.; Zwart, A.; Broadhurst, L.; Young, A.; Richardson, A. The influence of sampling strategies and spatial variation on the detected soil bacterial communities under three different land-use types. *Microbial Ecology*, v. 78, p. 70-79, 2011.
- Parentoni, S. N.; Souza-Júnior, C. L. Phosphorus acquisition and internal utilization efficiency in tropical maize genotypes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n. 7, p. 893-901, 2008.
- Pellet, D. M.; Grunes, D. L.; Kochian, L. V. Organic-acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta*, 196, 788-795, 1995.

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

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

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for statistical computing, 2012. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em: 2 jun. de 2014.

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

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

Ryan, P. R.; Delhaize, E.; Randall, P. J. Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta*, v. 196, p. 103-110, 1995.

Ryan, P. R.; Tyerman, S. D.; Sasaki, T.; Furuichi, T.; Yamamoto, Y.; Zhang, W. H.; Delhaize, E. The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, p. 9-20, 2011.

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

SAS Institute. SAS STAT 9.2 user's guide. Cary, v. 6, 1999.

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

Schmittgen, T. D.; Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, v. 3, p. 1101-08, 2008.

Silva, I. R.; Smyth, T. J.; Raper, C. D.; Carter, T. E.; Rufty, T. W. Differential aluminum tolerance in soybean: An evaluation of the role of organic acids. *Plant Physiology*, v. 112, p. 200-10, 2001.

Shaff, J. E.; Schultz, B. A.; Craft, E. J.; Clark, R. T.; Kochian, L. V. GEOCHEM-EZ: a chemical speciation program with greater power and flexibility. *Plant Soil*, v. 330, p. 207-214, 2010.

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

Takeda, K.; Kariuda, M.; Itoi, H. Blueing of sepal colour of *Hydrangea macrophylla*. *Photochemistry*, v. 24, p. 2251-2254, 1985.

Tinoco, C. F. S.; Magalhães, J. V.; Belicuas, S. N. J.; Guimarães, L. J. N.; Parentoni, S. N.; Lana, U. G. P.; Guimarães, C. T. Obtenção de linhagens isôgenicas para QTLs de tolerância ao alumínio em milho utilizando retrocruzamento assistido por marcadores moleculares. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 8p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 145).

Tolra, R.; Vogel-Mikus, K.; Hajiboland, R.; Kump, P.; Pongrac, P.; Kaulich, B.; Gianoncelli, A.; Babin, V.; Barcelo, J.; Regvar, M.; Poschenrieder, C. Localization of aluminium in tea (*Camellia sinensis*) leaves using low energy X-ray fluorescence spectro-microscopy. *Journal Plant Research*, v. 124, p. 165-172, 2011.

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

Vance, C. P.; Chiou, T. J. Phosphorus focus editorial. *Plant Physiology*, v. 156, p. 987-988, 2011.

Yang, Z.; Sivaguru, M.; Horst, W.; Matsumoto, H. Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). *Plant Physiology*, v. 110, p. 72-77, 2000.

Yokosho, K.; Yamaji, N.; Ma, J. F. Isolation and characterisation of two *MATE* genes in rye. *Functional Plant Biology*, v. 37, p. 296-303, 2010.

Zhang, W. H.; Ryan, P. R.; Sasaki, T.; Yamamoto, Y.; Sullivan, W.; Tyerman, S. D. Characterization of the TaALMT1 protein as an Al<sup>3+</sup>-activated anion channel in transformed tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells. *Plant and Cell Physiology*, v. 49, p. 316-330, 2008.

Zheng, S. J.; Ma, J. F.; Matsumoto, H. Continuous secretion of organic acids is related to aluminum resistance during relatively long-term exposure to aluminum stress. *Plant Physiology*, v. 103, p. 209-14, 1998.

Zhou, G. F.; Delhaize, E.; Zhou, M. X.; Ryan, P. R. The barley *MATE* gene, *HvAACT1*, increases citrate efflux and Al<sup>3+</sup> tolerance when expressed in wheat and barley. *Annals of Botany*, v. 112, p. 603-612, 2013.

Zhou, G.; Pereira, J. F.; Delhaize, E.; Zhou, M.; Magalhães, J. V.; Ryan, P. R. Enhancing the aluminium tolerance of barley by expressing the citrate transporter genes *SbMATE* and *FRD3*. *Journal of Experimental Botany*, v. 65, p. 2381-2390, 2014.

Zhu, J.; Kaepler, S. M.; Lynch, J. P. Mapping of QTLs for lateral root branching and length in maize (*Zea mays* L.) under differential phosphorus supply. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 111, p. 688-695, 2005.

Zhu, J.; Mickelson, S. M.; Kaepler, S. M.; Lynch, J. P. Detection of quantitative trait loci for seminal root traits in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown under differential phosphorus levels. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 113, p. 1-10, 2006.