



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

**FLÁIVE LOYZE BALDASSARINI SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS TRANSFORMADAS DE *Urochloa brizantha*  
SOB DÉFICIT HÍDRICO E VALIDAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA  
ESTRESSE SALINO**

Presidente Prudente - SP  
2022



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

**FLÁIVE LOYZE BALDASSARINI SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS TRANSFORMADAS DE *Urochloa brizantha*  
SOB DÉFICIT HÍDRICO E VALIDAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA  
ESTRESSE SALINO**

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

Orientadora:  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Ferreira Ribas

Presidente Prudente - SP  
2022

633.2  
S586c

Silva, Fláive Loyze Baldassarini  
Caracterização de plantas transformadas de  
*Urochloa brizantha* sob déficit hídrico e validação de  
genes de referência para estresse salino / Fláive Loyze  
Baldassarini Silva. – Presidente Prudente, 2022.  
110f.: il.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal)  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente  
Prudente, SP, 2022.

Bibliografia.

Orientador: Alessandra Ferreira Ribas

1. Forrageira. 2. Estresse abiótico. 3. Prolina. 4.  
Normalizadores. I. Título.

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS TRANSFORMADAS DE *Urochloa*  
*brizantha* SOB DÉFICIT HÍDRICO E VALIDAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA  
ESTRESSE SALINO"**

**AUTOR(A): FLÁVE LOYZE BALDASSARINI SILVA**

**ORIENTADOR(A): Profa. Dra. ALESSANDRA FERREIRA RIBAS**

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

Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:

*Alessandra Ferreira Ribas*

**Profa. Dra. Alessandra Ferreira Ribas**

UFPR – Universidade Federal do Paraná / Curitiba (PR) / UNOESTE – Universidade do  
Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

*Alexandrus de Moraes Barbosa*

**Prof. Dr. Alexandrus de Moraes Barbosa**

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

*Tiágo Benedito dos Santos*  
**Prof. Dr. Tiágo Benedito dos Santos**

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

*Hélida Mara Magalhães*

**Profa. Dra. Hélida Mara Magalhães**

UNIPAR – Universidade Paranaense / Umuarama (PR)

**Prof. Dr. Daniel Fernandes da Silva**

UFPR – Universidade Federal do Paraná / Curitiba (PR)

*Daniel Fernandes da Silva*

Presidente Prudente, 31 de outubro de 2022.

## **DEDICATÓRIA**

À minha família, meu alicerce e principais incentivadores  
para que eu chegasse até aqui. Dedico.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e saúde, pela oportunidade de trilhar a vida acadêmica com pessoas maravilhosas. Gratidão.

À minha família, minha base. Amor, paciência, incentivo e intercessão, nada disso seria possível sem a ajuda de vocês. Mãe, pai e irmã, obrigada por tudo!  
Ao meu esposo pelo encorajamento a me candidatar para o doutorado e aos meus filhos João Guilherme e Bruno que chegaram durante esse trajeto me tornando uma pessoa mais forte. Amo muito!

À professora Dra. Alessandra Ferreira Ribas, pela orientação com tamanha dedicação, paciência e amizade. Nunca vou me esquecer do seu auxílio, muito obrigada!

À professora Dra. Ana Cláudia Pacheco Santos, pelas sugestões para aprimoramento deste trabalho e pela amizade desde os tempos de graduação.

À banca de acompanhamento pela contribuição na construção desta tese.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos. Código de financiamento 001.

À Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), pela estrutura excelente e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia pelo conhecimento adquirido e amizade ao longo dos anos.

À amiga de doutorado Viviane Cacefo por me auxiliar desde a execução do experimento, até as análises mais complexas. Obrigada pelo carinho e amizade.

Aos amigos que fiz durante o doutorado e que levarei para toda vida.

À todos os funcionários, especialmente às técnicas de laboratório Mayara, Viviane e Cristiane pela disponibilidade em me ajudar nas análises laboratoriais e amizade.

À todos que contribuíram de forma direta e indireta para que esse trabalho fosse possível: **MEUS AGRADECIMENTOS!**

*...porque sem mim nada podeis fazer... (João 15:5b)*

## RESUMO

### Caracterização de plantas transformadas de *Urochloa brizantha* sob déficit hídrico e validação de genes de referência para estresse salino

Gramíneas forrageiras, dentre elas as do gênero *Urochloa sp.*, possuem grande importância para as cadeias produtivas de carne e leite no Brasil, entretanto ainda há poucos estudos visando melhorar a tolerância à seca, considerando que com as mudanças climáticas previstas, há demanda por culturas resistentes a esse estresse. Plantas transgênicas com o gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* sob controle do promotor induzido por estresse *AIPC*, seriam uma alternativa adequada, considerando que a prolina exerce uma contribuição de extrema importância na mitigação da deficiência hídrica. O capítulo 1 dessa tese teve por objetivo avaliar plantas de *Urochloa brizantha* transformadas com a construção *AIPC:P5CS* quanto à bioquímica, fisiologia e caracterização molecular na resposta às condições de déficit hídrico. Para isso as plantas (controle e transformadas) foram conduzidas por aproximadamente 30 dias com irrigação diária por gotejamento, próximo à sua capacidade de campo, e após o déficit hídrico foi imposto por suspensão da água até as plantas atingirem valores de potencial hídrico de - 3,0 a -3,5 MPa, onde foram analisados conteúdo de prolina, MDA, clorofila, trocas gasosas foliares, biomassa e perfil transcricional do gene nativo *UbP5CS* e do transgene *VaP5CS*. A análise de três eventos de braquiária transformados com a construção *AIPC:P5CS* revelou que o evento E3 apresentou diferenças fisiológicas, bioquímicas e moleculares comparados aos outros eventos e ao controle. Além disso, esse evento exibiu diferença fenotípica dos demais. Mesmo apresentando essas diferenças, não houve constatação de maior tolerância ao déficit hídrico dos eventos em relação ao controle não transformado. O capítulo 2 refere-se a seleção de genes de referência para estresse salino em *U. brizantha*. A salinidade é um dos estresses abióticos mais importantes que afetam a produtividade das plantas. A expressão quantitativa de genes usando PCR em tempo real (RT-qPCR) é uma ferramenta que mensura as mudanças transcricionais que ocorrem em tecidos vegetais sob estresse. Para uma análise RT-qPCR válida, a normalização contra os genes de referência apropriados é essencial para a precisão dos dados. Apesar da importância do capim-braquiária (syn. *Urochloa*) como forrageira tropical, não há estudos sobre a estabilidade de genes de referência sob estresse salino nesta espécie. Este estudo teve como objetivo avaliar a estabilidade de sete genes candidatos de referência: *Actin 12*; *fator de iniciação eucariótico 4A*; *fator de alongamento 1-  $\alpha$* ; *tubulina  $\alpha$ -5*; *tubulina  $\beta$ -6*; *enzima conjugadora de ubiquitina* e *glicose-6-fosfato desidrogenase* para ensaios quantitativos de PCR em tempo real em *U. brizantha* sob estresse salino. O RNA total foi extraído de folhas e raízes de plantas cultivadas em sistema hidropônico contendo NaCl 200 mM durante 0, 6, 12 e 24 hrs para análise de RT-qPCR. Foi utilizado a ferramenta da web RefFinder para estabelecer uma classificação abrangente para a estabilidade do gene. Identificamos que *eIF4a*,  *$\alpha$ -Tub5* e *Ubico* foram os genes de referência mais adequados para amostras de folhas, enquanto *eIF4a*, *Act12* e *Ubico* foram os genes mais estáveis nas raízes. Os genes mais e menos estáveis foram então usados para normalizar a expressão relativa de um gene transportador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (*NHX*). A quantificação relativa desse gene variou de acordo com os controles internos (genes mais estáveis, menos estáveis), confirmando a escolha dos genes de referência.

**Palavras-chave:** prolina; estresse abiótico; normalizadores; forrageira.



## ABSTRACT

### Characterization of transformed *Urochloa brizantha* plants under water stress and validation of reference genes for salt stress

Forage grasses, including those of the genus *Urochloa* sp., are of great importance for the meat and milk production chains in Brazil, however, there are still few studies aimed at improving drought tolerance, considering that with the predicted climate changes, there is a demand for resistant crops to that stress. Transgenic plants with the *P5CS* gene of *Vigna aconitifolia* under the control of the *AIPC* stress-induced promoter would be a suitable alternative, considering that proline plays an extremely important role in mitigating water deficit. Chapter 1 of this thesis aimed to evaluate *U. brizantha* plants transformed the *AIPC:P5CS* construct for biochemistry, physiology and molecular characterization in response to water deficit conditions. For this, the plants (control and transformed) were conducted for approximately 30 days with daily drip irrigation, close to their field capacity, and after the water deficit was imposed by water suspension until the plants reached water potential values of -3.0 to -3.5 MPa, where the content of proline, MDA, chlorophyll, leaf gas exchange, biomass and transcriptional profile of the native gene *UbP5CS* and the transgene *VaP5CS* were analyzed. The analysis of three brachiaria events transformed with the *AIPC:P5CS* construct revealed that the E3 event presented physiological, biochemical and molecular differences compared to the other events and the control. In addition, this event exhibited a phenotypic difference from the others. Even with these differences, there was no evidence of greater tolerance to the water deficit of the events in relation to the untransformed control. Chapter 2 refers to the selection of reference genes for salt stress in *U. brizantha*. Salinity is one of the most important abiotic stresses that affect plant productivity. Quantitative gene expression using real-time PCR (RT-qPCR) is a powerful tool for measuring transcriptional changes that occur in plant tissues under stress. For valid RT-qPCR analysis, normalization against the appropriate reference genes is essential for data accuracy. Despite the importance of signal grass (syn. *Urochloa*) as a tropical forage, there are no studies on the stability of reference genes under saline stress in this species. This study aimed to evaluate the stability of seven candidate reference genes: *Actin 12*; *eukaryotic initiation factor 4A*; *elongation factor 1-  $\alpha$* ;  *$\alpha$ -5 tubulin*;  *$\beta$ -6 tubulin*; *ubiquitin-conjugating enzyme* and *glucose-6-phosphate dehydrogenase* for quantitative real-time PCR assays in *Urochloa brizantha* under saline stress. Total RNA was extracted from leaves and roots of plants grown in a hydroponic system containing 200 mM NaCl for 0, 6, 12 and 24 hrs for RT-qPCR analysis. We used the RefFinder web tool to establish a comprehensive ranking for gene stability. We identified that *eIF4a*,  *$\alpha$ -Tub5* and *Ubico* were the most suitable reference genes for leaf samples, while *eIF4a*, *Act12* and *Ubico* were the most stable genes in roots. The most and least stable genes were then used to normalize the relative expression of a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (*NHX*) transporter gene. The relative quantification of this gene varied according to the internal controls (more stable genes, less stable genes), confirming the choice of reference genes.

**Keywords:** proline; abiotic stress; normalizers; forager.

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

A	– Assimilação líquida de CO <sub>2</sub>
cDNA	– DNA complementar
<i>C<sub>i</sub></i>	– Conteúdo intracelular de CO <sub>2</sub>
<i>C<sub>q</sub></i>	– Ciclo de quantificação
CQB	– Certificado de qualidade em biossegurança
CTAB	– Brometo de cetiltrimetilamônio
DEPC	– Diethyl pyrocarbonate (dietil pirocarbonato)
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
DNase	– Desoxirribonuclease
dNTP	– Desoxirribonucleotídeo fosfatado
<i>E</i>	– Transpiração
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROS	– Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	– Eficiência do uso da água
g	– Gramas
<i>g</i>	– Gravidade
<i>G<sub>s</sub></i>	– Condutância estomática
hrs	– Horas
kg	– Quilogramas
L	– Litro
M	– Molar
MDA	– Malondialdeído
mg	– Miligramas
min	– Minutos
mL	– Mililitros
mM	– Milimolar
mmol	– Milimol
NaCl	– Cloreto de sódio
ng	– Nanogramas
nm	– Nanômetros
pb	– Pares de bases
PCR	– <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
pH	– Potencial hidrogeniônico
pg	– Picograma
p/v	– Peso por volume
RNA	– Ácido ribonucleico
RNAse	– Ribonuclease
RT-qPCR	– PCR quantitativo em tempo real
s	– Segundos
TBE	– Tris / Ácido bórico / EDTA

TBA	– Ácido tiobarbitúrico
TCA	– Ácido tricloroacético
Tnos	– Terminador do gene da nopalina sintase
Tpin	– Terminador do gene <i>Pin II</i>
v/v	– Volume por volume
°C	– grau Celsius
µg	– Microgramas
µL	– Microlitros
µM	– Micromolar
µmol	– Micromol

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1 – Biossíntese e degradação da prolina em plantas a partir do glutamato...22
- Figura 2 – Vetor pJS107 utilizado para transformação de *U. brizantha* .....24
- Figura 3 – PCR para confirmação de amplificação do fragmento do gene *VaP5CS* em plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e eventos de transformação *AIPC:P5CS*.....33
- Figura 4 – Temperaturas máxima, média e mínima do ar durante o período do experimento.....34
- Figura 5 – Condução do experimento de déficit hídrico em plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação *AIPC:P5CS*. .....34
- Figura 6 – Plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação *AIPC:P5CS* submetidas à deficiência hídrica e recuperação pós estresse.....40
- Figura 7 – Potencial de água foliar em plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação *AIPC:P5CS* submetidas à deficiência hídrica e recuperação pós estresse.....41
- Figura 8 – Conteúdo de prolina nas folhas em plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação *AIPC:P5CS* submetidas à deficiência hídrica e recuperação pós estresse.....42
- Figura 9 – Conteúdo de malondialdeído (MDA) em plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação *AIPC:P5CS* submetidas à deficiência hídrica e recuperação pós estresse.....42
- Figura 10 – Conteúdo de clorofila total em plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação *AIPC:P5CS* submetidas à deficiência hídrica e recuperação pós estresse.....43
- Figura 11 – Trocas gasosas em plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação *AIPC:P5CS* submetidas à deficiência hídrica e recuperação pós estresse. ....44
- Figura 12 – Massa seca de parte aérea de plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação *AIPC:P5CS* na recuperação após deficiência hídrica.....46

Figura 13 – Massa seca de raiz de plantas de <i>U. brizantha</i> controle (não transformadas) e três eventos de transformação <i>AIPC:P5CS</i> na recuperação após deficiência hídrica.....	46
Figura 14 – Integridade do RNA das amostras de folhas de <i>U. brizantha</i> controle (não transformadas) e três eventos de transformação <i>AIPC:P5CS</i> submetidas à deficiência hídrica e recuperação pós estresse.....	47
Figura 15 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os cDNAs das amostras de folhas de <i>U. brizantha</i> controle (não transformadas) e três eventos de transformação <i>AIPC:P5CS</i> submetidas à deficiência hídrica e recuperação pós estresse com iniciadores para a amplificação de fragmento do gene <i>eIF4a</i> .....	48
Figura 16 – Amplificação do gene <i>UbP5CS</i> . Curva de dissociação demonstrando a especificidade de amplificação (esquerda) e banda em gel de agarose 1,5% (direita). .....	49
Figura 17 – Expressão relativa do gene <i>UbP5CS</i> em em plantas de <i>U. brizantha</i> controle (não transformadas) e três eventos de transformação <i>AIPC:P5CS</i> submetidas à deficiência hídrica e recuperação pós estresse. ....	50

