



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM AGRONOMIA

LUCIANA MIDORI TAKAMORI

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Urochloa brizantha* PARA TOLERÂNCIA AO
DÉFICIT HÍDRICO E VALIDAÇÃO DE GENES NORMALIZADORES PARA
ESTRESSES ABIÓTICOS**

Presidente Prudente - SP
2018



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM AGRONOMIA

LUCIANA MIDORI TAKAMORI

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Urochloa brizantha* PARA TOLERÂNCIA AO
DÉFICIT HÍDRICO E VALIDAÇÃO DE GENES NORMALIZADORES PARA
ESTRESSES ABIÓTICOS**

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor – Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientadora:
Profa. Dra. Alessandra Ferreira Ribas

633.2
T136t

Takamori, Luciana Midori.

Transformação genética de *Urochloa brizantha* para tolerância ao déficit hídrico e validação de genes normalizadores para estresses abióticos / Luciana Midori Takamori. – Presidente Prudente, 2018.

122 f.: il.

Tese (Doutorado em Agronomia.) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2018.

Bibliografia.

Orientadora: Alessandra Ferreira Ribas.

1. *Urochloa*. 2. Transformação. 3. Bombardeamento.
I Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Urochloa brizantha* PARA TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO E VALIDAÇÃO DE GENES NORMALIZADORES PARA ESTRESSES ABIÓTICOS"

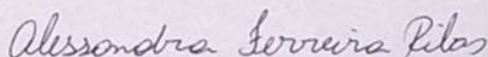
AUTOR(A): LUCIANA MIDORI TAKAMORI

ORIENTADOR(A): ALESSANDRA FERREIRA RIBAS

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR em AGRONOMIA

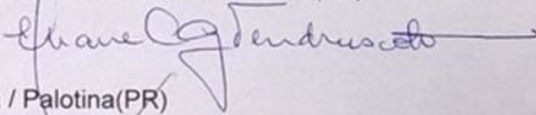
Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:

Alessandra Ferreira Ribas



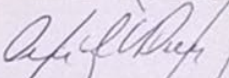
UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo



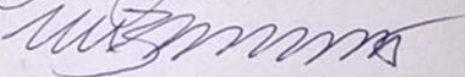
UFPR - Universidade Federal do Paraná / Palotina (PR)

Luiz Filipe Protasio Pereira



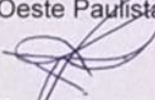
IAPAR – Instituto Agronômico do Paraná / Londrina (PR)

Nelson Barbosa Machado Neto



UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Tiago Benedito dos Santos



UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Data da realização: 03 de dezembro de 2018.

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais por tudo o que sou e
por sempre acreditarem em mim. Aos familiares que compartilharam
momentos ao longo desses anos. Dedico.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter enviado pessoas para me auxiliar, me dar forças nessa trajetória, e desta forma, superar todas as dificuldades.

A minha família como base de tudo. Em especial aos meus pais e minha mainha, pela paciência nos meus momentos de estresse, pela ausência do dia a dia e por sempre estarem almejando com orgulho mais um nível em minha vida profissional.

A minha sincera admiração à minha orientadora Professora Dra. Alessandra Ferreira Ribas, peça chave nessa minha conquista. Sem palavras para descrever a importância nesta trajetória, pois teve uma enorme paciência e uma dedicação incrível nos ensinamentos.

A minha sincera admiração ao Professor Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira, por ser um brilhante profissional e que é fonte de inspiração, por sua dedicação, empenho em tudo que faz e por colaborar imensamente neste trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo. Código de financiamento 001.

À FAPESP pelo suporte do Projeto de Pesquisa. FAPESP (2013/04919-4).

À Universidade do Oeste Paulista, em especial ao Programa de Pós Graduação em Agronomia, pela estrutura disponibilizada.

Aos professores do Programa de Pós Graduação pelos ensinamentos.

À banca de acompanhamento de bolsa, Professores. Dra. Vânia e Dr. Edeimar pela disponibilidade e sugestões durante o desenvolvimento do projeto.

À banca examinadora da qualificação pelos conselhos, sugestões e ensinamentos prestados, que acabaram por constituir essa tese.

A Adriana Mendonça pela ajuda em descascar “algumas muitas” sementes e pelo convívio.

A todos os funcionários da Unoeste em especial aos do bloco Q, em nome de Cristiane e Rosemar, pelo convívio, amizade e disponibilidade em me ajudar em todos os momentos.

À secretária Keid Krüger por sempre responder com simpatia, educação e eficiência aos meus e-mails e ajudar nos documentos ou nas informações solicitadas.

A todos que contribuíram direta e indiretamente na elaboração desta tese, cada um à sua maneira especial, portanto, a todos, meus sinceros agradecimentos.

GRATIDÃO!

“É exatamente disso que a vida é feita: de momentos! Momentos os quais temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso próprio aprendizado, por algum motivo. Nunca se esquecendo do mais importante: nada na vida é por acaso.” Chico Xavier

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. Martin Luther King

RESUMO

Transformação genética de *Urochloa brizantha* para tolerância ao déficit hídrico e validação de genes normalizadores para estresses abióticos

O capim braquiária é originário da África e pertence ao gênero *Urochloa*. Extensas áreas de pastagens são cultivadas com poucos cultivares devido a dificuldade no melhoramento genético dessa espécie. A espécie *U. brizantha* é tetraploide e apomítica e a mais cultivada no Brasil sendo utilizada tanto para alimentação animal quanto para a cobertura vegetal. A transformação genética é uma ferramenta importante para a introdução de genes com características de interesse agrônomico. Ainda não existem cultivares transgênicos para as espécies do gênero *Urochloa*. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo para obtenção de plantas geneticamente modificadas de *Urochloa* por biobalística. Foram testados três tipos de explantes de *Urochloa*: epicótilo, calos de epicótilo e calos derivados de sementes pré inoculadas por cinco dias em meio MS contendo auxina 2,4-D ou picloram (1 mg L^{-1}), as distâncias de 3, 6, 9 e 12 cm do microcarreador ao explante, e as concentrações de 30 e 60 mg.ml^{-1} de partículas. O vetor pANIC 6E e a pressão de 1100 psi foram utilizadas para avaliar a expressão transiente do gene *uidA*. A maior expressão do gene *uidA* foi observada quando calos induzidos a partir de sementes foram bombardeados na distância de seis cm e na concentração de 60 mg.ml^{-1} de partículas do ouro. Após a determinação dos melhores parâmetros, calos derivados de sementes foram bombardeados com o vetor pJS107 o qual contém o gene *p5cs* (Δ^1 - pirrolina - 5 - carboxilato sintetase) e o gene *bar*. Calos bombardeados foram cultivados em meio seletivo contendo 2 mg L^{-1} de glufosinato de amônio. Foram regeneradas um total de 91 plântulas *in vitro*. As plantas foram aclimatizadas em casa-de-vegetação e submetidas a análise pela PCR para os genes inseridos. Um total de 79 plantas foram analisadas. Os fragmentos correspondentes aos gene *bar* (450 pb) e ao gene *p5cs* (580 pb) foram amplificados em 21 e 13 plantas, respectivamente. Somente 8 plantas apresentam os fragmentos correspondentes aos dois genes. A eficiência de transformação foi de 0,32%. Eventos transgênicos e planta controle (não transformada) foram submetidas ao déficit hídrico (-2,9 a -3,4 MPa) e a concentração de prolina nas folhas foi determinada. Os eventos transgênicos apresentaram até 1,9 vezes mais prolina que a planta controle em condições de estresse hídrico. O capítulo 2 dessa tese refere-se à validação dos genes normalizadores para estresses abióticos (frio, calor e seca) em *U. Brizantha*. Foi avaliada a estabilidade de nove genes de referência: Actina 12, fator de iniciação eucariótica 4A, fator de alongação-1 alfa, FTSH protease 4, fator auxiliar U2, succinol co-enzima A, tubulina alfa-5, tubulina beta-6, ubiquitina enzima conjugada. A expressão dos genes de referência foi medida por RTqPCR em amostra de folhas submetidas a 6, 12 e 24 h de frio e calor (10 e 45°C respectivamente) e ao déficit hídrico moderado (-0,5 a -0,7 Mpa), severo (-1,1 a -1,8 Mpa) e recuperadas após a irrigação. O programa RefFinder foi utilizado para classificar os genes de referência mais estáveis em cada estresse. O fator de alongação-1 alfa, a ubiquitina enzima conjugada ou fator de alongação-1 alfa e o fator de iniciação eucariótica 4A foram os genes mais estáveis para os estresses de calor, frio e seca, respectivamente. A expressão do gene da Rubisco foi normalizada contra o gene mais estável selecionado pelo RefFinder para cada estresse para validação.

Palavras-chave: *Urochloa*. Transgênico. Transiente. Estresse Abiótico. Prolina.

ABSTRACT

Genetic transformation of *Urochloa brizantha* for tolerance to water deficit and validation of normalizing genes for abiotic stresses

Brachiaria grass comes from Africa and belongs to the genus *Urochloa*. The *U. brizantha* is tetraploid and apomictic and is the species more cultivated in Brazil, being used for both animal feeding and vegetation cover. Extensive pasture areas are cultivated with few cultivars due to a lack of genetic improvement of this species. Genetic transformation is an important tool for introducing genes with desirable agronomic traits. However, there are still no transgenic cultivars for the species of the genus *Urochloa*. The aim of this work was to develop a protocol to engineer genetically modified *Urochloa* plants by biobalistic delivery system. Three types of explants were tested: epicotyl, calli from epicotyl and seed pre-inoculated for 5 days in MS medium containing 2,4-D auxin or picloram (1 mg L^{-1}). The distances of 3, 6, 9 and 12 cm from the microcarrier to the explant, and the particle concentration 30 or 60 mg.ml^{-1} . The pANIC6E vector and the pressure of 1100 psi were used to evaluate the transient expression of the *uidA* gene. The highest expression of the *uidA* gene was observed when calluses induced from seeds were bombarded at the distance of six cm and at the concentration of 60 mg.ml^{-1} of gold particles. After determining the best parameters, calli derived from seeds were bombarded with the pJS107 vector which contains the *p5cs* ($\Delta 1$ - pyrroline - 5 - carboxylate synthetase) and the *bar* genes. Bombarded calli were cultured in a selective medium containing 2 mg L^{-1} of ammonium glufosinate. A total of 91 seedlings were regenerated *in vitro*. The plantlets were acclimatized in greenhouse and submitted to PCR analysis. A total of 79 plants were analyzed. Fragments corresponding to the *bar* (450 bp) and the *p5cs* (580 bp) genes were amplified in 21 and 13 plants, respectively. Only 8 plants present the fragments corresponding to the two genes. The transformation efficiency was 0.32%. Transgenic events and control plants (untransformed) were submitted to water deficit (-2.9 to -3.4 MPa) and the proline concentration in the leaves was determined. The transgenic events presented up to 1.9 times more proline than the control plant in conditions of water stress. Chapter 2 of this thesis refers to the validation of the normalizing genes for abiotic stresses (cold, heat and dry) in *U. brizantha*. The stability of nine reference genes: Actin 12, eukaryotic initiation factor 4A, alpha elongation factor-1, FTSH protease 4, U2 helper factor, succinyl coenzyme A, tubulin alpha-5, tubulin beta-6, ubiquitin conjugated enzyme. Expression of the reference genes was measured by RTqPCR in leaf samples submitted to 6, 12 and 24 h of cold and heat (10 and 45° C respectively) and to moderate water deficit (-0.5 to -0, 7 Mpa), severe (-1.1 to -1.8 MPa) and recovered after irrigation. The RefFinder program was used to classify the most stable reference genes in each stress. The elongation factor-1 alpha, the ubiquitin conjugated enzyme or elongation factor-1 alpha, and the eukaryotic initiation factor 4A were the most stable genes for the heat stresses, cold and dry, respectively. The expression of the Rubisco gene was normalized against the most stable gene selected by RefFinder for each stress for validation.

Keywords: *Urochloa*. Transgenic. Transient. Abiotic Stress. Proline.

LISTA DE SIGLAS

2,4-D – ácido 2,4-diclorofenoxiacético

35 S T - sequência de terminação 35S

bar - região de codificação da resistência ao bialapho – glufosinato de amônio

ccdB - seleção negativa marcador

CMM - célula mãe do megásporo

CMP - célula mãe do grão de pólen

Cmr - gene de resistência a cloranfenicol

cv. – cultivar

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

E. coli - *Escherichia coli*

GM – geneticamente modificada

GSA – Glutamato Ácido Glutâmico γ - semialdeído

GUS - gene *uidA*

GUSPlus - região de codificação *GUSPlus*™ juntamente com a sequência peptídica de proteína rica em proteína de glicina

LB – borda esquerda

Meio LB – Luria-Bertania

mg – miligrama

mi/ha – milhões por hectare

ml – mililitro

mM – milimolar

MS - Murashige e Skoog

MS/2 - meio MS com metade das soluções estoque

NaCl – Cloreto de sódio

NOS T - sequência terminadora de *Agrobacterium tumefaciens*

OCS T - sequência de terminador de octopina sintase

P2C - Δ^1 - pirrolina - 2 – carboxilato

p5c - Δ^1 - pirrolina - 5 – carboxilato

p5cr - Δ^1 - pirrolina - 5 - carboxilato redutase

p5cs - Δ^1 - pirrolina - 5 - carboxilato sintetase

PGM – Planta Geneticamente Modificada

PvUbi1 - promotor e intron de polubiquitina 1 de switchgrass

qsp – quantidade suficiente para

® - Produto Registrado

R1 e R2 - sitios de recombinação

RB – borda direita

rpm – rotação por minuto

TE – Tris-EDTA

U. – *Urochloa*

µg – micrograma

uidA - gene da beta-glucuronidase da *Escherichia coli*

µm – micrometro

v/v – volume por volume

ZmUbi1 - promotor e intron de ubiquitina 1 de milho)

kPa – quilopascal

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Esquema da reprodução sexual e apospórica em *Urochloa* (sin. *Brachiaria*). CMM: célula mãe do megásporo; CMP: célula mãe do grão de pólen (CARNEIRO; DUSI, 2002).22
- Figura 2 - Via metabólica de biossíntese de prolina em bactérias (A) e plantas superiores (B) (via Glutamato), GSA Ácido glutâmico semi-aldeído; P5C- Δ 1-pirrolina 5-carboxilato; *p5cs*- p5c sintetase; *p5cr*- p5c redutase; *prodh*- prolina desidrogenase; *p5cdh*- p5c desidrogenase (HARE; CRESS; VAN STADEN, 1999).32
- Figura 3 - Diagrama esquemático do vetor pANIC 6E utilizados nos experimentos de expressão transiente em *U. brizantha*.37
- Figura 4 - Diagrama esquemático do vetor pJS107 utilizado para transformação estável de *U. brizantha*.38
- Figura 5 - Expressão transiente do gene *uidA* em epicótilos de *U. brizantha* cv. Marandu nas concentrações de 30 mg.ml⁻¹ e 60 mg.ml⁻¹ da suspensão de micropartículas de ouro.45
- Figura 6 - Expressão transiente do gene *uidA* em epicótilo de *U. brizantha* cv. Marandu. A: Epicótilos controle bombardeados somente com partículas (sem adição de DNA vetor); B: Epicótilos bombardeados a 3 cm, na concentração de 60 mg.ml⁻¹ da suspensão de micropartículas; C: Epicótilos bombardeados a 6 cm, na concentração de 30 mg ml⁻¹ da suspensão de micropartículas. Barra: A e B 1 cm, C 0,5 cm.45
- Figura 7 - Expressão transiente do gene *uidA* em epicótilo de *U. brizantha* cv. Marandu. em calos de epicótilo de *U. brizantha* cv. Marandu, na concentração de 60 mg.ml⁻¹ da suspensão de micropartículas e com auxinas Picloram e 2,4-D.46
- Figura 8 - Expressão transiente do gene *uidA* em calos de epicótilo de *U. brizantha* cv. Marandu utilizando a auxina 2,4-D 1 mg.L⁻¹, concentração de 60 mg.ml⁻¹ da suspensão de micropartículas e na distância de 6 cm. Barras: 1 cm.47

- Figura 9 - Expressão transiente do gene *uidA* em sementes de *U. brizantha* cv. Marandu em duas concentrações da suspensão de micropartículas de ouro.....48
- Figura 10 – Expressão transiente em sementes *U. brizantha* cv. Marandu. A: Controle negativo (bombardeados sem adição do DNA plasmidial) e B: Sementes bombardeadas a 6 cm, na concentração de 60 mg.ml⁻¹ da suspensão de micropartículas. Barras: 1 cm.....48
- Figura 11 - Eventos putativos aclimatizados: plantas que regeneraram em meio seletivo foram aclimatizadas em substrato comercial.....49
- Figura 12 – Amplificação do fragmento correspondente ao gene *bar* pela PCR em eventos de *U. brizantha* cv. Marandu. LD: – Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb); C–: controle negativo (planta não transformada); Eventos: 1 - 9; B: branco; C+: controle positivo (vetor pJS107); C±: controle positivo (vetor pJS107) com DNA do controle negativo (planta não transformada). Seta indica a amplificação do fragmento do gene *bar* de 450 pares de base.....50
- Figura 13 - Amplificação do fragmento correspondente ao gene *p5cs* pela PCR em eventos de *U. brizantha* cv. Marandu. LD: – Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb); C–: controle negativo (planta não transformada); Eventos transformados: 1 - 9; B: branco; C+: controle positivo (vetor pJS107); C±: controle positivo (plasmídeo pJS107) adicionado o controle negativo (planta não transformada de *U. brizantha* cv. Marandu). Seta indica a amplificação do fragmento do gene *p5cs* de 580 pares de base.51
- Figura 14 – Aplicação do herbicida Finale[®] em plantas aclimatizadas. A: Planta controle (não transformada) sem aplicação de glufosinato de amônio; B: Planta controle 7 dias após a aplicação do glufosinato de amônio; C: Evento de transformação 7 dias após a aplicação de glufosinato de amônio. Seta: demonstra qual folha foi aplicado o herbicida.52
- Figura 15 – Plantas de *U. brizantha* cv. Marandu sob irrigação normal (A) e após 49 dias da suspensão da irrigação (B). Planta controle - C (não transformado) e plantas transformadas (1 a 8).54
- Figura 16 - Potencial hídrico (MPa) na fase fenológica vegetativa em *U. brizantha* cv. Marandu com irrigação e após 49 dias de déficit hídrico.....55

Figura 17 - Concentração de prolina nas folhas de braquiária (controle – não transformado e eventos transgênicos: 1 a 8) sob condição normal de irrigação e submetidas a estresse hídrico (49 dias)	56
Figura 18 - Concentração de prolina nas folhas de braquiária (controle – não transformado e eventos transgênicos: 1 a 8 sob condição normal de irrigação e submetidas a estresse hídrico (49 dias).....	56

CAPÍTULO 2

Figure 1 - Melting curves of PCR products from all reference genes used in this study showing a single peak (each includes two technical replicates of the cDNA pool from all samples).	102
Figure 2 - Ethidium bromide stained agarose gel (1.2 %) loaded with PCR products from cDNAs for each gene showing single amplification band.....	102
Figure 3 - Average of Cq values of the candidate reference genes for each stresses: A- heat; B- cold and C- drought stress, with a total of 12 samples for each gene. Box-plot graph shows the median values as lines across the box. Lower and upper boxes indicate the 25th percentile and 75th percentile, respectively. Whiskers represent the maximum and minimum values....	103
Figure 4 - Rank of the candidate genes for all treatments combined (heat, cold and drought) generated by RefFinder web-tool showing the values for each of the four different algorithms. Δ Ct method (Mean SD), NormFinder (Stability value), geNorm (Average expression stability M), BestKeeper (SD [\pm CP] crossing point values) and the final comprehensive ranking.	104
Figure 5 - Relative expression of the <i>rbCl</i> gene in leaves of <i>U. brizantha</i> cv. Marandú under three abiotic stresses normalized to reference genes ranked according to the RefFinder approach: A – heat, B – cold and C - drought. The results are expressed as mean fold in change in relative expression compared to control samples. Bars indicate the standard error (\pm SE) calculated from three biological replicates.....	105

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Eficiência de calos bombardeados e resistentes ao seletivo, na cultivar Marandu, com uso das auxinas 2,4-D e picloram.....	53
---	----

CAPÍTULO 2

Table 1 - List and description of the genes used in this study. Primer sequence (5' - 3") employed in the RT-qPCR analysis, amplicon sizes and LinRegPCR derived PCR efficiency values	85
Table 2 - Ranking of candidate reference genes according to stability values in a pool of <i>Urochloa brizantha</i> leaves samples subjected to various abiotic stresses	86

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	18
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Urochloa brizantha</i> PARATOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO	18
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Gênero <i>Urochloa</i>	20
2.2 Importância Econômica da Braquiária	20
2.3 Modo de Reprodução da Braquiária	21
2.4 Métodos de Melhoramento Clássico para Braquiária	23
2.5 Transformação Genética em Plantas	25
2.5.1 Bombardeamento de Partículas em Gramíneas.....	28
2.6 Estresse Abiótico: Déficit Hídrico em Plantas.....	29
2.7 Prolina em Plantas	31
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo Geral.....	34
3.2 Objetivos Específicos	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Material Vegetal	35
4.2 Desinfestação das Sementes	35
4.2.1 Germinação de Sementes <i>in Vitro</i>	35
4.2.2 Indução de Calos de Epicótilos	36
4.2.3 Indução de Calos em Sementes.....	36
4.3 Construção Utilizada na Transformação.....	37
4.4 Determinação dos Parâmetros de Bombardeamento de Partículas	38
4.5 Bombardeamento de Partículas para Inserção do Gene <i>p5cs</i>	39
4.6 Expressão Transiente do Gene <i>uidA</i>	40
4.7 Regeneração e Aclimatização de Eventos Transgênicos Putativos	40
4.8 Detecção dos Transgenes pela PCR	41
4.9 Frequência de Transformação	42
4.10 Aplicação do Herbicida.....	42
4.11 Déficit Hídrico	42
4.12 Conteúdo de Prolina	43

5	RESULTADOS.....	44
5.1	Expressão Transiente do Gene <i>uidA</i> em Epicótilos.....	44
5.2	Expressão Transiente do Gene <i>uidA</i> em Calos induzidos em Epicótilos	46
5.3	Expressão Transiente do Gene <i>uidA</i> em Calos Derivados de Sementes.....	47
5.4	Regeneração e Aclimatização dos Possíveis Eventos Transgênicos	49
5.5	Análise Molecular das Plantas Regeneradas pela PCR.....	50
5.6	Frequência de Transformação	52
5.7	Teste de Tolerância ao Herbicida	53
5.8	Déficit Hídrico	54
5.9	Determinação do Conteúdo de Prolina	56
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS.....	65
	CAPITULO 2	77
	VALIDAÇÃO DE GENES NORMALIZADORES PARA ESTRESSES	
	ABIÓTICOS EM <i>Urochloa brizantha</i>.....	77
1	INTRODUÇÃO	77
	REFERÊNCIAS.....	78
2	ARTIGO.....	80
	ANEXO - NORMAS DA PUBLICAÇÃO.....	107

CAPÍTULO 1

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Urochloa brizantha* PARA TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO

1 INTRODUÇÃO

As plantas consideradas como pastagens, ou plantas forrageiras, são aquelas consumidas por animais, na maior parte por ruminantes, sendo eficientemente convertidas em carne ou leite. Esta eficiência na conversão de pastagem em produtos animais é fruto, tanto do melhoramento animal quanto do melhoramento das plantas forrageiras, no desenvolvimento de novas espécies ou de cultivares forrageiras mais adaptadas às diferentes condições de clima, solo e manejo (FAOSTAT, 2007).

Os sistemas de produção de bovinos no Brasil são, em sua maioria, baseados na utilização de pastagens, onde cerca de 80 a 90% das áreas são constituídas por espécies forrageiras, do gênero *Urochloa*, principalmente *U. decumbens* e *U. brizantha* (BODDEY et al., 2004). As principais espécies do gênero *Urochloa* participam com 87% das sementes comercializadas no Brasil, das quais as mais importantes são: *U. brizantha*, *U. decumbens*, *U. humidicola* e *U. ruziziensis* (KARIA; DUARTE; ARAÚJO 2006).

As gramíneas do gênero *Urochloa* (sinônimo *Brachiaria*) são largamente utilizadas em pastagens brasileiras e vem substituindo cada vez mais as áreas de pastagens nativas (COSTA et al., 2007; FERRAZ; DE FELÍCIO, 2010) alimentando um rebanho de 219 milhões de cabeças de gado (ABIEC, 2017).

Os capins braquiária tem como vantagem a capacidade de se adaptar as mais variadas condições de solo e clima, ocupando desta forma, cada vez mais o território nacional, por proporcionar produções que atendem as demandas de forragem em solos com baixa e média fertilidade e também por sua resistência ao manejo inadequado de sistemas de produção extensivo (FAGUNDES et al., 2006). A gramínea *Urochloa brizantha* (ex Hochst. A. Rich) Stapf. é uma das mais utilizadas devido à sua ampla adaptabilidade aos tipos de solos e climas, e, principalmente, à sua resistência à cigarrinha das pastagens (SILVA; FERRARI, 2012). A maioria dos cultivares comerciais de *U. brizantha* possui,

predominantemente, modo de reprodução apomítico (VALLE, 1991). Neste caso, não há variabilidade genética sendo as sementes produzidas, clones da planta mãe (CARNEIRO; DUSI, 2002).

A engenharia genética permite a introdução de novos caminhos para a biossíntese de vários solutos compatíveis em plantas, resultando na produção de plantas transgênicas com melhor tolerância aos estresses. Como exemplo, a via de biossíntese de prolina que leva ao aumento da tolerância à osmorregulação e à salinidade do estresse em plantas transgênicas (LISAR et al., 2012).

A otimização das técnicas de cultura de tecidos de *Urochloa* é um passo fundamental para permitir o uso de técnicas de transgenia nesta espécie e um protocolo eficiente já foi desenvolvido para a regeneração *in vitro* de espécies do gênero *Urochloa* (TAKAMORI et al., 2015). O desenvolvimento do protocolo de regeneração para as espécies de *Urochloa* abre a possibilidade da obtenção de plantas geneticamente modificadas com a introdução de genes de interesse agrônômico.

O primeiro capítulo refere-se ao desenvolvimento de um protocolo para transformação genética de *Urochloa brizantha* por biolística. O protocolo de regeneração *in vitro* desenvolvido por Takamori et al. (2015) foi utilizado para experimentos de transformação genética para o capim braquiária, com o objetivo de obter plantas geneticamente modificadas de *Urochloa* com genes que conferem tolerância aos estresses abióticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Urochloa*

O gênero *Urochloa* (sinônimo *Brachiaria*) compreende cerca de 100 espécies, com grande concentração no continente africano, mas também são distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais (KELLER-GREIN; BRIGITTE; MAASS, 1996). Apresenta-se inserido na tribo *Paniceae*, subfamília *Panicoideae* e família *Poacea* (CATASUS GUERRA, 1997).

Os capins braquiária, têm distribuição marcadamente tropical e apresentam como centro de origem primário, a África Equatorial (GHISI, 1991). A braquiária começou a ser conhecida como forrageira, aqui no Brasil, a partir da década de 1950 e, foi introduzida, no país, por meio dos navios negreiros, onde a mesma era utilizada na composição dos colchões para os escravos (ALCÂNTRA, 1986).

Este gênero constitui-se em uma importante forrageira tropical, não só na região da África e no Brasil, mas também em diversas regiões da Ásia, Austrália e da América do Sul (FERRAZ; NAKAMAE, 2003). Suas principais espécies forrageiras de importância econômica nas Américas, originárias da África do leste, são: *U. arrecta* (*U. radicans*); *U. brizantha*; *U. decumbens*; *U. dictyoneura*; *U. humidicola*; *U. muticae* *U. ruziziensis* (BORGES DO VALLE; JANK; SIMEÃO RESENDE, 2009).

2.2 Importância Econômica da Braquiária

O gênero *Urochloa* é o mais utilizado no Brasil, devido ao fato de apresentar uma facilidade de estabelecimento, persistência, bom valor nutritivo, poucos problemas com doenças, alta produção de matéria seca, boa adaptabilidade, além de apresentar bom crescimento durante a maior parte do ano, inclusive no período seco (COSTA et al., 2005).

No Brasil, o cultivo da braquiária beneficia tanto a pecuária como também movimenta a indústria brasileira de sementes (SOUZA, 2006). As espécies *U. brizantha* e *U. decumbens* ocupam 90% das áreas de pastagem cultivadas (BUNGENSTAB, 2012). Na pecuária, as condições edafoclimáticas

são favoráveis ao desenvolvimento das pastagens, fonte alimentar principal na criação bovino de corte e leite (SILVA; CORRÊA LANDGRAF; OLIVA MACHADO, 2013). Em relação à indústria brasileira de sementes o volume exportado de sementes forrageiras tropicais entre 2015 e 2016 foi de 8,5 mil toneladas e 8,4 mil toneladas, gerando o equivalente a US\$ 47 milhões e 44 milhões, respectivamente (CARVALHO et al., 2017).

Na formulação de dietas para bovinos, a qualidade e a quantidade de forragens é o primeiro fator a ser analisado no atendimento das exigências nutricionais e do fornecimento de fibra (MEDEIROS; MARINO, 2015). A produtividade média das pastagens ainda está muito baixo quando comparada ao seu potencial, mesmo com a evolução do desempenho da pecuária brasileira (STRASSBURG et al., 2014).

O Brasil apresenta uma localização geográfica e extensão territorial privilegiada para a produção de bovinos a pasto (MOUSQUER et al., 2014). Apresenta aproximadamente 172 milhões de hectares de pasto e um rebanho bovino de 219 milhões de cabeças produzidas, sendo considerado o país com o maior rebanho bovino do mundo com 23% do total mundial (IBGE, 2017). Por ano, a cadeia produtiva brasileira de carne bovina movimenta cerca de R\$ 167,5 bilhões e gera aproximadamente sete milhões de empregos, produzindo 9,5 milhões de toneladas de carne (BRASIL, 2017). É o segundo maior exportador de carne bovina representando 18% do comércio mundial (USDA, 2017).