## CAPÍTULO 2

Fig. 1. Salt stress experiment in the greenhouse. (A) <i>U. brizantha</i> seeds germinated in commercial substrate and daily irrigated with tap water. (B) Plants transferred to the hydroponic system with ½ Hoagland's nutrient solution and constant aeration (C) Plant for sampling. Scale bars: A = 2 cm, B = 3 cm and C = 1 cm, respectively. ....	88
Fig. 2. Cq average of all treatments (0, 6, 12 and 24 h) in shoots or roots of <i>U. brizantha</i> plants under salt stress. The Boxplot graph shows the median values as lines in the boxes and bars show the upper and lower limits. Box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R software. Whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots; crosses represent sample means; bars indicate 95% confidence intervals of the means; width of the boxes is proportional to the square root of the sample size; data points are plotted as open circles. n = 12 sample points. The graph was generated by the BoxPlotR: a web-tool available on: <a href="http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/">http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/</a> .....	88
Fig. 3. Comprehensive rank of gene stability calculated by RefFinder web-tool. Shoots (A) and roots (B).....	89
Fig. 4. Relative expression of NHX gene in shoots (A) and roots (B) of <i>U. brizantha</i> under salt stress. Statistical analysis was performed by t-test (* p < 0.05) between means of the treatment without NaCl (0 h) and hours after NaCl addition for the most and the least stable reference genes selected by RefFinder. Bars represent the	

means and standard errors of three biological replicates each one was technical replicates twice.....90

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Table 1 Description of the reference genes evaluated for stability in *U. brizantha* plants under salt stress. ....86

Table 2 Classification of candidate reference genes in shoots and roots of *U. brizantha* under salt stress according to stability values.....87

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	18
2.1	<i>Urochloa brizantha</i> .....	18
2.2	Deficiência hídrica.....	19
2.3	Salinidade .....	20
2.4	Acúmulo de prolina.....	21
2.5	Transformação genética .....	22
2.6	Promotor <i>AIPC</i> .....	24
2.7	Genes de referência .....	25
3	CAPÍTULO 1 .....	28
3.1	Introdução.....	30
3.2	Objetivo .....	31
3.2.1	Objetivo geral .....	31
3.2.2	Objetivos específicos.....	31
3.3	Material e Métodos .....	31
3.3.1	Delineamento experimental.....	31
3.3.2	Material vegetal .....	32
3.3.3	Propagação vegetativa dos eventos.....	32
3.3.4	Avaliações da tolerância ao déficit hídrico em plantas transformadas..	33
3.3.5	Análises fisiológicas .....	34
3.3.5.1	Estado hídrico e caracterização do estresse.....	34
3.3.5.2	Trocas gasosas foliares.....	35
3.3.6	Análises bioquímicas.....	35
3.3.6.1	Conteúdo de prolina nas folhas .....	35
3.3.6.2	Concentração de malondialdeído .....	36
3.3.6.3	Conteúdo de clorofila total .....	36
3.3.7	Biomassa .....	37
3.3.8	Análises moleculares.....	37
3.3.8.1	Extração de RNA e síntese de cDNA .....	37
3.3.8.2	PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR) .....	38
3.3.8.3	Análise da expressão gênica .....	38
3.3.9	Análise estatística .....	39
3.4	Resultados .....	40
3.4.1	Estado hídrico e caracterização do estresse.....	40
3.4.2	Análises bioquímicas.....	41
3.4.3	Análises fisiológicas .....	43
3.4.4	Biomassa .....	45
3.4.5	Análises moleculares.....	47
3.5	Discussão .....	50
3.6	Considerações finais .....	57
3.7	Conclusão .....	57
	REFERÊNCIAS.....	58



	<b>ANEXOS .....</b>	<b>66</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>67</b>
<b>4.1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>68</b>
<b>4.2</b>	<b>Materials and methods.....</b>	<b>70</b>
4.2.1	Experimental conditions .....	70
4.2.2	Total RNA extraction and cDNA synthesis .....	71
4.2.3	Reference genes .....	71
4.2.4	RT-qPCR analysis .....	71
4.2.5	Reference genes stability and validation .....	72
<b>4.3</b>	<b>Results .....</b>	<b>73</b>
<b>4.4</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>75</b>
<b>4.5</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>78</b>
	<b>REFERENCES.....</b>	<b>79</b>
	<b>ANEXO - NORMAS DA PUBLICAÇÃO.....</b>	<b>91</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Os principais estresses abióticos como frio, calor, seca e salinidade, afetam negativamente a sobrevivência e produção de culturas em até 70% e ameaçam a segurança alimentar em todo o mundo. A desidratação é o principal fator no crescimento, desenvolvimento e produtividade das plantas, principalmente devido ao sal, seca e estresse térmico (THAKUR *et al.*, 2010)

Quase todas as regiões cultivadas do mundo enfrentam condições de déficit hídrico e desenvolver plantas que possam resistir às condições de deficiência de água por um longo tempo e manter o rendimento constituem uma das principais pesquisas na área da agricultura (KHALID *et al.*, 2019).

O acúmulo do aminoácido prolina é uma resposta comum em várias espécies de plantas a uma ampla gama de estresses, incluindo seca e salinidade. A prolina tem papéis multifacetados nas plantas, pois protege as células contra danos, agindo como um osmoprotetor, antioxidante e uma fonte de energia para impulsionar o crescimento durante a recuperação do estresse. Além disso, tem impacto em vários processos de desenvolvimento durante o estresse (KHANNA-CHOPRA *et al.*, 2019).

Em gramíneas forrageiras como *Urochloa brizantha*, há barreiras para incorporação de novas características agronômicas importantes por meio de cruzamento pelo melhoramento convencional, considerando a forma de reprodução apomítica, além das diferenças na ploidia entre as plantas sexuadas e apomíticas (CABRAL *et al.*, 2018). A inserção do gene *AIPC:P5CS* por transgenia é uma alternativa para melhorar a tolerância à seca, considerando que com as mudanças climáticas previstas, há demanda por culturas resistentes a esse estresse.

Muitos estudos que retratam o impacto dos estresses abióticos em plantas utilizam a reação em cadeia da polimerase via transcrição reversa quantitativa em tempo real (RT-qPCR) como uma ferramenta para entender o mecanismo de tolerância ao estresse das plantas por ser o método de quantificação mais prevalente utilizado em ensaios de expressão gênica por sua especificidade, precisão, eficiência e alta sensibilidade (JIANG *et al.*, 2014).

A normalização dos dados de expressão gênica é essencial para corrigir variações entre diferentes amostras e condições e é geralmente realizada usando um gene de referência que deve ser expresso em níveis estáveis,

independentemente das condições experimentais, tipos de células, tecidos, estágio de desenvolvimento ou tratamento de estresse (WONG; MEDRANO, 2005).

Assim, a seleção do gene de referência apropriado em *U. brizantha* sob estresse salino fornece novas informações para investigar a expressão relativa de genes candidatos envolvidos na resposta do capim braquiária às condições de estresse salino.

Nesse contexto, torna-se pertinente a caracterização de plantas de *U. brizantha* transformadas com o gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* controlado por um promotor induzido por estresse (*AIPC*) sob condições de déficit hídrico como também a validação de genes de referência para estresse salino em plantas de *U. brizantha*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Urochloa brizantha*

O gênero *Urochloa* (syn. *Brachiaria*) P. Beauv sp. é classificado como pertencente à família Poaceae, subfamília Panicoideae e tribo Paniceae (SORENG *et al.*, 2017) e inclui mais de 110 espécies distribuídas por regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (SALARIATO *et al.*, 2010). O número de cromossomos básicos do gênero é  $X=9$ , com predominância de tetraplóides apomíticos ( $2n=4X=36$ ), sendo encontrados diplóides naturais em *U. brizantha*, *U. decumbens* e *U. ruziziensis* com reprodução sexuada. Porém as plantas comerciais de maior importância forrageira são tetraplóides como *U. brizantha*, *U. decumbens* e *U. mutica* ou hexaplóides como *U. humidicola* e apomíticas (VALLE *et al.*, 2004).

No Brasil, dentre outras gramíneas forrageiras, *U. brizantha*, a cultivar Marandu tem uma representatividade de 51,4 milhões de hectares e beneficia toda a cadeia produtiva da carne e leite (EMBRAPA, 2017). Esta cultivar originária do Zimbábue, África foi introduzida no Brasil em 1967 e lançada ao mercado em 1984 (NUNES *et al.*, 1984). Durante mais de 20 anos ela foi a braquiária mais produtiva do mercado e até hoje ocupa cerca de 40% das pastagens no país (JANK *et al.*, 2017).

Em *U. brizantha* e outras gramíneas tropicais, o embrião é formado por apomixia, um processo assexual (sem a fusão de gametas) no qual ocorre a formação do embrião derivado apenas de tecidos maternos, ou seja, clones da planta mãe (KARASAWA, 2009).

A variabilidade genética das pastagens tropicais é extremamente limitada, por serem oriundas de extensos monocultivos de cultivares apomíticas. Essa situação impõe sério risco à produção animal em pastagens tropicais, sendo de urgência o desenvolvimento de outras alternativas para o mercado visando à diversificação das pastagens (RAPOSO *et al.*, 2019).

Apesar da elevada importância na agricultura tropical, *U. brizantha* ainda pode ser considerada uma “cultura órfã” em termos de recursos para análises genéticas moleculares, biológicas e genômicas, pois há apenas um corpo limitado de

conhecimento sobre mudanças relacionadas ao estresse hídrico nos padrões de expressão gênica (JONES *et al.*, 2021).

## 2.2 Deficiência hídrica

A limitação de água para as plantas é uma problemática que está se acentuando ao longo do tempo, assim como sua duração e intensidade (SUN *et al.*, 2020), ainda mais pelo fato de que as mudanças climáticas podem nos trazer secas mais severas, ocasionando desastrosos impactos, entre eles, na produção de alimentos via agricultura e pecuária (FAO, 2019).

Em termos de planeta, cerca de 35% das terras são áridas ou semi-áridas, onde a única fonte de água é a chuva. Existem áreas com quantidades suficientes de chuvas, mas a distribuição é desigual ao longo do ano e ainda enfrentam condições de déficit hídrico que diminuem o rendimento das culturas (KHALID *et al.*, 2019).

Já é bem conhecido o papel de extrema importância que a água exerce nas plantas e que a deficiência hídrica limita o seu crescimento (GUPTA *et al.*, 2020). Quando há restrição na disponibilidade de água para as plantas, os processos celulares vitais para funcionamento do organismo ficam prejudicados, pois requerem água suficiente para serem executados (ZARGAR *et al.*, 2017).

O mecanismo de resposta fisiológica para estresses abióticos como a seca, ocorre a partir de um complexo caminho de respostas, começando com a percepção do estresse, que desencadeia uma cascata de eventos moleculares, terminando em vários níveis de alterações fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento (BHARGAVA; SAWANT, 2013).

Entre as alterações na manutenção do metabolismo das plantas, podemos citar as alterações morfológicas, respostas fisiológicas e bioquímicas, incluindo mudanças na fotossíntese, respiração, troca iônica, transpiração, regulação osmótica, ativação de proteínas e enzimas antioxidantes (SANTOS *et al.*, 2022).

Adicionalmente, uma das principais respostas à seca nas plantas envolve a manutenção de equilíbrio osmótico. Para compensar a perda de pressão de turgor, as células vegetais fazem ajustes osmóticos, aumentando o acúmulo de solutos compatíveis (BLUM, 2017).

## 2.3 Salinidade

A salinidade do solo é um grande estresse abiótico que restringe o crescimento e o desenvolvimento das plantas, ainda mais sabendo que quase todas as culturas que são importantes para os seres humanos são sensíveis à alta concentração de sal no solo (LIANG *et al.*, 2018). Mais de um terço das terras irrigadas no mundo são afetadas pela salinização, prejudicando a produção e o rendimento das culturas (FAO, 2011). Em muitas áreas de produção, a utilização de água para irrigação de baixa qualidade e a aplicação de quantidades excessivas de fertilizantes são as principais razões para o problema do aumento da salinidade do solo (DIAS; BLANCO, 2010).

O estresse salino impõe várias restrições importantes nas plantas. A primeira limitação é um estresse osmótico (o potencial hídrico externo fica mais baixo) que compromete a capacidade das raízes das plantas absorverem água, e para lidar com esta questão, as quais devem se ajustar osmoticamente. Este processo desencadeia vários principais eventos nos tecidos vegetais, como fechamento estomático e conseqüentemente diminuição na assimilação de CO<sub>2</sub>. A segunda restrição imposta pela salinidade é o desequilíbrio iônico (muitas vezes chamado de "estresse iônico" ou "toxicidade iônica"). Na maioria dos casos, essa restrição está associada com um acúmulo excessivo de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> em compartimentos intracelulares metabolicamente ativos. Parece que o efeito negativo causado por Na<sup>+</sup> ou Cl<sup>-</sup> não é uma toxicidade *per se*, mas resulta da interferência com a absorção ou metabolismo de outros íons essenciais (ZHAO *et al.*, 2020).

O estresse salino afeta todos os principais processos, como germinação, crescimento, pigmentos fotossintéticos e fotossíntese, relação hídrica, desequilíbrio de nutrientes, estresse oxidativo e rendimento (PARIHAR *et al.*, 2015). Na parte aérea das plantas, tanto o fechamento estomático induzido pelo estresse osmótico e acúmulo de altos níveis de Na<sup>+</sup> no citosol prejudicam a maquinaria fotossintética. Como resultado, a quantidade de luz absorvida excede a demanda por fotossíntese, que leva à formação de EROS (Espécies Reativas de Oxigênio) em tecidos verdes (ASADA, 2006).

As plantas podem desencadear diferentes mecanismos fisiológicos e bioquímicos para lidar com o estresse por salinidade, que incluem: alterações na

morfologia, anatomia, relações hídricas, fotossíntese, hormônios, distribuição de íons, adaptação bioquímica (ASHRAF; HARRIS, 2013), ativação e alteração da expressão de inúmeros genes de diferentes grupos funcionais responsáveis por minimizar os efeitos deletérios desse estresse (MUNNS; GILLIHAM, 2015).

## 2.4 Acúmulo de prolina

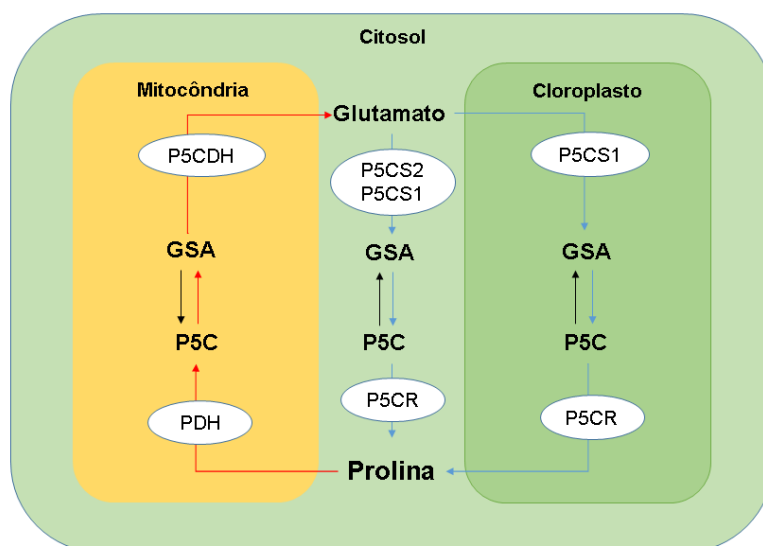
Para mitigar o estresse hídrico, as plantas respondem também com a síntese e acúmulo de solutos orgânicos conhecidos como osmoprotetores ou solutos compatíveis, como a prolina (Pro), glicina betaína, colina, O-sulfato, açúcares e polióis (IQBAL *et al.*, 2014; KHAN *et al.*, 2014; KLEPEK *et al.*, 2005; SZABADOS; SAVOURE, 2010). Entre os principais solutos compatíveis, a prolina é um aminoácido cíclico de baixo peso molecular que é conhecido por fornecer ajustes osmóticos em plantas sob ambientes estressantes (SZABADOS; SAVOURE, 2010; KAUR; ASTHIR, 2015). O acúmulo de solutos como a prolina diminui o potencial osmótico da célula, que aumenta o gradiente para influxo de água e manutenção do turgor, esse ajuste osmótico ajuda a manter o equilíbrio hídrico da célula, minimizando assim os efeitos nocivos da seca (CHOURASIA, 2017), e também responsável por diminuir os efeitos de EROS, estabilizando o sistema antioxidante e protegendo a integridade das membranas celulares (REDDY *et al.*, 2015; SZABADOS; SAVOURE, 2010). A prolina também melhora a tolerância ao estresse influenciando respostas adaptativas, agindo como um quelante de metal, servindo como fonte de nitrogênio/carbono para células sob condições de estresse e após o alívio do estresse, mantendo o pH citoplasmático e como chaperona molecular para estabilizar estruturas subcelulares (MEENA *et al.*, 2019).

O nível de acúmulo de prolina nas plantas varia entre espécies e pode ser 100 vezes maior durante o estresse do que em condições normais de crescimento (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008). A síntese da prolina nas plantas ocorre por duas vias, a principal quando as plantas estão sob estresse osmótico é pelo glutamato e ocorre no citosol ou cloroplasto, catalisadas por duas enzimas, sendo elas  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase - P5CS (EC 2.7.2.11/1.2.1.41) e  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato redutase - P5CR (EC 1.5.1.2), e duas enzimas que catalisam a degradação, a prolina desidrogenase - PDH (EC 1.5.99.8) e a pirrolina-5-carboxilato

desidrogenase - P5CDH (EC 1.5.1.12). Alternativamente, a prolina pode ser sintetizada a partir de ornitina, pela enzima ornitina  $\delta$ -aminotransferase - OAT (EC 2.6.1.13). A enzima P5CS é limitante no processo de biossíntese da prolina, sendo inibida pelo acúmulo deste aminoácido (SZABADOS; SAVOURE, 2010).

O gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* L. foi introduzido em genoma de arroz pelo método biobalístico. A expressão deste transgene *P5CS* sob o controle de um promotor estresse induzido (*AIPC*) levou à superprodução induzida por estresse hídrico e salino da enzima P5CS e acúmulo de prolina em plantas transgênicas de arroz. Em diferentes linhagens de plantas transgênicas, o teor de prolina estava entre 67 e 152% acima das plantas controle (ZHU *et al.*, 1998).

Figura 1 – Biossíntese e degradação da prolina em plantas a partir do glutamato.



P5CS:  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase; P5CR:  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato redutase; PDH: prolina desidrogenase; P5CDH: pirrolina-5-carboxilato desidrogenase; GSA: Glutamato semi-aldeído; P5C: Pirrolina 5 carboxilato. Setas azuis indicam a biossíntese e setas vermelhas indicam a degradação da prolina. Fonte: O Autor, adaptado de Szabados e Savoure (2010).

## 2.5 Transformação genética

A transgenia em plantas envolve modificações nas características qualitativas bem como quantitativas por meio da transferência de genes desejados (ASHRAF, 2010). A maior ênfase tem sido na engenharia dos genes que codificam reguladores de crescimento, solutos compatíveis e antioxidantes envolvidos na



tolerância ao estresse (FAHAD *et al.*, 2017). Essa tecnologia é uma ferramenta de auxílio ao melhoramento genético tradicional, que transpõe as barreiras do cruzamento entre diferentes espécies e acelera o processo de seleção de plantas (CARRER; BARBOSA; RAMIRO, 2010).

A estratégia de transferência de genes envolvidos na biossíntese de osmoprotetores para plantas tem mostrado ser efetiva para aumentar a tolerância a temperaturas extremas (ALIA, 2003), salinidade (GAO *et al.*, 2000; GUERZONI, 2010) e seca (MOLINARI *et al.*, 2004; VENDRUSCOLO *et al.*, 2007). Portanto, plantas transgênicas contendo genes codificando enzimas envolvidas na produção de osmólitos como a prolina, manitol e glicina betaina desempenhariam redução significativa de sensibilidade frente ao estresse hídrico.

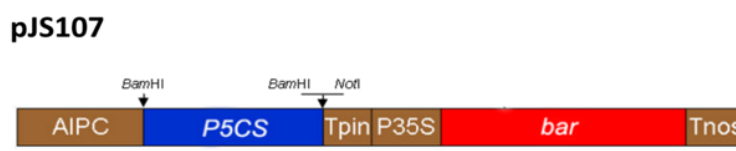
Bellido *et al.* (2021) revisando o *status* atual da cultura *in vitro* e métodos de transformação genética com foco em gramíneas apomíticas, ressaltaram que para espécies de gramíneas, os métodos disponíveis para transformação e desenvolvimento da planta permanecem críticos para o melhoramento das culturas, principalmente devido a desvantagens na regeneração *in vitro* e que apesar da existência de muitos protocolos em gramíneas para alcançar a transformação genética por meio de *Agrobacterium* ou da biobalística, suas eficiências são dependentes do genótipo e ainda muito baixas devido à recalcitrância dessas espécies à regeneração *in vitro*.

Em *U. brizantha*, Cabral *et al.* (2018), introduziram genes marcadores *GUS* (gene da beta-glucuronidase da *Escherichia coli*) e *HPTII* por biobalística, usando calos embriogênicos e suspensões de células como tecidos alvo, porém somente uma planta foi regenerada e aclimatizada.

Takamori *et al.* (2015) desenvolveram um protocolo para a regeneração *in vitro* de plantas de *U. brizantha* e determinaram níveis adequados de diversos agentes seletivos a serem utilizados em trabalhos de transformação genética dessa espécie (PEREIRA *et al.*, 2016), após o estabelecimento dos parâmetros de bombardeamento de partículas, sendo como fonte de explante calos derivados de sementes, distância de bombardeamento de 6 cm, concentração da partícula de ouro 60 mg mL<sup>-1</sup> e pressão 1100 psi, estes foram adotados para a inserção do vetor pJS107 (Figura 2), contendo os genes *AIPC:P5CS* e *35S:bar* (TAKAMORI, 2018). Calos bombardeados foram cultivados em meio seletivo contendo 2 mg L<sup>-1</sup> 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. Um total de 79 plantas foram analisadas. Os fragmentos correspondentes ao 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. As plantas transformadas regeneradas e aclimatizadas resultantes desses trabalhos são o objeto do presente estudo, que é o pioneiro, tendo em vista que ainda não há outras braquiárias transgênicas com genes de interesse agrônômico.

Figura 2 – Vetor pJS107 utilizado para transformação de *U. brizantha*



Fonte: Molinari (2007).

## 2.6 Promotor *AIPC*

Experimentos de transformação utilizando genes estresses-induzidos parece ser uma alternativa mais interessante para a transformação de *Urochloa* possibilitando assim aumento na tolerância a estresses incluindo a seca.

Su e Wu (2004) relataram que a expressão estresse-induzido do transgene *P5CS* resultou em maior produção de biomassa quando comparado com a expressão constitutiva. Quando as plantas de arroz foram cultivadas em condições normais, a superexpressão constitutiva de prolina mostrou efeitos prejudiciais no crescimento das plantas. No entanto, quando um promotor-induzido *AIPC* (ABA inducible promoter complex) ou seja, um complexo promotor induzido pelo ácido abscísico, foi utilizado para conduzir a expressão do gene *P5CS*, o acúmulo de prolina ocorreu apenas quando as plantas estavam sob estresse. Desta forma os baixos níveis de prolina não interferiram no crescimento normal das plantas transgênicas resultando em um rápido crescimento em condições de estresse do que com o acúmulo constitutivo da prolina (SU; WU, 2004).

O complexo promotor estresse induzido *AIPC* inclui um elemento ABA-responsivo, com 49 pb (SHEN; HO, 1995), ligado a um promotor mínimo do gene da

actina do arroz com 180 pb (SU *et al.*, 1998) e ao íntron do gene *HVA22* (SHEN; HO, 1995). Este gene pode ser expresso em órgãos e tecidos, além de sementes, como verificado em brotos e raízes de mudas de cevada tratadas com frio e seca, em trabalhos de Shen *et al.* (2001).

Plantas transgênicas de cana-de-açúcar utilizando o gene *AIPC:P5CS* foram produzidas e após 9 dias sem irrigação, o conteúdo de prolina nos eventos transgênicos estava em média 2,5 vezes maior do que nos controles, conferindo tolerância para essas plantas sob condições severas de déficit hídrico, sugerindo que o acúmulo de prolina atuou como um componente do sistema de defesa antioxidante ao invés de um mediador de ajuste osmótico (MOLINARI *et al.*, 2007).

Guerzoni *et al.* (2014) utilizando também plantas de cana-de-açúcar transformadas com o gene *AIPC:P5CS* sob estresse salino, obtiveram ao final de 28 dias, linhagens transgênicas com acúmulo de quantidades até 25% maiores de prolina quando comparada com o controle não transformado. Esses autores sugerem que a prolina contribuiu para a proteção do aparelho fotossintético e prevenção de dano oxidativo.

Plantas de trigo transgênico com a mesma construção *AIPC:P5CS* submetidos a 15 dias de escassez de água resultou em até 2,5 vezes mais conteúdo de prolina quando comparada com plantas controle não transformadas. A tolerância ao déficit hídrico observada foi principalmente devido aos mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo (VENDRUSCOLO *et al.*, 2007).

## 2.7 Genes de referência

Uma das metodologias para determinar os níveis de expressão de um gene por RT-qPCR é comparando a expressão do gene de interesse em diferentes condições com os genes de referência cujas expressões são estáveis sob várias condições experimentais. Para isso, métodos de análise estatística foram desenvolvidos para classificar os melhores genes de referência para um determinado organismo ou condição experimental como o geNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002), NormFinder (ANDERSEN *et al.*, 2002), BestKeeper (PFAFFL *et al.*, 2004) e o método  $\Delta C_t$  comparativo (SILVER *et al.*, 2006).

O geNorm determina os genes de referência mais estáveis com base no valor de estabilidade (M) para um gene de referência e calcula o número mínimo de candidatos genes de referência necessários para normalização dos genes alvo. Requer valores calculados de Cq (ciclo de quantificação) em quantidades relativas, usando a fórmula dada:  $[Q = E^{(\min Cq - Cq)}$ , em que Q representa quantidade da amostra em relação à amostra com a expressão mais alta, E é a eficiência de amplificação e min Cq são os valores mais baixos de Cq]. O valor da estabilidade (M) é definido como uma média pareada de variação (V) do gene em comparação com todos os outros genes de referência testados e o ponto de corte é 1,5 (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Se o valor M for menor que 1,5, ele representa um gene de referência candidato estável e valores mais altos refletem menos estável.

O NormFinder calcula os valores de estabilidade da expressão para genes de referência candidatos e avalia os pares de genes de referência mais estáveis, calcula variação intra e intergrupos usando uma comparação direta entre genes. Ele usa os mesmos arquivos de cálculo de entrada que são necessários para o geNorm com uma pequena variação, como a primeira linha representa uma amostra, a primeira coluna representa genes e a última linha representa um grupo de amostras. NormFinder é disponível com o suplemento da planilha do Excel (<https://moma.dk/normfinder-software>). Classifica genes de referência candidatos com base no valor da estabilidade da expressão. O menor valor M representa gene de referência mais estável (ANDERSEN *et al.*, 2002).

O BestKeeper determina o melhor gene de referência com base no fator de normalização (também chamado índice de Bestkeeper) e análise de correlação aos pares. Requer valores brutos de Cq como dados de entrada para selecionar os genes de referência candidatos mais estáveis e menos estáveis. Está disponível em um arquivo de planilha do Microsoft Excel (<http://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html>). Avalia a estabilidade do gene de referência candidato, comparando o desvio padrão de cada gene e médias desses valores. Também calcula o coeficiente de variância, coeficiente de correlação de Pearson (r), média geométrica (GM) e média aritmética (AM).

O método delta CT calcula o gene de referência candidato estável com base no desvio padrão e comparação pareada com outros genes. O delta Ct requer valores Cq brutos como dados de entrada. Considera um par de genes para cálculos e compara valores de delta Ct entre genes (SILVER *et al.*, 2006).

O RefFinder é uma ferramenta abrangente baseada na Web, desenvolvida para avaliar e rastrear genes de referência de extensos conjuntos de dados experimentais, é usado para gerar classificações de estabilidade abrangentes. Essa ferramenta calcula a estabilidade dos genes normalizadores testados atribuindo um peso individual para cada um dos quatro métodos descritos acima e estabelece uma classificação abrangente utilizando a média geométrica (XIE *et al.*, 2012).

A seleção do gene de referência apropriado para normalização de dados de RT-qPCR é um passo muito importante para a análise relativa da expressão gênica, pois o uso de genes de referência sem verificação prévia de sua expressão e estabilidade pode levar à interpretação incorreta dos dados e, assim, modificar resultados (SILVEIRA *et al.*, 2009).

Takamori *et al.* (2017), identificou genes de referência para estresses abióticos em *U. brizantha* e obteve os genes mais estáveis *fator de alongamento 1- $\alpha$* , para calor, *fator de alongamento 1- $\alpha$*  ou *enzima conjugadora de ubiquitina*, para frio e *fator de iniciação eucariótico 4A* para déficit hídrico.

Em nosso trabalho com *U. brizantha* sob estresse salino, identificamos que *eIF4a*,  *$\alpha$ -Tub5* e *Ubico* foram os genes de referência mais adequados para amostras de folhas, enquanto *eIF4a*, *Act12* e *Ubico* foram os genes mais estáveis nas raízes (SILVA *et al.*, 2021).

### 3 CAPÍTULO 1

## CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS TRANSFORMADAS DE *Urochloa brizantha* SOB DÉFICIT HÍDRICO

### RESUMO

Gramíneas forrageiras, dentre elas as do gênero *Urochloa* sp, possuem grande importância para as cadeias produtivas de carne e leite no Brasil, entretanto ainda há poucos estudos visando melhorar a tolerância à seca, considerando que com as mudanças climáticas previstas, há demanda por culturas resistentes a esse estresse. Plantas transgênicas com o gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* sob controle do promotor induzido por estresse *AIPC*, seriam uma alternativa adequada, considerando que a prolina exerce uma contribuição de extrema importância na mitigação da deficiência hídrica. O capítulo 1 dessa tese teve por objetivo avaliar plantas de *Urochloa brizantha* geneticamente modificadas para a superexpressão do gene *AIPC:P5CS* quanto à bioquímica, fisiologia e caracterização molecular na resposta às condições de déficit hídrico. Para isso as plantas (controle e transformadas) foram conduzidas por aproximadamente 30 dias com irrigação diária por gotejamento, próximo à sua capacidade de campo, e após o déficit hídrico foi imposto por suspensão da água até as plantas atingirem valores de potencial hídrico de - 3,0 a -3,5 MPa, onde foram analisados conteúdo de prolina, MDA, clorofila, trocas gasosas foliares, biomassa e perfil transcricional do gene nativo *UbP5CS* e do transgene *VaP5CS*. A análise de três eventos de braquiária transformados com a construção *AIPC:P5CS* revelou que o evento E3 apresentou diferenças fisiológicas, bioquímicas e moleculares comparados aos outros eventos e ao controle. Além disso, esse evento exibiu diferença fenotípica dos demais. Mesmo apresentando essas diferenças, não houve constatação de maior tolerância ao déficit hídrico dos eventos em relação ao controle não transformado, não proporcionando maior eficiência do uso da água no déficit quanto na recuperação e conseqüentemente acúmulo de biomassa de parte aérea.