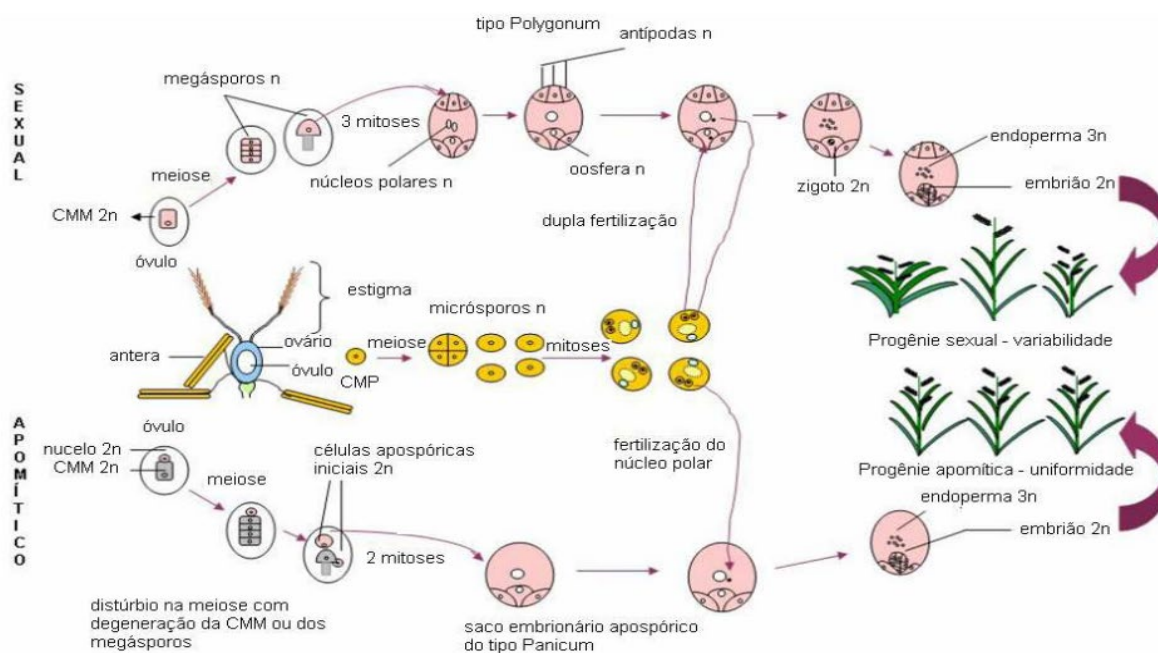
2.3 Modo de Reprodução da Braquiária

A reprodução da braquiária dá-se pelo modo sexual ou assexual apomítico. Nas plantas caracterizadas como sexual diploide, o saco embrionário é do tipo *Polygonum* com seis antípodas (VALLE et al., 2008). Enquanto que, as assexuais poliplóides apresentam apomixia do tipo apospórico (WORTHINGTON; MILES 2015), onde as células do nucelo dão origem aos sacos embrionários do tipo *Panicum* (VALLE et al., 2008) (Figura 1).

Em *Urochloa* existe a predominância da apomixia, na qual a progênie resultante é idêntica à planta-mãe (MILES; MAASS; VALLE, 1996).

Geralmente, as plantas apomíticas são poliploides, enquanto as sexuais são diploides (VALLE; SADIVAN, 1996). A maioria das cultivares comerciais é tetraploide e apomítica, sendo a *U. ruzizensis* a única espécie diploide e sexual de importância econômica (MILLES; MAASS; VALLE, 1996).

Figura 1- Esquema da reprodução sexual e apospórica em *Urochloa* (sin. *Brachiaria*). CMM: célula mãe do megásporo; CMP: célula mãe do grão de pólen (CARNEIRO; DUSI, 2002).



Fonte: (CARNEIRO; DUSI, 2002).

Como nas plantas sexuais, os gametas masculinos das plantas apomíticas são meioticamente reduzidos, a apomixia ocorre apenas na porção reprodutiva feminina, estes gametas são úteis para a formação do endosperma, pois diferentemente do embrião, a formação deste tecido depende da fecundação do núcleo polar da célula central, ocorrendo a pseudogamia (ALVES; CARNEIRO; ARAÚJO, 2001). As plantas apomíticas só podem ser utilizadas como doadoras de pólen, já que o desenvolvimento do embrião nestas plantas ocorre independente de fertilização (ARAÚJO; DEMINICIS; CAMPOS, 2008). Na reprodução assexual, por via apomítica, não

há segregação e, portanto, todos os descendentes são clones da planta mãe (WORTHINGTON; MILES, 2015).

Os cariótipos de 12 acessos e cinco espécies de *Urochloa* foram caracterizados por Bernini e Marin-Morales (2001) e apresentaram variações no número cromossômico como em *U. decumbens* ($2n=18$ e 36) e em *U. humidicola* ($2n=36$, 42 e 54), mas *U. jubata* e *U. brizantha* apresentaram $2n=36$ e *U. ruziziensis*, $2n=18$. Assim, com exceção de um acesso de *U. humidicola* ($x=7$), os demais apresentaram número básico de cromossomos igual a 9 (BERNINI; MARIN-MORALES, 2001).

Além da apomixia, a diferença de ploidia observada entre espécies do gênero *Urochloa* impossibilita os cruzamentos, gerando um baixo número de híbridos e um alto grau de esterilidade (VALLE et al., 2004).

2.4 Métodos de Melhoramento Clássico para Braquiária

A Embrapa foi o órgão governamental responsável pela introdução de grandes coleções de germoplasma de *Urochloa* e *Panicum*, além de outros, implementando um programa de melhoramento de forrageiras tropicais, tomando por base as experiências de produção comercial de cultivares australiano (PEREIRA, et al., 2003).

Esses germoplasmas introduzidos, contribuíram para a seleção de materiais genéticos propagados por sementes, exibindo alto potencial produtivo de forragem, vasta distribuição estacional da produção, boa adaptação às áreas de baixa fertilidade, principalmente, com melhor adaptação à região dos Cerrados (PEREIRA, et al., 2003).

Como consequência, a base genética dos materiais cultivados de braquiária é extremamente estreita, com poucos genótipos selecionados, devido ao seu modo de reprodução apomítico, que levou à homogeneidade (monocultivos) na população de gramíneas das pastagens implantadas, contribuindo para o aparecimento e a propagação de pragas e patógenos, devido aos desequilíbrios edafoclimáticos e, diante disso, o resultado foi de perdas significativas na produção de gramíneas forrageiras e, também, na produtividade de sementes (ASSIS et al., 2003).

As principais estratégias de melhoramento consistem na avaliação e seleção de acessos promissores, explorando a variabilidade do germoplasma e cruzamentos interespecíficos envolvendo *U. brizantha*, *U. decumbens* e *U. ruziziensis* e até o momento, as principais cultivares de *Urochloa* utilizadas são oriundas da avaliação e seleção do germoplasma (SOUZA SOBRINHO et al., 2009), com base apenas na seleção de genótipos elites (ARAÚJO; DEMINICIS; CAMPOS, 2008; MILES, 2007). A maior parte dos genótipos lançados no mercado surgiu por meio da variabilidade natural (RESENDE et al., 2008) ou, por uniformização da ploidia dos genitores que podem ser obtida pela haploidização de tetraploides ou duplicação de diploides (PEREIRA et al., 2012).

Da mesma maneira que em outras espécies, nas forrageiras a colchicina é a substância mais usada para a indução da poliploidia, como foi relatado para *Urochloa* (SOUZA-KANESHIMA et al., 2010), *Pennisetum* (CAMPOS et al., 2009) e *Paspalum notatum* (QUESENBERRY et al., 2010).

A realização de cruzamentos interespecíficos e a obtenção de descendentes férteis em espécies apomíticas podem ser realizadas por meio da duplicação de genótipos sexuais, pois este procedimento iguala a ploidia e desta forma pode-se obter uma geração da variabilidade genética nessas espécies (SOUZA SOBRINHO et al., 2009). Dessa forma, a obtenção de genótipos duplicados para forrageiras, também, objetiva maximizar características de interesse agrônomo, tais como: o valor nutricional, excelente vigor vegetativo, alta produtividade, distribuição de forragem de acordo com o ciclo vegetativo, dentre outras características (NAIR, 2004).

As duas espécies de maior importância econômica brasileira são *U. decumbens* e *U. brizantha*, que são apomíticas, inviabilizando desta forma a recombinação genética para obtenção de variabilidade dentro dos melhores acessos identificados e, por isso, a metodologia adotada para recombinação dessas espécies envolve a realização de cruzamentos com *U. ruziziensis*, que é diploide e sexual (LIMA et al., 2001). Entretanto, o número de cromossomos destas três espécies é diferente dificultando a obtenção de descendência nos primeiros cruzamentos efetuados, desse modo, foi necessária a indução de uniformização de ploidias de genitores com a duplicação do número de cromossomos de acessos de *U. ruziziensis*, para igualar aos de *U. brizantha* e

de *U. decumbens*, sendo possível, então, a obtenção de descendência do cruzamento interespecífico, utilizando-se a *U. ruzizensis* sempre como genitor feminino (LIMA et al., 2001).

O melhoramento genético das forrageiras tropicais e também o lançamento de novas cultivares é de suma importância para a diversificação das pastagens, reduzindo os problemas provenientes do monocultivo (JANK; VALLE; RESENDE, 2011). Os programas de melhoramento tem como propósito à obtenção de novas cultivares que apresentem aumento da qualidade e quantidade da forragem produzida para a eficiência na produção animal (SOUSA et al., 2013).

2.5 Transformação Genética em Plantas

A adoção da biotecnologia pelos produtores tem atingido níveis elevados em relação as outras tecnologias avançadas e a produção de transgênicos, está difundida em praticamente todas as regiões agrícolas do planeta (JAMES et al., 2010). A tecnologia da transgênia acelerou a produção de novas variedades tolerantes aos estresses bióticos e abióticos em relação ao melhoramento convencional, e para facilitar a engenharia genética, genes candidatos que estão envolvidos na tolerância ao estresse em várias espécies vegetais já foram identificados tais como: prolina, glicina betaína, manitol e trehalose (CHEN et al., 2014).

Em 2017, um total de 67 países adotaram o cultivo de produtos biotecnológicos, 24 países são os produtores e os outros 43 são apenas importadores desses produtos, o cultivo de plantas geneticamente modificadas nesses 24 países produtores, sendo 19 países em desenvolvimento cultivam 53% e cinco industrializados (47%), apresentou um aumento de 4,7 milhões de hectares resultando em 189,8 milhões de hectares plantados (ISAAA, 2017). Os cinco maiores produtores de transgênicos mundiais tiveram uma taxa de adoção de 94,5% (EUA), 94% (Brasil), ~100% (Argentina), 95% (Canadá) e 93% Índia, esses países citados plantaram o equivalente a 91,3% da área global de cultivos de transgênicos (ISAAA, 2017).

O Brasil cultivou 50,2 milhões de hectares (ha) com culturas transgênicas, ficando em segundo lugar no *ranking* mundial de adoção de

biotecnologia agrícola, atrás apenas dos Estados Unidos (75 milhões de ha) e na sequência aparecem Argentina (23,6 milhões de ha), Canadá (13,1 milhões de ha), Índia (11,4 milhões de ha) e Paraguai (3 milhões de ha) (ISAAA, 2017). Esta evolução tecnológica em diversos setores causada pela biotecnologia é devido a sua multidisciplinaridade em sua base de conhecimento, confiança que tem sido considerada importantíssima nos processos de inovação e desenvolvimento de uma variedade de novos produtos diariamente lançados no mercado devido a competitividade entre as empresas (CARNEIRO et al., 2018).

A biotecnologia está diretamente voltada a evolução tecnológica em diversos setores, pois apresenta base de conhecimento multidisciplinar, confiança em processos de inovação e desenvolvimento de novos produtos, gerando competitividade entre empresas e lançamento de produtos no mercado.

O uso de técnicas de cultura de tecidos e de engenharia genética proporciona inúmeras possibilidades de introduzir genes de interesse agrônomo (LAKSHMANA et al., 2005). A engenharia genética é uma técnica potencial que encurta o processo no melhoramento de plantas e animais, principalmente pelo fato de contornar barreiras biológicas para a recombinação e troca genética entre espécies não relacionadas, criando os transgenes (HOLST-JENSEN, 2009).

Por meio da transformação genética de plantas pode se realizar, por exemplo, a introdução de genes de osmorregulação e fatores de transcrição de genes regulados por estresses abióticos para aumentar a tolerância aos diferentes tipos de estresses abióticos (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SEKI 2003). A introdução de genes exógenos, em plantas, pode ser feita por meio da *Agrobacterium tumefaciens* ou por métodos diretos como a eletroporação e a biolística (LAKSHMANA et al., 2005).

O método preferido para a transformação genética é a transformação por *Agrobacterium tumefaciens* por ter uma alta eficiência de transformação e baixo número de cópias do transgene (ZHAO et al., 2000). Tem sido muito utilizada principalmente em dicotiledôneas, porque em monocotiledôneas existe a dificuldade das bactérias infectarem estas plantas (WEBB; MORRIS, 1992).

Um outro método utilizado para superar as barreiras de incompatibilidade de infecção por *Agrobacterium* é a transformação por biobalística ou também conhecida como biolística, aceleração ou bombardeamento de partículas, *particle gun* ou *gene gun* (MIR et al., 2004). A transformação por biobalística é baseado na aceleração de micropartículas de ouro ou tungstênio em altas velocidades com o objetivo de atravessar a parede celular, membrana plasmática e membranas de organelas, com a finalidade de serem alojadas nos compartimentos celulares de forma não letal a planta (KLEIN et al., 1987; SANFORD, 1988).

A transformação genética de plantas por biobalística pode ser aplicada em qualquer tipo de tecido vegetal e em diferentes espécies vegetais, mas como desvantagem é necessário um equipamento específico que apresenta um custo elevado e, ao contrário da infecção por *Agrobacterium*. A biobalística tende a inserir um número bem maior de cópias do gene de interesse que pode provocar problemas na inserção e regulação dos genes (WEBB; MORRIS, 1992).

A transformação tanto por agrobacteria ou biobalística tem apresentado grande eficiência e aplicabilidade (WANG; FRAME, 2009). A transformação genética em plantas tornou-se uma ferramenta importante que auxilia o melhoramento genético tradicional, pois é capaz de romper barreiras do cruzamento em diferentes espécies, uma solução biotecnológica para problemas que afetam a agricultura brasileira e mundial (CARRER; BARBOSA; RAMIRO, 2010).

A grande maioria das cultivares de braquiárias existente, como mencionado acima, é resultado da seleção realizada sobre acessos introduzidos ou coletados no país, e algumas, do trabalho de seleção em grandes coleções representativas da variabilidade natural. Poucas ganharam destaque comercial e abrangência (VALLE; JANK; SIMEÃO RESENDE, 2009).

Até o momento, não existem cultivares transgênicos comerciais em nenhuma espécie do gênero *Urochloa*.

2.5.1 Bombardeamento de Partículas em Gramíneas.

A transformação por biobalística é bastante utilizada em monocotiledôneas que não são suscetíveis ou recalcitrantes a *Agrobacterium* (SOOD; BHATTACHARYA; SOOD, 2011) e em espécies que apresentam sementes recalcitrantes (SHARMA; BHATNAGAR-MATHUR; THORPE, 2005).

Os materiais alvos utilizados na transformação genética de gramíneas, forrageiras e cereais são os embriões imaturos ou as culturas embriogênicas (HARWOOD, 2011). Um fator muito importante para obter uma metodologia eficiente de transformação de plantas é que o explante (tecido ou célula alvo) apresente competência para a regeneração de plantas (KOICHI et al., 2002).

O resultado da transformação genética é influenciado por alguns fatores como: método de precipitação do DNA sobre as micropartículas antes do bombardeamento, distância de migração das partículas e velocidade de impacto do complexo DNA-micropartículas, e pelo dano causado ao tecido alvo, sendo necessário a realização de testes e adaptações em diversas condições para determinar quais são as melhores para um determinado tecido-alvo e genótipo vegetal (MIR et al., 2004). Como pré-requisito para que a integração do DNA exógeno ocorra, é necessária uma elevada taxa de divisão celular nos explantes usados para a transformação genética em monocotiledôneas (VASIL, 2005).

Frente às barreiras enfrentadas, como os problemas de incompatibilidade e esterilidade em cruzamentos interespecíficos, entre espécies de *Urochloa*, a transformação genética pode contribuir eficazmente com análises funcionais de genes por superexpressão e silenciamento (LI; TODD; TRICK, 2010) assim como para os genes candidatos relacionados à apomixia (SILVEIRA et al., 2012).

Para a aplicação eficiente das técnicas de transgenia em *U. brizantha* o aperfeiçoamento das técnicas de cultura de tecidos é ponto crucial, deste modo, a inserção de genes de interesse agrônomico poderá aumentar a variabilidade genética permitindo o desenvolvimento de novas variedades elite (HARWOOD, 2011).

Poucos trabalhos de transformação foram realizadas no gênero *Urochloa*. Em *U. ruziziensis* apenas duas plantas transformadas foram obtidas

por biolística a partir de brotos múltiplos e calos embriogênicos, no qual foi inserido um vetor contendo o gene de resistência a herbicida (*bar*) e um marcador repórter *GUS*, a análise histoquímica revelou expressão estável em raízes, brotações e inflorescências (ISHIGAKI et al., 2012). Em *U. brizantha* suspensões celulares embriogênicas, calos embriogênicos, embriões isolados de sementes maduras foram também transformados por biolística para a introdução dos genes marcadores *GUS* e *HPTII*. A análise da expressão transiente e estabilidade de transgenes foram observadas em todos os explantes testados, porém somente uma planta foi regenerada e aclimatizada (CABRAL et al., 2018).

Como relatado acima, até o momento poucas plantas transgênicas foram obtidas em espécies do gênero *Urochloa* e nenhum gene de interesse agrônômico foi inserido.

2.6 Estresse Abiótico: Déficit Hídrico em Plantas

Os estresses abióticos são fatores que afetam a qualidade e a produção agrícola, causando danos no crescimento e produtividade das plantas, principalmente quando os estresses ocorrem em combinação. As perdas causadas por estresses abióticos equivalem a mais de 50% da perda de rendimento mundial da produção das principais culturas produzidas (SHAO et al., 2009; AHUJA et al., 2010; LOBELL et al., 2011).

O déficit hídrico é um dos principais estresses ambientais que reduz o crescimento e a produtividade das plantas (ZLATEV; LIDON, 2012), pelo fato de ocasionar mudanças fisiológicas nas plantas superiores, incluindo perda de turgescência, ajuste osmótico e redução do potencial hídrico das folhas (SHAO et al., 2008; LISAR et al., 2012). É muito variável e complexo a maneira como o déficit hídrico afeta as plantas, seja ele proveniente de um suprimento limitado de água no solo ou de uma grande demanda evaporativa (FERNANDES; CAIRO; NOVAES, 2015).

A seca ou desidratação resulta em estresse por déficit hídrico que é considerado um desequilíbrio entre a quantidade de água disponível no solo e a necessidade evaporativa, sendo que as plantas necessitam de uma absorção combinada de água e expansão irreversível da parede celular para aumentar

as células resultando no seu crescimento (TARDIEU; GRANIER; MULLER, 2011). O fechamento dos estômatos é uma das reações que ocasiona a redução da absorção de nutrientes essenciais do solo pelo fluxo de água no interior do vegetal (BONFIM-SILVA et al., 2015).

Constantes variações climáticas causam estresses e podem alterar a morfologia e fisiologia das forrageiras, sendo que um dos principais limitantes isolados que altera a produção e qualidade da matéria seca é a precipitação pluviométrica (DUARTE, 2012). Fatores como elevado potencial evaporativo, variabilidade e irregularidade na alta incidência solar causam períodos curtos de estresse hídrico e podem chegar a seca prolongada, isso resulta em um déficit hídrico nas plantas (DUARTE, 2012).

Para possibilitar o uso de práticas de manejo e melhor aproveitamento da utilização da pastagem durante períodos de seca e chuva, é necessário o conhecimento das respostas da planta forrageira em condições de estresse hídrico (CARMO ARAÚJO et al., 2010). Em déficit hídrico, as plantas são afetadas pela relação hídrica do teor relativo e o potencial de água na folha (ZHANG et al., 2014), este teor relativo de água é representado pelo balanço hídrico da planta, sendo baseada na quantidade de água necessária para a turgescência e nível ideal para gerar o metabolismo fisiológico das plantas (FAROOQ et al., 2009; ZHANG et al., 2014).

A produção de forragem, assim como em outras espécies, depende de fatores inerentes ao ambiente, como temperatura e radiação bem como fatores passíveis de serem alterados pelo homem, como disponibilidade de nutrientes e de água (BARBOSA et al., 2006). O fator comprometedor da produção de fitomassa das gramíneas é a distribuição irregular da quantidade mensal de água precipitada, isso afeta diretamente a quantidade de animais a ser alimentada na área, uma vez que a escassez de alimento afeta a capacidade de suporte do talhão e o tempo de permanência dos animais na área de pastejo, já em período chuvoso, a forragem permanece em abundância, com boa qualidade, o que possibilita maior produção animal (PAIVA, 2014).

Na presença de déficit hídrico, as plantas desenvolvem mecanismos de defesas que mantem o seu metabolismo (VERSLUES et al., 2006) suportando o estresse (WILLADINO; CAMARA, 2010). Dentre as alterações metabólicas sob deficiência hídrica destaca-se o acúmulo de solutos orgânicos como a

glicina-betaína, prolina, aminoácidos solúveis e açúcares solúveis (MASOUDI-SADAGHIANI, et al., 2011). Tais solutos podem acumular-se em grandes quantidades, em condições de baixo potencial hídrico, protegendo as células contra desidratação e contribuindo para o ajustamento osmótico (ZHOU; YU, 2010).

De um modo geral, como resposta aos primeiros sintomas de estresse, as plantas alteram o sistema de trocas gasosas, o fechamento dos estômatos, a redução da taxa fotossintética e da transpiração foliar (GRACIANO et al., 2016; MATHOBO et al., 2017). Uma série de mecanismos a nível celular, bioquímico e fisiológico são ativados na planta como a percepção de sinal e cascatas de transdução, redes transcricionais e vias metabólicas adaptativas, envolvendo os diferentes estresses abióticos como a tolerância e sensibilidade (ALI; BANO; FAZAL, 2017). Em resposta ao estresse hídrico, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos para responder à limitada disponibilidade de água e também ao acúmulo de prolina (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010).

Os genes envolvidos no estresse hídrico, tais como: genes regulados pelo ABA (Ácido Abscísico), SA (Ácido Salicílico) e IAA (Ácido Indolacético) em plantas transgênicas melhora a tolerância ao estresse abiótico por meio de enzimas chaves de codificação que realizam a regulação da biossíntese de solutos compatíveis (ALI; BANO; FAZAL, 2017). A turgescência das folhas é consequência do movimento da água que é favorecido pelo potencial hídrico que é mais negativo, gerando um ajustamento osmótico (SILVA et al., 2014).

2.7 Prolina em Plantas

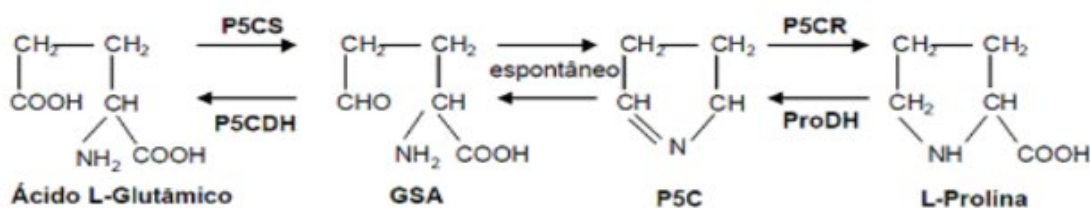
A prolina é um osmólito orgânico não carregado altamente solúvel em água (KISHOR et al., 2005). Apresenta a capacidade de equilibrar as concentrações dos solutos celulares mantendo o equilíbrio osmótico no citosol e das espécies reativas de oxigênio (EROS) protegendo os ácidos nucleicos e proteínas (KISHOR; SREENIVASULU, 2014).

A prolina pode ser sintetizada por duas vias, sendo que a via considerada principal especialmente quando está sob estresse osmótico (DELAUNEY; VERMA, 1993; KISHOR et al., 1995) é a do ácido glutâmico

(glutamato) que ocorre no citoplasma onde inicia a conversão do glutamato à ácido glutâmico - γ - semialdeído (GSA) pela enzima Δ^1 - pirrolina - 5 - carboxilato sintetase (*p5cs*) e por ciclização o GSA é convertido a Δ^1 - pirrolina - 5 - carboxilato (P5C), e este sofre redução resultando na prolina (Figura 2).

Altos níveis de prolina livres têm sido reportados em várias espécies de plantas modificadas geneticamente (PGM). O aumento da prolina em plantas transgênicas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico atuou mais como um agente antioxidante do que como um osmoprotetor, já que não ocorreu ajustamento osmótico nessas plantas em solos secos, havendo, porém, proteção do aparato fotossintético (MOLINARI et al., 2007). O aumento dos teores de prolina em plantas levam a atenuação dos efeitos do estresse e desempenha papel de adaptação em tolerância a esses estresses pela planta (CVIKROVÁ et al., 2013; FILIPPOU et al., 2014). E em tecidos foliares de plantas transgênicas de citrumelo Swingle apresentou uma quantidade de prolina cinco vezes mais em relação á planta controle (CARNEIRO et al., 2006).

Figura 2 - Via metabólica de biossíntese de prolina em plantas superiores (via Glutamato), GSA Ácido glutâmico semi-aldeído; P5C- Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato; *p5cs*- P5C sintetase; *p5cr*- P5C redutase; *prodh*-prolina desidrogenase; *p5cdh*- P5C desidrogenase (HARE; CRESS; VAN STADEN, 1999).



Fonte: (HARE; CRESS; VAN STADEN, 1999).

Em período de seca, devido a baixa disponibilidade de água, as plantas para manter a sua turgescência celular reduzem o seu potencial hídrico das suas células, ocasionando o acúmulo da prolina que é uma substância orgânica que ajuda na osmorregulação (SILVA et al., 2004). Portanto, plantas que apresentam tolerância ao estresse apresentam o acúmulo da concentração

de prolina mais elevadas do que as plantas que são sensíveis (ASHRAF et al., 2011). O acúmulo de prolina em diferentes estresses ambientais necessita das vias metabólicas sintéticas e de degradação (BHASKARA; YANG; VERSLUES, 2015).

Na tolerância das plantas ao estresse, a prolina desempenha uma função de adaptação e apresenta propriedade osmoprotetora que mantém o equilíbrio hídrico e preserva a integridade celular das proteínas, membranas e enzimas envolvidas nas atividades vitais da planta (MILÉO, 2014; GONÇALVES, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Desenvolver um protocolo por biolística para obter plantas geneticamente modificadas de *Urochloa* com introdução do gene *p5cs*.

3.2 Objetivos Específicos

- Definir melhores explantes *in vitro* de *U. brizantha* cv. Marandu para a utilização nos experimentos transformação genética;
- Determinar os parâmetros para bombardeamento em diferentes explantes de *Urochloa* com o gene *uidA*;
- Analisar a expressão transiente do gene *uidA* em diferentes explantes;
- Inserir o gene *Vap5cs* em *Urochloa brizantha* por biolística;
- Regenerar e aclimatizar eventos transgênicos;
- Verificar a concentração de prolina nas plantas transformadas submetidas ao déficit hídrico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

O experimento foi realizado nos laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais e de Genética, localizado Bloco Q, no *Campus II* da Unoeste em Presidente Prudente - SP. Os explantes foram obtidos de sementes maduras de *Urochloa brizantha* cv. Marandu.

4.2 Desinfestação das Sementes

As sementes que estavam armazenadas em câmara fria do laboratório de Sementes foram escarificadas em ácido sulfúrico P.A. por 15 min, sendo agitadas com bastão de vidro e lavadas em água corrente para remoção do ácido. Após a lavagem as sementes foram secas à temperatura ambiente.

As sementes escarificadas foram descascadas manualmente, sendo desinfestadas por imersão: em etanol 70% (v/v) por cinco minutos; hipoclorito de sódio 5% (v/v) contendo 0,3 ml de Tween 80 por 20 min; lavadas cinco vezes em água destilada autoclavada, sempre com frequentes agitações.

4.2.1 Germinação de Sementes *in vitro*

Para obtenção dos epicótilos, aproximadamente 50 sementes escarificadas, descascadas e desinfestadas foram inoculadas em placas de Petri de 20 cm de diâmetro e 1 cm de altura, contendo 50 ml meio de cultura básico MS/2 (meio MS com metade das soluções estoque) (MURASHIGE; SKOOG, 1962). No meio MS/2 utilizado foi acrescentado 30 g L⁻¹ de sacarose, 300 mg L⁻¹ de caseína hidrolisada, solidificado com 8 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 ± 0,1 e autoclavados por 20 min a uma temperatura de 121 ± 1°C e pressão de 1 atm. Em câmara de fluxo laminar o meio foi distribuído em placas de Petri estéreis.

As placas foram vedadas com filme PVC e mantidas na ausência de luz, em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C por um período de 21 dias para obtenção dos epicótilos. Após este período, os epicótilos foram

cortados longitudinalmente com aproximadamente 2,5 cm. Os explantes foram inoculados em meio osmótico para serem utilizados no bombardeamento.

4.2.2 Indução de Calos de Epicótilos

Sementes escarificadas, descascadas e desinfestadas foram inoculadas em placas de Petri de 20 cm de diâmetro e 1 cm de altura, contendo 50 ml de meio de cultura básico MS/2. Foram inoculadas aproximadamente 50 sementes por placa. As placas foram vedadas com filme PVC e mantidas na ausência de luz, em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 21 dias para obtenção dos epicótilos. Os epicótilos foram cortados transversalmente obtendo disco de aproximadamente 1 a 2 mm.