**Palavras-chave:** prolina. estresse abiótico. forrageira.

## CHARACTERIZATION OF TRANSFORMED *Urochloa brizantha* PLANTS UNDER WATER STRESS

### ABSTRACT

Forage grasses, including those of the genus *Urochloa* sp, are of great importance for the meat and milk production chains in Brazil, however, there are still few studies aimed at improving drought tolerance, considering that with the predicted climate changes, there is a demand for resistant crops to that stress. Transgenic plants with the *P5CS* gene of *Vigna aconitifolia* under the control of the *AIPC* stress-induced promoter would be a suitable alternative, considering that proline plays an extremely important role in mitigating water deficit. Chapter 1 of this thesis aimed to evaluate *Urochloa brizantha* plants genetically modified for the overexpression of the *AIPC:P5CS* gene in terms of biochemistry, physiology and molecular characterization in response to water deficit conditions. For this, the plants (control and transformed) were conducted for approximately 30 days with daily drip irrigation, close to their field capacity, and after the water deficit was imposed by water suspension until the plants reached water potential values of -3.0 to -3.5 MPa, where the content of proline, MDA, chlorophyll, leaf gas exchange, biomass and transcriptional profile of the native gene *UbP5CS* and the transgene *VaP5CS* were analyzed. The analysis of three brachiaria events transformed with the *AIPC:P5CS* construct revealed that the E3 event presented physiological, biochemical and molecular differences compared to the other events and the control. In addition, this event exhibited a phenotypic difference from the others. Even with these differences, there was no evidence of greater tolerance to the water deficit of the events in relation to the untransformed control, not providing greater efficiency in the use of water in the deficit as in the recovery and consequently accumulation of aerial part biomass.

**Keywords:** proline. abiotic stress. forager.

### 3.1 Introdução

Gramíneas forrageiras, dentre elas as do gênero *Urochloa sp*, representam grande importância para as cadeias produtivas de carne e leite no Brasil, sendo utilizados cerca de 172,5 milhões de hectares de áreas de pastagens (IBGE, 2017) e a maior parte destas é de pastagens cultivadas.

O Brasil é o segundo maior produtor de carne bovina, representando 15,3% de toda carne produzida no mundo (ABIEC, 2019). Apesar da importância econômica da pecuária de corte e leite e da proporção de áreas que as gramíneas forrageiras ocupam (45% do território nacional contra apenas 18% das áreas agrícolas) (IBGE, 2017) e possuindo o segundo maior rebanho bovino do mundo, com cerca de 214,69 milhões de cabeças (ABIEC, 2019), ainda há poucos estudos visando melhorar a produção de forragem, mesmo em épocas de estiagem ou problemas de salinidade no solo que ocorrem em muitas áreas distribuídas pelo país.

Como o modo de reprodução do gênero *Urochloa* é predominantemente apomítico, é fundamental que programas de melhoramento possam contar com meios alternativos para a obtenção de germoplasma melhorado, como por exemplo, mutações induzidas e produção de plantas geneticamente modificadas.

O gene *P5CS* codifica a enzima  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase a qual catalisa a conversão do glutamato para  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato, que então é reduzido para prolina, sendo uma etapa chave na produção desse aminoácido que quando acumulado nas células auxilia na proteção contra estresse oxidativo, além de estar envolvido no ajustamento osmótico, conferindo maior tolerância à estresses abióticos em plantas (SZABADOS; SAVOURE, 2010).

A utilização do promotor sintético *AIPC* (ABA-inducible promoter complex) seria uma opção adequada para induzir a expressão do gene *P5CS* somente sob estresse, sem efeitos prejudiciais no crescimento das plantas, os quais ocorrem quando promotores constitutivos são utilizados para o acúmulo de prolina.

Nesse contexto, esse trabalho investigou a hipótese de que plantas transformadas de *U. brizantha* contendo o gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* controlado por um promotor induzido por estresse (*AIPC*) seriam tolerantes às condições de déficit hídrico.



## 3.2 Objetivo

### 3.2.1 Objetivo geral

Caracterizar plantas de *Urochloa brizantha* geneticamente modificadas para a superexpressão do gene *P5CS* sob controle do promotor sintético *AIPC* em condições de déficit hídrico.

### 3.2.2 Objetivos específicos

Avaliar parâmetros bioquímicos relacionados ao déficit hídrico;

Avaliar parâmetros fisiológicos e biométricos dos eventos transformados (metabolismo e crescimento);

Determinar o perfil transcricional do gene *UbP5CS* nativo e transgene *VaP5CS* nos eventos selecionados.

## 3.3 Material e Métodos

### 3.3.1 Delineamento experimental

O experimento foi realizado no período de outubro a dezembro de 2019 na Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Campus II de Presidente Prudente – SP. Foi conduzido em casa de vegetação e nos laboratórios de Genética Molecular e de Cultura de Tecidos Vegetais, devidamente credenciados pela CTNBio (CQB - 346/12) para desenvolver trabalhos de pesquisa com organismos geneticamente modificados.

O delineamento experimental utilizado foi em arranjo inteiramente casualizado, no esquema fatorial (4x2) composto por 4 genótipos, sendo 3 eventos transformados e plantas controle não transformadas sob dois regimes hídricos (com irrigação e com déficit hídrico seguido de recuperação), resultando em oito tratamentos com cinco repetições cada, totalizando 40 parcelas. As parcelas consistiram em um vaso contendo 6 kg de terra vegetal Bioterra® com uma planta por vaso.

### 3.3.2 Material vegetal

Foram utilizadas plantas controle não transformadas de *U. brizantha* (cv. Marandu) e transformadas através do método de biobalística, regeneradas e aclimatizadas por Takamori (2018) na Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) em Presidente Prudente – SP. Três eventos denominados E1, E2 e E3, foram selecionados para as avaliações de tolerância ao déficit hídrico. Esses eventos foram positivos para as ampliações de fragmentos dos transgenes *bar* e *VaP5CS*, e apresentaram maior acúmulo de prolina nas folhas de acordo com resultados preliminares obtidos por Takamori (2018). Cada planta regenerada a partir de uma célula vegetal transformada independentemente é considerada um evento de transformação, no qual varia na localização e no número de cópias de inserção de DNA (DONG; RONALD, 2021).

### 3.3.3 Propagação vegetativa dos eventos

Para compor as repetições biológicas, os eventos previamente selecionados foram propagados vegetativamente. Os eventos já aclimatizados foram novamente testados para a presença do transgene *VaP5CS*. Foram retirados perfilhos foliares para extração de DNA pelo método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) de Doyle, Doyle (1987). Após verificação da integridade do DNA por eletroforese em gel de agarose 1%, corados por brometo de etídeo e visualizados em UV por transluminador, foi realizado uma PCR (reação em cadeia da polimerase) para confirmação da amplificação do fragmento do gene *VaP5CS* e do controle não transformado. Foram utilizados iniciadores conforme Takamori (2018) com amplificação de 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 a reação de PCR foi utilizado protocolo do Kit GoTaq® Green Master Mix (Promega). A amplificação foi conduzida seguindo as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 5 min, seguidos por 35 ciclos de desnaturação 94°C por 45 s, anelamento a 55°C por 45 s, extensão a 72°C por 45 s e extensão final a 72°C por 5 min. O controle positivo consistiu em 100 pg de DNA do plasmídeo pJS107 (vetor utilizado na transformação) e o branco na substituição de DNA por água MilliQ autoclavada. As plantas que amplificaram o

fragmento correto (Figura 3), foram mantidas para crescimento e a partir destas foram retirados perfilhos para comporem as repetições dentro de cada tratamento.

Figura 3 – PCR para confirmação de amplificação do fragmento do gene *VaP5CS* em plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e eventos de transformação *AIPC:P5CS*



LD: Marcador de peso molecular (Ladder 1kb); E1 – E3: Eventos transformados; C: Plantas controle não transformadas; P: Plasmídeo pJS107; B: Branco. As caixas em vermelho correspondem as plantas escolhidas para o experimento. Fonte: O autor.

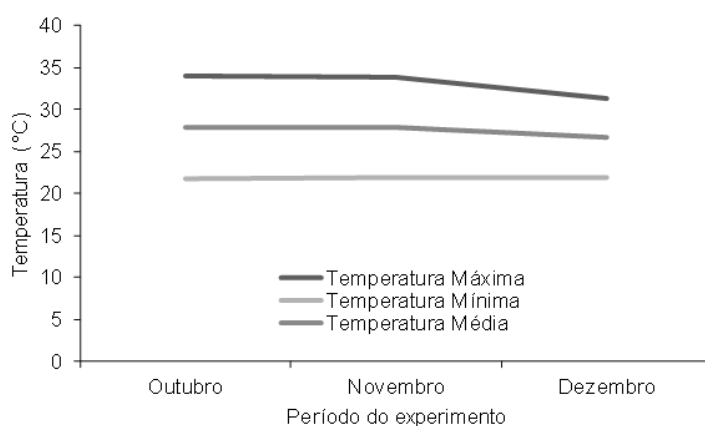
### 3.3.4 Avaliações da tolerância ao déficit hídrico em plantas transformadas

Para a condução do experimento, as repetições foram realizadas a partir de um único perfilho e plantadas em vasos contendo 6 kg de terra vegetal Bioterra® (análise química de macro e micronutrientes nos anexos 1 e 2). Para minimizar a variabilidade, foi realizado um corte de rebrota em todas as plantas, para assim apresentarem idade e tamanho similares para o experimento de imposição do déficit hídrico.

Todas as 40 plantas (controle e transformadas) foram conduzidas por aproximadamente 30 dias com irrigação diária por gotejamento, próximo à sua capacidade de campo, e após o estabelecimento das mesmas o déficit hídrico foi imposto por suspensão da água até as plantas atingirem valores de potencial hídrico de -3,0 a -3,5 MPa, onde foram realizadas análises fisiológicas, coletadas folhas +1 (primeira folha totalmente expandida) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C para análises bioquímicas e moleculares. As plantas foram reidratadas por 48 hrs e novamente realizadas análises fisiológicas, coletadas as folhas +1 para avaliação da recuperação pós

estresse e realizado a colheita final das plantas. As temperaturas máxima, média e mínima do ar durante o período do experimento estão apresentadas na Figura 4.

Figura 4 – Temperaturas máxima, média e mínima do ar durante o período do experimento.



Fonte: Estação Meteorológica – Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), Campus II, Presidente Prudente-SP.

Figura 5 – Condução do experimento de déficit hídrico em plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação AIPC:P5CS.



A: Propagação vegetativa do perfilho, B: Rebrotas, C: Início da suspensão da irrigação. Fonte: O autor.

### 3.3.5 Análises fisiológicas

#### 3.3.5.1 Estado hídrico e caracterização do estresse

A avaliação do estado hídrico das plantas foi realizada utilizando-se o potencial de água foliar. Essa característica descreve a condição hídrica da folha, sendo bem utilizado em estudos de relações hídricas de plantas, exibindo um

declínio com o déficit hídrico, atingindo valores mais negativos (PARKASH; SINGH, 2020).

O potencial de água foliar foi monitorado diariamente até as plantas atingirem o nível de deficiência hídrica de -3,0 a -3,5 MPa, estabelecido anteriormente por Takamori (2018) e na recuperação. Foi realizado em uma folha do terço médio das plantas, entre as 9:00 e 11:00 hrs, com uma câmara de pressão (PMS 1000, PMS Instruments, EUA).

### 3.3.5.2 Trocas gasosas foliares

As análises de trocas gasosas foliares foram realizadas assim que as plantas atingiram o nível de estresse hídrico estabelecido, e na recuperação, logo após a medida do potencial de água foliar, entre as 9:00 e 11:00 hrs, antes da coleta das folhas. A medida foi realizada utilizando a folha +1, avaliando medidas pontuais de fotossíntese, como assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $G_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), conteúdo intracelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ , ppm), transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e eficiência do uso da água ( $EUA = A/E$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Estas avaliações foram feitas em três repetições, utilizando o analisador de gases por infravermelho (Li-6400XTR, LI-COR, EUA), sob irradiação de  $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e concentração de CO<sub>2</sub> de 400 ppm.

### 3.3.6 Análises bioquímicas

#### 3.3.6.1 Conteúdo de prolina nas folhas

A determinação de prolina foi realizada conforme metodologia descrita por Bates, Waldren e Teare (1973). Foram macerados 25 mg de tecido, de folhas +1 em nitrogênio líquido e adicionados 5 mL de ácido sulfosalicílico (3%) e centrifugados a 7500 rpm por três minutos. Foram coletados 2 mL do sobrenadante e acrescentados 2 mL da solução de ninidrina ácida (1,25 g de ninidrina; 30 mL de ácido acético glacial; 20 mL de ácido fosfórico 6 M) e de 2 mL de ácido acético glacial em tubos de 15 mL. As amostras foram então incubadas a 100°C por 60 min em banho maria, e em seguida, transferidas para gelo. Após incubação, foram acrescentados 4 mL de

tolueno à mistura reacional, e agitados em vortex por 20 s. O cromóforo contendo tolueno foi retirado da fase aquosa e realizado a leitura por espectrofotometria (520 nm). A concentração de prolina foi determinada utilizando uma curva padrão diluída de 0, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de prolina com a equação  $y = 0,0258x + 0,0009$  e  $R^2 = 0,9992$  e utilizando a seguinte fórmula: Conteúdo de prolina ( $\mu\text{mol g MF}^{-1}$ ) =  $[(\mu\text{g prolina} \times \text{mL tolueno}) / 115,13 \mu\text{g } \mu\text{mol}^{-1}] / (\text{massa fresca da amostra} / 2,5)$ . As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos expressos em  $\mu\text{mol}$  de prolina por grama de massa fresca ( $\mu\text{mol g MF}^{-1}$ ).

### 3.3.6.2 Concentração de malondialdeído

A atividade de peroxidação de lipídeos foi quantificada pela determinação da concentração de malondialdeído (MDA), segundo metodologia de Heath e Packer (1968). Foram macerados 200 mg de tecido de folha +1 em nitrogênio líquido e acrescentado 6 mL de etanol 80% e centrifugados a  $3000 \times g$  por 10 min. Foi retirado desse extrato 1 mL e misturado com 1 mL de solução de ácido tricloroacético TCA 20% (p/v) e ácido tiobarbitúrico TBA 0,65% (p/v), em seguida as amostras foram agitadas em vortex e incubadas a  $100^\circ\text{C}$  por 25 min e depois transferidas para gelo. As amostras então foram centrifugadas novamente a  $3000 \times g$  por 10 min e as absorbâncias foram lidas nos comprimentos de onda 532 nm e 600 nm, e a concentração do complexo de MDA calculados na seguinte fórmula: Equivalentes de MDA ( $\text{nmol mL}^{-1}$ ) =  $[(A_{532} - A_{600}) / 155000] \times 10^6$ , onde,  $A_{532}$  indica a absorbância máxima do complexo MDA-TBA a 532 nm,  $A_{600}$  é a absorbância a 600 nm, que corrige interferentes não-específicos e 155000 é o coeficiente de extinção molar para o MDA. O ensaio foi realizado em triplicata e os valores expressos em nanomol de MDA por grama de massa fresca ( $\text{nmol g MF}^{-1}$ ).

### 3.3.6.3 Conteúdo de clorofila total

O conteúdo de clorofila total foi determinado a partir de 20 mg de tecido foliar, onde foram adicionados 6 mL de solução de acetona 80% gelada e protegendo-se da luz por 72 h à  $4^\circ\text{C}$  para a liberação dos pigmentos. Após esse tempo, as amostras foram agitadas em vortex e a leitura realizada em espectrofotômetro a 663 nm e 645 nm, em triplicata. Os cálculos foram realizados

utilizando a seguinte fórmula:  $Chl_{total} (g L^{-1}) = 0,0202 \times A_{645} + 0,00802 \times A_{663}$  (ARNON, 1949) e os resultados expressos em miligrama por grama de massa fresca ( $mg gMF^{-1}$ ).

### 3.3.7 Biomassa

A massa seca de parte aérea e de raiz foi medida no final do experimento, separando-se os materiais em sacos de papel identificados e colocados para secar em estufa de circulação forçada de ar a 60°C, até obtenção de massa constante, aferida em balança de precisão com resultados expressos em gramas.

### 3.3.8 Análises moleculares

#### 3.3.8.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de tecido foliar, retirados do terço médio da folha +1, macerados em nitrogênio líquido, utilizando o kit PureLink RNA Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Todo material de manipulação foi esterilizado a seco overnight (180°C), para evitar a ação de RNases e possível degradação dos ácidos nucleicos e proteínas. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em H<sub>2</sub>O tratada com DEPC (dietil pirocarbonato).

Após a extração de RNA foi verificado a integridade das amostras, através de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), com tampão TAE (2M Tris – acetato, 0,05 M EDTA), contendo brometo de etídio (0,5  $\mu g mL^{-1}$ ) e visualizados sob luz UV em transluminador.

A concentração do RNA total e a pureza foram determinadas usando Biophotometer® espectrometria a 260 e 280 nm e as razões 260/280 e 260/230. Foram utilizadas as amostras que apresentaram razão acima de 1,8. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por um SuperScript Transcriptase Reversa (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante, em um volume final de 20  $\mu L$  utilizando 5  $\mu g$  de RNA total. Para cada 1  $\mu g$  do RNA total extraído das folhas foi misturado a 500 ng de Oligo (dT) e 1 mM de dNTPmix. A remoção do RNA original foi feita por meio de incubação dessa reação a 37°C por 20 min com 2 unidades de RNase H. A ausência de contaminação com DNA genômico foi confirmada por PCR

utilizando o par de primers do gene normalizador *eIF4a* – fator de iniciação eucariótica 4A, utilizado conforme (TAKAMORI *et al.*, 2017).

### 3.3.8.2 PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)

As reações de RT-qPCR foram realizadas em placas utilizando 5 µL de SYBR Green, 0,4 µL do iniciador senso (5 µM), 0,4 µL do iniciador antisenso (5 µM), 1 µL do *pool* de cDNA, completando o volume final para 10 µL com água Milli-Q autoclavada. Um *pool* de cDNA foi feito com todas amostras para testar a eficiência dos iniciadores. Foi incluso também uma amostra de controle negativo (sem cDNA). Cada reação foi montada em triplicata. As placas foram centrifugadas brevemente (*spin*) e analisadas pelo equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), seguindo as seguintes condições: desnaturação a 95°C por 2 min, anelamento a 95°C por 30 s e extensão a 60°C por 30 s, ciclo este repetido 40 vezes. Ao término da reação, a curva de *melting* foi determinada para cada par de iniciadores visando verificar a presença de somente um pico para o gene-específico e ausência de dímeros. Os dados foram exportados para o Excel e a eficiência de amplificação individual de cada par de iniciadores, foi calculada utilizando o programa *LinRegPCR* (RAMAKERS *et al.*, 2003).

### 3.3.8.3 Análise da expressão gênica

Para o desenho do gene nativo *UbP5CS* foi utilizada a estratégia de homologia com a *U. ruzizensis*. Primeiramente a sequência de *P5CS1* foi buscada na espécie *Arabidopsis thaliana* no site do TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) por palavra-chave. A sequência foi utilizada como isca para identificação do seu homólogo no “*scaffold*” do genoma de *U. ruzizensis* Embrapa\_Uruz\_1.0 (WORTHINGTON *et al.*, 2021) depositado no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Urochloa+ruzizensis>). A sequência correspondente foi utilizada para desenho de um par de iniciadores utilizando o programa Primer3Plus (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi/>; Untergasser *et al.*, 2007). O par de iniciadores para *UbP5CS*: 5'-ACACGATTCTCTGATGGGGC-3' e 5'-



ACCTTCAACACCCCACTGGTC-3' foi avaliado para possíveis dímeros e grampos usando Multiple Primer Analyzer (<https://www.thermofisher.com/multiple-primer-analyzer.html>). Primer-Blast contra a família *Panicoideae* no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) foi utilizado para verificar a especificidade do primer. O par de iniciadores; 5'-TGAGTCACGTCCTGATGCTC-3' e 5'-AGCTTCTTTGCCACCTTTCA-3' foi utilizado para testar a amplificação do *P5CSF129A* de *Vigna aconitifolia* (M92276.1) amplifica um fragmento de 88 pb e apresenta eficiência de 97,5 % (BORGIO *et al.*, 2021).

A reação para amplificação do transgene *VaP5CS* e do gene *UbP5CS* nativo foi realizada no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando 5 µL de SYBR Green, 0,4 µL do iniciador senso (5 µM), 0,4 µL do iniciador antisenso (5 µM), 1 µL do cDNA 1:5 (v/v), completando o volume final para 10 µL com água Milli-Q autoclavada. Para cada amostra, as reações foram montadas em triplicata para cada uma das três repetições biológicas. A amplificação foi conduzida seguindo as seguintes condições: 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 2 min, anelamento a 95°C por 30 s e extensão a 60°C por 30 s. A quantificação relativa da expressão do gene seguiu o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e análise da expressão diferencial do gene alvo (transgene *VaP5CS*) foi normalizado pela expressão do gene constitutivo *eIF4a* – fator de iniciação eucariótica 4A, determinado por Takamori *et al.* (2017) e como calibrador o genótipo controle irrigado.

### 3.3.9 Análise estatística

Os resultados obtidos nas análises, exceto de RT-qPCR foram testados quanto à normalidade e homogeneidade e submetidos à análise de variância (ANOVA) realizada pelo software SISVAR para análise de significância e médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). A expressão relativa dos genes foi comparada pelo teste t ( $p < 0,05$ ). Cada evento e tratamento foi comparado ao controle irrigado.

### 3.4 Resultados

#### 3.4.1 Estado hídrico e caracterização do estresse

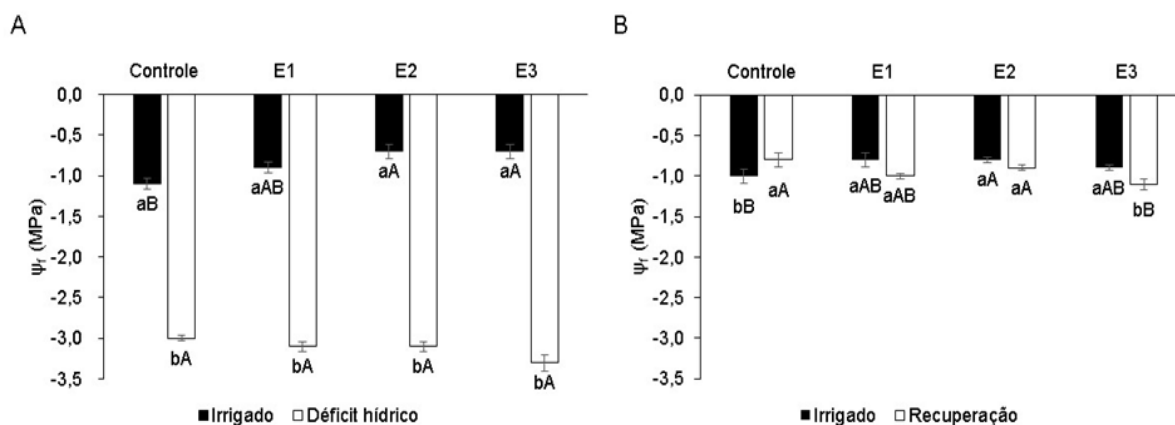
O potencial hídrico foliar estabelecido para o déficit (-3,0 a -3,5 MPa) foi atingido aos 20 dias de suspensão da irrigação. Visualmente, as plantas de todos os genótipos sob deficiência hídrica ficaram com as folhas pálidas, enroladas e prostradas (Figura 6). Sob condições normais de irrigação, as plantas transformadas, principalmente os eventos E2 e E3 apresentaram maior potencial hídrico (-0,7 MPa) e foram superiores ao controle (-1,1 MPa). A deficiência hídrica reduziu o potencial foliar em todos os genótipos igualmente (Figura 7A). Já na recuperação, com reidratação das plantas por 48 hrs, observou-se que as plantas retomaram o potencial hídrico inicial, com diferença entre os eventos, onde o evento E3 foi o mais baixo (-1,1 MPa), e os eventos E1 e E2 se apresentaram iguais às plantas controle não transformadas (-0,8 MPa) (Figura 7B).

Figura 6 – Plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação *AIPC:P5CS* submetidas à deficiência hídrica e recuperação pós estresse.



A) Plantas irrigadas; B) Plantas sob deficiência hídrica; C) Comparativo de todos os tratamentos, à esquerda plantas irrigadas e à direita sob deficiência hídrica. Fonte: O autor.

Figura 7 – Potencial de água foliar em plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação *AIPC:P5CS* submetidas à deficiência hídrica e recuperação pós estresse.

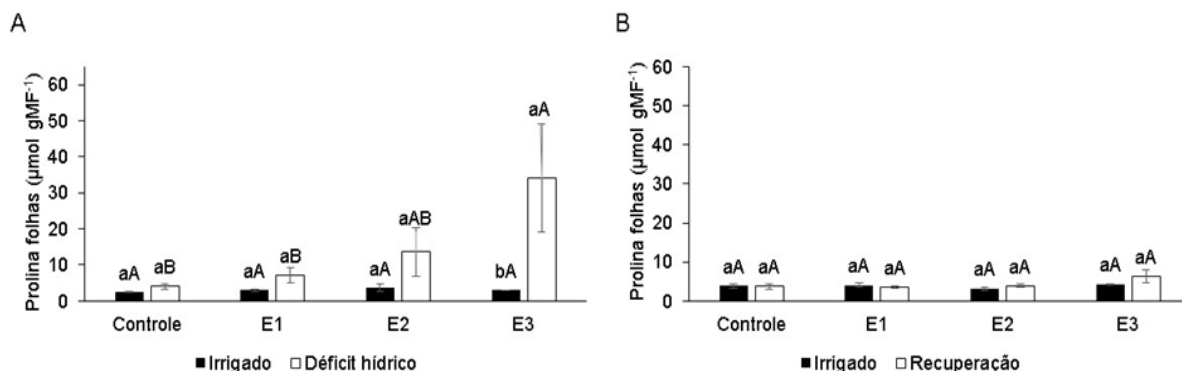


A) Déficit hídrico; B) Recuperação pós estresse. Letras minúsculas comparam os regimes hídricos e letras maiúsculas comparam os genótipos em cada regime hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barra de erros indica erro padrão (n=3). Fonte: O autor.

### 3.4.2 Análises bioquímicas

Em condições normais de suprimento de água, o conteúdo de prolina nas folhas, não diferiu entre os genótipos com média de 3  $\mu\text{mol gMF}^{-1}$ . Em resposta à deficiência hídrica, houve um aumento expressivo de prolina, no evento E3 (cerca de 8 vezes mais que o controle não transformado) (Figura 8A). Já na recuperação não houve diferença entre os genótipos, voltando aos valores iniciais de quando hidratados (Figura 8B).

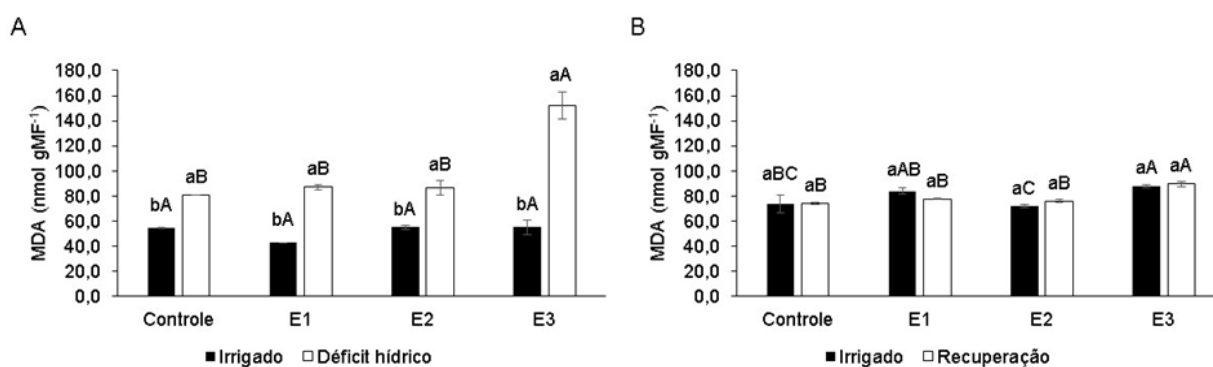
Figura 8 – Conteúdo de prolina nas folhas em plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação *AIPC:P5CS* submetidas à deficiência hídrica e recuperação pós estresse.



A) Déficit hídrico; B) Recuperação pós estresse. Letras minúsculas comparam os regimes hídricos e letras maiúsculas comparam os genótipos em cada regime hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barra de erros indica erro padrão (n=3). Fonte: O autor.

A concentração de malondialdeído (MDA) não diferiu em todos os genótipos na condição de irrigação. Já quando houve a deficiência hídrica, observou-se um aumento de MDA em todos os genótipos, principalmente no evento E3 que diferiu dos demais, apresentando 152 nmol gMF<sup>-1</sup> (Figura 9A). Quando as plantas foram recuperadas, não houve diferença entre irrigadas e recuperadas, entretanto o evento E3, apresentou conteúdo de MDA maior que os outros genótipos (Figura 9B).

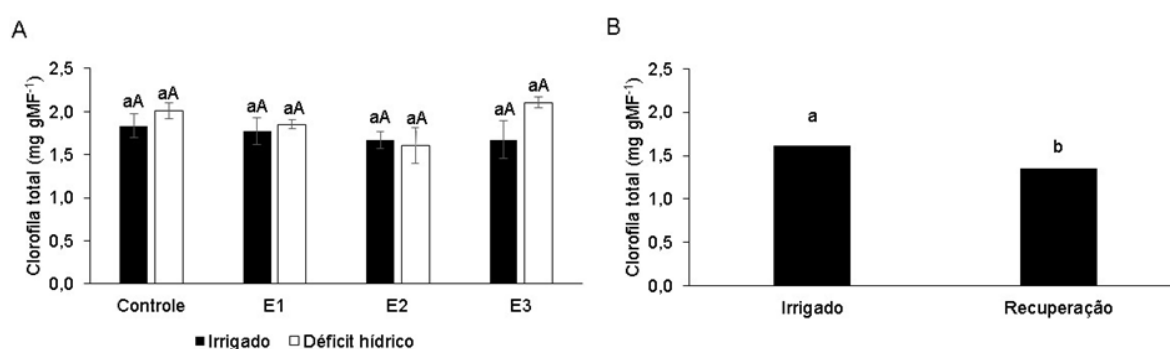
Figura 9 – Conteúdo de malondialdeído (MDA) em plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação *AIPC:P5CS* submetidas à deficiência hídrica e recuperação pós estresse.