Os explantes (discos dos epicótilos) foram inoculados em placas de Petri contendo meio MS com 30 g L^{-1} de sacarose, 300 mg L^{-1} de caseína hidrolisada, solidificado com 8 g L^{-1} de ágar, adicionando-se picloram (4-amino-3,5,6 – tricloro 2 ácido piridinocarboxílico) na concentração de 1 mg L^{-1} (TAKAMORI et al., 2015) ou 2,4-D (2,4 ácido diclorofenoxiacético) 1 mg L^{-1} . Os explantes foram repicados a cada 14 dias, totalizando três repicagens para obtenção dos calos dos epicótilos para serem utilizados no bombardeamento.

4.2.3 Indução de Calos em Sementes

Sementes escarificadas, descascadas e desinfestadas foram inoculadas com o embrião voltado para cima em placas de Petri de 10 cm de diâmetro e 1 cm de altura, contendo 25 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescentado 30 g L^{-1} de sacarose, 300 mg L^{-1} de caseína hidrolisada, solidificado com 8 g L^{-1} de ágar, adicionando-se picloram (4-Amino-3,5,6-trichloro-2 – Ácido piridinocarboxílico) na concentração de 1 mg L^{-1} ou 2,4-D (2,4 Ácido Diclorofenoxiacético) 1 mg L^{-1} . O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e autoclavados por 20 min a uma temperatura de $121 \pm 1^\circ\text{C}$ e pressão de 1 atm. As sementes foram cultivadas neste meio no escuro, por cinco dias antes do bombardeamento.

4.3 Construção Utilizada na Transformação

Para a análise da expressão transiente foi utilizado o vetor pANIC 6E contendo o gene *uidA* (*GUSplus*) que codifica a β -glucuronidase sob o controle do promotor *ZmUbi1* (MANN et al., 2012). No diagrama abaixo encontra-se a composição do vetor: LB (borda esquerda), *OsAct1* (promotor e intron de arroz actina 1), *bar* (região de codificação da resistência ao bialaphos – glufosinato de amônio), 35S T (sequência de terminação 35S), *PvUbi1* (promotor e intron de polubiquitina 1 de switchgrass), *GUSPlus* (região de codificação *GUSPlus*TM juntamente com a sequência peptídica de proteína rica em proteína de glicina), NOS-T (sequência terminadora de *Agrobacterium tumefaciens*), *ZmUbi1* (promotor e intron de ubiquitina 1 de milho), R1 e R2 (attR1 e attR2 sitios de recombinação), *Cmr* (gene de resistência a cloranfenicol), *ccdB* (seleção negativa marcador), *AcV5* (etiqueta de epítipo), OCS T (sequência de terminador de octopina sintase), RB (borda direita) (Figura 3).

Figura 3 - Diagrama esquemático do vetor pANIC 6E utilizados nos experimentos de expressão transiente em *U. brizantha*.

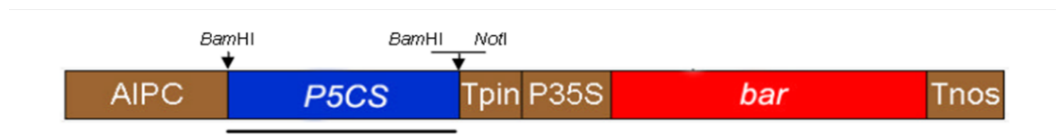


Fonte: (MANN et al., 2012).

Para a introdução do gene *Vap5cs* (*Vigna aconitifolia* $\Delta 1$ – pirrolina – 5 – carboxilato sintetase) foi utilizado o vetor pJS107 (SU et al., 1998), o qual contém o gene marcador de seleção *bar*, que codifica a enzima fosfinotricina acetil transferase (confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio) sob o controle do promotor constitutivo CaMV 35S com Tnos (terminador do gene da nopalina sintase) e o gene *p5cs* de *Vigna aconitifolia*, sob controle do complexo promotor estresse induzido designado como AIPC (ABA complexo do promotor induzido) e o Tpin (terminador do gene Pin II) (ZHU et al., 1998) (Figura 4).

Figura 4 - Diagrama esquemático do vetor pJS107 utilizado para transformação de *U. brizantha*

pJS107



Fonte: (MOLINARI, 2007).

Os vetores foram multiplicados em *Escherichia coli* estirpe DH5 α . Colônias bacterianas foram inoculadas em meio LB (Luria-Bertania com a constituição de: NaCl 170 mM; triptona 1% e extrato de levedura 0,5%, pH 7,0) contendo o antibiótico específico para pJS107 (Ampicilina 50 mg L⁻¹) e pANIC 6E (Canamicina 50 mg L⁻¹), sendo incubadas por 16-20 horas à 37°C, em agitador à 100 rpm até atingirem o final da fase exponencial de crescimento (A₆₀₀ de aproximadamente 0,6). A extração do DNA plasmidial foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante do Kit Plasmid Midi da Qiagen[®].

A análise do DNA obtido foi avaliada por meio da técnica a eletroforese em gel de agarose 1,0 % corados com brometo de etídio e posterior visualização em transiluminador (Vilber Lourmat Quantum ST4) através da incidência de luz ultravioleta, analisando a presença de bandas.

4.4 Determinação dos Parâmetros de Bombardeamento de Partículas

Os explantes (epicótilos, calos de epicótilos e sementes) foram transferidos para meio osmótico contendo 0,4 M de sorbitol e 0,4 M de manitol adicionado 1 mg L⁻¹ de picloram ou 2,4-D mg L⁻¹, 4 horas antes do bombardeamento.

A suspensão de micropartículas de tungstênio (0,7 ou 1,0 μ m Biorad[®]) ou de ouro (1,0 μ m Biorad[®]) foram preparadas conforme as instruções do fabricante (Biorad[®]). Foi adicionado à suspensão de partículas, 1 μ g do vetor pANIC 6E 2,5 M de CaCl₂ e 100 mM de espermidina. Para os controles negativos o protocolo foi o mesmo, exceto a adição de DNA do vetor.

Nos testes iniciais os explantes de epicótilo foram bombardeados com tungstênio (0,7 ou 1,0 μ m Biorad[®]) e ouro (1,0 μ m Biorad[®]). Após os testes, os

epicótilo, os calos de epicótilos e sementes foram bombardeados apenas com partículas de ouro (1,0 μm Biorad[®]). As micropartículas foram revestidas com o vector pANIC 6E, que contém gene *uidA*, sob pressão de aceleração de 1100 psi nas distâncias de 3, 6, 9 e 12 cm e em duas concentrações de micropartículas (30 mg ml^{-1} e 60 mg ml^{-1}).

Foram bombardeadas quatro placas contendo 10 explantes de epicótilo, quatro placas contendo 25 calos de epicótilos e quatro placas contendo 35 calos de sementes, com quatro repetições para cada distância. Para o controle negativo, também foram bombardeados a mesma quantidade de explantes e nas mesmas distâncias (3, 6, 9 e 12 cm) as micropartículas foram preparadas de acordo com o protocolo, exceto a adição de DNA do vetor.

De cada concentração, foram pipetadas 7 μL da suspensão de micropartículas em membranas carreadoras e secas em suporte contendo sílica gel, em câmara de fluxo laminar. O equipamento de bombardeamento PDS-1000/He (Biorad[®]) foi utilizado com pressão a vácuo de 27" Hg.

4.5 Bombardeamento de Partículas para Inserção do Gene *p5cs*

Calos obtidos a partir de sementes foram transferidas para meio osmótico (0,4 M de sorbitol e 0,4 M de manitol) contendo 1 mg L^{-1} de picloram ou 2,4-D, sendo mantidas por 4 horas antes do bombardeamento.

O preparo da da suspensão de micropartículas de partículas de ouro (1,0 μm Biorad[®]) seguiu as recomendações do fabricante (Biorad[®]). A suspensão para bombardeamento continha 2,5 M de CaCl_2 e 100 mM de espermidina e preparadas nas concentrações 30 ou 60 mg ml^{-1} e adicionando 1 μg do vetor pJS107. Para os controles negativos o protocolo foi o mesmo, exceto a adição de DNA de do vetor.

Foram pipetadas 7 μL da suspensão de micropartículas em membrana carreadora e secas em suporte contendo sílica gel, em câmara de fluxo laminar. O equipamento de bombardeamento PDS-1000/He (Biorad[®]) foi utilizado com pressão a vácuo de 27" Hg e 6 mm da membrana carreadora. A pressão de ruptura de disco usada foi de 1100 psi e distância percorrida pela micropartícula até atingir o explante foi de 6 cm.

4.6 Expressão Transiente do Gene *uidA*

Após o bombardeamento, os explantes foram mantidos em meio osmótico em sala de crescimento por 48 h, os explantes (epicótilos, calos de epicótilos e calos derivados de sementes) de cada tratamento foram transferidos para microtubos estéril e incubados à 37°C por 24 h, em solução composta por 10 mM de Na₂EDTA.H₂O, 0,1% de Triton X-100, 0,1 mM de NaH₂PO₄, 0,5 mM de K₄Fe (CN)₆ e 250 µg mL⁻¹ de X-gluc.

Para a determinação visual da expressão transiente da enzima β-glucuronidase. Após o tempo de incubação foi retirada a solução dos microtubos e os explantes foram imersos em etanol 70%. Considerou-se como resultado positivo as regiões que apresentaram pontos definidos de coloração azul. Realizou-se a contagem do número de pontos azuis, com auxílio de microscópio estereoscópio binocular (Zoom 0,7 a 5X Bel Photonics).

4.7 Regeneração e Aclimatização de Eventos Transgênicos Putativos

Após o bombardeamento de calos derivados de sementes com o vetor pJS107, os explantes permaneceram em meio osmótico por 48 h. Após este período, os explantes foram transferidos para meio de indução de regeneração de calos (MS contendo 1 mg L⁻¹ de 2,4-D ou picloram) sem adição de agente seletivo por 14 dias. Após esse período, os explantes foram sub-cultivados a cada 14 dias, no mesmo meio de cultura e foi adicionado o herbicida Finale[®] (contendo 2 mg L⁻¹ do glufosinato de amônio).

Os brotos formados foram transferidos para frascos contendo o meio seletivo MS/2 contendo 2 mg L⁻¹ de benziladenina para o desenvolvimentos das plântulas. As plântulas foram mantidas a 25 ± 1°C, sob fotoperíodo de 16 h luz e intensidade luminosa de 30 µmol m⁻²s⁻¹ conforme descrito em Takamori et al. (2015).

As plântulas que regeneraram e enraizaram em meio seletivo, foram retiradas do meio de cultura, lavadas em água corrente e transplantadas para copos descartáveis contendo substrato comercial (Bioplant[®]). Os copos foram cobertos com outro copo transparente para manutenção da umidade por 14 dias.

Após esse período os copos foram perfurados para permitir a aclimatização das plântulas. Depois de 21 dias foram removidos os copos da parte superior. Os eventos que resistiram à aclimatização foram submetidos a análise molecular.

4.8 Detecção dos Transgenes pela PCR

Folhas de plantas aclimatizadas foram coletadas para a extração de DNA pelo método CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium bromide) (DOYLE; DOYLE, 1987).

A análise da integridade do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio e posterior visualização em fotodocumentador (Vilber Lourmat Quantum ST4) através da incidência de luz ultravioleta.

A detecção de fragmentos correspondentes aos transgenes foi realizada pela reação em cadeia da DNA Polimerase (PCR) utilizando o termociclador Multigene Biosystems[®] com os iniciadores para o gene *p5cs*, que amplifica um fragmento de 580 pb (5' AGC AAC TCA ACT CTC TCG GA 3' e 3' CCA CTC TAG ACT TGT CGC CA 5'). Para verificar a presença do gene *bar* utilizou o iniciador que amplifica um fragmento de 450 pb (5' GGT CTG CAC CAT CGT CAA CC 3' e 3' GAA GTC CAG CTG CCA GAA AC 5').

Para as reações da PCR foram utilizados 100 ng de DNA genômico, 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix da Promega[®], adicionado 100 mM de cada *primer* e H₂O ultrapura autoclavada para um volume final de 20 µL. O controle negativo da reação (C-) consistiu de uma amostra contendo DNA de planta controle (não transformada). O branco da reação (B) consistiu do mix contendo água MilliQ autoclavada substituindo o DNA. O controle positivo (C+) continha 100 pg de DNA do vetor pJS107 e o controle positivo mais negativo (C±) continha DNA do vetor pJS107 mais o DNA da planta controle (não transformada).

As amplificações foram realizadas utilizando o seguinte programa para o gene *p5cs*: desnaturação a 94 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 45 seg, 55 °C por 45 seg, 72 °C por 45 seg e extensão final a 72 °C por 5 min e para o gene *bar*: desnaturação a 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 55 °C

por 45 seg, 72 °C por 45 seg e extensão final a 72 °C por 5 min. O produto final da PCR submetido a eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio e visualizados e fotografados sob luz ultravioleta no transiluminador.

4.9 Frequência de Transformação

A frequência de transformação foi calculada pelo número de plantas regeneradas aclimatizadas que foram positivas para PCR dos genes *bar* e *p5cs* em função do número total de explantes bombardeados (%).

4.10 Aplicação do Herbicida

As plantas transgênicas putativas foram avaliadas em relação à resistência ao herbicida Finale[®] que apresenta como princípio ativo o gluosinato de amônio (na concentração de 20%). O herbicida foi diluído a 2% v/v do produto comercial e aplicado em uma folha de cada evento com o auxílio de uma haste flexível. A folha pincelada foi marcada com uma linha colorida e avaliadas após sete dias.

4.11 Déficit Hídrico

Os eventos que resistiram à aclimatização (oito eventos) e uma planta controle foram transplantados para vasos contendo seis quilos de terra vegetal comercial Bioterra[®], foram adicionados dois perfilhos (compostos por 3 folhas) de cada evento em cada vaso. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação sob condições controladas de temperatura (28 ± 2 °C) e com irrigação diária por gotejamento (dois turnos: uma na parte da manhã e outro a tarde com vazão de dois litros por hora, operando na pressão de 100 kPa por cinco minutos), onde permaneceram por 60 dias. Os vasos foram dispostos em posições semelhantes em relação à incidência de radiação solar.

O potencial hídrico das folhas (Ψ_w , MPa) foi medido entre as 13 e 15 h com auxílio da câmara de pressão do tipo Scholander (PMS 1000, PMS Instruments EUA) em condições normais de irrigação. Após a leitura a irrigação dos vasos foi suspensa.

Foram coletadas as folhas +1 (primeira folha totalmente expandida) quando o potencial hídrico estava entre -2,9 a -3,4 MPa. As folhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e em seguida armazenadas a -80°C até serem utilizadas na análise bioquímica da concentração de prolina. Após a coleta as plantas foram irrigadas em capacidade de campo de 100% para a sua recuperação.

4.12 Conteúdo de Prolina

A determinação do conteúdo de prolina foi baseada na metodologia descrita por Bates; Waldren, Teare (1973), sendo realizada a amostragem em triplicata técnica. Foram coletadas três folhas de cada evento transgênico e da planta controle (não transformada), em condições normais e de déficit hídrico.

As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e 25 mg do macerado foi utilizado para a análise do conteúdo de prolina. A extração foi realizada com a adição de ácido sulfosalicílico (3%) e em seguida, o extrato foi centrifugado a 7500 rpm por três minutos. Coletou 2 ml do sobrenadante do centrifugado e acrescentou 2 ml da solução de ácido ninidrina (1,25 g de ninidrina; 30 ml de ácido acético glacial; 20 ml de ácido fosfórico 6M) e 2 ml de ácido acético glacial em tubos de ensaio de 15 ml. As amostras foram incubadas a 100 °C por 1 hora em banho-maria e, em seguida, transferida para gelo.

Após a incubação, acrescentou 4 ml de tolueno e homogeneizou por 20 segundos em vortex para completa extração da prolina. Para determinação da concentração de prolina foi utilizado 1 ml do sobrenadante e realizou a leitura por espectrofotometria (520 nm).

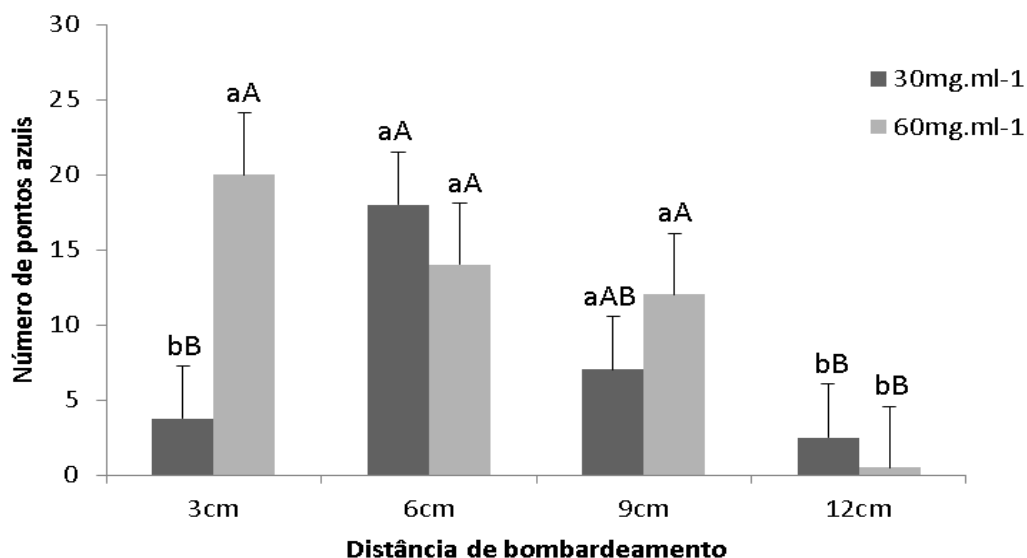
5 RESULTADOS

5.1 Expressão Transiente do Gene *uidA* em Epicótilos

Um ensaio foi realizado para a otimização dos experimentos de biobalística, utilizando micropartículas de tungstênio (0,7 e 1,0 μm) e ouro (1,0 μm) e uma pressão de gás hélio de 1100 psi. No bombardeamento com micropartículas de tungstênio (0,7 e 1,0 μm) não houve expressão transiente. Diante deste resultado os experimentos foram realizados somente com a micropartícula de ouro (1,0 μm), pressão do gás hélio a 1100 psi, com distâncias entre o microcarreador de três, seis, nove e 12 cm, nas concentrações de 30 e 60 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de suspensão de micropartículas e três tipos de explante (epicótilos, calos de epicótilos e sementes) obtendo sucesso nas observações da expressão transiente.

Em epicótilo bombardeado de *U. brizantha* cv. Marandu o maior número de pontos azuis demonstrando a expressão transiente do gene *uidA* foi observado na distância de 3 cm, na concentração de 60 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ da suspensão de micropartículas de ouro (Figuras 5 e 6).

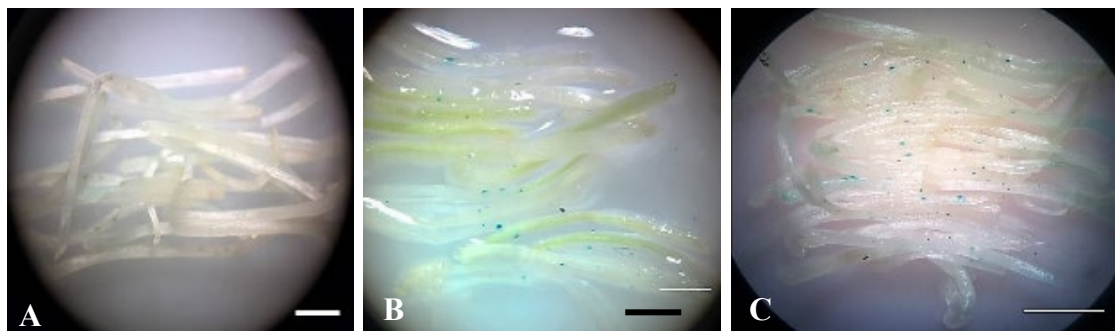
Figura 5 - Expressão transiente do gene *uidA* em epicótilos de *U. brizantha* cv. Marandu nas concentrações de 30 mg ml⁻¹ e 60 mg ml⁻¹ da suspensão de micropartículas de ouro.



Fonte: A Autora (2017).

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si para concentração da suspensão de micropartículas em cada distância. Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente entre si para cada concentração em todas as distâncias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barra ± erro padrão.

Figura 6 - Expressão transiente do gene *uidA* em epicótilo de *U. brizantha* cv. Marandu. A: Epicótilos controle bombardeados somente com partículas (sem adição de DNA vetor); B: Epicótilos bombardeados a 6 cm, na concentração de 60 mg ml⁻¹ da suspensão de micropartículas; C: Epicótilos bombardeados a 3 cm, na concentração de 60 mg ml⁻¹ da suspensão de micropartículas. Barra: A e B 1 cm, C 0,5 cm.

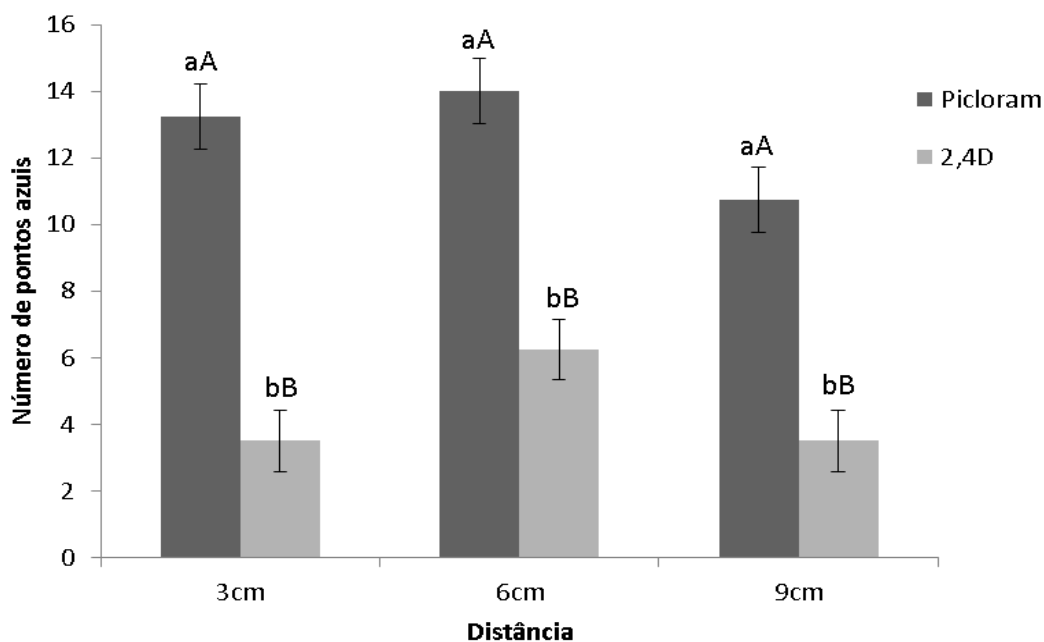


Fonte: A Autora (2017).

5.2 Expressão Transiente do Gene *uidA* em Calos induzidos em Epicótilos

Para os calos induzidos a partir de epicótilos em meio contendo 1 mg L^{-1} das auxinas picloram ou 2,4-D, o maior número de pontos azuis para a análise da expressão transiente foi observado em calos induzidos com o picloram, independente da distância de bombardeamento (Figuras 7 e 8).

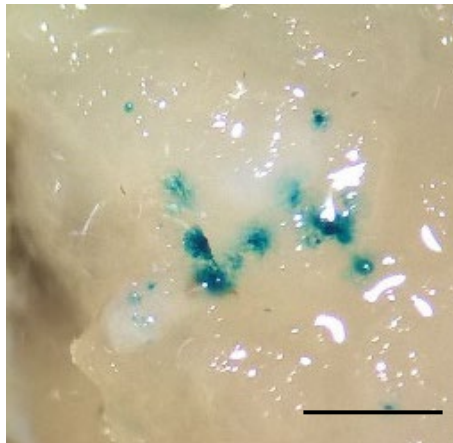
Figura 7 - Expressão transiente do gene *uidA* em epicótilo de *U. brizantha* cv. Marandu. em calos de epicótilo de *U. brizantha* cv. Marandu, na concentração de 60 mg ml^{-1} da suspensão de micropartículas e com auxinas picloram e 2,4-D.



Fonte: A Autora (2017).

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si para fitorreguladores na mesma distância. Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente para cada fitorreguladores em todas as distâncias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 8 - Expressão transiente do gene *uidA* em calos de epicótilo de *U. brizantha* cv. Marandu utilizando a auxina 2,4-D 1 mg L⁻¹, concentração de 60 mg ml⁻¹ da suspensão de micropartículas e na distância de 6 cm. Barras: 1 cm.



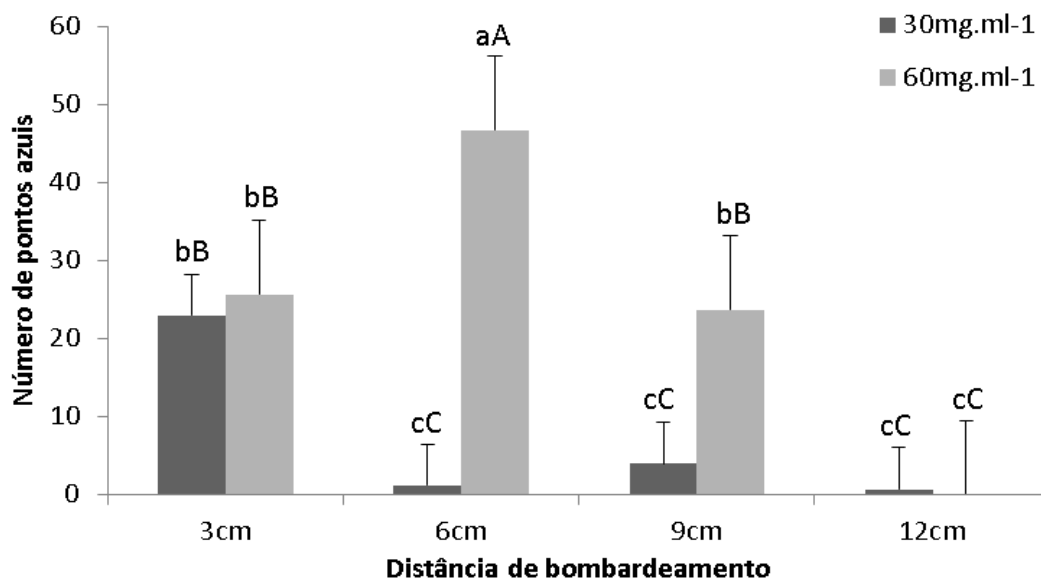
Fonte: A Autora (2017).

5.3 Expressão Transiente do Gene *uidA* em Calos Derivados de Sementes

O ensaio de expressão transiente em calos derivados de sementes maduras induzidos em meio MS com 1 mg L⁻¹ de picloram detectou maior atividade do gene repórter *uidA* na distância de 6 cm e na concentração de 60 mg ml⁻¹ da suspensão de micropartículas de ouro, sendo de 1,8 e 1,97 vezes maior que a detectada nas distâncias de 3 e 9 cm respectivamente (Figura 9).

Nos controles negativos (explantes bombardeados sem DNA plasmidial pJS107), foi observada a reação inespecífica do gene *uidA*, sendo visualizadas somente manchas de coloração azulada sem pontos definidos (Figura 10A). A atividade da enzima β -glucuronidase apresenta-se com coloração de azul intenso e regiões bem delimitadas (Figura 10B).

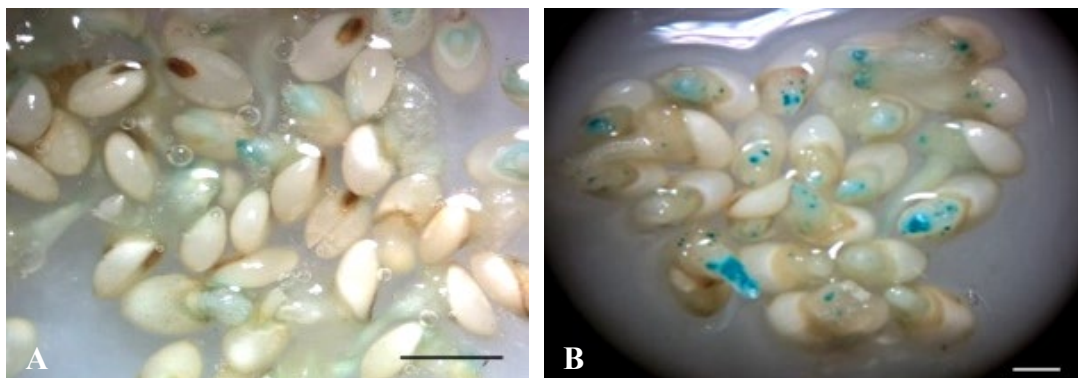
Figura 9 - Expressão transiente do gene *uidA* em calos derivados de sementes de *U. brizantha* cv. Marandu em duas concentrações da suspensão de micropartículas de ouro.



Fonte: A Autora (2017).

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si para concentração da suspensão de micropartículas em cada distância. Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente entre si para cada concentração em todas as distâncias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barra \pm erro padrão.

Figura 10 – Expressão transiente em calos derivados de sementes *U. brizantha* cv. Marandu. A: Controle negativo (bombardeados sem adição do DNA plasmidial) e B: Calos derivados de sementes bombardeadas a 6 cm, na concentração de 60 mg.ml⁻¹ da suspensão de micropartículas. Barras: 1 cm.



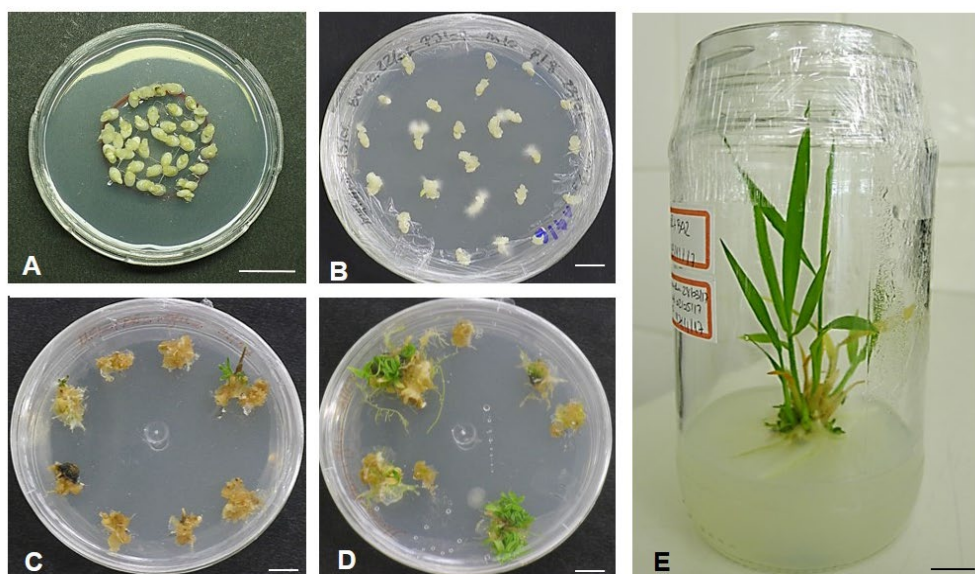
Fonte: A Autora (2017).