A) Déficit hídrico; B) Recuperação pós estresse. Letras minúsculas comparam os regimes hídricos e letras maiúsculas comparam os genótipos em cada regime hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barra de erros indica erro padrão (n=3). Fonte: O autor.

O conteúdo de clorofila total não se alterou em todos os genótipos apesar do déficit hídrico. Quando recuperadas, houve diferença somente entre regime hídrico, com as plantas que passaram por estresse seguido de recuperação hídrica apresentando menores conteúdo de clorofila total (Figura 10B).

Figura 10 – Conteúdo de clorofila total em plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação *AIPC:P5CS* submetidas à deficiência hídrica e recuperação pós estresse.



A) Déficit hídrico; B) Recuperação pós estresse. Letras minúsculas comparam os regimes hídricos e letras maiúsculas comparam os genótipos em cada regime hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barra de erros indica erro padrão (n=3). Fonte: O autor.

### 3.4.3 Análises fisiológicas

Para as medidas de trocas gasosas, observou-se que a deficiência hídrica reduziu a assimilação de CO<sub>2</sub> (A) em todos os genótipos (Figura 11A), principalmente no evento E3, enquanto E1 e E2 não diferiram do controle que teve 80% de redução. Quando reidratados, retomaram a assimilação de CO<sub>2</sub> inicial igualmente ao controle e o evento E2 apresentou valores em média de 20 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> e foi menor nos dois regimes hídricos (Figura 11B).

Foi observado também uma redução na condutância estomática (Gs) em todos os genótipos em resposta a suspensão de água (Figura 11C) sem diferença entre os genótipos. Entretanto, quando reidratados, os eventos E1 e E3 (0,19 mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) foram superiores ao controle (0,13 mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) (Figura 11D).

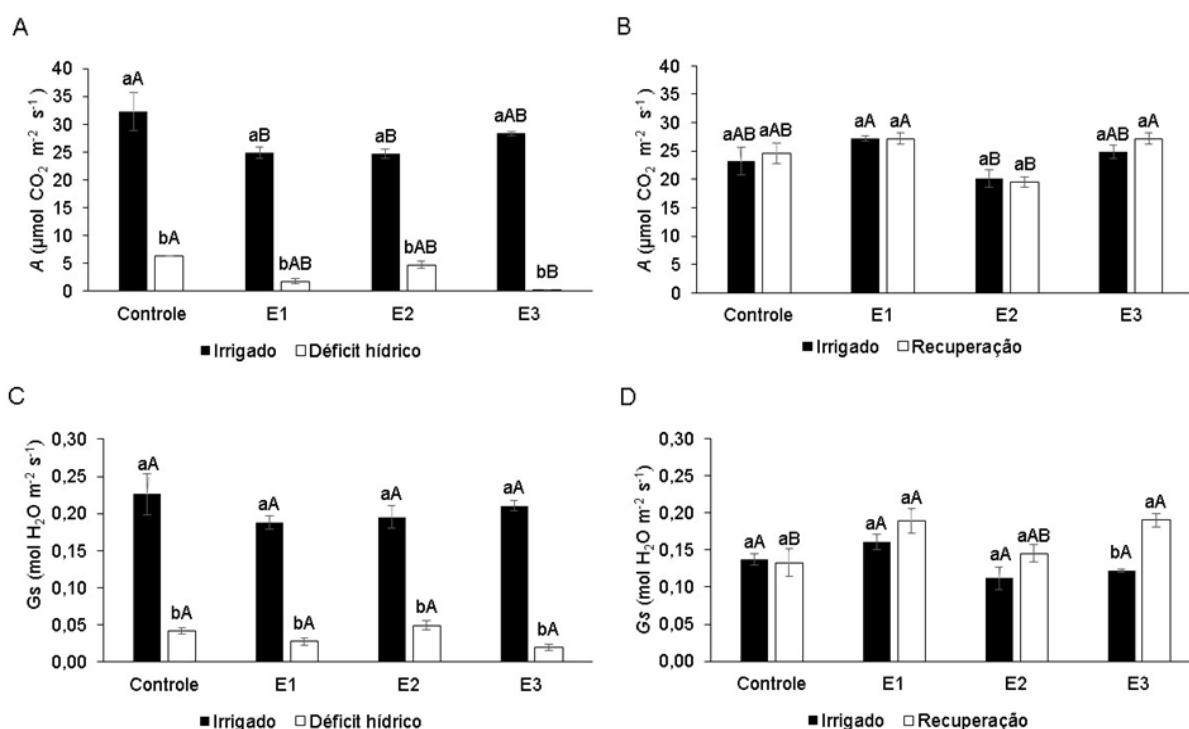
O conteúdo intracelular de CO<sub>2</sub> (Ci) aumentou 76, 31 e 142% nos eventos E1, E2 e E3 respectivamente com a deficiência hídrica (Figura 11E), porém quando

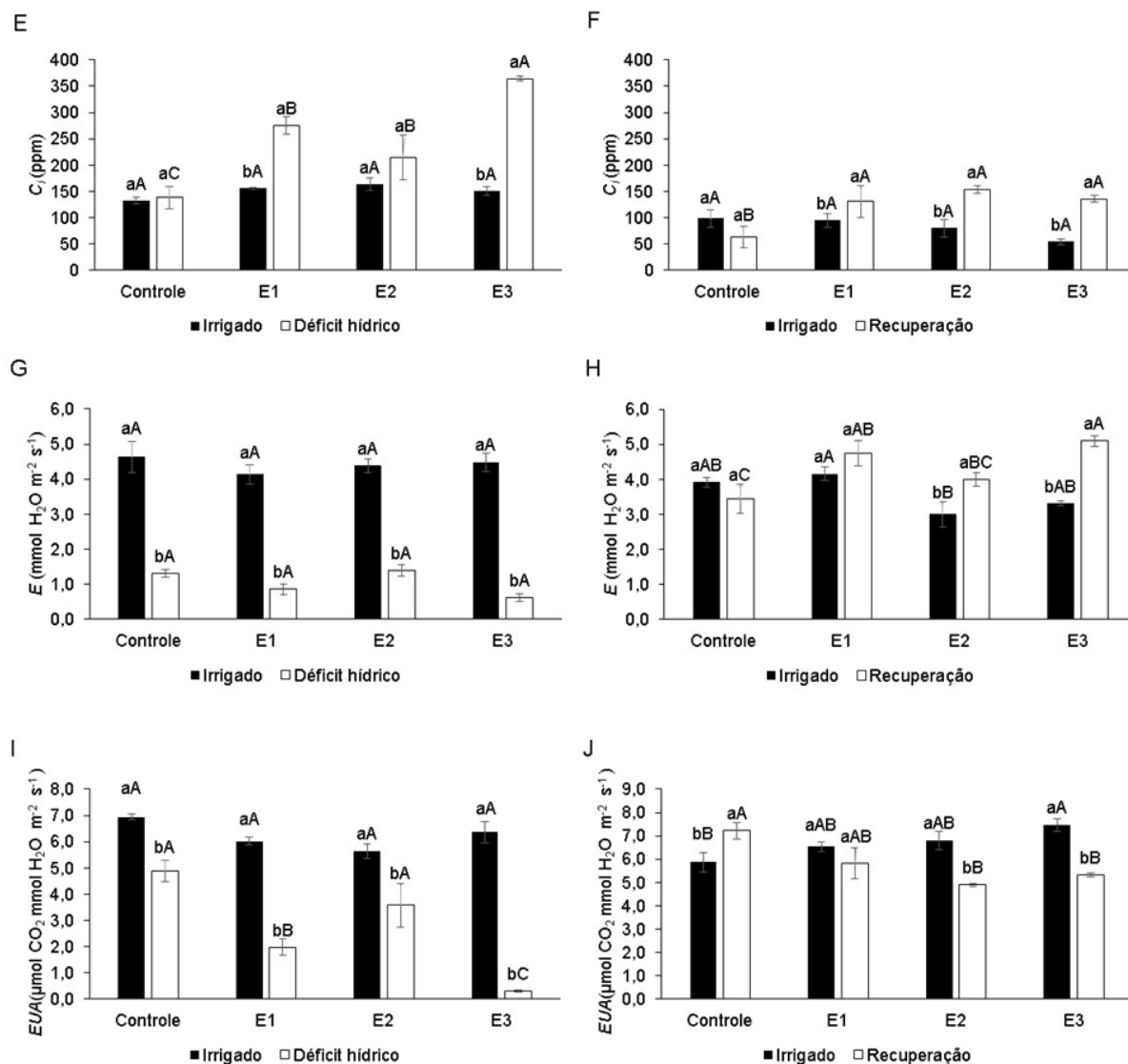
novamente hidratados, esses valores diminuíram, mas os eventos transformados continuaram com  $C_i$  maiores que o tratamento controle não transformado que apresentou 63,4 ppm (Figura 11F).

A suspensão da irrigação fez com que os níveis de transpiração ( $E$ ) diminuíssem em todos os genótipos (Figura 11G), já com a reidratação, os genótipos transformados E2 e E3 aumentaram a  $E$  quando comparadas as plantas que se mantiveram irrigadas, principalmente no evento E3 que aumentou em 1,5 vezes ( $5,09 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) (Figura 11H).

A deficiência hídrica reduziu a eficiência do uso da água ( $EUA$ ), tanto em plantas controle, como nas transformadas. Plantas controle e E2 apresentaram diminuições de 29,5% e 36,5%, mas mesmo assim com maior eficiência que os demais genótipos (Figura 11I). Na recuperação pós estresse, as plantas controle foram superiores apresentando  $7,22 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Figura 11J).

Figura 11 – Trocas gasosas em plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação *AIPC:P5CS* submetidas à deficiência hídrica e recuperação pós estresse.





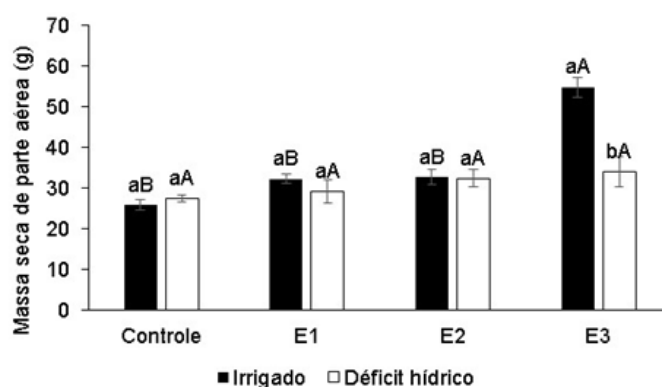
A) Assimilação de  $\text{CO}_2$  (déficit hídrico); B) Assimilação de  $\text{CO}_2$  (recuperação pós estresse); C) Condutância estomática (déficit hídrico); D) Condutância estomática (recuperação pós estresse); E) Conteúdo intracelular de  $\text{CO}_2$  (déficit hídrico); F) Conteúdo intracelular de  $\text{CO}_2$  (recuperação pós estresse); G) Transpiração (déficit hídrico); H) Transpiração (recuperação pós estresse); I) Eficiência do uso da água (déficit hídrico); J) Eficiência do uso da água (recuperação pós estresse). Letras minúsculas comparam os regimes hídricos e letras maiúsculas comparam os genótipos em cada regime hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barra de erros indica erro padrão ( $n=3$ ). Fonte: O autor.

### 3.4.4 Biomassa

Quanto à avaliação da biomassa das plantas, o evento E3 apresentou maiores valores de massa seca de parte aérea (MSPA) (54,7 g) em condições irrigadas. Após 48 hrs de reidratação, não houve diferença na MSPA, com exceção para o evento E3 o qual apresentou 34,06 g se igualando estatisticamente aos demais genótipos (Figura 12). Na massa seca de raiz (MSR), não houve diferença

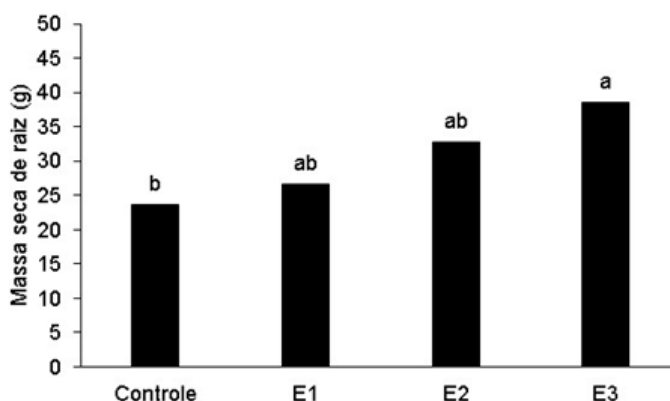
entre as plantas irrigadas e as recuperadas, mas houve superioridade do evento E3 em relação as plantas controle não transformadas, nos dois regimes hídricos, apresentando média de 38,5 g (Figura 13).

Figura 12 – Massa seca de parte aérea de plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação *AIPC:P5CS* na recuperação após deficiência hídrica.



Letras minúsculas comparam os regimes hídricos e letras maiúsculas comparam os genótipos em cada regime hídrico. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barra de erros indica erro padrão (n=4). Fonte: O autor.

Figura 13 – Massa seca de raiz de plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação *AIPC:P5CS* na recuperação após deficiência hídrica.



Comparação entre os genótipos nos dois regimes hídricos. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (n=4). Fonte: O autor.



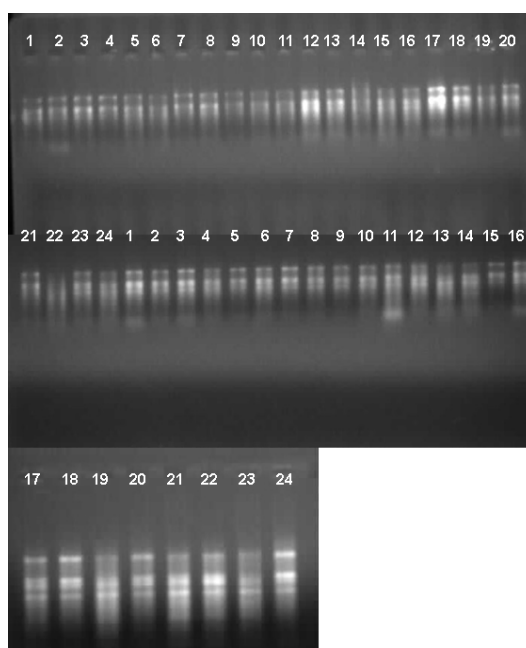
### 3.4.5 Análises moleculares

A integridade dos RNAs de todas as amostras foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose, onde foi possível a visualização das bandas íntegras dos RNAs ribossomais 28S, 18S e 5S, viabilizando a utilização destas amostras para síntese de cDNA (Figura 14).

Para verificar se todas as amostras de RNA foram convertidas em cDNA foi realizada a amplificação pela PCR convencional utilizando cDNA das amostras e o par de iniciadores do gene normalizador *eIF4a* – fator de iniciação eucariótica 4A, utilizado conforme Takamori *et al.* (2017). As reações da PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose na qual apenas as bandas de 100 pb foram visualizadas, conforme o tamanho da amplificação esperada para o referido gene (Figura 15).