5.4 Regeneração e Aclimatização dos Possíveis Eventos Transgênicos

Um total de 2500 calos derivados de sementes de *U. brizantha* cv Marandu foram bombardeados com o vetor pJS107 (Figura 11A). Após o bombardeamento os explantes permaneceram em meio de regeneração sem adição de meio seletivo (Figura 11B). Em seguida, os explantes foram transferidos para meio de regeneração contendo 2% v/v de glufosinato de amônio (Figura 11C). Os explantes foram repicados a cada 14 dias no mesmo meio seletivo até a formação dos brotos (Figura 11D). As plântulas permaneceram *in vitro* em meio seletivo até o enraizamento (Figura 11E).

Um total de 91 plântulas de *U. brizantha* cv. Marandu foram regeneradas. Todas as plântulas regeneradas foram transferidos para copos plásticos contendo substrato comercial para serem aclimatizadas. Doze plantas não sobreviveram e 79 foram aclimatizadas, resultando em um percentual de 86,8% de sobrevivência (Figura 12).

Figura 11- Regeneração de plântulas de *U. brizantha* em meio seletivo. A: explantes bombardeados; B: explantes em meio sem seletivo; C: explantes cultivados em meio seletivo; D: regeneração de brotos em meio seletivo e E: desenvolvimento da plântula e enraizamento *in vitro*.



Fonte: A Autora (2017).

Figura 12 - Eventos putativos aclimatizados: plantas que regeneraram em meio seletivo foram aclimatizadas em substrato comercial.

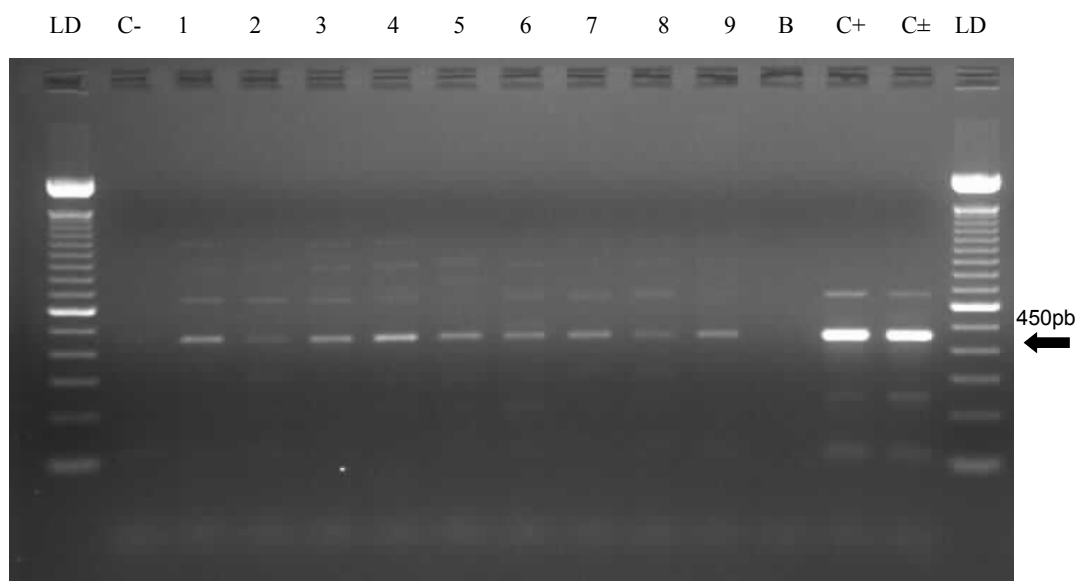


Fonte: A Autora (2017).

5.5 Análise Molecular das Plantas Regeneradas pela PCR

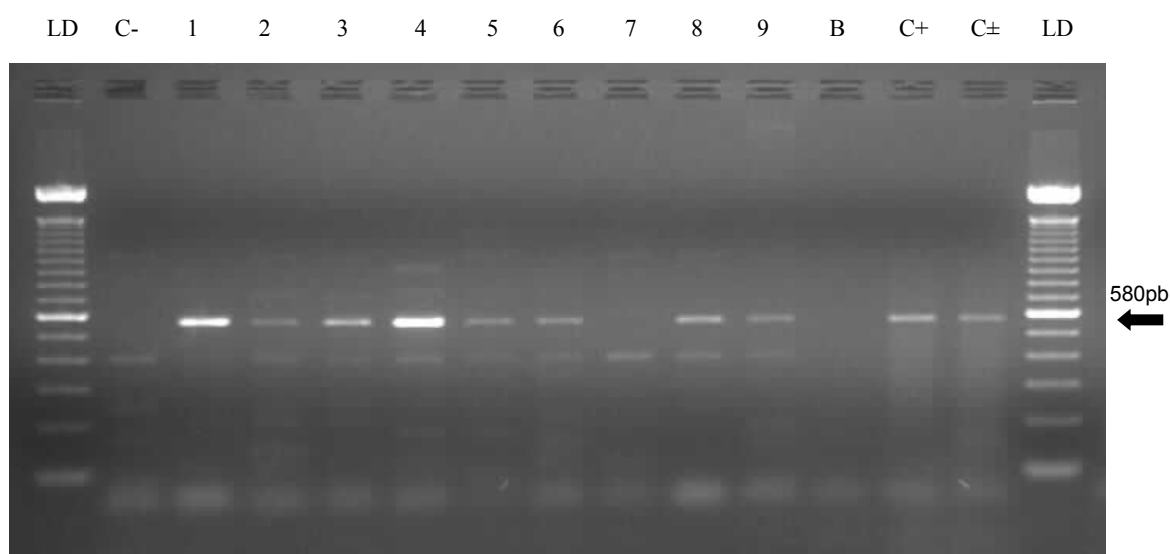
Para confirmação da transgenicidade das plantas de *U. brizantha* cv. Marandu foram realizadas análises para detecção de fragmentos dos genes *bar* e *p5cs* pela PCR (Reação em Cadeia da DNA Polimerase). Do total de 79 eventos sobreviventes ao processo de aclimatização, 34 eventos confirmaram serem eventos transgênicos. Destes eventos, 21 apresentaram a amplificação para o gene *bar* (fragmento específico de 450 pares de base) e 13 eventos amplificaram para o gene *p5cs* (fragmento de DNA esperado de 580 pares de base). Apenas em oito eventos foi confirmada a amplificação para os dois genes (Figuras 13 e Figura 14).

Figura 13 – Amplificação do fragmento correspondente ao gene *bar* pela PCR em eventos de *U. brizantha* cv. Marandu. LD: – Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb); C–: controle negativo (planta não transformada); Eventos: 1 - 9; B: branco; C+: controle positivo (vetor pJS107); C±: controle positivo (vetor pJS107) com DNA do controle negativo (planta não transformada). Seta indica a amplificação do fragmento do gene *bar* de 450 pares de base.



Fonte: A Autora (2018).

Figura 14 - Amplificação do fragmento correspondente ao gene *p5cs* pela PCR em eventos de *U. brizantha* cv. Marandu. LD: – Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb); C–: controle negativo (planta não transformada); Eventos transformados: 1 - 9; B: branco; C+: controle positivo (vetor pJS107); C±: controle positivo (plasmídeo pJS107) adicionado o controle negativo (planta não transformada de *U. brizantha* cv. Marandu). Seta indica a amplificação do fragmento do gene *p5cs* de 580 pares de base.



Fonte: A Autora (2018).

5.6 Frequência de Transformação

Calos embriogênicos induzidos em meio MS contendo 1 mg L^{-1} 2,4-D ou picloram foram bombardeados e resultaram na formação de 0,88 e 4,80% de calos resistentes ao meio seletivo contendo 2 mg L^{-1} de glufosinato de amônio, respectivamente.

Do total de 79 plantas de *U. brizantha* cv. Marandu que regeneraram, 54 plantas foram originadas em meio contendo a auxina picloram. Dentre estas, 19 plantas amplificaram os fragmentos desejados sendo que 12 plantas apresentaram a amplificação para o gene *bar* (450 pb) e sete para o gene *p5cs* (580 pb) e cinco eventos apresentaram a amplificação de ambos os genes resultando em uma frequência de transformação de 0,40% (Tabela 1).

Enquanto que 25 plantas foram regeneradas em meio MS que continha 1 mg L^{-1} da auxina 2,4D. Dentre estas, 15 plantas apresentaram amplificação de pelo menos um dos fragmentos sendo que nove eventos amplificaram o gene *bar* (450 pb) e seis eventos amplificaram o gene *p5cs* (580 pb), mas apenas três eventos amplificaram para os dois fragmentos resultado em uma frequência de transformação 0,24% (Tabela 1).

Em resumo, somando as duas auxinas obtivemos um total de oito plantas transformadas com os dois genes *bar* e *p5cs*, apresentando uma eficiência de transformação de 0,32% (Tabela 1).

Tabela 1 - Eficiência de calos bombardeados e resistentes ao seletivo, na cultivar Marandu, com uso das auxinas 2,4-D e picloram.

Auxina 1 mg.L^{-1}	Nº total de calos bombardeados	Nº de calos com brotos	Nº de plantas regeneradas aclimatizadas	Nº de plantas positivas ao <i>bar</i>	Nº de plantas positivas ao <i>p5cs</i>	Nº de plantas positivas ao <i>bar</i> e <i>p5cs</i>	Frequência de plantas positivas ao <i>bar</i> e <i>p5cs</i> %
2,4D	1260	11	25	9	6	3	0,24
Picloram	1260	60	54	12	7	5	0,40
Total	2520	71	79	21	13	8	0,32

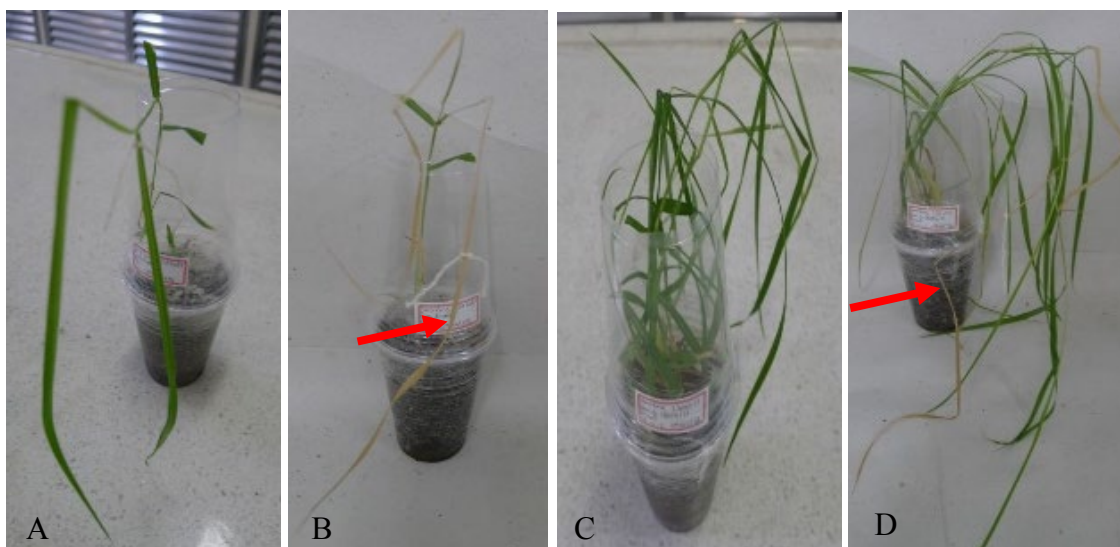
Fonte: A Autora (2018).

5.7 Teste de Tolerância ao Herbicida

O herbicida Finale[®] cujo princípio ativo é o glufosinato de amônio na concentração de 20% foi utilizado para testar se a introdução do transgene *bar* conferiu tolerância as plantas de braquiária aclimatizadas. A segunda folha de um perfilho de cada evento e o controle não transformado foram pincelados com uma solução comercial (20%) diluída a 2% v/v.

Após sete dias da aplicação do herbicida as plantas foram avaliadas visualmente. Não foi observada diferença entre as plantas controle e as transformadas em relação a tolerância ao herbicida. Todas as folhas que foram pinceladas com o herbicida ficaram progressivamente amareladas e morreram (Figura 15).

Figura 15 – Aplicação do herbicida Finale® em plantas aclimatizadas. A: Planta controle (não transformada) sem aplicação de glufosinato de amônio; B: Planta controle sete dias após a aplicação do glufosinato de amônio; C: Evento de transformação sem aplicação de glufosinato de amônio e D: Evento de transformação sete dias após a aplicação de glufosinato de amônio. Seta: demonstra qual folha foi aplicado o herbicida.



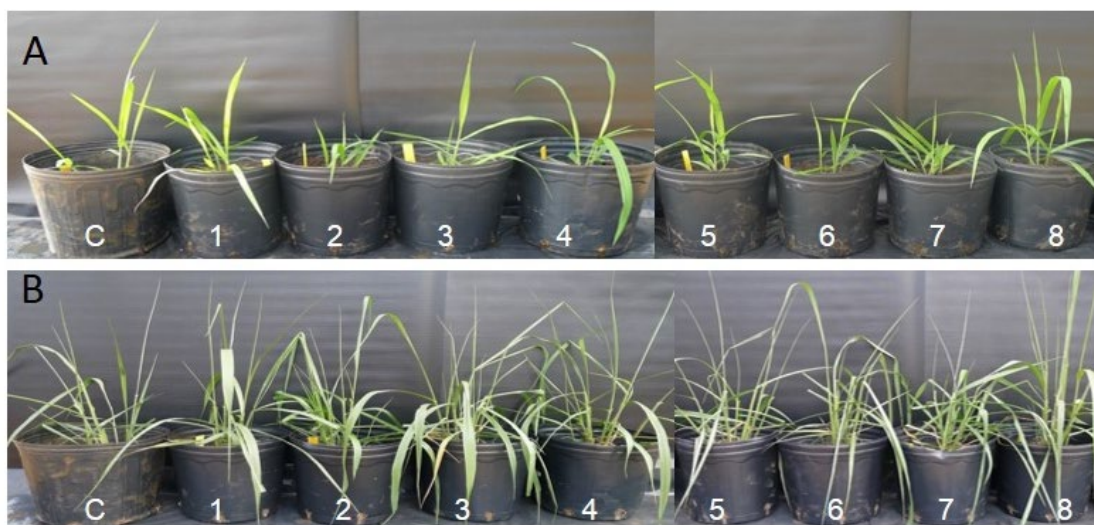
Fonte: A Autora (2018).

5.8 Déficit Hídrico

Os oito eventos que amplificaram para os dois genes *bar* e *p5cs* e uma planta controle (não transformada) foram submetidas ao déficit hídrico. Antes do início da imposição do déficit hídrico as plantas foram padronizadas, mantendo três perfilhos por planta e a irrigação em condições normais durante sete dias (Figura 16 A). O potencial de água foi medido durante essa fase e manteve-se na faixa de -0,3 a -0,6 MPa (Figura 17).

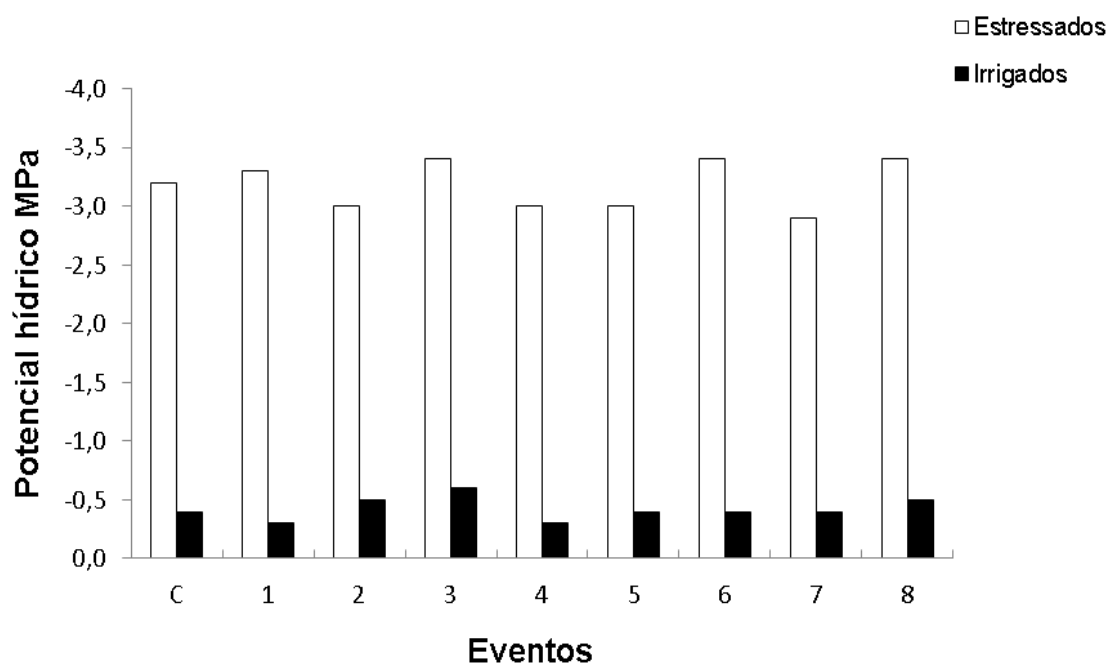
Após esse período, a irrigação foi suspensa e as plantas levaram 49 dias para atingir o estresse severo (Figura 16 B). Folhas foram coletadas para determinação do conteúdo de prolina quando as plantas atingiram o potencial entre -2,9 a -3,4 MPa (Figura 16).

Figura 16 – Plantas de *U. brizantha* cv. Marandu sob irrigação normal (A) e após 49 dias da suspensão da irrigação (B). Planta controle - C (não transformado) e plantas transformadas (1 a 8).



Fonte: A Autora (2018).

Figura 17 - Potencial hídrico (MPa) na fase fenológica vegetativa em *U. brizantha* cv. Marandu com irrigação e após 49 dias de déficit hídrico.

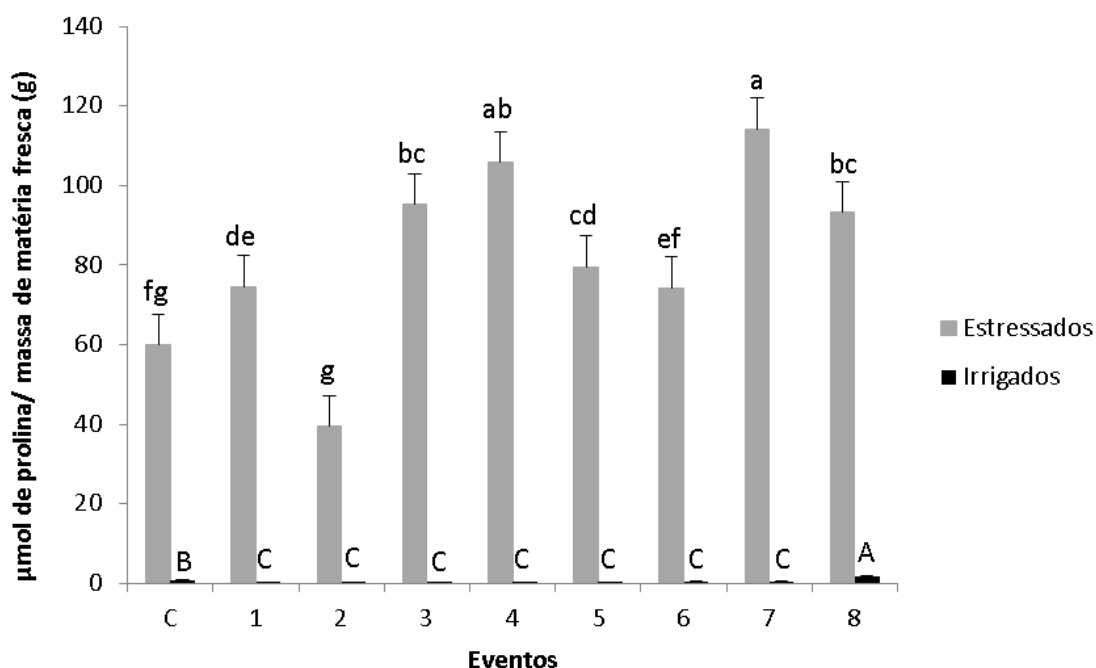


Fonte: A Autora (2018).

5.9 Determinação do Conteúdo de Prolina

A concentração de prolina nas folhas de *U. brizantha* cv. Marandu transformadas e sob condições normais de irrigação apresentou uma variação de 0,25 a 1,66 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (Figura 18). Quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico severo, os eventos transgênicos acumularam mais prolina em comparação ao controle, com exceção dos eventos dois e seis, o qual apresentou conteúdo de prolina similar ao controle, não diferindo estatisticamente deste. O evento sete foi o que apresentou maior acúmulo de prolina (114,23 $\mu\text{mol g}^{-1}$) sendo 1,9 vezes mais prolina em relação à planta controle/não transformada (59,97 $\mu\text{mol g}^{-1}$). (Figura 18).

Figura 18 - Concentração de prolina nas folhas de braquiária (controle – não transformado e eventos transgênicos: 1 a 8 sob condição normal de irrigação e submetidas a estresse hídrico (49 dias).



Fonte: A Autora (2018).

Plantas controle – planta não transformada (C) e eventos transformados (1a 8) sob condições normais de irrigação apresentando potencial hídrico variando de -0,3 a -0,6 MPa e sob estresse hídrico -2,9 a -3,4 MPa sobre a concentração de prolina ($\mu\text{mol g}^{-1}$) em estágio fenológico vegetativo. Barras com \pm erro padrão. Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si na condição de estresse hídrico e letras maiúsculas na condição de irrigação pelo teste de Tukey a 5%.

6 DISCUSSÃO

Poucas cultivares comerciais dessa espécie estão no mercado, pois existe dificuldade na transferência de genes entre as espécies do gênero *Urochloa*, devido as diferenças no modo de reprodução, havendo espécies sexuais e outras apomíticas e com diferença na ploidia desde diploides, tetraploides a hexaploides (VALLE et al., 2004).

A obtenção de plantas transgênicas de *Urochloa brizantha* pode ser uma alternativa aos programas de melhoramento convencional. Portanto, a otimização dos protocolos de transformação genética são de suma importância para essa espécie. Nesse trabalho foi desenvolvido um protocolo para a transformação de *Urochloa brizantha* cv. Marandu por biobalística.

No presente trabalho, ensaios histoquímicos foram realizados para detectar a expressão transiente do gene repórter *uidA* (*GUS*) em diferentes explantes tais como: epicótilos, calos de epicótilos e em sementes de *Urochloa brizantha* cv Marandu. Para a determinação dos melhores parâmetros de bombardeamento, primeiramente foram utilizados os epicótilos como explantes para detecção da expressão transiente (Figura 5). Por serem tecidos aclorofilados a detecção visual se torna mais fácil (Figura 6).

Porém esse tipo de explante não regenera plantas. Como o objetivo do trabalho era introduzir genes de interesse agrônomico e regenerar plantas transgênicas de *U. brizantha* foram testados também calos induzidos a partir de epicótilos cortados transversalmente e cultivados em meios contendo auxina (YAGUINUMA et al., 2018) e calos induzidos a partir do epicótilo de sementes maduras (TAKAMORI et al., 2015). Esses dois tipos de explante foram bem sucedidos para a regeneração de plantas *in vitro* em diferentes espécies do gênero *Urochloa* (YAGUINUMA et al. 2018; TAKAMORI et al., 2015).

Neste estudo, os primeiros ensaios de expressão transiente foram realizados utilizando partículas de tungstênio, porém um número muito baixo de pontos azuis foram detectados. A partir desse resultado optou-se por utilizar apenas as partículas de ouro para os demais ensaios. Em relação à distância entre o tecido alvo e o macrocarreador, verificou-se que 6 cm é a melhor distância a ser utilizada para transformação de *U. brizantha*.

A micropartícula utilizada no bombardeamento e a avaliação da expressão do gene introduzido devem ser avaliadas em relação à espécie e tecido utilizado, micropartículas de ouro são mais eficientes, pois são capazes de atingirem as camadas celulares mais profundas do tecido, devido a sua alta densidade, o que difere das micropartículas de tungstênio que conseguem penetrar somente as camadas superficiais dos tecidos (SANFORD, 1990; SANTARÉM, 2000).

Partículas de ouro são as preferidas para a transformação de gramíneas. Em cana de açúcar bombardeada com partículas de tungstênio e ouro, verificou-se que esse tipo de partícula foi mais eficiente por ser inerte e não ser tóxica (MATROODI et al., 2013). Em *Panicum virgatum* L., no genótipo SA37, um total de oito calos foram transformados por biobalística utilizando partículas de ouro, com pressão de ruptura de 4,442 kPa e na 9 cm de distância do tecido alvo (KING et al., 2014).

Na gramínea modelo para o estudo da biologia de plantas monocotiledoneas, *Setaria viridis*, um protocolo mediado por bombardeamento de partículas foi desenvolvido com estudo da expressão transiente da GFP (green fluorescente proteína). Os melhores parâmetros foram: distância de bombardeamento de 6 cm, partículas de ouro de 0,6 mm e pressão de 1100 psi (MOOKKAN, 2018). Parâmetros similares foram obtidos também para a *U. brizantha* como foi demonstrado neste trabalho (Figura 9).

Poucos trabalhos foram publicados até o momento para espécies do gênero *Urochloa*. Em *U. ruziziensis*, foi utilizado o bombardeamento com partículas de ouro em calos embriogênicos e brotos múltiplos, com pressão de -0,1 MPa, a uma distância alvo de 9,6 cm, pressão de hélio de 5 kgcm⁻². Calos embriogênicos mostraram números significativamente maiores de pontos de expressão de *GUS* quando comparado aos brotos múltiplos (ISHIGAKI et al., 2012).

Por outro lado, Cabral et al. (2018) utilizou micropartículas de tungstênio (M10), para a transformação de *U. brizantha* cv Marandu com pressão de 900 psi e na distância de 6 cm. Diferentes explantes foram utilizados e sementes foram preferíveis para visualização da expressão transiente em relação as células em suspensão e calos embriogênicos. Porém a eficiência de

transformação foi muito baixa resultando em apenas uma planta putativa que sobreviveu a aclimatização (CABRAL et al., 2018).

Sementes maduras pré inoculadas por cinco dias em meio contendo auxina picloram foram os melhores explantes para a expressão transiente de *uidA*. As auxinas sintéticas 2,4-D ou picloram atuam como reguladores do crescimento vegetal (KERBAUY, 2013) e são frequentemente utilizadas para estimular o desenvolvimento de calos embriogênicos *in vitro* em diversas espécies tanto mono como dicotiledôneas. Ambas as auxinas são capazes de induzir calos levando à regeneração de plantas em espécies do gênero *Urochloa*. O picloram já havia demonstrado superioridade em relação ao 2,4-D na regeneração de plantas em *U. brizantha* cv Marandu (TAKAMORI et. al., 2015), o que foi confirmado nesse trabalho (Figura 7).

Após o estabelecimento dos parâmetros de bombardeamento para *Urochloa brizantha* cv Marandu, sendo como fonte de explante calos derivados de sementes, distância de bombardeamento de 6cm, concentração da partícula de ouro 60 mg ml⁻¹ e pressão 1100psi, estes foram adotados para a inserção do vetor pSJ107 o qual contém os genes *AIPC:p5cs* e *35S:bar*.

A identificação ou seleção das células que tiveram o DNA exógeno integrado ao genoma da planta é um passo decisivo na produção de plantas transgênicas pois somente uma menor fração das células bombardeadas torna-se transgênica, enquanto a maioria das células permanece não transformada. Para diferenciar células transformadas de uma população de células não transformadas, genes de seleção são tipicamente co-transformados com o gene de interesse (JI et al., 2013). Nesse trabalho o gene *bar* o qual confere tolerância ao herbicida fosfinotricina (PPT), também conhecido como glufosinato de amônio foi incluído aos meios de seleção para cultivo dos explantes bombardeados.

Nos primeiros experimentos desse trabalho foi utilizada a concentração de 5 mg L⁻¹ de glufosinato de amônio nos meios seletivos, porém nenhuma planta foi regenerada. Assim, nos experimentos subsequentes a concentração do agente seletivo foi reduzida para 2 mg L⁻¹ permitindo a regeneração *in vitro*.

Em um trabalho para a determinação da concentração ideal de glufosinato de amônio para a inibição do desenvolvimento de calos de *U. brizantha* cv. Marandu *in vitro* foi constatado que a concentração de 10 mg L⁻¹

inibiu completamente a regeneração levando os calos a morte (PEREIRA et al., 2016). Já na concentração de 5 mg L⁻¹ o desenvolvimento foi inibido porém alguns escapes foram observados (PEREIRA et al., 2016).

Em *U. ruziziensis* duas plantas transgênicas foram regeneradas em meio contendo glufosinato de amônio na concentração de 10 mg L⁻¹ embora as plantas tenham florescido elas foram estéreis não produzindo sementes maduras (ISHIGAKI et al., 2012).

Foram regeneradas 91 plantas e 79 foram aclimatizadas com sucesso, sendo que 12 não sobreviveram nesta etapa (Figura 12). Notou-se que as plantas que morreram possuíam um sistema radicular pouco desenvolvido o que dificultou o estabelecimento dessas plantas no substrato.