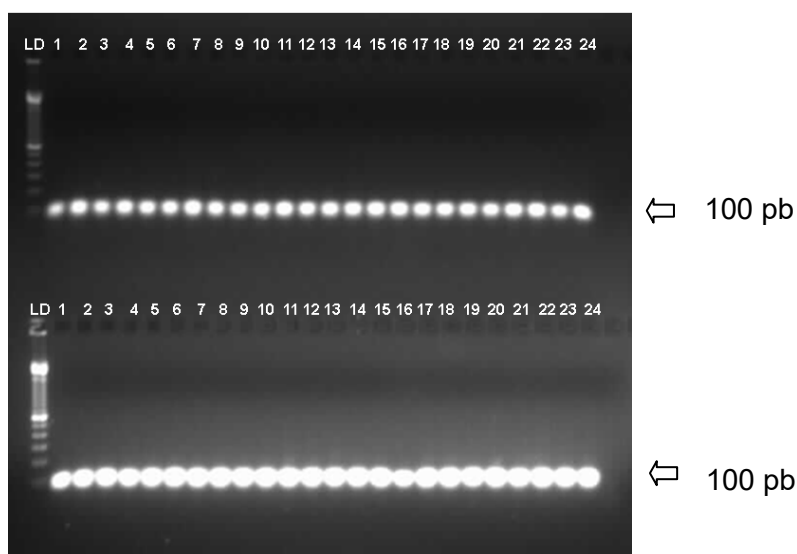
Para a análise da expressão relativa, a eficiência de amplificação do iniciador *UbP5CS* calculada pelo programa *LinRegPCR* foi de 100,25%, demonstrando ser adequada para análises de expressão relativa, apresentando somente uma banda e pico específicos (Figura 16).

Figura 14 – Integridade do RNA das amostras de folhas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação *AIPC:P5CS* submetidas à deficiência hídrica e recuperação pós estresse.



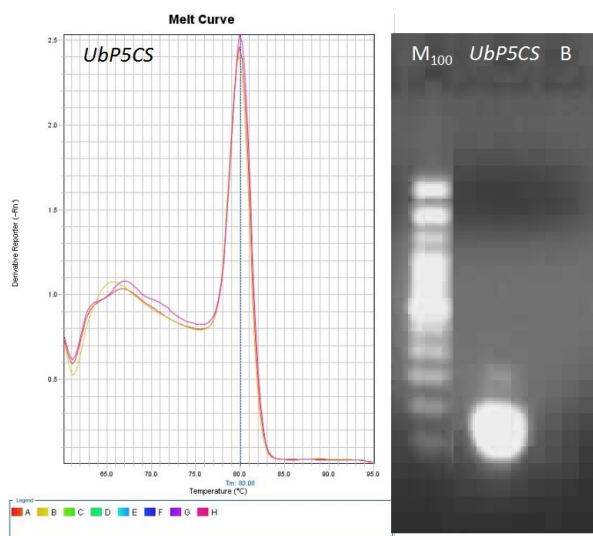
Primeira linha: 1 – 3) Plantas controle irrigadas; 4 – 6) E1 irrigadas; 7 – 9) E2 irrigadas; 10 -12) E3 irrigadas; 13 – 15) Plantas controle sob déficit hídrico, 16 – 18) E1 sob déficit hídrico; 19 – 21) E2 sob déficit hídrico; 22 – 24) E3 sob déficit hídrico. Segunda linha: 1 – 3) Plantas controle irrigadas; 4 – 6) E1 irrigadas; 7 – 9) E2 irrigadas; 10 -12) E3 irrigadas; 13 – 15) Plantas controle sob recuperação, 16 – 18) E1 sob recuperação; 19 – 21) E2 sob recuperação; 22 – 24) E3 sob recuperação. Fonte: O autor.

Figura 15 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os cDNAs das amostras de folhas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação *AIPC:P5CS* submetidas à deficiência hídrica e recuperação pós estresse com iniciadores para a amplificação de fragmento do gene *eIF4a*.



LD: Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb); Primeira linha: 1 – 3) Plantas controle irrigadas; 4 – 6) E1 irrigadas; 7 – 9) E2 irrigadas; 10 -12) E3 irrigadas; 13 – 15) Plantas controle sob déficit hídrico, 16 – 18) E1 sob déficit hídrico; 19 – 21) E2 sob déficit hídrico; 22 – 24) E3 sob déficit hídrico. Segunda linha: 1 – 3) Plantas controle irrigadas; 4 – 6) E1 irrigadas; 7 – 9) E2 irrigadas; 10 -12) E3 irrigadas; 13 – 15) Plantas controle sob recuperação, 16 – 18) E1 sob recuperação; 19 – 21) E2 sob recuperação; 22 – 24) E3 sob recuperação. Fonte: O autor.

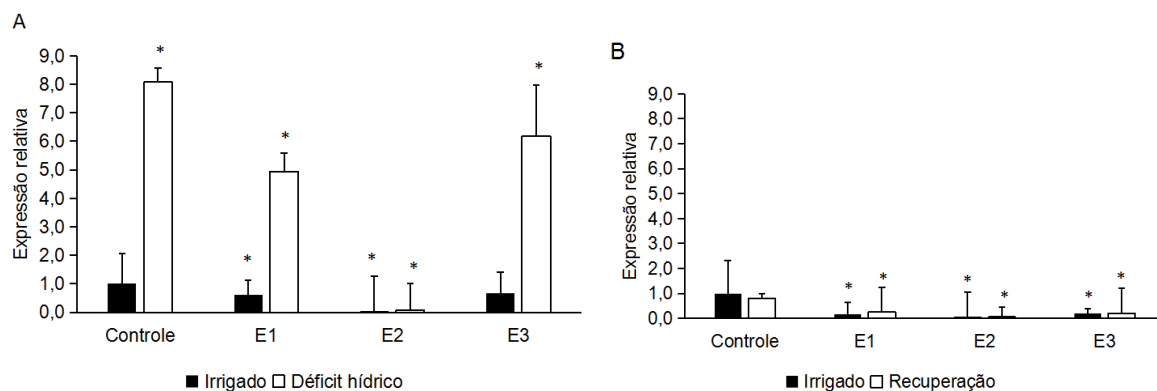
Figura 16 – Amplificação do gene *UbP5CS*. Curva de dissociação demonstrando a especificidade de amplificação (esquerda) e banda em gel de agarose 1,5% (direita).



M<sub>100</sub>: Marcador de 100 pares de bases; B: branco (mix sem DNA). Fonte: O autor.

Na expressão relativa do gene nativo *UbP5CS* constatou-se que sob irrigação, houve redução no número de transcritos nos eventos E1 (1,6) e E2 (133) vezes em comparação ao controle irrigado, já no E3 não houve diferença. Sob déficit hídrico, o gene teve um aumento na expressão nas plantas controle cerca de 8 vezes mais do que nas plantas controle irrigadas (tratamento calibrador) e nos eventos E1 e E3 cerca de 5 e 6 vezes respectivamente, enquanto que no evento E2 houve redução na ordem de 14,5 vezes (Figura 17A). Na recuperação, houve uma redução na expressão, nos três eventos comparados ao controle que se manteve irrigado, cerca de 4 (E1), 250 (E2) e 5 vezes (E3). Em relação ao controle que passou pelo déficit e foi recuperado não houve diferença de expressão. (Figura 17B).

Figura 17 – Expressão relativa do gene *Ubp5CS* em plantas de *U. brizantha* controle (não transformadas) e três eventos de transformação *AIPC:P5CS* submetidas à deficiência hídrica e recuperação pós estresse.



Valores apresentados como média por meio do método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para os cálculos foi utilizado o gene normalizador *eIF4a* – fator de iniciação eucariótica 4A, determinado por Takamori *et al.* (2017) e como calibrador o genótipo controle irrigado (n=3). \*Compara o controle irrigado com cada tratamento pelo teste t ( $p < 0,05$ ) Fonte: O autor.

Em relação a expressão do gene *VaP5CS* foi verificado uma instabilidade nas amplificações sendo que somente em algumas repetições biológicas houve a detecção dos transcritos principalmente no evento 3, nesse evento foi detectada um aumento na expressão nas três condições: irrigado, déficit e recuperado sendo 12,4; 5,7 e 0,48 vezes respectivamente. Nos eventos E1 e E2 houve detecção da transcrição somente sob déficit hídrico com aumento na transcrição de 9,3 e 7,7 vezes, respectivamente. Nesse caso a expressão relativa foi calculada apenas em relação ao normalizador (*eIF4a*), visto que não há expressão do *VaP5CS* nos controles não transformados para ser usado como calibrador. Apesar da detecção dos transcritos, houve instabilidade nas amplificações não sendo detectada os transcritos do gene *VaP5CS* em todas repetições biológicas em cada evento.

### 3.5 Discussão

De maneira geral, as plantas de braquiária sob déficit hídrico, se apresentaram enroladas, pálidas e prostradas. Em gramíneas, as folhas enrolam e ajustam a orientação das lâminas devido a baixa umidade, pois assim, reduzem a área exposta à radiação solar diminuindo a transpiração (CHOURASIA, 2017).

Os maiores conteúdos de prolina foram obtidos em folhas das plantas submetidas ao déficit hídrico, sendo esse aumento maior nas plantas do evento E3, já na recuperação as plantas de todos os genótipos voltaram aos valores de prolina de quando irrigadas. Esse aumento de prolina nas plantas sob déficit hídrico se deve pela biossíntese de prolina que é ativada e seu catabolismo reprimido durante a desidratação, enquanto a reidratação desencadeia a regulação oposta (SZABADOS; SAVOURE, 2010). O acúmulo de prolina durante a seca foi relatado repetidamente em muitas espécies, assim como nossos resultados. O conteúdo de prolina também aumentou em plantas transgênicas de arroz (SU; WU 2004), de cana-de-açúcar (MOLINARI *et al.*, 2007, GUERZONI *et al.*, 2014) e trigo (VENDRUSCOLO *et al.*, 2007) transformadas com a construção *AIPC:P5CS* quando submetidas ao déficit hídrico. Além do déficit hídrico, o acúmulo de prolina nos eventos (exemplo o E3) pode ser devido a transcrição tanto do gene nativo quanto do transgene.

A oxidação de membranas gerando o malondialdeído (MDA), é uma das consequências que a deficiência hídrica pode causar. As membranas biológicas são o primeiro alvo de muitos estresses abióticos. É geralmente aceito que a manutenção da integridade e estabilidade das membranas sob estresse hídrico é um dos principais componentes da tolerância à seca em plantas (BAJJI *et al.*, 2002). Em nossos resultados, as plantas controle e transformadas sob déficit hídrico apresentaram aumento no conteúdo de MDA. O evento E3 apresentou conteúdo de MDA mais elevado, mesmo com maior produção de prolina, o que indicou que, apesar do maior acúmulo de prolina, a proteção da membrana celular contra o estresse oxidativo não foi aumentada.

Em plantas transgênicas para acúmulo de prolina, nem sempre o conteúdo de MDA reduziu. Em plantas de cana-de-açúcar transformadas *AIPC:VaP5CS*, sob condições de estresse salino severo, o conteúdo de MDA foi semelhante nas folhas em relação aos controles não transformados (GUERZONI *et al.*, 2014). Em plantas transgênicas de trigo para acúmulo de prolina, não ocorreu diferença entre plantas transgênicas e controle para o conteúdo de MDA durante o estresse hídrico de oito dias (PAVEI *et al.*, 2016). Em plantas de tabaco transgênico com o gene *P5CSF129A* sob controle do promotor estresse induzido *rd29A* as concentrações de MDA nas folhas foram muito semelhantes às plantas sob controle de promotor constitutivo 35S e plantas selvagens, quando foram expostas a estresse por Cádmio (BORGO *et al.*, 2021). Ainda em plantas transgênicas de tabaco para acúmulo de

prolina, foi observado que mesmo com o conteúdo de prolina sendo alto nas plantas transgênicas submetidas ao déficit hídrico, o MDA também foi mais alto que plantas controle irrigadas (CACEFO, 2020).

Na literatura, foram relatadas correlações positivas e negativas entre acúmulo de prolina e conteúdo de MDA. Du *et al.* (2014) estudando seis espécies cereais, observaram que entre as espécies, existem diferentes correlações entre a prolina e os teores de MDA, e sugeriram que isso provavelmente se deve a: 1) O aminoácido da prolina não serve apenas funcionalmente para a prevenção da peroxidação da membrana lipídica. A prolina envolve várias funções fisiológicas e é sintetizada quando necessita dessas funções quando as plantas sofrem estresse. Essas funções incluem grupo relacionado à prevenção da peroxidação de membrana, osmoproteção, eliminação de radicais livres, proteção de macromoléculas da desnaturação e outros grupos que não têm associação direta com a proteção da membrana, como regulação da acidez citosólica, inibição da morte celular programada e fonte de carbono e nitrogênio acumulados durante o estresse abiótico. 2) E há outros ajustes osmóticos de íons como  $K^+$ ,  $Na^+$  e  $Cl^-$  vacuolar, e osmólitos orgânicos como álcoois de açúcar (por exemplo, frutanos) ou compostos de amônio (por exemplo, glicina-betaína) que têm a mesma função. 3) O compartimento de síntese e transporte de prolina também pode contribuir para a ineficácia da proteção da membrana. 4) O acúmulo de prolina e sua contribuição para prevenir a peroxidação lipídica varia entre espécies e estágios fenológicos.

Os pigmentos cloroplastídicos como as clorofilas *a* e *b*, são responsáveis pela captura de luz usada na fotossíntese, sendo essenciais na conversão da radiação luminosa em energia química (BATISTA *et al.*, 2011). O estresse por déficit hídrico pode levar a perda de clorofila e declínio na capacidade fotossintética (SILVA *et al.*, 2014). Em nossos resultados, o conteúdo total de clorofila não foi afetado negativamente durante o estresse hídrico em todos genótipos, porém todas as plantas depois de recuperadas exibiram valores significativamente menores que as plantas que sempre foram irrigadas.

A fotossíntese está entre os processos primários que são regulados negativamente pela deficiência hídrica. A redução na fotossíntese é atribuída à diminuição da pressão de turgor, fechamento dos estômatos, limitação da troca gasosa, redução na assimilação de  $CO_2$ , aparelho fotossintético prejudicado principalmente o fotossistema I e fotossistema II e fluxos de metabólitos aumentados

(CHAVES *et al.*, 2004; JALLEL *et al.*, 2009). Neste trabalho o déficit hídrico diminuiu a assimilação de CO<sub>2</sub> (*A*) em todos os genótipos, com maior redução no evento E3, o qual apresentou melhor rendimento na recuperação.

O fechamento estomático é a primeira resposta ao déficit de água de praticamente todas as plantas para prevenir a perda de água transpiracional. Assim, a diminuição da taxa fotossintética sob condições estressantes, como seca e salinidade, é normalmente atribuída a uma supressão na condutância do mesófilo e ao fechamento estomático em estresse moderado e severo (CHAVES *et al.*, 2009; SAGE; ZHU 2011). A condutância estomática (*G<sub>s</sub>*), decaiu igualmente em todos os genótipos, por outro lado, na recuperação os eventos transformados E1 e E3 foram superiores ao controle.

Dentro das folhas, as células do mesófilo consomem CO<sub>2</sub> durante a assimilação fotossintética (*A*). O CO<sub>2</sub> entra nas folhas por difusão através dos poros estomáticos na superfície da folha, então *C<sub>i</sub>* indica essencialmente o substrato de CO<sub>2</sub> disponível para *A* (FARQUHAR *et al.*, 1980). As plantas transformadas tanto sob estresse, quanto na recuperação exibiram maior conteúdo intracelular de CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>*).