Em algumas espécies o processo de aclimatização pode ser um fator limitante, pois é a etapa de transferência das plantas para condições externas (*ex vitro*). Nesse período um número considerável de espécies vegetais micropropagadas não consegue sobreviver, pois é a transição do heterotrofismo para o autotrofismo (HAZARIKA, 2003). A dificuldade de determinadas espécies em aclimatizar está relacionada as características da planta *in vitro*, tais como, um sistema radicular adventício frágil, pouco ramificado e isento de pelos radiculares, dificultando processos funcionais como absorção de água e nutrientes (HOFFMANN et al., 2001).

Dos 79 eventos aclimatizados, somente 34 eventos apresentaram amplificação de pelo menos um dos fragmentos correspondentes aos genes desejados (*bar* e *p5cs*). Esses dados revelam que mais de 50% dos eventos aclimatizados eram escapes. Isto pode ter ocorrido em função da redução na concentração do agente seletivo durante o processo de regeneração *in vitro* das plantas.

Apenas oito eventos apresentaram a amplificação dos fragmentos correspondentes aos dois genes de interesse resultando em 0,32% de eficiência de transformação (Figuras 13 e 14). O número de cópias inseridas em cada evento ainda não foi determinada, portando não podemos afirmar que sejam oito eventos distintos.

A eficiência de transformação por biobalística na maioria das gramíneas forrageiras é considerada baixa. No capim Napier (*Pennisetum purpureum* Schumach) a eficiência de transformação de 0,64% sendo que apenas quatro

plantas transgênicas foram regeneradas e caracterizadas como tendo o mesmo padrão de bandas demonstrando ser um único evento de transformação (GONDO et al., 2017). Em *U. ruziziensis* duas plantas transgênicas foram regeneradas (ISHIGAKI et al., 2012), e em *U. brizantha* apenas uma (CABRAL et al., 2018). Por outro lado em *Panicum virgatum* a eficiência de transformação chegou a 40% rendendo até 1,4 eventos por 30 calos bombardeados (KING et al., 2014).

Em milho, a transformação por biobalística a partir de calos embriogênicos friáveis foi de 0,2%; enquanto que em sementes cortadas longitudinalmente em duas metades iguais, foi de 1,3%, (ANDRADE VIDIGAL et al., 2014). Em outras gramíneas tais como o sorgo a eficiência de transformação via biobalística é mais elevada, em meristemas apicais de foi obtido 1,5% de eficiência (GIRIJASHANKAR et al. 2005) e em embriões imaturos a eficiência chegou a 20,7%, obtendo 25 eventos transgênicos (LIU; GODWIN, 2012).

A transformação por biobalística por ser um método físico de introdução de genes possui algumas desvantagem tais como: a tendência de criar grandes cadeias de transgene quebrados e rearranjados; inserção de cópias múltiplas e ainda há evidências da instabilidade e silenciamento de transgenes. Além disso, durante o bombardeamento as partículas podem ser inseridas em qualquer célula mesmo aquelas ainda organizadas e gerar plantas quiméricas (MERRICK; FEI, 2015).

Isso pode explicar a detecção de apenas oito eventos de braquiária contendo os dois genes (*bar* e *p5cs*) sendo que nos outros 26 eventos regenerados apenas um dos dois genes foi detectado. Embora tais desvantagens existam a biobalística é uma opção para a transformação de plantas que não são suscetíveis a infecção por *Agrobacterium* como é o caso da braquiária (CABRAL et al., 2005).

As plantas transformadas e aclimatizadas de *U. brizantha* e que amplificaram para o gene *bar* tiveram suas folhas pinceladas com o herbicida Finale[®] e demonstraram sensibilidade à ação do herbicida tornando-se progressivamente amareladas (Figura 15). Da mesma maneira, plantas de trigo e cana-de-açúcar transformadas com a construção *p35SCAMV:bar*

demonstraram tolerância a 1 e 2% do herbicida Finale[®], respectivamente (VENDRUSCOLO et al., 2007; MOLINARI et al., 2007).

Foi demonstrado que esse promotor, *p35SCAMV*, não foi eficiente para promover a expressão do gene *gus* em células de braquiária em diferentes explantes testados (SILVEIRA et al., 2003; CABRAL et al., 2005), enquanto que os promotores de monocotiledôneas tais como *pAct1* de arroz e *pUbi* de milho foram eficientes para expressão transiente do gene *gus* (SILVEIRA et al., 2003).

Neste trabalho, para monitorar a expressão transiente foi utilizado o vetor pANIC6E o qual contém o gene *GUSPlus* sob controle do promotor da Ubiquitina de *Panicum virgatum*. A expressão foi facilmente visualizada demonstrando que esse promotor é funcional em braquiária. Portanto, há evidências que para uma eficiente expressão de transgenes em braquiária os promotores dos genes devem ser específicos para monocotiledôneas.

A elevada porcentagem de plantas escape de braquiárias regeneradas pode ser devido a baixa eficiência do promotor *p35SCAMV* utilizado para promover a expressão do gene *bar*. A substituição por promotores específicos para monocotiledôneas pode aumentar a eficiência na seleção dos eventos transformados.

Já para o gene *p5cs* introduzido em braquiária, o promotor foi o sintético *AIPC*, o qual já demonstrou ser funcional em outras monocotiledôneas tais como arroz (SU; WU 2004), trigo (VENDRUSCOLO et al., 2007; PAVEI et al., 2016) e cana-de-açúcar (MOLINARI et al., 2007; GUERZONI et al., 2014).

Os oito eventos de braquiária que continham os dois genes (*bar* e *p5cs*) foram submetidos ao déficit hídrico severo (Figura 16) e a quantificação de prolina nas folhas foi realizada. Os eventos mostraram diferenças no acúmulo de prolina chegando até 1,9 vezes mais de prolina (matéria fresca) em relação à planta controle (não transformada) (Figura 18). Plantas de *U. brizantha* apresentam tolerância natural a seca, acumulando elevadas concentrações de prolina em resposta a deficiência hídrica (CARMONA MUÑOZ et al., 2003). Plantas transgênicas de braquiária levaram quase 50 dias sem irrigação para atingir a condição de déficit hídrico (-2,9 a -3,4 MPa) (Figura 17) enquanto que em trigo 14 dias de escassez de água as plantas apresentaram o potencial de -

3,47 a -3,52 MPa e em cana-de-açúcar cerca de 12 dias atingiram o potencial de -4,06 a -5,29 MPa (VENDRUSCOLO et al., 2007; MOLINARI et al., 2007).

Tanto em trigo quanto em cana-de-açúcar plantas transgênicas para a superexpressão do gene *p5cs* sob controle do promotor *AIPC* apresentaram acúmulo de 2,5 vezes mais prolina (matéria seca) em folhas quando comparados às plantas controle em condições de deficiência hídrica (VENDRUSCOLO et al., 2007; MOLINARI et al., 2007). Em arroz o acúmulo de prolina induzida por estresse salino ou déficit hídrico variou entre duas a cinco vezes entre as diferentes linhas transgênicas (SU; WU, 2004).

Sabe-se que a expressão de transgenes em plantas é influenciada por diversos fatores tais como: elementos regulatórios utilizados, posição cromossômica do inserto, devido a estrutura da cromatina, ou proximidade a elementos regulatórios endógenos no local de inserção (WEISING et al., 1988). Além disso, pode também ocorrer a inativação ou silenciamento do transgene devido à metilação do promotor juntamente com a condensação da cromatina, ou degradação de transcrições por diferentes mecanismos (RAJEEV KUMAR et al., 2015). Portanto, há necessidade de futuros estudos com esses oito eventos transgênicos de braquiária para a determinação do número de cópias inseridas avaliação da estabilidade e segregação dos transgenes e da fertilidade das plantas.

Os resultados da obtidos neste trabalho demonstram a viabilidade de obtenção de plantas transgênicas de *U. brizantha* com genes de interesse agrônomo por biobalística. Assim, essa metodologia pode vir a ser uma ferramenta aos programas de melhoramento da braquiária.

7 CONCLUSÃO

Em *Urochloa brizantha* cv Marandu a eficiência de transformação por biolística utilizando micropartículas de ouro foi de 0,32% para a inserção dos dois genes (*bar* e *p5cs*). Plantas transformadas e fenotipicamente normais foram regeneradas e aclimatizadas. A inserção do gene *p5cs* sob controle do promotor *AIPC* proporcionou um aumento da biossíntese de prolina nas plantas transgênicas sob déficit hídrico. Esse trabalho é o primeiro a obter plantas transgênicas de *U. brizantha* com a introdução de gene com característica de interesse agrônomo, possibilitando o desenvolvimento futuro de novas plantas transgênicas.

REFERÊNCIAS

- ABIEC. **Exportações brasileiras de carne bovina**. Annual report.48 p. 2017. Disponível em: <http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>. Acesso em: 28 mai. 2018.
- AHUJA, I. et al. Plant molecular stress responses face climate change. **Trends in plant science**, v. 15, n. 12, p. 664-674, 2010.
- ALCÂNTRA, P. B. Origem das brachiarias e suas características morfológicas de interesse forrageiro: In: ENCONTRO PARA DISCUSSÃO SOBRE CAPINS DO GÊNERO *BRACHIARIA*, Nova Odessa, 1986. **Resumos...** Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, p. 1-18, 1986.
- ALI, F.; BANO, A.; FAZAL, A. Recent methods of drought stress tolerance in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 82, n. 3, p. 363-375, 2017.
- ALVES, E. R.; CARNEIRO, V. T.; ARAUJO, A. C. Direct evidence of pseudogamy in apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Sexual plant reproduction**, v. 14, n. 4, p. 207-212, 2001.
- ANDRADE VIDIGAL, T. M. et al. Regeneração de plantas a partir de dois tipos de explantes de milho submetidos à transformação genética por biobalística. **Ciência Rural**, v. 44, n. 10, 2014.
- ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B.; CAMPOS, P. R. S. S. Melhoramento genético de plantas forrageiras tropicais no Brasil. **Archivos de zootecnia**, v. 57, n. 1, p. 61-76, 2008.
- ASHRAF, M. et al. Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. **Advances in Agronomy**, v.111, p.249-296, 2011.
- ASSIS, G. M. L. et al. Discriminação de espécies de *Brachiaria* baseada em diferentes grupos de caracteres morfológicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 576-584, 2003.
- BARBOSA, M. A. A. F.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; CECATO, U. Dinâmica da pastagem e desempenho de novilhos em pastagem de capim-tanzânia sob diferentes ofertas de forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, pp. 1594-1600, 2006.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, n. 1, p. 205-207, 1973.
- BERNINI, C.; MARIN-MORALES, M. A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios-Cambridge-**, p. 157-172, 2001.

BHASKARA, G. B.; YANG, T.; VERSLUES, P. E. Dynamic proline metabolism: importance and regulation in water limited environments. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 484, 2015.

BODDEY, R. M. et al. Nitrogen cycling in *Brachiaria* pastures: the key to understanding the process of pasture decline. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 103, n. 2, p. 389-403, 2004.

BONFIM-SILVA, E. M.; SANTOS, C. C.; SILVA, T. J. A. Wood ash fertilization on structural characteristics and chlorophyll index of tropical forage grasses. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 09, p. 1341, 2015.

BORGES DO VALLE, C.; JANK, L.; SIMEÃO RESENDE, R. M. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/camaras-setoriais-1/carne- bovina>. Acesso: dezembro 2017.

BUDAK, H.; KANTAR, M.; YUCEBILGILI KURTOGLU, K. Drought tolerance in modern and wild wheat. **Sci World J.**, v. 4, p.66–75, 2013.

BUNGENSTAB, D. J. (Ed.). **Sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta** : a produção sustentável. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2012. 239 p. il. color.

CABRAL, G. B. et al. Prospecção de cepas de *Agrobacterium spp.* para a transformação genética de braquiária. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2005.

CABRAL, G. B. et al. Genetic transformation of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu by biolistics. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 1789-1797, 2018.

CARMO ARAÚJO, S. A. et al. Características fotossintéticas de genótipos de capim-elefante anão (*Pennisetum purpureum* Schum.), em estresse hídrico. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, p. 1-7, 2010.

CARMONA MUÑOZ, I. et al. Resistencia a sequía de *Brachiaria* spp. I. Aspectos fisiológicos. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 26, n. 3, 2003.

CAMPOS, J. M. S. et al. In vitro induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**, v. 128, n. 1, p. 101-104, 2009.

CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotecnologia na agricultura. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 149-164, 2010.

CARVALHO, C. de et al. Anuário brasileiro de sementes 2017.

CARNEIRO, C. E. A. et al. Produção de prolina e suscetibilidade ao glufosinato de amônio em plantas transgênicas de citrumele Swingle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 747-753, 2006.

CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. Apomixia: em busca de tecnologias de clonagem de plantas por sementes. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.25, 2002.

CARNEIRO, R. C. et al. Principais riscos do processo de desenvolvimento em biotecnologia. **Inovar: Revista de ciencias administrativas y sociales**, v. 28, n. 70, p. 55-68, 2018.

CASTRO, P. R. C.; SOUZA, M. R. C. Tópicos de fisiologia: Estresse. **STAB**, Piracicaba, v. 33. n .4, p. 24-25. 2015.

CATASUS GUERRA, L. Las gramineas (Poaceae) de Cuba, 1. **Fontqueria**, v. 46, p. 259p, 1997.

CHEN, X. et al. The NAC family transcription factor OsNAP confers abiotic stress response through the ABA pathway. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 3, p. 604-619, 2014.

COSTA, K. A. P. et al. Efeito da estacionalidade na produção de matéria seca e composição bromatológica da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. 2005.

COSTA, N. L. et al. Considerações sobre o manejo de pastagens na Amazônia Ocidental. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 40, p. 37-56, 2007.

CVIKROVÁ, M. et al. Effect of drought and combined drought and heat stress on polyamine metabolism in prolineoverproducing tobacco plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.73, p.7-15, 2013.

DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The plant journal**, v. 4, n. 2, p. 215-223, 1993.

DHIR, S. et al. Optimization and transformation of *Arundo donax* L. using particle bombardment. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 39, p. 6460-6469, 2010.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

DUARTE, A. L. M. Efeito da água sobre o crescimento e o valor nutritivo das plantas forrageiras. **Revista Pesquisa & Tecnologia**, v. 9, n. 2, 2012.

FAGUNDES, J. L. et al. Características morfogênicas e estruturais do capim-braquiária em pastagem adubada com nitrogênio avaliadas nas quatro estações do ano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 1, p. 21-29, 2006.

FAROOQ, M. et al. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In: **Sustainable agriculture**. Springer, Dordrecht, 2009. p. 153-188.

FAOSTAT, FAO. Food and Agriculture Organisation (FAO). 2007.

FERNANDES, E. T.; CAIRO, P. A. R.; NOVAES, A. B. Respostas fisiológicas de clones de eucalipto cultivados em casa de vegetação sob deficiência hídrica. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 29–34, 2015.

FERRAZ, J. B. S.; DE FELÍCIO, P. E. Production systems—An example from Brazil. **Meat science**, v. 84, n. 2, p. 238-243, 2010.

FERRAZ, F. M.; NAKAMAE, I. J. Pastagens garantem o futuro da agropecuária brasileira. **Anualpec—Anuário da pecuária brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos**, p. 55-56, 2003.

FILIPPOU, P. et al. Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v.97, p.1-10, 2014.

GHISI, O. M. A. A. Brachiaria na pecuária brasileira: importância e perspectivas. **Encontro para discussão sobre capins do gênero Brachiaria**, v. 2, 1991.

GIRIJASHANKAR, V. et al. Development of transgenic sorghum for insect resistance against the spotted stem borer (*Chilo partellus*). **Plant Cell Reports**, v. 24, n. 9, p. 513-522, 2005.

GONDO, T. et al. Regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos derivados de ápices de brotos e produção de plantas transgênicas por injetor de influxo de partículas em capim anão-napier (*Pennisetum purpureum* Schumach.). **Plant Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 143-150, 2017.

GONÇALVES; G. S. Período crítico de interferência de plantas infestantes e seus efeitos sobre as características fisiológicas e nutricionais em laranja 'pera', no Amazonas. 2015, 88 f. Tese (doutorado em agronomia tropical) – Universidade Federal do Amazonas.

GRACIANO, E. S. A.; SANTOS, H. R. B.; NOGUEIRA, R. J. M. C. Trocas gasosas, eficiência fotoquímica e pigmentos fotossintéticos de cultivares de amendoim sob deficiência hídrica no solo. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science**, v.9, n.1, p.27-36, 2016.

GUERZONI, J. T. S. et al. Stress-induced Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*) gene confers tolerance to salt stress in transgenic sugarcane. **Acta physiologiae plantarum**, v. 36, n. 9, p. 2309-2319, 2014.

HARE, P.D.; CRESS, W.A.; VAN STADEN, J. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. **Journal of Experimental Botany** v.50, p.413-434, 1999.

HARWOOD, W. A. Advances and remaining challenges in the transformation of barley and wheat. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 5, p. 1791-1798, 2011.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current science**, p. 1704-1712, 2003.

HOFFMANN, A. et al. Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira “marubakaido”. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 2, p. 462-467, 2001.

HOLST-JENSEN, A. Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 6, p. 1071-1082, 2009.

IBGE. **Produção da pecuária municipal**. 2017. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualização/periodicos/84/ppm_2017_v44_br.pdf . Acesso em: 30 setembro 2017.

ISAAA). 2017. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2017**. ISAAA Brief No. 53. ISAAA: Ithaca, NY. 2017.

ISHIGAKI, G. et al. Fertile transgenic *Brachiaria ruziziensis* (ruzigrass) plants by particle bombardment of tetraploidized callus. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 5, p. 546-549, 2012.

JAGGA-CHUGH, S. et al. Optimization of factors influencing microprojectile bombardment-mediated genetic transformation of seed-derived callus and regeneration of transgenic plants in *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 109, n. 3, p. 401-410, 2012.

JAMES, C. et al. **Global status of commercialized biotech/GM crops: 2010**. Ithaca: ISAAA, 2010.

JANK, L; VALLE, C. B. ; RESENDE, R.M.S. Forragem tropical. **Criação de Culturas e Biotecnologia Aplicada**, v. 11, n. SPE, p. 27-34, 2011.

JI, Q.; XU, X.; WANG, K. Genetic transformation of major cereal crops. **International Journal of Developmental Biology**, v. 57, n. 6-7-8, p. 495-508, 2013.

KARIA, C. T.; DUARTE, J. B.; ARAÚJO, A.C.G. **Desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (trin.) Griseb. no Brasil**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2006.

- KELLER-GREIN, G.; BRIGITTE, L.; MAASS, J. H. **Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections**. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1996.
- KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- KLEIN, T. M. et al. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, v. 327, n. 6117, p. 70-73, 1987.
- KIM, T. H. Mechanism of ABA signal transduction: agricultural highlights for improving drought tolerance. **J Plant Biol**, v.57, n.1, p.1–8, 2014.
- KING, Z. R. et al. Biolistic transformation of elite genotypes of switchgrass (*Panicum virgatum* L.). **Plant cell reports**, v. 33, n. 2, p. 313-322, 2014.
- KISHOR, P. B. K. et al. Overexpression of [δ]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**, v. 108, n. 4, p. 1387-1394, 1995.
- KISHOR, P.B. K. et al. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current science**, p. 424-438, 2005.
- KISHOR, P. B. K.;SREENIVASULU, N. O acúmulo de prolina, por si só, está correlacionado com a tolerância ao estresse ou a homeostase da prolina é uma questão mais crítica ?. **Plant, cell & environment**, v. 37, n. 2, p. 300-311, 2014.
- KOICHI, T. et al. Overcoming of barriers to transformation in monocot plants. **J Plant Biotechnol**, v. 4, p. 135-141, 2002.
- KRENEK, P. et al. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: principles, methods and applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1024-1042, 2015.
- LAKSHMANAN, P. et al. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 41, n. 4, p. 345-363, 2005.
- LI, J.; TODD, T. C.; TRICK, H. N. Rapid in planta evaluation of root expressed transgenes in chimeric soybean plants. **Plant cell reports**, v. 29, n. 2, p. 113-123, 2010.
- LIMA, M. L. P et al. Estimation of voluntary intake of tanzania grass (*Panicum maximum*, Jacq. cv. Tanzania) rotationally grazed by lactating cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 6, p. 1919-1924, 2001.
- LISAR, S. YS et al. Water stress in plants: causes, effects and responses. In: **Water stress**. InTech, 2012.

LOBELL, D. B.; SCHLENKER, W.; COSTA-ROBERTS, J. Climate trends and global crop production since 1980. **Science**, p. 1204531, 2011.

LIU, G.; GODWIN, I. D. Highly efficient sorghum transformation. **Plant cell reports**, v. 31, n. 6, p. 999-1007, 2012.

MANN, D. G.J. et al. Gateway-compatible vectors for high-throughput gene functional analysis in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and other monocot species. **Plant Biotechnology Journal**, v. 10, n. 2, p. 226-236, 2012.

MASOUDI-SADAGHIANI, F. et al. Response of proline, soluble sugars, photosynthetic pigments and antioxidant enzymes in potato (*Solanum tuberosum* L.) to different irrigation regimes in greenhouse condition. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 1, p. 55, 2011.

MATHOBO, R.; MARAIS, D.; STEYN, J. M. The effect of drought stress on yield, leaf gaseous exchange and chlorophyll fluorescence of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Agricultural Water Management**, v. 180, p. 118, 125, 2017.

MATROODI, et al. Sugarcane (NCo310) Transient Transformation Using uidA Reporter Gene. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 89-95, 2013.

MEDEIROS, S. R.; MARINO, C. T. Carboidratos na nutrição de gado de corte. **Embrapa Gado de Corte-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2015.

MERRICK, P.; FEI, S. Plant regeneration and genetic transformation in switchgrass - a review. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 3, p. 483-493, 2015.

MILES, J. W. Apomixis for cultivar development in tropical forage grasses. **Crop Science**, v. 47, n. Supplement_3, p. S-238-S-249, 2007.

MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C.B do. Brachiaria: Biology. **Agronomy, and Improvement**, p. 288, 1996.

MILÉO, L. DE J. **Período crítico de interferência de plantas daninhas sobre características agronômicas e fisiológicas de duas variedades de mandioca (manihot esculenta crantz)**. 2014. 121 f. Tese (Doutorado em agronomia tropical) – Universidade Federal do Amazonas, 2014.

MIR, N. et al. Inhibiting tomato ripening with 1-methylcyclopropene. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 129, n. 1, p. 112-120, 2004.

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

MOOKKAN, M. Particle bombardment-mediated gene transfer and GFP transient expression in *Setaria viridis*. **Plant signaling & behavior**, n. just-accepted, p. 1-7, 2018.

MOUSQUER, C.J. et al. Intensificação do Sistema Produtivo de Bovinos de Corte: Suplementação á Pasto. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 11, n. 2, p. 3288-3308, 2014.

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

NAIR, R. M. Developing tetraploid perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 47, n. 1, p. 45-49, 2004.

PAIVA, A. P. R. **Produtividade de pastagens em diferentes épocas do ano em latossolo amarelo no brejo paraibano**. 2014.

PAVEI, D. et al. Response to water stress in transgenic (*p5cs* gene) wheat plants (*Triticum aestivum* L.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, n. 6, p. 776, 2016.

PEREIRA, A. V. et al. Tendências do melhoramento genético e produção de sementes de forrageiras no Brasil. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 7., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA/GEN, 2003. (Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em Anais de Congresso (Alice))

PEREIRA, A. V. C.; VIEIRA, L. G. E.; RIBAS, A. F. Optimal concentration of selective agents for inhibiting in vitro growth of *Urochloa brizantha* embryogenic calli. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 23, p. 1159-1167, 2016.

PEREIRA, R. C. et al. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1278-1285, 2012.

PETRILLO, C. P. et al. Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 3, p. 371-378, 2008.

QUESENBERRY, K. H. et al. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. **Euphytica**, v. 175, n. 1, p. 43-50, 2010.

RAJEEV KUMAR, Sarma; ANUNANTHINI, Pushpanathan; RAMALINGAM, Sathishkumar. Epigenetic silencing in transgenic plants. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 693, 2015.

- RESENDE, R. M. S. et al. Melhoria de forrageiras tropicais. In: SIMPÓSIO DE PASTAGEM E FORRAGICULTURA DO CAMPO DAS VERTENTES, 2., 2015, São João del Rei. **Anais...** São João del Rei: UFSJ, 2015. p. 114-130., 2008. (Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em Anais de Congresso (Alice))
- SANFORD, J. C. The biolistic process. **Trends in Biotechnology**, v. 6, n. 12, p. 299-302, 1988.
- SANFORD, J. C. Biolistic plant transformation. **Physiologia Plantarum**, v. 79, n. 1, p. 206-209, 1990.
- SANFORD, J. C.; SMITH, F. D.; RUSSELL, J. A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1993. p. 483-509.
- SANTARÉM, E. R. Métodos eficientes para a transformação genética de plantas. **Revista da Ciência & Tecnologia, Piracicaba, SP**, v. 8, n. 15, p. 81-90, 2000.
- SHAO, H.-B. et al. Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants—biotechnologically and sustainably improving agriculture and the environment in arid regions of the globe. **Critical reviews in biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 131-151, 2009.
- SHAO, H. B. et al. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. **Comptes rendus biologies**, v. 331, n. 3, p. 215-225, 2008.
- SHARMA, K. K.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; THORPE, T. A. Tecnologia de transformação genética: status e problemas. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 41, n. 2, p. 102-112, 2005.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current opinion in plant biology**, v. 6, n. 5, p. 410-417, 2003.
- SILVA, S.F.; FERRARI, J.L. Descrição botânica, distribuição geográfica e potencialidades de uso da *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex. A. Rich) Stapf. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p.302. 2012.
- SILVA, M. A. et al. Potencial produtivo da cana-de-açúcar sob irrigação por gotejamento em função de variedades e ciclos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, p. 241-249, 2014.
- SILVA, A. B.; CORRÊA LANDGRAF, P. R.; OLIVA MACHADO, G. W. Germinação de sementes de braquiária sob diferentes concentrações de giberelina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, 2013.

SILVA, W. et al. Índice de consumo e eficiência do uso da água em eucalipto, submetido a diferentes teores de água em convivência com braquiária. **Floresta**, v. 34, n. 3, 2004.

SILVEIRA, E. D. Evaluation of exogenous promoters for use in *Brachiaria brizantha* transformation. **J Plant Biotechnol**, v. 5, p. 87-93, 2003.

SILVEIRA, E. D. et al. Expressed sequence-tag analysis of ovaries of *Brachiaria brizantha* reveals genes associated with the early steps of embryo sac differentiation of apomictic plants. **Plant cell reports**, v. 31, n. 2, p. 403-416, 2012.

SOOD, P.; BHATTACHARYA, A.; SOOD, A. Problems and possibilities of monocot transformation. **Biologia Plantarum**, v. 55, n. 1, p. 1-15, 2011.

SOUZA, F. H. D. Usos alternativos da palhada residual da produção de sementes para pastagens. Embrapa Pecuária Sudeste, 2006.

SOUSA, B. M. L. et al. Piata palisade grass deferred with two distinct initial heights: luminous environment and tillering dynamics. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, n. 1, p. 36-43, 2013.

SOUZA SOBRINHO, F. et al. Melhoramento de gramíneas forrageiras na Embrapa gado de leite. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS, 7., Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2009.

SOUZA-KANESHIMA, D. et al. Meiotic behaviour in the first interspecific hybrids between *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria decumbens*. **Plant Breeding**, v. 129, n. 2, p. 186-191, 2010.

STRASSBURG, B. B. N. et al. When enough should be enough: Improving the use of current agricultural lands could meet production demands and spare natural habitats in Brazil. **Global Environmental Change**, v. 28, p. 84-97, 2014.

SU, J.; WU, R. Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. **Plant Science**, v. 166, n. 4, p. 941-948, 2004.

SZABADOS, L.; SAVOURE, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in plant science**, v. 15, n. 2, p. 89-97, 2010.

TAKAMORI, L. M. et al. Optimization of somatic embryogenesis and in vitro plant regeneration of *Urochloa* species using picloram. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, n. 5, p. 554-563, 2015.

TANG, N. et al. Constitutive activation of transcription factor OsbZIP46 improves drought tolerance in rice. **Plant Physiol**, v.158, n.4, p.1755–1768, 2012.

- TARDIEU, F.; GRANIER, C.; MULLER, B. Water deficit and growth. Coordinating processes without an orchestrator?. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 3, p. 283-289, 2011.
- TROVATO, M.; MATTIOLI, R.; COSTANTINO, P. Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. **Rendiconti Lincei**, v.19, p.325-346, 2008.
- USDA. **Livestock and Poultry: World Market and Trades**. 2017. Disponível em: https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf. Acesso em: 10 jan. 2018.
- VAIN, P. Thirty years of plant transformation technology development. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, n. 2, p. 221-229, 2007.
- VALLE, C.B.D. Avaliação de germoplasma e melhoramento genético de braquiárias. **Encontro para discussão sobre espécies do gênero**, 1991.
- VALLE, C. B.; SAVIDAN, Y. H. **Genetics, cytogenetics, and reproductive biology of *Brachiaria***. Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1996.
- VALLE, C. B. et al. Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. Clonagem de Plantas por Sementes: Estratégias de Estudo da Apomixia. Carneiro V.T. de C., Dusi D.M. de A.(Org.). **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, v. 1, p. 47-65, 2004.
- VALLE, C. B. et al. Melhoramento genético de *Brachiaria*. **Melhoramento de forrageiras tropicais**, p. 13-53, 2008.
- VASIL, I. K. The story of transgenic cereals: the challenge, the debate, and the solution—a historical perspective. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 41, n. 5, p. 577-583, 2005.
- VENDRUSCOLO, E. C. G. et al. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 10, p. 1367-1376, 2007.
- VERSLUES, P.E. et al. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, v. 45, p. 523–539, 2006.
- WANG, K.; FRAME, B. Biolistic gun-mediated maize genetic transformation. **Transgenic Maize: Methods and Protocols**, p. 29-45, 2009.
- WANG, Z. Y.; GE, Y. Rapid and efficient production of transgenic bermudagrass and creeping bentgrass bypassing the callus formation phase. **Functional plant biology**, v. 32, n. 9, p. 769-776, 2005.
- WEBB, K. J.; MORRIS, P. **Methodologies of plant transformation**. 1992.

WEISING, K.; SCHELL, J.; KAHL, G. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression, and applications. **Annual review of genetics**, v. 22, n. 1, p. 421-477, 1988.

WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Enciclopédia biosfera**, v. 6, n. 11, p. 1-23, 2010.

WORTHINGTON, M. L.; MILES, J. W. Reciprocal full-sib recurrent selection and tools for accelerating genetic gain in apomictic *Brachiaria*. In: **Molecular breeding of forage and turf**. Springer, Cham, 2015.

YAGUINUMA, D. H. et al. In vitro regeneration from leaf-base segments in three genotypes of *Urochloa spp.* **Crop And Pasture Science**, 2018.

ZHANG, L. L. et al. Effects of surface piezoelectricity and nonlocal scale on wave propagation in piezoelectric nanoplates. **European Journal of Mechanics-A/Solids**, v. 46, p. 22-29, 2014.

ZHANG, Y. et al. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. **Nature communications**, v. 7, p. 12617, 2016.

ZHAO, Z. et al. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation. **Plant Molecular Biology**, v. 44, n. 6, p. 789-798, 2000.

ZHOU, Q.; YU, B. Changes in content of free, conjugated and bound polyamines and osmotic adjustment in adaptation of vetiver grass to water deficit. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 6, p. 417-425, 2010.

ZHU, B. et al. Overexpression of a Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water-and salt-stress in transgenic rice. **Plant Science**, v. 139, n. 1, p. 41-48, 1998.

ZLATEV, Z.; LIDON, F. C. An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, p. 57-72, 2012.

CAPITULO 2

VALIDAÇÃO DE GENES NORMALIZADORES PARA ESTRESSES ABIÓTICOS EM *Urochloa brizantha*

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de gado e carne no mundo, sendo essa produção baseada em pastagens plantadas, pois fornecem alimentação e garantem baixos custos de produção (DIAS-FILHO, 2014). As variações na produção e qualidade das forrageiras são os principais limitadores na produtividade do rebanho bovino brasileiro (MARANHÃO et al., 2010).

As espécies vegetais e os genótipos de cada espécie podem apresentar alterações diversas e em vários níveis organizacionais devido aos estresses abióticos (OLIVEIRA, 2017). O mecanismo de tolerância das plantas em superar o estresse abiótico é produto de uma complexa relação entre as atividades das diferentes enzimas antioxidantes (XU et al., 2013). Em diferentes condições a habilidade de quantificar a expressão de genes é o pilar de qualquer estudo de função gênica (BUSTIN, 2000). Aos níveis transcricionais para quantificação, os métodos mais utilizados são: RNAseq, hibridação in situ, arranjo de cDNA e a RT-qPCR (transcrição reversa em reação da DNA polimerase quantitativa) (JOHNSON et al., 2014).

A reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-qPCR) em tempo real, é um método muito eficaz para quantificar os níveis de expressão de genes alvos (VALASEK.; REPA, 2005). E vem sendo bastante utilizada em estudos para determinar a expressão gênica em resposta aos estresses abióticos (LE et al., 2012). Isto deve-se ao fato de que a técnica é sensível, específica, apresenta custo-efetivo, é reprodutível, sendo amplamente aplicada para estudar a variação na expressão gênica de genes alvo em diferentes órgãos e tecidos de gramíneas, sob diferentes estresses abióticos (CHEN et al., 2015).

A acuracidade dos resultados da RT-qPCR é intimamente dependente da seleção e obtenção de genes de referência (ou genes normalizadores) estáveis (CHEN et al., 2015). A utilização de genes de referência apropriados é o método mais eficiente para normalizar a expressão relativa dos genes alvo

(DELPORTE et al., 2015). Estes genes são considerados ideais quando apresentam pouca ou nenhuma variação na expressão em diferentes amostras, independentemente, das condições experimentais (RADONIC et al., 2004).

Os genes de referência em espécies de plantas consideradas não modelo são identificados por meio de busca de sequências ortólogas de genes de espécies vegetais comuns, devido à limitada informação genética e de sequência entre elas (GONZÁLEZ-AGÜERO et al., 2013).

Para ranquear os genes de referência mais estáveis para a normalização da expressão relativa em amostras biológicas é necessário utilizar programas tais como: geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002), Normfinder (ANDERSEN et al., 2004), BestKeeper (PFAFFL et al., 2004) e RefFinder (XIE et al., 2012) que foram desenvolvidos para analisar os algoritmos estatísticos gerados. O programa RefFinder compila dados de diferentes programas computacionais, comparando e reclassificando os genes de referência testados com base na média geométrica dos pesos individuais de cada gene (XIE et al., 2012).

Em *Urochloa brizantha* nenhuma seleção sistemática de genes de referência para análise em condição de estresses abióticos foi relatada e existe pouca informação genômica disponível para a espécie. Portanto, o objetivo deste capítulo foi selecionar genes endógenos de referência em *Urochloa brizantha* submetidas a três estresses abióticos utilizando RT- qPCR. Posteriormente, os normalizadores selecionados serão utilizados para determinação da expressão relativa de genes tal como o *p5cs* nos eventos de braquiária transgênica submetidas ao déficit hídrico e/ou a outros estresses.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.

CHEN, Y. et al. Selection and validation of reference genes for target gene analysis with quantitative RT-PCR in leaves and roots of bermudagrass under four different abiotic stresses. **Physiologia Plantarum**, v. 155, n. 2, p. 138-148, 2015.

DELPORTE, M. et al. Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in *Cichorium intybus*. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 651, 2015.

DIAS-FILHO, M. B. Diagnóstico das pastagens no Brasil. **Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E)**, 2014.

GONZÁLEZ-AGÜERO, M. et al. Identification of two putative reference genes from grapevine suitable for gene expression analysis in berry and related tissues derived from RNA-Seq data. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 878, 2013.

JOHNSON, G. et al. **Quantitative Real-Time PCR**. v. 1160, 2014.

LE, D. T. et al. Evaluation of candidate reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in soybean tissues under various abiotic stress conditions. **PloS One**, v. 7, n. 9, p. e46487, 2012.

OLIVEIRA, C. **Mudanças fisiológicas e moleculares na cultura do arroz e em plantas daninhas C3 e C4 submetidas a estresses abióticos**. 2017.

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

RADONIĆ, A. et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, n. 4, p. 856-862, 2004.

VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, n. 3, p. 151-159, 2005.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. research0034. 1, 2002.

XIE, F. et al. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Molecular Biology**, v. 80, n. 1, p. 75-84, 2012.

2 ARTIGO

Artigo apresentado na íntegra, conforme publicado nas normas da revista Scientific Reports, volume 7, número 1, pagina 8502-8513, 2017. DOI:10.1038/s41598-017-09156-7.

Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-09156-7>.

Identification of Endogenous Reference Genes for RT-qPCR Expression Analysis in *Urochloa brizantha* Under Abiotic Stresses

Luciana Midori Takamori¹, Alyne Valéria Carrion Pereira¹, Gustavo Maia Souza², Luiz Gonzaga Esteves Vieira¹ and Alessandra Ferreira Ribas^{1*}

¹Graduate Program in Agronomy, Plant Tissue Culture Laboratory, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rod. Raposo Tavares, km 572, Limoeiro, 19067-175, Presidente Prudente-SP, Brazil

²Plant Physiology Department, Federal University of Pelotas (UFPEL), Rua Almirante. Barroso, 1734 – Centro, 96010-280, Pelotas -RS, Brazil

*Corresponding author: alessandra_ribas@hotmail.com, phone number +00 55 43 32292139

ABSTRACT

Urochloa brizantha is one of the most important warm season forage grasses in tropical countries. Despite its importance, there are few studies on gene expression in this species under stressful conditions. Real-time (RT-qPCR) is an accurate technique for gene quantification analysis, but reference genes must be validated under the same conditions used to assess the expression of the target genes. Here, we evaluated the stability of nine reference genes: Actin 12, Eukaryotic initiation factor 4A, Elongation factor-1 alpha, FTSH protease 4, U2 auxiliary factor, Succinyl Co-enzyme A, Tubulin alpha-5, Tubulin beta-6,

Ubiquitin conjugating enzyme. Total RNA was extracted from leaf tissues of *U. brizantha* subjected to 6, 12 and 24 h of cold and heat stresses (10 and 45 °C, respectively), and drought, including moderate (-0.5 to -0.7 MPa), severe (-1.1 to -1.8 MPa) and recovery after re-watering. The RefFinder web-based tool was used to rank the most stable reference genes for each stress. Elongation factor-1 alpha, Elongation factor-1 alpha or Ubiquitin conjugating enzyme, and Eukaryotic initiation factor 4A were the most stable genes for heat, cold and drought stress, respectively. The expression of Rubisco large subunit gene was normalized against the most stable gene selected by ReFinder for each stress.

Introduction

Native from Africa, signal grass [*Urochloa brizantha* (Hochst. Ex. A. Rich)] Stapf, formerly *Brachiaria brizantha*¹ is a perennial grass belonging to the Poaceae family that is mainly used for livestock farming. Brazil is the second largest cattle and beef producer in the world. That production is based on planted pastures, as they provide feed and ensure low production costs². Despite its great importance, this species is still considered a 'genomic orphan' due to limited availability of genetic and genomic information.

Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) is considered the most accurate and reliable technique to measure gene expression and to validate data obtained by other methods like cDNA microarrays and RNA-seq. For some genes with very low levels of transcription, only RT-qPCR technique can detect such a small number of mRNA copies³. However, accurate normalization is a crucial step for the correct measurement of gene expression since the expression of constitutive genes might vary from cell to cell and according to the experimental conditions; therefore, the expression stability of candidate reference genes has to be verified before each research condition⁴.

Different algorithms have been developed to identify the best reference gene(s) among a group of potential candidate genes. NormFinder⁴, geNorm⁵, BestKeeper⁶ and Δ Ct method⁷ are the most commonly methods used for this propose. These softwares calculate a measure of the stability of potential reference genes by comparing their individual stability in relation to the other

tested genes under different experimental conditions. RefFinder⁸ is a web-based tool that integrates the four algorithms cited before. Based on the rankings from each program, it calculates the geometric mean to establish a comprehensive rank from a panel of candidate genes.

In *U. brizantha*, only one study investigated the expression profile of eight candidate reference genes in sexual and apomictic accessions of this species⁹. To our knowledge, there is no report regarding the identification of the stably expressed reference genes in *U. brizantha* for experimental conditions such as heat, cold and drought stresses.

In this work, we evaluate the suitability of nine reference genes [Actin 12 (*ACT12*), Eukaryotic initiation factor 4A (*eIF4a*), Elongation factor 1-alpha (*EF1- α*), FTSH protease 4 (*FTHS*), U2 auxiliary factor (*U2AF*), Succinyl Co-enzyme A (*SucCoa*), Tubulin alpha-5 (*α -TUB5*), Tubulin beta-6 (*β -TUB6*) and Ubiquitin conjugating enzyme (*UbiCo*)] as candidates for normalization in RT-qPCR assays to study the transcriptional changes involved in the responses of *U. brizantha* to three different abiotic stresses using the RefFinder web-based tool⁸.

In addition, considering that Rubisco activity is highly regulated in response to abiotic stresses¹⁰, the relative expression of the plastidial large subunit of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (*rbCl*) gene in leaves of *U. brizantha* plants under the abiotic stresses was calculated to assess the reliability of the chosen reference genes to normalize the RT-qPCR data.

Results

The description of the nine genes tested in this work and their genebank accession number are in Table 1. Primer sequences, amplicon sizes and amplification efficiency values are in Table 2. The primer efficiency was calculated with LinRegPCR software, where 2.0 means 100% efficiency (Table 1).

The mean efficiency values for the primer pairs (three replicates) ranged from 1.90 (*U2AF*) to 2.07 (*β -TUB6*) that means 95 to 103.5% efficiency,

respectively. The melting curve analysis performed at the end of RT-qPCR reactions for all selected candidate genes to check the specificity and integrity of the PCR products showed the presence of a single peak (Fig. 1). In addition, regular PCR reaction using the primer pairs followed by agarose gel electrophoresis revealed a single DNA band in each gel lane (Fig. 2).

In order to select the best stable genes for normalization, expressions of the selected candidate reference genes were compared using leaf tissue of *U. brizantha* cv. Marandú plants under three abiotic stresses: drought, cold and heat shocks. The means and ranges of the Cq values are an indication of the most stable reference genes across all samples for each stress. The Cq means for all genes ranged from 22.8 (*UbiCo*) to 34.4 (*U2AF*) for drought, 24.9 (*UbiCo*) to 33.7 (*U2AF*) for cold and 24.3 (*ACT12*) to 33.0 (*FTSH*) for heat stress. The lowest Cq values were 19.6 (*UbiCo*) for drought, 23.7 (*UbiCo*) for cold and 22.5 (*ACT12*) for heat stress, while the highest values were 36.5 and 35.9 (*U2AF*) for drought and cold stress, respectively, and 35.9 (*FTSH*) for heat stress (Fig. 3). The coefficients of variation (CV%) of the Cq values ranged from 2.89 (*U2AF*) to 8.2% (*UbiCo*) for heat stress, 3.4 (*EF1 α*) to 5.5% (*β -TUB6*) for cold stress and 2.9 (*α -TUB5*) to 7.8% (*UbiCo*) for drought stress. To calculate the gene stability values of reference genes for gene expression studies in *U. brizantha* we used RefFinder⁸, a freely available web-based tool that combines the results from geNorm, NormFinder, and BestKeeper and Δ Ct methods. When all stresses were considered together the NormFinder and Δ Ct methods showed exactly the same classification for all genes from the most to least stable gene: (*eIF4a* > *α -TUB5* > *β -TUB6* > *SucCoa* > *ACT12* > *EF1- α* > *UbiCo* > *U2AF* > *FTSH*) (Fig. 4). On the other hand, for the BestKeeper and geNorm algorithms only the two least stable genes ranked at the same position (Fig. 4). Considering all stress together *α -TUB5* was the most stable gene, while the reference gene *FTSH* was considered the least stable gene in all four algorithms and in the comprehensive ranking generated by RefFinder (Fig. 4).

The rankings of the four algorithms (geNorm, NormFinder, and BestKeeper and Δ Ct method) and the RefFinder comprehensive ranking for each stress separately is shown in Table 2. The most and the least stable genes do not rank at the same position for all four algorithms. For heat stress,

the most stable gene ranked by the NormFinder and ΔCt methods was *EF1- α* , while *β -TUB6* was selected by the geNorm and BestKeeper. *UbiCo* was ranked as the least stable reference gene, with exception of the BestKeeper software that selected *FTSH* instead.

Table 1 List and description of the genes used in this study. Primer sequence (5' - 3") employed in the RT-qPCR analysis, amplicon sizes and LinRegPCR derived PCR efficiency values

Gene Name	NCBI genbank Accession number	Gene symbol	Forward primer	Reverse primer	Amplicon size (bp)	Primer efficiency \pm SD	R
Actin 12	JG436709.1	<i>ACT12</i>	GGGTGGAGAGAGATTGCAGGTTA	GGGAACTGAGGCAACCACAGA	85	1.99 \pm 0,073	0,9861
Eukaryotic initiation factor 4A	EZ000622	<i>eIF4a</i>	CAGGTGTCCCTGGTCATCAACTAT	GAAACGACCTCTACGACCAATGC	81	2.01 \pm 0,025	0,9998
Elongation factor-1 alpha	EZ000623	<i>EF1-α</i>	CAAGGCTGCTGCCAAGAAGA	CTGCAAGAACCAGCCTTGAACA	111	1.97 \pm 0,052	0,9887
FTSH protease 4	JG437233.1	<i>FTSH</i>	GCAACTTATGGACCAGGAGGTT	CGCACTGGGTTTCATCAATCA	115	1.97 \pm 0,007	0,9995
U2 auxiliary factor	JG436537.1	<i>U2AF</i>	CGCCACCTGCAAAGATATT	GGTGCTGGTAAGCAGTCCTCAT	104	1.90 \pm 0,015	0,9984
Succinyl Co-enzyme A	GE617476	<i>SucCoa</i>	ATGTACTTTGCCATCACCCCTTGA	TCAATACTGGTTCCTCCCTTGCT	80	1.94 \pm 0,029	0,9992
Tubulin alpha-5	GE617477	<i>α-TUB5</i>	CGTGTGCATGATCAGCAACA	GCGCTTGGCGTACATCAGAT	85	1.98 \pm 0,019	0,9765
Tubulin beta-6	JG436975.1	<i>β-TUB6</i>	GTACCAGGACGCAACTGCTGAT	GAAATCTGCCTGCCCTAGAAGCT	119	2.07 \pm 0,018	0,9989
Ubiquitin conjugating enzyme	GE617481.1	<i>UbiCo</i>	CATCTGCTCCCTGCTGACTGA	GCCGGTCCGTCTTGTACATATG	80	1.92 \pm 0,049	0,9247
Rubisco large subunit from <i>U. Panicoides</i>	HE573318.1	<i>rbCl</i>	CGGAGTACGAAACCAAGGATACTG	ACTGCAGCCCCTGCTTCTT	91	1.97 \pm 0,007	0,9994

Table 2 Ranking of candidate reference genes according to stability values in a pool of *Urochloa brizantha* leaves samples subjected to various abiotic stresses

Gene Name	geNorm		NormFinder		BestKeeper		ΔCt		RefFinder	
	Rank order	Average expression stability (M)	Rank order	Stability Value (SV)	Rank order	Standard deviation [±CP]	Rank order	Average of standard deviations	Rank order	Geometric mean of ranking values
Heat Stress										
<i>EF1-α</i>	6	1,297	1	0,727	5	1,21	1	1,35	1	2,34
<i>U2AF</i>	2	0,813	4	0,988	2	0,78	4	1,44	2	2,38
<i>β-TUB6</i>	1	0,813	8	1,472	1	0,76	8	1,73	3	2,83
<i>Act12</i>	5	1,231	2	0,788	6	1,46	2	1,39	4	3,31
<i>α-TUB5</i>	3	0,976	5	1,009	3	1,12	5	1,47	5	3,87
<i>eIF4a</i>	7	1,374	3	0,943	8	2,02	3	1,41	6	4,74
<i>SucCoa</i>	4	1,109	6	1,018	4	1,19	6	1,49	7	4,90
<i>FTSH</i>	8	1,453	7	1,360	9	2,35	7	1,68	8	7,71
<i>UbiCo</i>	9	1,529	9	1,517	7	1,77	9	1,80	9	8,45
Cold Stress										
<i>EF1-α</i>	1	0,667	4	0,592	1	0,84	3	1,18	1	1,86
<i>UbiCo</i>	3	0,824	1	0,501	4	0,91	1	1,15	2	1,86
<i>α-TUB5</i>	2	0,667	2	0,549	5	0,90	2	1,16	3	2,11
<i>eIF4a</i>	4	0,915	3	0,591	6	0,98	4	1,18	4	4,12
<i>SucCoa</i>	5	1,010	5	0,992	8	1,24	5	1,40	5	5,62
<i>Act12</i>	7	1,109	8	1,360	2	0,87	8	1,55	6	5,66
<i>FTSH</i>	8	1,206	7	1,247	3	0,90	7	1,55	7	5,66
<i>β-TUB6</i>	6	1,105	6	1,237	9	1,52	6	1,54	8	6,64
<i>U2AF</i>	9	1,392	9	1,496	7	1,00	9	1,73	9	8,45
Drought Stress										
<i>eIF4a</i>	1	0,565	1	0,656	6	0,96	1	1,26	1	1,57
<i>U2AF</i>	2	0,565	2	0,761	3	0,92	2	1,31	2	1,86
<i>α-TUB5</i>	5	1,208	5	1,155	1	0,74	6	1,54	3	3,50
<i>SucCoa</i>	6	1,261	3	0,772	4	0,93	3	1,33	4	3,83
<i>β-TUB6</i>	4	1,110	6	1,210	2	0,78	5	1,53	5	3,94
<i>EF1-α</i>	3	1,023	8	1,301	5	0,95	7	1,61	6	5,38
<i>Act12</i>	7	1,324	4	0,867	7	1,03	4	1,36	7	5,29
<i>FTSH</i>	8	1,414	7	1,294	8	1,11	8	1,64	8	7,74
<i>UbiCo</i>	9	1,474	9	1,437	9	1,51	9	1,68	9	9,00

For cold stress *EF1- α* was ranked as the most stable by geNorm and BestKeeper while *UbiCo* by NormFinder and Δ Ct. For drought stress, *eIF4a* was ranked as most stable for all methods, except for BestKeeper; under this stress condition, the *UbiCo* was ranked as the least stable by the four algorithms (Table 2). Considering the comprehensive rank generated by RefFinder for each stress separately, the most stable genes were *EF1- α* , *EF1- α* or *UbiCo* and *eIF4a* for heat, cold and drought stresses, respectively, whereas the genes ranked as the least stable were *UbiCo* (heat and drought) and *U2AF* (cold) (Table 2).

The analysis of the transcriptional profile of the *rbCl* gene in leaves of *U. brizantha* cv. Marandú subjected to the various abiotic stresses was normalized against all genes from the most to the least stable gene selected by the ranking generated by RefFinder (Table 2). The results in figure 5 indicate that different reference genes can influence target gene relative expression levels. Our results showed that *EF1- α* was progressively upregulated under heat stress. However, when using the least stable gene (*UbiCo*) for that same stress treatment, the mRNA level showed a 5-fold difference in the severe heat stress condition (24 h at 45 °C) compared to the value detected using *EF1- α* (Fig. 5A).

For the cold stress treatment, the relative expression patterns of *rbCl* gene were very similar when normalized with the three most stable genes ranking by RefFinder (*EF1- α* , *UbiCo* and α -*TUB5*). In contrast, when normalized against the least stable gene (*U2AF*), the target gene *rbCl* showed a quite different expression pattern. When the *EF1- α* gene was used as reference, a 1.5 fold increase in transcript abundance of the *rbCl* gene after 6 h at 10°C was detected, while a near 8-fold difference was observed when the transcripts were normalized against *U2AF* (Fig. 5B).

On the other hand, there was no noticeable difference between the *rbCl* expression in plants exposed to drought stress treatments when the data was normalized against the two most (*eIF4a* and *U2AF*), or the least stable gene (*UbiCo*), for the severe water deficit and recovery conditions. Although all algorithms, including RefFinder, ranked *UbiCo* as the least stable reference gene for normalization in leaves of *U. brizantha* submitted to drought stress (Table 2), the *rbCl* gene was shown to be slightly down-regulated across all water deficit

treatments, similarly to the results obtained using the most stable reference genes (Fig. 5C).

Discussion

RefFinder⁸, an easy to use web-based tool that integrates the currently most used methods (geNorm, NormFinder, BestKeeper and the comparative Δ Ct method) was used to compare and rank a set of nine reference genes for assessing gene expression in *U. brizantha* plants under three abiotic stresses: heat, cold and drought. The geNorm determines the average pairwise variation (V) for a candidate reference gene in comparison with all other tested reference genes by calculating the expression stability measure (M). The NormFinder software compares each gene to the mean derived from the dataset to identify the gene(s) with the greatest stability⁵. BestKeeper directly uses Cq values as the input to calculate the geometric and arithmetic mean, minimal and maximal value, standard deviation and coefficient of variance⁶. Δ Ct method approach compares relative expression of pairs of genes within each sample⁷. Comparisons among these methods have been frequently reported and, in many cases, a set of candidate genes selected by those approaches does not rank at same position¹¹⁻¹⁵.

Based on the rankings obtained from each method, RefFinder gives an appropriate weight to individual genes and calculates the geometric mean of their weights for the overall final ranking⁸. The composite scores from RefFinder allow for the validation of the most stable reference genes. In this work, only the NormFinder algorithm and the Δ Ct method gave the same rank order when considering all stresses together.

From the set of reference genes tested, tubulin alfa-5 (α -TUB5) was found to be the most stable while *FTSH* ranked as the least stable gene across all stresses (drought, cold and heat) in *U. brizantha* as calculated by RefFinder. This gene (α -TUB5) is one of the most commonly used as reference gene for the analysis of relative transcript expression levels; nevertheless it was considered one of the most unstable reference among 32 genes used for quantification of gene expression in wheat in various tested conditions, including different tissues,

developmental stages and temperature stresses¹⁶. Tubulin was also found to be the second most stable for normalization of different tissues of switchgrass plants (*Panicum virgatum*) considering different abiotic stresses (drought, high salinity, cold, heat, and waterlogging) altogether. However, when each stress was analyzed separately, this gene was not ranked in the same position, presenting the largest variation in transcript levels between the stresses¹⁷.

As the expression of most the reference genes varied under different abiotic stresses, no single gene could be considered suitable for normalization of all experiments. Thus, it is more appropriate to select the reference genes for each specific stress. In this work, the eukaryotic initiation factor (*eIF4a*), which mediates the binding of mRNA to the ribosome, functioning as a subunit of the initiation factor complex *eIF4a*¹⁸, was considered the most stable gene under drought stress using RefFinder. The *eIF4a* has also been identified as the most suitable reference gene for normalization in gene expression studies of sugarcane under drought treatments¹³. For different abiotic stresses, including drought, salt and heat waterlogging and ABA treatments, the *eIF4a* gene ranked as one of the best reference genes for normalization of RT-qPCR data in perennial ryegrass (*Lolium perenne*), although not always ranked first for all stresses¹⁹.

Eukaryotic elongation factor 1 alpha (*EF1- α*), which catalyzes the binding of aminoacyl-trna to the A-site of the ribosome by a GTP-dependent mechanism²⁰, was identified as the most stable reference gene for both heat and cold stresses by the RefFinder tool. In several species and at different experimental conditions, *EF1- α* has been selected as one of the most stable genes. For example, it was considered the most stable gene in *Caragana intermedia*, a drought-resistant desert shrub, subjected to cold and salt stress¹². In addition, for gene expression normalization in coffee plants under abiotic stresses, *EF1- α* was one of the recommended reference genes²¹.

In several species of grasses, the *EF1- α* gene has been selected as one of the most stable genes under different conditions. In perennial ryegrass, *EF-1 α* and *UBQ5* genes were the most stably expressed reference genes in leaves during plant development²². This same combination of reference genes were found to be a reliable for RT-qPCR data normalization in aerial tissues of *Lolium temulentum* plants under abiotic stresses²³. In male and female reproductive tissues, spikelets,

roots and leaves of *U. brizantha*, the genes *EF1- α* and *UbiCo* were the more stable, while for ovary tissues, where apomictic and sexual reproduction occur, the best ranked reference genes were *UbiCo*, *eIF4a* and *EF1- α* ⁹.

The genes *EF1- α* and *eIF4a* are among the most stable reference genes for normalization in different monocot plant species, such as maize under heat and cold stress²⁴ and switchgrass^{25,26}. In *Brachypodium distachyon*, the *EF1- α* was the most stable gene for cold and heat treatments²⁷. Also, in leaves of creeping bentgrass (*Agrotis stolonifera*) under cold stress, *EF1- α* and *Ubi3* (E3 ubiquitin protein ligase) were selected by RefFinder as the most stable genes for normalization²⁸. Besides that, *EF1- α* and RNA POL II were identified as the most appropriate internal controls for dehydration stress-related expression analyses in foxtail millet (*Setaria italica*)²⁹.

In our work, as observed in other grass species, the *EF1- α* gene was ranked by RefFinder at the first position in gene stability for cold and drought stresses in leaves of *U. brizantha*. Ubiquitin-conjugating enzyme, ranked in the second position for cold stress, was also one of the most suitable reference genes across different cold treatments in switchgrass¹⁷. Elongation factor-1 alpha and Ubiquitin-conjugating enzyme E2 were also ranked as the most stable genes across individual and multiple abiotic stresses, and also various developmental tissues in pearl millet (*Pennisetum glaucum*)³⁰. On the other hand, *EF1- α* was considered the least stable gene for four abiotic stresses (drought, salt, dark and heat) in *Reaumuria soongorica*, a plant that is tolerant to extremely drought conditions, while the histone *H2A* and eukaryotic initiation factor 4A-2 (*eIF4a*) were considered the most stable genes for those conditions³¹.

Aiming to validate the reference genes selected for studies with *U. brizantha* plants under the three major abiotic stresses (heat, cold and drought) we evaluated the relative expression of the plastidial *rbCl* gene normalized to reference genes according to RefFinder rank. The plastidic *rbCl* gene encodes the large subunit of the primary CO₂ fixation enzyme Rubisco in the mature C₄ leaves of *U. brizantha* and has been used to validate candidate reference genes in plants submitted to abiotic stress³¹.

When normalization of *rbCL* gene was performed with reference genes poorly ranked according to RefFinder, a clear over-estimation of transcript

abundance the target gene was observed in some samples, particularly in leaves subjected to heat and cold stresses. For drought stress, a high variation on expression pattern was observed depending on the reference gene used for normalization, except for the two better-ranked genes that showed exactly the same profile.

The analysis of the transcriptional profile of the *rbCl* gene in plants of *U. brizantha* cv. Marandú normalized with *EF1- α* , ranked as the most stable gene, showed that it was progressively upregulated under heat stress. C4 plants, such as *U. brizantha*, are generally adapted to warm environments. This fact could be explained by the increased CO₂ assimilation rates at high temperatures at the place of Rubisco in the photosynthetic bundle sheath³². The increased transcript levels of large subunit of Rubisco was also observed during heat stress in tobacco, a C3 species, where increased respiration did not cause a significant change in photosynthesis³³.

The analysis of the transcriptional profile of the *rbCl* gene in plants of *U. brizantha* cv. Marandú normalized with *EF1- α* showed that this gene was progressively upregulated under heat stress. This observation was expected since C4 plants, such as *U. brizantha*, are generally adapted to warm environments. This fact could be explained by the increased CO₂ assimilation rates at high temperatures at the place of Rubisco in the photosynthetic bundle sheath³². The increased transcript levels of the large subunit of Rubisco was also detected during heat stress in tobacco, a C3 species³³.

For the cold treatment, the relative expression of *rbCl* normalized against the *EF1- α* showed only a slight increase in the transcript abundance after 6 hour at 10 °C and then a small but progressive decline until 24 °C of cold stress. This small variation in *rbCl* transcripts was expected since only in long-term acclimation the large subunits of rubisco increased in abundance³⁴. It occurs because plants grown at low temperatures have higher amounts of photosynthetic enzymes, including Rubisco to compensate for decreased activities of the enzymes at low temperatures³⁴. In contrast, when the *rcbl* gene was normalized against the less stable reference gene (*U2AF*), a large variability was observed, illustrating the low expression stability when using this gene for normalization of data from cold stress treatment.

The relative expression of *rbCl* gene against the two most stable reference genes *eIF4a* and *U2AF* showed the same profile. The *rbCl* gene was down-regulated under drought stress treatment. There was no remarkable expression differences between the most and the least stable candidate references used for normalize *rbCl* gene in *U. brizantha* subjected to drought stress. The *rbCl* was down-regulated when *U. brizantha* plants were exposed to the drought stress treatments using either the most stable or the unstable reference gene. In agreement with our results, the quantity of *rbCl* mRNA transcript was reduced when *Pinus halepensis* plants were subjected to drought stress³⁵. This was expected as Rubisco was proved to be down-regulated in several stressful conditions that impose alterations in photosynthesis rate and carbon assimilation^{32, 37}.

The use of the stable reference genes resulted in the consistency of *rbCl* gene expression according to the literature, as discussed above. In contrast, biases were produced when the less stable reference genes were used as internal control, which could lead to misinterpretation of the *rbCl* expression patterns in *U. brizantha* plants under different environmental stresses.

To our knowledge, this is the first detailed report on selection and validation of reference genes for RT-qPCR of *Urochloa brizantha* plants under different abiotic stresses. Our results showed the stability of nine selected genes by using RefFinder to rank the potential candidate reference genes. Based on this approach, α -*TUB5* was ranked as the overall most suitable reference gene across the multiple abiotic stresses tested - drought, cold and heat. However, different reference genes are recommended for gene expression normalization for *U. brizantha* under those stress conditions: *EF1- α* for heat, *EF1- α* or *UbiCo* for cold and *eIF4a* for drought stress. In contrast, the frequently used reference genes *UbiCo* (for drought and heat) and *U2AF* (for cold) were the least suitable for the conditions used in this work. The appropriateness of these genes for further studies of abiotic stresses in *U. brizantha* was confirmed by the expression the *rbCl* gene after normalization.

Methods

Plant Material

Signal grass seeds from the 2012/13 season kept in cold storage at 15°C were sown in trays containing Bioplant® substrate. Forty days after sowing, the seedlings were transferred to pots containing 5 kg of sandy soil (Ferric alisol). Soil acidity was corrected with dolomitic limestone and treated with 10-10-10 (NPK) fertilizer. The plants were cultivated in a greenhouse under natural light and long-day photoperiod of 16/8 h (light/dark) at 28°C. The plants were irrigated daily with 500 ml of tap water.

Cold and heat stresses

The stress treatments started five weeks after transferring the plants to pots. Initially, the pots containing two plants each were transferred to a phytotron (Eletrolab model EL011, São Paulo, Brazil), where they were kept for one week at 25°C/day and 22°C/night with a photoperiod of 16-h light (intensity 400 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and 8-h dark. The pots were irrigated every day to the maximum soil retention capacity.

The temperatures treatments were carried out after the plants were held for one week under the conditions described above. Sixteen pots containing two plants each were used for each experiment. Four pots were used as control (normal phytotron temperatures prior to stress treatments). After collecting the samples from the control plants, the other twelve pots were subjected to constant temperature of 10 or 45 °C for 24 h for cold or heat shock, respectively. For all treatments, each sample were constituted by six pooled young flag leaves collected before the beginning of each stress and after 6, 12 and 24 h under stressful conditions.

Drought stress

This experiment was carried out under the same conditions depicted above for the initial growth of the plants in a greenhouse. Twenty pots, with two five weeks-old plants per pot, were used in this experiment. The plants were kept at 100% field capacity for a week and then exposed to four watering regimes: 1) No stress (soil water-holding capacity); 2) moderate stress (soil water content maintained at 50% of the maximum soil retention capacity until reaching -0.5 to -0.7 MPa); 3) severe stress (soil water content maintained at 20% of the maximum soil retention capacity -1.0 to -1.8 MPa); and 3) recovery (full-irrigation to soil saturation following the severe stress). The soil moisture was measured daily using sensors (model EC-TM Decagon devices, Pullman, USA). Leaf water status was monitored with a pressure chamber instrument (model PMS 1000, Oregon, USA). The light intensity at the green house was about $900 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ during the day.

Biological replicates were represented by three pots with two plants each. Each sample was composed by a pool of six flag leaves collected from each pot subjected to the different stress levels. The samples were placed in plastic bags, frozen with liquid N_2 and stored at -80°C until RNA extraction.

RNA extraction and cDNA synthesis

Each leaf sample (30 mg) was ground in liquid N_2 using a mortar and pestle to a fine powder and quickly transferred to pre-cooled eppendorf tubes for RNA extraction. The total RNA was isolated using RNA Mini Kit Purelink™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) and the samples were treated with TURBO DNase™ (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. After DNase treatment, the samples were purified with phenol/chloroform, precipitated with isopropanol and resuspended in 20 μl of DEPC (diethylpyrocarbonate) water. The quality and quantity of total RNA were assessed with a Nanodrop ND-1000™ spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). Only RNA with OD 260:280 ratios always greater than 1.8 was used. The integrity of the RNA was checked upon electrophoresis in a 1.2 % agarose gel with Tris-Borate-EDTA buffer (pH 8,0)

stained with ethidium bromide by evaluating the integrity of the 28S and 18S ribosomal RNA bands and absence of smears.

For each sample, two micrograms of total RNA were used to synthesize first-strand cDNAs using oligo-(dt)18 primers and the Superscript III™ RT kit (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to manufacturer's recommendations.

Selection of reference genes and primer design

Genbank accession numbers for *U. brizantha* ESTs (Expressed Sequence Tags) corresponding to the reference genes have been previously published by Silveira et al⁹. These genes are Elongation factor-1 alpha (*EF1-α*), Eukaryotic initiation factor (*eIF4a*), Splicing factor (*U2AF*), FTSH protease 4 (*FTSH*), Succinyl-coa ligase (*SucCoa*), Tubulin alfa-5 (*α-TUB5*) and Ubiquitin conjugating enzyme (*UbiCo*). The accession numbers were used to search for nucleotide sequences against dbest database in the GenBank, which in turn, were used to design the primers. To search for ESTs of Actin 12 (*ACT12*) and Tubulin beta-6 (*β-TUB6*) genes of *U. brizantha*, sequences of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) were used as query (accession numbers GR878265 and GR880018, respectively)¹¹. The protein sequences of these genes were blasted against the dbest of *U. brizantha* using TBLASTN tool³⁷. The selected ESTs were then used as query for the BLASTX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) against the non-redundant protein database for identity verification. The gene description and the GenBank accession numbers of the ESTs used in this work are in Table 1.

For reference gene validation we design primers using the sequence from the plastidial large subunit of Rubisco (*rbCl*) homolog from *U. panicoides* (Accession number HE573318.1) (Table 1) because of the absence of *rbCl* nucleotide sequences from *U. brizantha* in the NCBI and the high conservation of this gene across plant species³⁸.

All primers were designed using Primer Express software version 3.0.1 (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) with the following parameters: amplicon length between 80 and 120 bp; melting temperature (T_m) between 58 and 60°C, GC content ranging from 50% to 60% and length between 18 and 24 bases

(Table 1). The specificity of the primers was checked using Primer-Blast tool (available at: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)).

RT-qPCR

The RT-qPCR assays were performed in 96-well plates using the StepOnePlus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City USA). All cDNAs were diluted 1:25 to serve as a template for the reactions. Each RT-qPCR reaction contained 5µl Power SYBR Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA), 2 µl of the diluted cDNA, 4 pmol of each of forward and reverse gene-specific primers and ultrapure water up to 10 µl. RT-qPCR reactions were performed as follow: one step thermal cycle of 2 min at 95 °C, and then 40 cycles of 30 s at 95 °C and 30 s at 60 °C. A melting curve analysis was carried out to assess primer specificity and product quality by step-wise denaturation of the PCR product with the following conditions: a final step of 15 s at 95 °C, 1 min at 60 °C and then the fluorescence measured from 60 to 95 °C at each 0.7 °C increment of temperature.

The experiment was performed using biological triplicate samples for each condition tested. Two technical replicates were used for each biological replicate and the average Cq values (Cycle quantification) were used for quantification.

Data analysis

A pool of cDNA from 36 samples was used to carry out the RT-qPCR reactions to estimate the efficiency of each primer pair using the LinRegPCR software version 2015.0³⁹. This program uses non-baseline corrected data, performs a baseline correction on each sample separately, determines a window-of-linearity and then uses linear regression analysis to fit a straight line through the PCR data set from which the PCR efficiency of each individual sample is calculated. The primer efficiency is calculated based on slope of the line ($E = 10^{-1/\text{slope}}$), considering an ideal value range ($1.8 \leq E \leq 2$) and correlation ($R \geq 0.995$)⁴⁰.

The expression stabilities of the nine candidate genes was analyzed by RefFinder⁸ a web-tool that use four different algorithms geNorm⁵, NormFinder⁴,

BestKeeper⁶ and the comparative ΔCt method⁷ all together to establish a comprehensive rank of gene stability. A score is then assigned to each gene considering the rankings of the various algorithms employed.

Reference Gene Validation

In order to determine whether the choice of the reference genes ranked by RefFinder affects the normalization of target genes, the same cDNA samples used for the stability analysis of the reference genes were also analysed for the expression of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (*rbCl*) under drought, cold and heat stresses. The ranking of all the reference genes, from the most stable to the less stable according to the RefFinder analysis, was used to normalize the *rbCl* expressions. The relative expression profile of *rbCl* was obtained according to the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method⁴¹. Plants grown without stress treatments (controls) were selected as calibrator to calculate the $\Delta\Delta\text{Ct}$.

References

1. González, A. T., Morton, C. M. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). *Mol Phy Evol.* **37**, 36-44 (2005).
2. Dias-Filho, M. B. Diagnóstico das pastagens no Brasil. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Documentos n°402. Embrapa Amazônia Oriental Belém, Brasil. ISSN 1983-0513. 2014.
3. Kozera, B., Rapacz, M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genetics* **54**, 391–406 (2013).
4. Andersen, C. L., Jensen, J. L., Orntoft, T. F. Normalization of real time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identified genes suited for normalization, applied for a bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* **64**, 5245-5250 (2004).
5. Vandesompele, J., *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, 1-12 (2002).

6. Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.* **26**, 509–515 (2004).
7. Silver, N., Best, S., Jiang, J., Thein, S.L. The comparative delta-Ct method: Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology* **7**, 33 (2006).
8. Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., Zhang, B. Mir. Deepfinder: a mirna analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol.* **80**, 75-84 (2012).
9. Silveira, E. D., Ferreira, M. A., Guimarães, L. A., Silva, F. R., Carneiro, V. T. C. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual grass *Brachiaria brizantha*. *BMC Plant Biol.* **9**, 84 (2009).
10. Parry, M. A. J., Keys, A. J., Madgwick, P. J., Carmo-Silva, A. E., Andralojc, P. J. Rubisco regulation: a role for inhibitors. *J Exp Bot.* **59**, 1569–1580 (2008).
11. Gimeno J, Eattock N, Van Deynze A, Blumwald E. Selection and validation of reference genes for gene expression analysis in switchgrass (*Panicum virgatum*) using quantitative real-time RT-PCR. *PlosOne* **9**, e91474 (2014).
12. Zhu, J., Zhang, L., Li, W., Han, S., Yang, W., Qi, L. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in *Caragana intermedia* under different abiotic stress conditions. *PlosOne* **8**, e53196 (2013).
13. Guo, J., Ling, H., Wu, Q., Xu, L., Que, Y. The choice of reference genes for assessing gene expression in sugarcane under salinity and drought stresses. *Sci. Rep.* **4**, 7042 (2014).
14. Qi, S., Yang, L., Wen, X., Hong, Y., Song, X., Zhang M., Dai S. Reference Gene Selection for RT-qPCR Analysis of Flower Development in *Chrysanthemum morifolium* and *Chrysanthemum lavandulifolium*. *Frontiers in Plant Science* **7**, 287 (2016).

15. Martins, P. K. et al. Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis during developmental stages and abiotic stress in *Setaria viridis*. *Sci. Rep.* **6**, 28348 (2016).
16. Paolacci, A. R., Tanzarella, O. A., Porceddu, E., Ciaffi, M. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Mol Biol.* **10**, 11 (2009).
17. Huang, L. et al. Evaluation of candidate reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in switchgrass under various abiotic stress conditions. *Bioenerg Res.* **7**, 1201–1211 (2014).
18. Svitkin, Y. V. et al. The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (elf4a) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *RNA* **7**, 382–394 (2001).
19. Huang, L. et al. Identification of candidate reference genes in perennial ryegrass for quantitative RT-PCR under various abiotic stress conditions. *PLoSOne* **9**, e93724 (2014).
20. Browning, K. The plant translational apparatus. *Plant Mol Biol.* **32**, 107–144 (1996).
21. Carvalho, K. et al. Nitrogen starvation, salt and heat stress in coffee (*Coffea arabica* L.): Identification and validation of new genes for qPCR normalization. *Mol Biotechnol* **53**, 315–325 (2013).
22. Martin, R. C., V. G. Hollenbeck., J. E. Dombrowski. Evaluation of reference genes for quantitative RT-PCR in *Lolium perenne*. *Crop Sci.* **48**, 1881-1887 (2008).
23. Dombrowski, J. E., Martin, R. C. Evaluation of reference genes for quantitative RT-PCR in *Lolium temulentum* under abiotic stress. *Plant Sci.* **176**, 390–396 (2009).
24. Lin, Y. et al. Validation of potential reference genes for qPCR in maize across abiotic stresses, hormone treatments, and tissue types. *PlosOne* **9**, e95445 (2014).
25. Fu, C. X. et al. Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass. *PNAS* **108**, 3803–3808 (2011).

26. Saathoff, A. J., Tobias, C. M., Sattler, S. E., Haas, E. J., Twigg, P. S. Switchgrass contains two cinnamyl alcohol deshydrogenases involved in lignin formation. *Bioenergy Res.* **4**, 120–133 (2001).
27. Hong, S. Y., Seo, P. J., Yang, M. S., Xiang, F., Park, C. M. Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *BMC Plant Biology* **8**, 112 (2008).
28. Chen Y. *et al.* Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in creeping bentgrass involved in four abiotic stresses. *Plant Cell Rep* **34**, 1825–1834 (2015).
29. Kumar, K., Muthamilarasan, M., Prasad M. Reference genes for quantitative real-time PCR analysis in the model plant foxtail millet (*Setaria italica* L.) subjected to abiotic stress conditions. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* **115**, 13–22 (2013).
30. Shivhare, R. and Lata, C. Selection of suitable reference genes for assessing gene expression in pearl millet under different abiotic stresses and their combinations. *Sci. Rep.* **6**, 23036 (2016).
31. Yan, X. *et al.* Reference gene selection for quantitative Real-Time PCR normalization in *Reaumuria soongorica*. *PlosOne* **9**, e104124. (2014).
32. Yamori, W., Hikosaka, K., Way, D. A. Temperature response of photosynthesis in C3, C4, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynth Res.* **119**, 101–117 (2014).
33. Rizhsky, L., Liang, H., Mittler, R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* **130**, 1143-1151 (2002).
34. Goulas, E. *et al.* The chloroplast lumen and stromal proteomes of *Arabidopsis thaliana* show differential sensitivity to short- and long-term exposure to low temperature. *The Plant Journal.* **47**, 720–734 (2006).
35. Pelloux, J., Jolivet, Y., Fontaine, V., Banvoy, J., Dizengremel, P. Changes in Rubisco activase gene expression and polypeptide content in *Pinus halepensis* M. subjected to ozone and drought. *Plant, Cell and Env.* **24**, 123-131 (2001).
36. Desimone, M., Henke, A., Wagner, E. Oxidative stress induces partial degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/

- oxygenase in isolated chloroplasts of barley. *Plant Physiol.* **111**, 789–796 (1996).
37. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* **215**, 403-410 (1990).
38. Bowman, S. M. *et al.* A novel RNA binding protein affects *rbCl* gene expression and is specific to bundle sheath chloroplasts in C4 plants. *BMC Plant Biol.* **22**, 13-138 (2013).
39. Ruijter, J. M. *et al.* Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* **37**, e452009.
40. Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H., Moorman, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett.* **339**, 62-66 (2003).
41. Livak, J. K., Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).

Figure 1 Melting curves of PCR products from all reference genes used in this study showing a single peak (each includes two technical replicates of the cDNA pool from all samples).

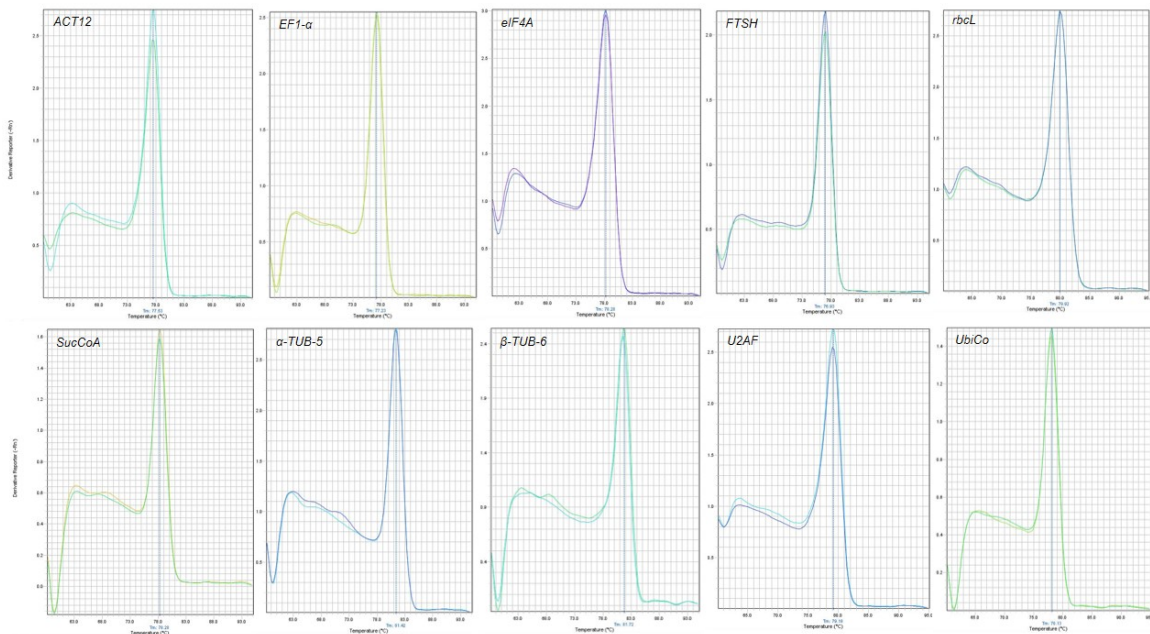


Figure 2 Ethidium bromide stained agarose gel (1.2 %) loaded with PCR products from cDNAs for each gene showing single amplification band.

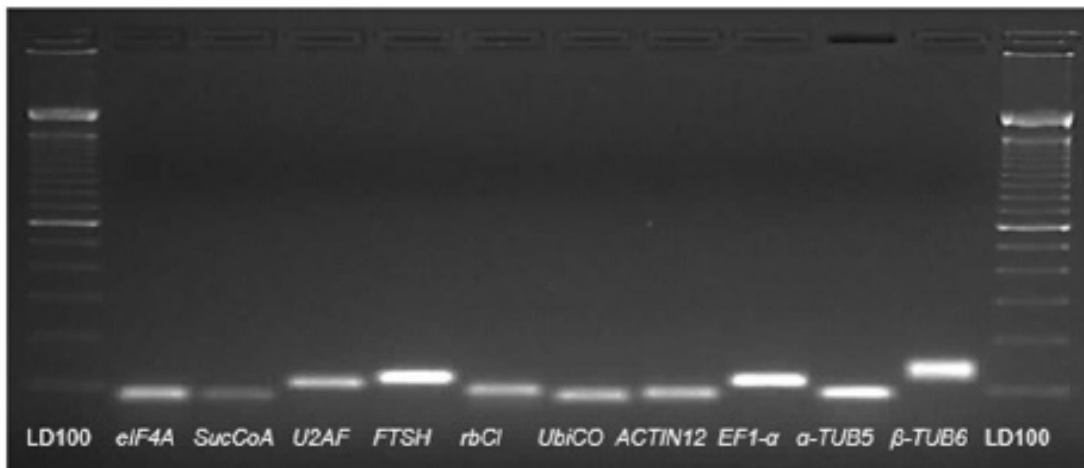


Figure 3 Average of Cq values of the candidate reference genes for each stresses: A- heat; B- cold and C- drought stress, with a total of 12 samples for each gene. Box-plot graph shows the median values as lines across the box. Lower and upper boxes indicate the 25th percentile and 75th percentile, respectively. Whiskers represent the maximum and minimum values.

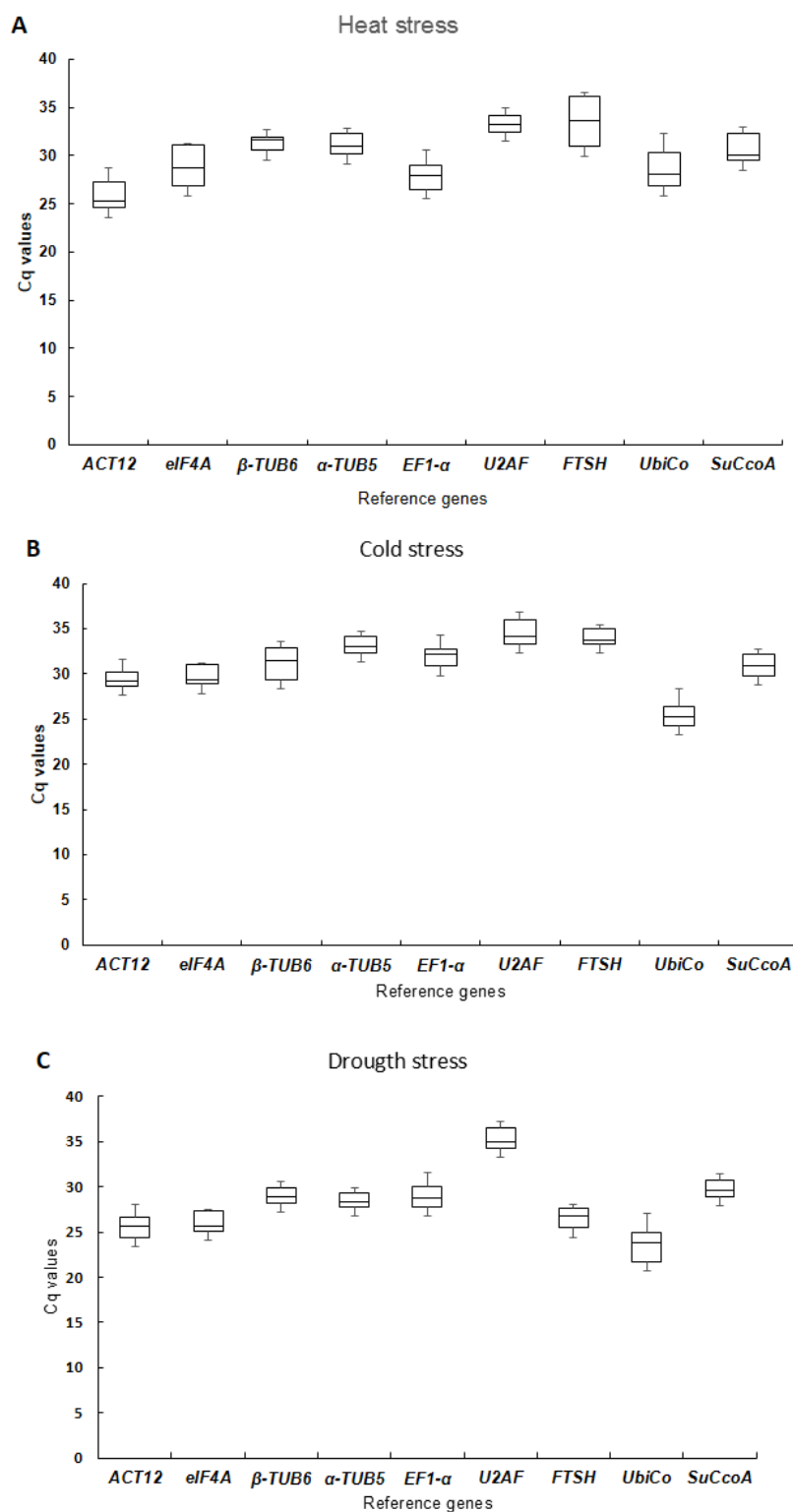


Figure 4 Rank of the candidate genes for all treatments combined (heat, cold and drought) generated by RefFinder web-tool showing the values for each of the four different algorithms. Δ Ct method (Mean SD), NormFinder (Stability value), geNorm (Average expression stability M), BestKeeper (SD [\pm CP] crossing point values) and the final comprehensive ranking.

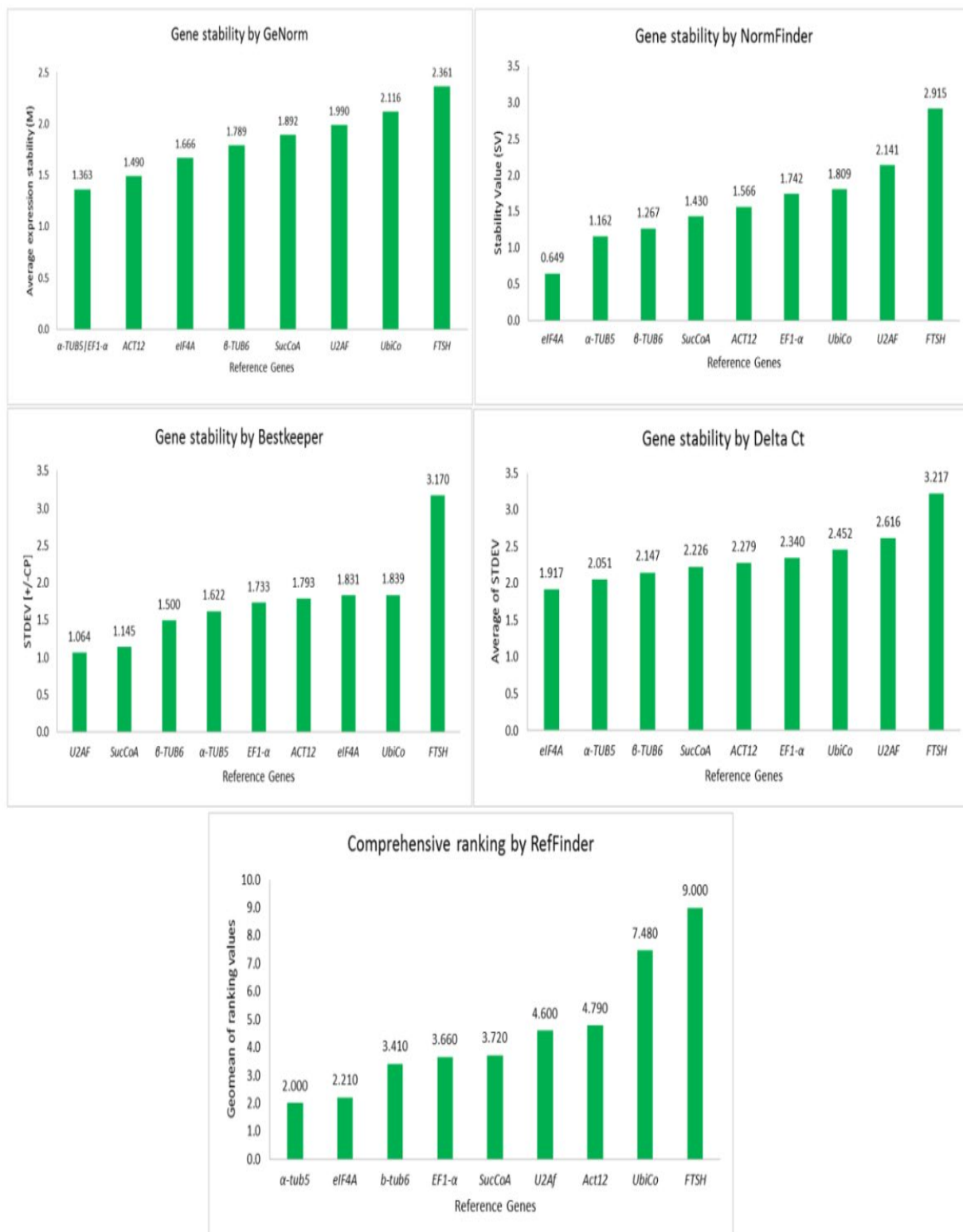
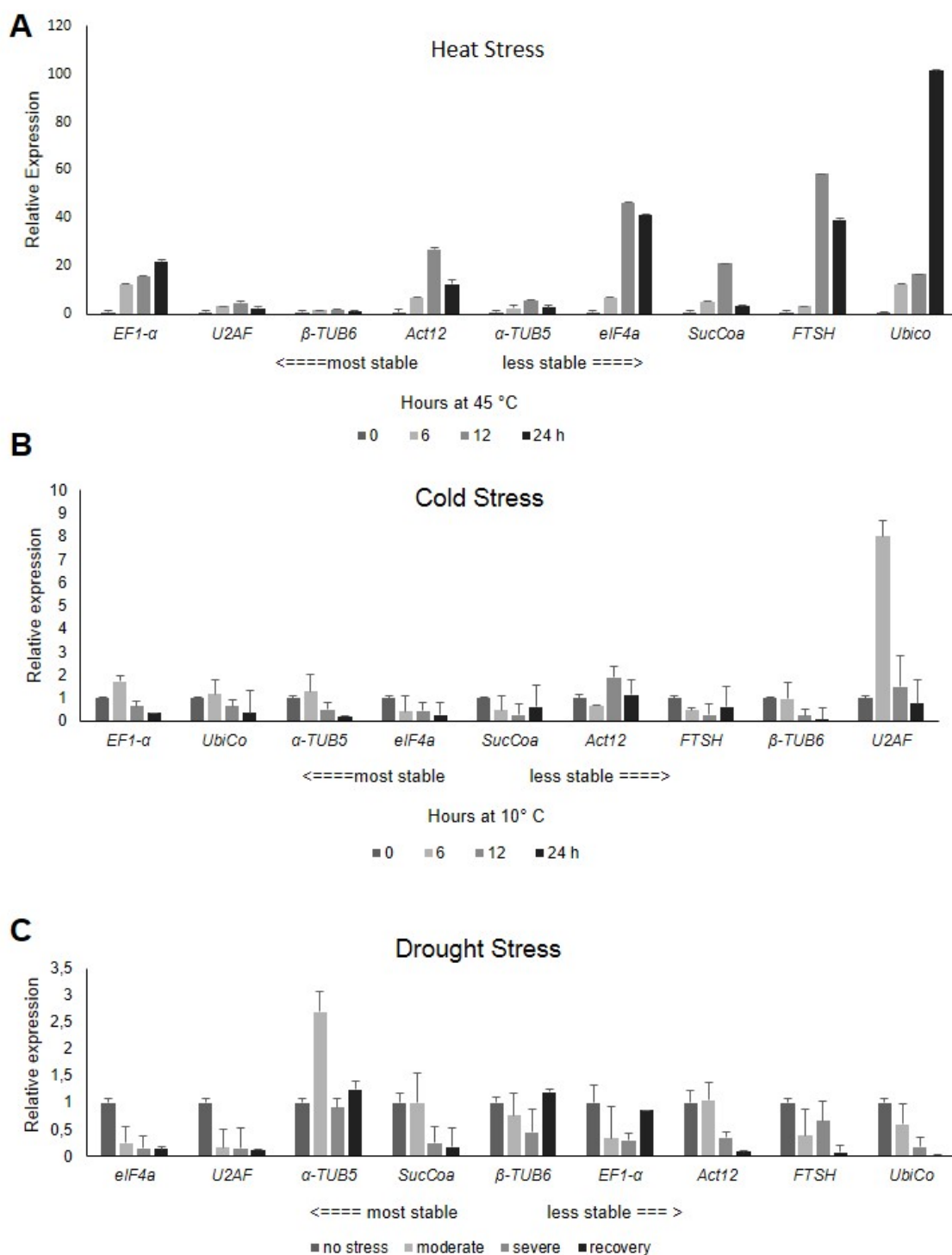


Figure 5 Relative expression of the *rbCl* gene in leaves of *U. brizantha* cv. Marandú under three abiotic stresses normalized to reference genes ranked according to the RefFinder approach: A – heat, B – cold and C - drought. The results are expressed as mean fold in change in relative expression compared to control samples. Bars indicate the standard error (\pm SE) calculated from three biological replicates.



Acknowledgments

This study was supported by Grant n° 2013/04819-4 São Paulo Research Foundation (FAPESP). We are grateful by technical support provided by Rafael Rebes Ziliani in the physiological measures. A.V.C.P. received a TT3 scholarship Grant n° 2014/07830-1 São Paulo Research

Foundation (FAPESP). L.G.E.V is supported by a research fellowships from National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPQ) (CNPq). L.M.T. is supported by a doctor degree scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Author Contributions

A.F.R, G.M.S and L.G.E.V conceived and designed the experiments. A.V.C.P and L.M.T. performed the abiotic stress experiments. A.F.R and L.M.V carried out the RT-qPCR assays and analyzed the data. A.F.R and L.G.E.V wrote the manuscript. G. M. S. provided intellectual input and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional Information

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interest.

ANEXO - NORMAS DA PUBLICAÇÃO

Submission guidelines

- [General information for preparing manuscripts](#)
- [Cover letter](#)
- [Format of manuscripts](#)
- [Methods](#)
- [References](#)
- [Acknowledgements](#)
- [Author contributions](#)
- [Competing interests](#)
- [Data availability](#)
- [Supplementary information](#)
- [Figure legends](#)
- [Tables](#)
- [Equations](#)
- [General figure guidelines](#)
- [Figures for peer review](#)
- [Figures for publication](#)
- [Statistical guidelines](#)
- [Chemical and biological nomenclature and abbreviations](#)
- [Gene nomenclature](#)
- [Characterisation of chemical and biomolecular materials](#)

General information for preparing manuscripts

Format of articles

Scientific Reports publishes original research in one format, Article. In most cases we do not impose strict limits on word count or page number. We do, however, strongly encourage authors to write concisely and to adhere to the guidelines below.

Articles should ideally be no more than 11 typeset pages in length. As a guide, the main text (not including Abstract, Methods, References and figure legends) should be no more than 4,500 words. The maximum Article title length is 20 words. The Abstract — which must be no more than 200 words long and contain no references — should serve both as a general introduction to the topic and as a brief, non-technical summary of the main results and their implications.

For the main body of the text, there are no explicit requirements for section organization. According to the authors' preference, the text may be organized as best suits the research. As a guideline and in the majority of cases, however, we recommend that you structure your manuscript as follows:

- Introduction
- Results (with subheadings)
- Discussion (without subheadings)
- Methods

A specific order for the main body of the text is not compulsory and, in some cases, it may be appropriate to combine sections. Figure legends are limited to 350 words. As a guideline references should be limited to 60 (this is not strictly enforced). Footnotes should not be used.

We suggest that Articles contain no more than 8 display items ([figures](#) and/or [tables](#)). In addition, a limited number of uncaptioned molecular structure graphics and numbered mathematical equations may be included if necessary. To enable typesetting of papers, the number of display items should be commensurate with the word length — we suggest that for Articles with less than 2,000 words, no more than 4 figures/tables should be included. Please note that schemes are not used and should be presented as figures.

Authors must provide a competing interests statement within the manuscript file.

Submissions should include a cover letter, a manuscript text file, individual figure files and optional supplementary information files. For first submissions (i.e. not revised manuscripts), authors may incorporate the manuscript text and figures into a single file up to 3 MB in size; the figures may be inserted in the text at the appropriate positions, or grouped at the end. Supplementary information should be combined and supplied as a single separate file, preferably in PDF format.

The following file types can be uploaded for Article text:

- txt, doc, docx, tex, (pdf [first submissions only])*

*We are unable to accept PDF files for article text for revised manuscripts.

A [submission template](#) is available in the [Overleaf](#) template gallery to help you prepare a LaTeX manuscript within the *Scientific Reports* formatting criteria.

Scientific Reports is read by scientists from diverse backgrounds. In addition, many are not native English speakers. Authors should, therefore, give careful thought to how their findings may be communicated clearly. Although a shared basic knowledge of science may be assumed, please bear in mind that the language and concepts that are standard in one field may be unfamiliar to non-specialists. Thus, technical jargon should be avoided and clearly explained where its use is unavoidable.

Abbreviations, particularly those that are not standard, should also be kept to a minimum. Where unavoidable, abbreviations should be defined in the text or legends at their first occurrence, and abbreviations should be used thereafter. The background, rationale and main conclusions of the study should be clearly explained. Titles and abstracts in particular should be written in language that will be readily intelligible to any scientist. We strongly recommend that authors ask a colleague with different expertise to review the manuscript before submission, in order to identify concepts and terminology that may present difficulties to non-specialist readers.

The format requirements of *Scientific Reports* are described below.

Scientific Reports uses UK English spelling.

Cover letter

Authors should provide a cover letter that includes the affiliation and contact information for the corresponding author. Authors should briefly explain why the work is considered appropriate for *Scientific Reports*. Authors are asked to suggest the names and contact information for scientific reviewers and they may request the exclusion of certain referees. Please ensure that your cover letter also includes suggestions for [Editorial Board Members](#) who would be able to handle your submission. Finally, authors should indicate whether they have had any prior discussions with a *Scientific Reports* Editorial Board Member about the work described in the manuscript.

Format of manuscripts

In most cases we do not impose strict limits on word counts and page numbers, but we encourage authors to write concisely and suggest authors adhere to the guidelines below. For a definitive list of which limits are mandatory please visit the [submission checklist page](#).

Articles should be no more than 11 typeset pages in length. As a guide, the main text (not including Abstract, Methods, References and figure legends) should be no more than 4,500 words. The maximum title length is 20 words. The Abstract (without heading) - which must be no more than 200 words long and contain no references - should serve both as a general introduction to the topic and as a brief, non-technical summary of the main results and their implications.

The manuscript text file should include the following parts, in order: a title page with author affiliations and contact information (the corresponding author should be identified with an asterisk). The main text of an Article can be organised in

different ways and according to the authors' preferences, it may be appropriate to combine sections.

As a guideline, we recommend that sections include an Introduction of referenced text that expands on the background of the work. Some overlap with the Abstract is acceptable. This may then be followed by sections headed Results (with subheadings), Discussion (without subheadings) and Methods.

The main body of text must be followed by References, Acknowledgements (optional), Author Contributions (names must be given as initials), Additional Information (including a Competing Interests Statement), Figure Legends (these are limited to 350 words per figure) and Tables (maximum size of one page). Footnotes are not used.

For first submissions (i.e. not revised manuscripts), authors may choose to incorporate the manuscript text and figures into a single file up to 3 MB in size in either a Microsoft Word, LaTeX, or PDF format - the figures may be inserted within the text at the appropriate positions, or grouped at the end.

For revised manuscripts authors should provide all textual content in a single file, prepared using either Microsoft Word or LaTeX. We do not accept PDF files for article text for revised manuscripts. Figures should be provided as individual files.

Supplementary Information should be combined and supplied as a separate file, preferably in PDF format. The first page of the Supplementary Information file should include the title of the manuscript and the author list.

Authors who do not incorporate the manuscript text and figures into a single file should adhere to the following: all textual content should be provided in a single file, prepared using either Microsoft Word or LaTeX; figures should be provided as individual files.

The manuscript file should be formatted as single-column text without justification. Pages should be numbered using an Arabic numeral in the footer of each page. Standard fonts are recommended and the 'symbols' font should be used for representing Greek characters.

TeX/LaTeX - Authors submitting LaTeX files may use the standard 'article' document class (or similar) or may use the `wlscirep.cls` file and [template provided by Overleaf](#). Non-standard fonts should be avoided; please use the default Computer Modern fonts. For the inclusion of graphics, we recommend

graphicx.sty. Please use numerical references only for citations. Our system cannot accept .bib files. If references are prepared using BibTeX (which is optional), please include the .bbl file with your submission (as a ‘related manuscript file’) in order for it to be processed correctly; this file is included automatically in the zip file generated by Overleaf for submissions. Please see this [help article on Overleaf](#) for more details. Alternatively ensure that the references (source code) are included within the manuscript file itself. As a final precaution, authors should ensure that the complete .tex file compiles successfully on their own system with no errors or warnings, before submission.

Manuscripts published in *Scientific Reports* are not subject to in-depth copy editing as part of the production process. Authors are responsible for procuring copy editing or language editing services for their manuscripts, either before submission, or at the revision stage, should they feel it would benefit their manuscript. Such services include those provided by our affiliate [Nature Research Editing Service](#) and [American Journal Experts](#). *Scientific Reports* authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services. To claim 10% off English editing from Nature Research Editing Service, click [here](#). To claim 10% off American Journal Experts, click [here](#). Please note that the use of an editing service is at the author's own expense, and in no way implies that the article will be selected for peer-review or accepted for publication.

Methods

Where appropriate, we recommend that authors limit their Methods section to 1,500 words. Authors must ensure that their Methods section includes adequate experimental and characterization data necessary for others in the field to reproduce their work. Descriptions of standard protocols and experimental procedures should be given. Commercial suppliers of reagents or instrumentation should be identified only when the source is critical to the outcome of the experiments. Sources for kits should be identified. Experimental protocols that describe the synthesis of new compounds should be included. The systematic name of the compound and its bold Arabic numeral are used as the heading for the experimental protocol. Thereafter, the compound is represented by its assigned bold numeral. Authors should describe the experimental protocol in detail, referring to amounts of reagents in parentheses, when possible (eg 1.03 g, 0.100 mmol). Standard abbreviations for reagents and solvents are encouraged. Safety hazards posed by reagents or protocols should be identified clearly. Isolated mass and percent yields should be reported at the end of each protocol. Any manuscript reporting an experiment/s on live vertebrates (or higher invertebrates), humans or human samples must include a statement of ethical approval in the Methods section (see [our detailed requirements](#) for further information on preparing these statements).

References

References will not be copy edited by *Scientific Reports*. References will be linked electronically to external databases where possible, making correct formatting of the references essential.

References should be numbered sequentially, first throughout the text, then in tables, followed by figures; that is, references that only appear in tables or figures should be last in the reference list. Only one publication is given for each number. Only papers or datasets that have been published or accepted by a named publication, recognized preprint server or data repository should be in the numbered list; preprints of accepted papers in the reference list should be submitted with the manuscript. Published conference abstracts and numbered patents may be included in the reference list. Grant details and acknowledgements are not permitted as numbered references. Footnotes are not used.

BibTeX (.bib) bibliography files cannot be accepted. LaTeX submission must either contain all references within the manuscript .tex file itself, or (for authors using the Overleaf template) can include the .bbl file generated during the compilation process as a 'related manuscript file' (see the "Format of manuscripts" section for more details).

Scientific Reports uses standard *Nature* referencing style. All authors should be included in reference lists unless there are six or more, in which case only the first author should be given, followed by 'et al.'. Authors should be listed last name first, followed by a comma and initials (followed by full stops) of given names. Article and dataset titles should be in Roman text, only the first word of the title should have an initial capital and the title should be written exactly as it appears in the work cited, ending with a full stop. Book titles should be given in italics and all words in the title should have initial capitals. Journal and data repository names are italicized and abbreviated (with full stops) according to common usage. Volume numbers and the subsequent comma appear in bold. The full page range should be given (or article number), where appropriate.

Published papers:

Printed journals

Schott, D. H., Collins, R. N. & Bretscher, A. Secretory vesicle transport velocity in living cells depends on the myosin V lever arm length. *J. Cell Biol.* **156**, 35-39 (2002).

Online only

Bellin, D. L. *et al.* Electrochemical camera chip for simultaneous imaging of multiple metabolites in biofilms. *Nat. Commun.* **7**, 10535; [10.1038/ncomms10535](https://doi.org/10.1038/ncomms10535) (2016).

For papers with more than five authors include only the first author's name followed by 'et al.'

Books:

Smith, J. Syntax of referencing in *How to reference books* (ed. Smith, S.) 180-181 (Macmillan, 2013).

Online material:

Babichev, S. A., Ries, J. & Lvovsky, A. I. Quantum scissors: teleportation of single-mode optical states by means of a nonlocal single photon. Preprint at <https://arxiv.org/abs/quant-ph/0208066> (2002).

Manaster, J. Sloth squeak. *Scientific American Blog Network* <http://blogs.scientificamerican.com/psi-vid/2014/04/09/sloth-squeak> (2014).

Hao, Z., AghaKouchak, A., Nakhjiri, N. & Farahmand, A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. *figshare* <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.853801> (2014).

Acknowledgements

Acknowledgements should be brief, and should not include thanks to anonymous referees and editors, or effusive comments. Grant or contribution numbers may be acknowledged. Assistance from medical writers, proof-readers and editors should also be acknowledged here.

Author contributions

Scientific Reports requires an Author Contribution Statement as described in the [Author responsibilities](#) section of our [Editorial and Publishing Policies](#).

Competing interests

A [competing interests statement](#) is required for all papers submitted to *Scientific Reports*. If there is no conflict of interest, a statement declaring this must still be included in the paper.

The statement included in the article file must be explicit and unambiguous, describing any potential competing interest (or lack thereof) for EACH contributing author.

Examples of declarations are:

Competing interests

The author(s) declare no competing interests.

Competing interests

Dr X's work has been funded by A. He has received compensation as a member of the scientific advisory board of B and owns stock in the company. He also has consulted for C and received compensation. Dr Y and Dr Z declare no potential conflict of interest.

Data availability

Scientific Reports requires a Data Availability Statement to be included in all submitted manuscripts (at the end of the main text, before the References section); see '[Availability of materials and data](#)' section for more information.

Supplementary Information

Any Supplementary Information should be submitted with the manuscript and will be sent to referees during peer review. It is published online with accepted manuscripts. We request that authors avoid "data not shown" statements and instead make their data available via deposition in a public repository (see '[Availability of materials and data](#)' for more information). Any data necessary to evaluation of the claims of the paper that are not available via a public depository should be provided as Supplementary Information. Supplementary Information is not edited, typeset or proofed, so authors should ensure that it is clearly and succinctly presented at initial submission, and that the style and terminology conform to the rest of the paper. Authors should include the title of the manuscript and full author list on the first page.

The guidelines below detail the creation, citation and submission of Supplementary Information - publication may be delayed if these are not followed correctly. Please note that modification of Supplementary Information after the paper is published requires a formal correction, so authors are encouraged to check their Supplementary Information carefully before submitting the final version.

1. Multiple pieces of Supplementary Information can be combined and supplied as a single file, or supplied separately (e.g. supplementary videos, spreadsheets [.csv or .xlsx] or data files).
2. Designate each item as Supplementary Table, Figure, Video, Audio, Note, Data, Discussion, Equations or Methods, as appropriate. Number Supplementary Tables and Figures as, for example, "Supplementary Table S1". This numbering should be separate from that used in tables and figures appearing in the main article. Supplementary Note or Methods should not be numbered; titles for these are optional.
3. Refer to each piece of supplementary material at the appropriate point(s) in the main article. Be sure to include the word "Supplementary" each time one is mentioned. Please do not refer to individual panels of supplementary figures.
4. Use the following examples as a guide (note: abbreviate "Figure" as "Fig." when in the middle of a sentence): "Table 1 provides a selected subset of the most active compounds. The entire list of 96 compounds can be found as Supplementary Table S1 online." "The biosynthetic pathway of L-ascorbic acid in animals involves intermediates of the D-glucuronic acid pathway (see Supplementary Fig. S2 online). Figure 2 shows..."
5. Remember to include a brief title and legend (incorporated into the file to appear near the image) as part of every figure submitted, and a title as part of every table.
6. File sizes should be as small as possible, with a maximum size of 50 MB, so that they can be downloaded quickly.

Further queries about submission and preparation of Supplementary Information should be directed to email: scirep.admin@nature.com.

Figure legends

Figure legends begin with a brief title sentence for the whole figure and continue with a short description of what is shown in each panel in sequence and the symbols used; methodological details should be minimised as much as possible. Each legend must total no more than 350 words. Text for figure legends should be provided in numerical order after the references.

Tables

Please submit tables in your main article document in an editable format (Word or TeX/LaTeX, as appropriate), and not as images. Tables that include statistical analysis of data should describe their standards of error analysis and ranges in a table legend.

Equations

Equations and mathematical expressions should be provided in the main text of the paper. Equations that are referred to in the text are identified by parenthetical numbers, such as (1), and are referred to in the manuscript as "equation (1)".

For submissions in a .doc or .docx format please ensure that all equations are provided in an editable Word format. These can be produced with the equation editor included in Microsoft Word.

General figure guidelines

Authors are responsible for obtaining permission to publish any figures or illustrations that are protected by copyright, including figures published elsewhere and pictures taken by professional photographers. The journal cannot publish images downloaded from the internet without appropriate permission.

Figures should be numbered separately with Arabic numerals in the order of occurrence in the text of the manuscript. When appropriate, figures should include error bars. A description of the statistical treatment of error analysis should be included in the figure legend. Please note that schemes are not used; sequences of chemical reactions or experimental procedures should be submitted as figures, with appropriate captions. A limited number of uncaptioned graphics depicting chemical structures - each labelled with their name, by a defined abbreviation, or by the bold Arabic numeral - may be included in a manuscript.

Figure lettering should be in a clear, sans-serif typeface (for example, Helvetica); the same typeface in the same font size should be used for all figures in a paper. Use 'symbols' font for Greek letters. All display items should be on a white background, and should avoid excessive boxing, unnecessary colour, spurious decorative effects (such as three-dimensional 'skyscraper' histograms) and highly pixelated computer drawings. The vertical axis of histograms should not be truncated to exaggerate small differences. Labelling must be of sufficient size and contrast to be readable, even after appropriate reduction. The thinnest lines in the final figure should be no smaller than one point wide. Authors will see a proof that will include figures.

Figures divided into parts should be labelled with a lower-case bold a, b, and so on, in the same type size as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with only the first letter of each label capitalized. Units should have a single space between the number and the unit, and follow SI nomenclature (for example, ms rather than msec) or the nomenclature common to a particular field. Thousands should be separated by commas (1,000). Unusual units or abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale

bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined on the bar itself rather than in the legend. In legends, please use visual cues rather than verbal explanations such as "open red triangles".

Unnecessary figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected; each panel of a multipart figure should be sized so that the whole figure can be reduced by the same amount and reproduced at the smallest size at which essential details are visible.

Figures for peer review

At the initial submission stage authors may choose to upload separate figure files or to incorporate figures into the main article file, ensuring that any inserted figures are of sufficient quality to be clearly legible.

When submitting a revised manuscript all figures must be uploaded as separate figure files ensuring that the image quality and formatting conforms to the specifications below.

Figures for publication

Each complete figure must be supplied as a separate file upload. Multi-part/panel figures must be prepared and arranged as a single image file (including all sub-parts; a, b, c, etc.). Please do not upload each panel individually.

Please read the [digital images integrity and standards](#) section of our [Editorial and Publishing Policies](#). When possible, we prefer to use original digital figures to ensure the highest-quality reproduction in the journal. When creating and submitting digital files, please follow the guidelines below. Failure to do so, or to adhere to the following guidelines, can significantly delay publication of your work.

Authors are responsible for obtaining permission to publish any figures or illustrations that are protected by copyright, including figures published elsewhere and pictures taken by professional photographers. The journal cannot publish images downloaded from the internet without appropriate permission.

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

1. Line art, graphs, charts and schematics

For optimal results, all line art, graphs, charts and schematics should be supplied in vector format, such as EPS or AI, and should be saved or exported as such directly from the application in which they were made. Please ensure that data points and axis labels are clearly legible.

2. Photographic and bitmap images

All photographic and bitmap images should be supplied in a bitmap image format such as tiff, jpg, or psd. If saving tiff files, please ensure that the compression option is selected to avoid very large file sizes.

Please do not supply Word or Powerpoint files with placed images. Images can be supplied as RGB or CMYK (note: we will not convert image colour modes).

Figures that do not meet these standards will not reproduce well and may delay publication until we receive high-resolution images.

3. Chemical structures

Chemical structures should be produced using ChemDraw or a similar program. All chemical compounds must be assigned a bold, Arabic numeral in the order in which the compounds are presented in the manuscript text. Structures should then be exported into a 300 dpi RGB tiff file before being submitted.

4. Stereo images

Stereo diagrams should be presented for divergent 'wall-eyed' viewing, with the two panels separated by 5.5 cm. In the final accepted version of the manuscript, the stereo images should be submitted at their final page size.

Statistical guidelines

Every article that contains statistical testing should state the name of the statistical test, the n value for each statistical analysis, the comparisons of interest, a justification for the use of that test (including, for example, a discussion of the normality of the data when the test is appropriate only for normal data), the alpha level for all tests, whether the tests were one-tailed or two-tailed, and the actual P value for each test (not merely "significant" or " $P < 0.05$ "). It should be clear what statistical test was used to generate every P value. Use of the word "significant" should always be accompanied by a P value; otherwise, use "substantial," "considerable," etc.

Data sets should be summarized with descriptive statistics, which should include the *n* value for each data set, a clearly labelled measure of centre (such as the mean or the median), and a clearly labelled measure of variability (such as standard deviation or range). Ranges are more appropriate than standard deviations or standard errors for small data sets. Graphs should include clearly labelled error bars. Authors must state whether a number that follows the \pm sign is a standard error (s.e.m.) or a standard deviation (s.d.).

Authors must justify the use of a particular test and explain whether their data conform to the assumptions of the tests. Three errors are particularly common:

- **Multiple comparisons:** When making multiple statistical comparisons on a single data set, authors should explain how they adjusted the alpha level to avoid an inflated Type I error rate, or they should select statistical tests appropriate for multiple groups (such as ANOVA rather than a series of *t*-tests).
- **Normal distribution:** Many statistical tests require that the data be approximately normally distributed; when using these tests, authors should explain how they tested their data for normality. If the data do not meet the assumptions of the test, then a non-parametric alternative should be used instead.
- **Small sample size:** When the sample size is small (less than about 10), authors should use tests appropriate to small samples or justify their use of large-sample tests.

Chemical and biological nomenclature and abbreviations

Molecular structures are identified by bold, Arabic numerals assigned in order of presentation in the text. Once identified in the main text or a figure, compounds may be referred to by their name, by a defined abbreviation, or by the bold Arabic numeral (as long as the compound is referred to consistently as one of these three).

When possible, authors should refer to chemical compounds and biomolecules using systematic nomenclature, preferably using [IUPAC](#). Standard chemical and biological abbreviations should be used. Unconventional or specialist abbreviations should be defined at their first occurrence in the text.

Gene nomenclature

Authors should use approved nomenclature for gene symbols, and use symbols rather than italicized full names (for example *Ttn*, not *titin*). Please consult the appropriate nomenclature databases for correct gene names and symbols. A useful resource is LocusLink.

Approved human gene symbols are provided by HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC), e-mail: hgnc@genenames.org; see also www.genenames.org. Approved mouse symbols are provided by The Jackson Laboratory, e-mail: nomen@informatics.jax.org; see also www.informatics.jax.org/mgihome/nomen.

For proposed gene names that are not already approved, please submit the gene symbols to the appropriate nomenclature committees as soon as possible, as these must be deposited and approved before publication of an article.

Avoid listing multiple names of genes (or proteins) separated by a slash, as in 'Oct4/Pou5f1', as this is ambiguous (it could mean a ratio, a complex, alternative names or different subunits). Use one name throughout and include the other at first mention: 'Oct4 (also known as Pou5f1)'.

Characterization of chemical and biomolecular materials

Scientific Reports is committed to publishing technically sound research. Manuscripts submitted to the journal will be held to rigorous standards with respect to experimental methods and characterization of new compounds. Authors must provide adequate data to support their assignment of identity and purity for each new compound described in the manuscript. Authors should provide a statement confirming the source, identity and purity of known compounds that are central to the scientific study, even if they are purchased or resynthesized using published methods.

1. Chemical identity

Chemical identity for organic and organometallic compounds should be established through spectroscopic analysis. Standard peak listings (see formatting guidelines below) for ¹H NMR and proton-decoupled ¹³C NMR should be provided for all new compounds. Other NMR data should be reported (³¹P NMR, ¹⁹F NMR, etc.) when appropriate. For new materials, authors should also provide mass spectral data to support molecular weight identity. High-resolution mass spectral (HRMS) data are preferred. UV or IR spectral data may be reported for the identification of characteristic functional groups, when appropriate. Melting-point ranges should be provided for crystalline materials. Specific rotations may be reported for chiral compounds. Authors should provide references, rather than detailed procedures, for known compounds, unless their protocols represent a departure from or improvement on published methods.

2. Combinational compound libraries

Authors describing the preparation of combinatorial libraries should include standard characterization data for a diverse panel of library components.

3. Biomolecular identity

For new biopolymeric materials (oligosaccharides, peptides, nucleic acids, etc.), direct structural analysis by NMR spectroscopic methods may not be possible. In these cases, authors must provide evidence of identity based on sequence (when appropriate) and mass spectral characterization.

4. Biological constructs

Authors should provide sequencing or functional data that validates the identity of their biological constructs (plasmids, fusion proteins, site-directed mutants, etc.) either in the manuscript text or the Methods section, as appropriate.

5. Sample purity

Evidence of sample purity is requested for each new compound. Methods for purity analysis depend on the compound class. For most organic and organometallic compounds, purity may be demonstrated by high-field ^1H NMR or ^{13}C NMR data, although elemental analysis ($\pm 0.4\%$) is encouraged for small molecules. Quantitative analytical methods including chromatographic (GC, HPLC, etc.) or electrophoretic analyses may be used to demonstrate purity for small molecules and polymeric materials.

6. Spectral data

Detailed spectral data for new compounds should be provided in list form (see below) in the Methods section. Figures containing spectra generally will not be published as a manuscript figure unless the data are directly relevant to the central conclusions of the paper. Authors are encouraged to include high-quality images of spectral data for key compounds in the Supplementary Information. Specific NMR assignments should be listed after integration values only if they were unambiguously determined by multidimensional NMR or decoupling experiments. Authors should provide information about how assignments were made in a general Methods section.

Example format for compound characterization data. mp: 100-102 °C (lit.^{ref} 99-101 °C); TLC (CHCl_3 :MeOH, 98:2 v/v): $R_f = 0.23$; $[\alpha]_D = -21.5$ (0.1 M in n-hexane); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 9.30 (s, 1H), 7.55-7.41 (m, 6H), 5.61 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 5.40 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.93 (m, 1H), 4.20 (q, $J = 8.5$ Hz, 2H), 2.11 (s, 3H), 1.25 (t, $J = 8.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 165.4, 165.0, 140.5, 138.7, 131.5, 129.2, 118.6, 84.2, 75.8, 66.7, 37.9, 20.1; IR (Nujol):

1765 cm⁻¹; UV/Vis: λ_{max} 267 nm; HRMS (m/z): [M]⁺ calcd. for C₂₀H₁₅C₁₂NO₅, 420.0406; found, 420.0412; analysis (calcd., found for C₂₀H₁₅C₁₂NO₅): C (57.16, 57.22), H (3.60, 3.61), Cl (16.87, 16.88), N (3.33, 3.33), O (19.04, 19.09).

7. Crystallographic data for small molecules

Manuscripts reporting new three-dimensional structures of small molecules from crystallographic analysis should include a .cif file and a structural figure with probability ellipsoids for publication as Supplementary Information. These must have been checked using the IUCR's [CheckCIF](#) routine, and a PDF copy of the output must be included with the submission, together with a justification for any alerts reported. Crystallographic data for small molecules should be submitted to the [Cambridge Structural Database](#) and the deposition number referenced appropriately in the manuscript. Full access must be provided on publication.

8. Macromolecular structural data

Manuscripts reporting new structures should contain a table summarizing structural and refinement statistics. Templates are available for such tables describing [NMR](#) and [X-ray crystallography](#) data. To facilitate assessment of the quality of the structural data, a stereo image of a portion of the electron density map (for crystallography papers) or of the superimposed lowest energy structures (≥ 10 ; for NMR papers) should be provided with the submitted manuscript. If the reported structure represents a novel overall fold, a stereo image of the entire structure (as a backbone trace) should also be provided.