As plantas sob déficit hídrico em geral, apresentaram um declínio na condutância estomática com conseqüente diminuição na assimilação de CO<sub>2</sub> e transpiração, já na recuperação os eventos E1 e E3 tiveram maior condutância estomática e maior transpiração e *C<sub>i</sub>* continuou maior nas plantas transformadas do que nas plantas controle não transformadas. As plantas transformadas apresentaram um aumento no conteúdo intracelular de CO<sub>2</sub>, o que não foi utilizado para a fotossíntese. Diferentemente dos nossos dados, Cacefo (2020) obteve maiores taxas fotossintéticas e maior acúmulo de biomassa nas plantas transgênicas de tabaco com maior acúmulo de prolina, sob deficiência hídrica, mostrando-se mais tolerantes ao estresse.

A falta de água limita o crescimento das plantas que é afetado pela diminuição da fotossíntese, porém em nossos resultados, as plantas não apresentaram diferença na massa seca de parte aérea entre irrigadas e déficit hídrico, exceto o evento E3 que sob irrigação foi maior e teve redução, porém se igualando aos demais genótipos sob déficit hídrico. As plantas de todos os genótipos também não apresentaram redução na massa seca de raiz, porém o evento E3 foi significativamente maior que o controle em ambas situações. Com esses dados,

sugere-se que o tempo do déficit hídrico não foi suficiente para reduzir a biomassa dessas plantas, ainda mais sabendo que as braquiárias são espécies C4, as quais apresentam maior capacidade de manter maiores taxas fotossintéticas por unidade de perda de água do que as espécies C3. A maioria das braquiárias respondem às condições de seca leve por meio de crescimento ajustado e alocação de biomassa, deixando o rendimento total da planta relativamente inalterado (GUENNI *et al.*, 2002). No entanto, a disponibilidade de água ainda é o fator essencial para alcançar rendimentos máximos em plantas C4, como a braquiária (CHERUIYOT *et al.*, 2018).

Quanto às análises moleculares, a disponibilização do genoma de *U. ruziziensis* (WORTHINGTON *et al.*, 2021) na plataforma *NCBI* tornou possível o desenho de iniciadores para a avaliação gênica em espécies de *Urochloa*. A sequência de *U. ruziziensis* mostrou 97% de cobertura e 94.64% de identidade com o *P5CS* de *Panicum halli* demonstrando que os genes são altamente conservados entre as espécies de *Panicoideae*. Iniciadores únicos tem sido utilizado com sucesso para a análise de expressão gênica entre as espécies de *U. brizantha* e *U. ruziziensis* (SANTOS *et al.*, 2020).

Como esperado o déficit hídrico causou um aumento nos transcritos do gene nativo *UbP5CS* tanto na planta controle como nos eventos E1 e E3, porém os incrementos da transcrição foram menores que nas plantas controle. Por outro lado, não houve modificação na expressão, mesmo sob déficit hídrico no evento E2. Semelhante aos nossos resultados, Bondok *et al.* (2022) observou que após estresse hídrico prolongado, os genótipos da forrageira *Zea mexicana* Schrad L. apresentaram superexpressão dos genes responsivos ao estresse hídrico estudados, inclusive *P5CS*. Nasirzadeh *et al.* (2021) comparando três genótipos de trigo, obteve aumento na expressão do gene *P5CS* sob deficiência hídrica.

Observou-se também que a transcrição do gene foi menor nos eventos comparados com o controle (não transformado), sob déficit hídrico. Em plantas de citrumelo 'Swingle' com alto acúmulo de prolina (gene *VaP5CSF129A*), também foi observado que a transcrição de *P5CS* nativo foi menor que em plantas controle, tanto sob condições normais como restritas de água (CARVALHO *et al.*, 2013).

A maior redução na transcrição foi observada no evento E2, indicando que nesse evento a transcrição do gene nativo pode ter sido prejudicada ou mesmo silenciada. Em plantas geneticamente modificadas, os transgenes introduzidos nem sempre se comportam como esperado, às vezes não são expressos, podem ser



silenciados e também podem causar o silenciamento de genes endógenos se forem suficientemente homólogos, um fenômeno conhecido como co-supressão (STAM *et al.*, 1997). O silenciamento pode ocorrer transcricionalmente e pós-transcricionalmente, devido a metilação do DNA, número de cópias e a repetitividade da inserção, nível de expressão do transgene, possível produção de RNAs e interações DNA ectópicas (STAM *et al.*, 1997). As variações que podem surgir durante o processo de transformação das células são imprevisíveis e não totalmente controláveis. Sendo assim, a expressão gênica em um organismo é complexa e influenciada por interações entre fatores externos e internos (BHAT; SRINIVASAN, 2002). Uma das possibilidades da causa da redução da expressão do gene nativo, é que nesse evento (E2), fragmentos do transgenes interferiram na transcrição do gene endógeno.

Em relação ao perfil transcricional do transgene *VaP5CS*, houve instabilidade nas amplificações entre os eventos e mesmo entre as repetições. O par de iniciadores utilizado para verificar a expressão do transgene, foi anteriormente utilizado com sucesso em estudos de expressão relativa do transgene *VaP5CS129A* em plantas de tabaco (BORGIO *et al.*, 2021). Sendo assim a instabilidade de expressão não pode ser atribuída aos iniciadores, aos equipamentos ou mesmos as amostras de cDNA pois foram as mesmas utilizadas para a análise da expressão do *P5CS* nativo e no normalizador (*eIF4a*). A instabilidade na expressão do transgene sugere que as plantas regeneradas *in vitro* podem ser quiméricas. A geração de plantas transgênicas pelo método físico de biobalística, envolve primeiramente a desdiferenciação dos tecidos organizados, formando calos, utilizando normalmente auxinas fortes (picloram e 2,4D) como no caso das plantas avaliadas nesse trabalho. A desdiferenciação seguida da rediferenciação das células para regenerar as plantas *in vitro* pode produzir plantas quiméricas, as quais podem resultar em plantas contendo células transformadas e não transformadas (MERRICK; FEI, 2015).

Em transformação genética por biobalística, devido à integração aleatória do cassete de expressão no genoma da planta, o DNA pode resultar em níveis de expressão variáveis nos diferentes eventos transformados, como também o silenciamento do transgene se ocorrerem várias integrações do mesmo gene ou em locais metilados (DELPORTE *et al.*, 2012; ANAMI *et al.*, 2013; DONG; RONALD, 2021). Sabe-se que o procedimento de cultura de tecidos pode gerar diferentes

modificações nas células e conseqüentemente nas plantas regeneradas. Entre elas a variação epigenética e somaclonal, ativação de transposons, amplificação de DNA, mutações pontuais, metilação os quais contribuem para a variabilidade das plantas regeneradas (BHAT; SRINIVASAN, 2002).

Nesse trabalho não foi possível a determinação do número de cópias inseridas nos eventos, via *Southern blot*, devido a falta de condições para a realização dessa técnica. Porém os testes de detecção via PCR convencional foram realizados repetidas vezes para a confirmação dos eventos (T0). Anteriormente a realização desse trabalho, além do gene *P5CS*, os eventos também foram testados para a presença do gene *bar* e ambos foram confirmados sendo que em plantas controle não houve amplificação de nenhum dos dois genes (TAKAMORI, 2018). Sendo assim, a instabilidade da expressão do transgene pode ser devido ao local de inserção, quebra ou rearranjo do fragmento dentro das células, ou ainda como já citado, sugere-se que as plantas sejam quiméricas.

É fundamental ressaltar que o processo de transcrição é muito preciso, para que ocorra e posteriormente produza a proteína esperada, o gene precisa estar completo. Além disso, e a PCR convencional utilizada para selecionar os eventos, detecta apenas um fragmento do gene, portanto não prova que o gene inserido está inteiro e funcional (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

Além disso, o processo de transformação pode ser acompanhado de variação somaclonal o que pode contribuir para diferenças entre os transgênicos, a qual pode influenciar a expressão do transgene e conseqüentemente no fenótipo da planta (BHAT; SRINIVASAN, 2002). O evento E3 mostrou variação fenotípica comparada as outras plantas regeneradas. As plantas foram mais vigorosas, maior biomassa da parte aérea em condições normais de irrigação (Figura 12) e de raiz nas duas condições (Figura 13), também foi o evento que produziu mais prolina sob déficit hídrico (Figura 8A) e MDA (Figura 9A). Além disso esse evento apresentou transcrição do transgene mesmo em condições irrigadas, e mais baixa sob déficit hídrico comparado aos demais eventos. O aumento da expressão do transgene *VaP5CS* no evento E3 mesmo sob irrigação, e a sua variação fenotípica pode indicar que além da inserção do transgene este evento pode apresentar variação somaclonal.

### 3.6 Considerações finais

A análise de três eventos de braquiária transformados com a construção *AIPC:P5CS* revelou que o evento E3 apresentou diferenças fisiológicas, bioquímicas e moleculares comparados aos outros eventos e ao controle, além disso, esse evento exibiu diferença fenotípica em relação aos demais.

Esse trabalho foi o primeiro esforço para caracterizar eventos de transformação contendo genes de interesse nessa espécie, porém o processo de transformação por biobalística é complexo, sendo necessário analisar um grande número de eventos para encontrar o ideal, verificar o número de cópias, presença de variação somaclonal, entre outras características. Ainda é preciso otimizar os processos de transformação genética da braquiária, pois essas ferramentas biotecnológicas são de grande relevância para essa espécie visto que o melhoramento é dificultado pela sua natureza apomítica e poliplóide.

### 3.7 Conclusão

Não houve constatação de maior tolerância ao déficit hídrico dos eventos em relação ao controle não transformado, não proporcionando maior eficiência do uso da água no déficit quanto na recuperação e conseqüentemente acúmulo de biomassa de parte aérea, visto que seria interessante como forrageira.

No que se refere a atuação da prolina, não distinguimos as respostas frente ao estresse dos diferentes genótipos.

## REFERÊNCIAS

- ANAMI, S. *et al.* Higher plant transformation: principles and molecular tools. **International Journal of Developmental Biology**, v. 57, n. 6-8, p. 483-494, 2013.
- 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 Research**, v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 2004.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p. 1-15, jan. 1949.
- ABIEC. **Perfil da Pecuária no Brasil relatório anual**. 2019. Disponível em: <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2019/>. Acesso em: 24 set. 2021.
- ALIA. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline. *In*: ANNUAL USER MEETING OF THE FREE RADICAL RESEARCH FACILITY, 1. **Proceedings [...]**. Daresbury, Cheshire, UK, 2003.
- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 391-396, 2006.
- ASHRAF, M. Inducing drought tolerance in plants: recent advances. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 1, p. 169-183, 2010.
- ASHRAF, M.H.P.J.C.; HARRIS, P.J. Photosynthesis under stressful environments: an overview. **Photosynthetica**, v. 51, n. 2, p. 163-190, 2013.
- BAJJI, M.; KINET, J.M.; LUTTS, S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. **Plant Growth Regulation**, v. 36, n. 1, p. 61-70, 2002.
- 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.
- BATISTA, K. D. *et al.* Photosynthetic limitations in coffee plants are chiefly governed by diffusive factors. **Trees**, v. 26, n. 2, p.459-468, 2011.
- BELLIDO, A. M. *et al.* Genetic Transformation of Apomictic Grasses: Progress and Constraints. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021.
- BHARGAVA, S.; SAWANT, K. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. **Plant breeding**, v. 132, n. 1, p. 21-32, 2013.
- BHAT, S. R.; SRINIVASAN, S. Molecular and genetic analyses of transgenic plants:: Considerations and approaches. **Plant Science**, v. 163, n. 4, p. 673-681, 2002.
- BLUM, A. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. **Plant, Cell & Environment**, v. 40, n. 1, p. 4-10, 2017.

BONDOK, A. E. T. *et al.* Phenotypical, physiological and molecular assessment of drought tolerance of five Egyptian teosinte genotypes. **Journal of Plant Interactions**, v. 17, n. 1, p. 656-673, 2022.

BORGO, L. *et al.* Proline Exogenously Supplied or Endogenously Overproduced Induces Different Nutritional, Metabolic, and Antioxidative Responses in Transgenic Tobacco Exposed to Cadmium. **Journal of Plant Growth Regulation**, p. 1-23, 2021.

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

CACEFO, V. **Prolina endógena e exógena em plantas de tabaco submetidas à deficiência hídrica: respostas fisiológicas, bioquímicas, moleculares e no perfil ionômico.** 2020. 129f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2020.

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

CARVALHO, K. *et al.* The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 4, p. 3269-3279, 2013.

CHAVES, M. M.; OLIVEIRA, M. M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 407, p. 2365-2384, 2004.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 551-560, 2009.

CHERUIYOT, D. *et al.* Genotypic responses of brachiaria grass (*Brachiaria* spp.) accessions to drought stress. **Journal of Agronomy**, v. 17, n. 3, p.136-146, 2018.

CHOURASIA, K. N. Resistance/Tolerance mechanism under water deficit (Drought) condition in plants. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 4, p. 66-78, 2017.

DELPORTE, F. *et al.* Insights into the regenerative property of plant cells and their receptivity to transgenesis: wheat as a research case study. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 12, p. 1608-1620, 2012.

DIAS, N. S.; BLANCO, F. F. Efeitos dos sais no solo e na planta. **Embrapa Meio-Norte-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2010.

DONG, O.; RONALD, P. C. Targeted DNA insertion in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 22, p. e2004834117, 2021.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.

DU, F. *et al.* Responses of reactive oxygen scavenging enzymes, proline and malondialdehyde to water deficits among six secondary successional seral species in Loess Plateau. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e98872, 2014.

EMBRAPA. **Soluções Tecnológicas**, 2017. *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/863/brachiaria-brizanthacv-marandu>. Acesso em: 24 set. 2021.

FAHAD, S. *et al.* Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1147, 2017.

FAO. **Proactive approaches to drought preparedness**: where are we now and where do we go from here? 2019.

FAO. **The State of the World's Land and Water Resources for Food and Agriculture (SOLAW)**: Managing Systems at Risk (Food and Agriculture Organization of the United Nations and Earthscan). 2011.

FARQUHAR, G. D.; VON CAEMMERER, S.; BERRY, J. A. A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C3 species. **Planta**, v. 149, n. 1, p. 78-90, 1980.

GAO, M. *et al.* Transformation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) with a bacterial gene for choline oxidase. **Molecular Breeding**, v. 6, p. 501-510, 2000.

GUENNI, O.; MARÍN, D.; BARUCH, Z. Responses to drought of five *Brachiaria* species. I. Biomass production, leaf growth, root distribution, water use and forage quality. **Plant and Soil**, v. 243, n. 2, p. 229-241, 2002.

GUERZONI, J. T. S. *et al.* Stress-induced  $\Delta^1$ -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.

GUERZONI, J.T.S. **Avaliação da tolerância ao estresse salino de plantas de cana-de-açúcar transformadas com o gene P5CS**. 2010. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

GUPTA, A.; RICO-MEDINA, A.; CAÑO-DELGADO, A. I. The physiology of plant responses to drought. **Science**, v. 368, n. 6488, p. 266-269, 2020.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.

HONG, Z. *et al.* Removal of feedback inhibition of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiology**, v. 122, n. 4, p. 1129-1136, 2000.

IBGE. **Censo agropecuário**: resultados preliminares. Rio de Janeiro: IBGE, 2017. v. 7, p.1-108.

- IQBAL, N. *et al.* A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: regulation of proline metabolism. **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p. 34-42, 2014.
- JALEEL, C. A. *et al.* Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 11, n. 1, p. 100-105, 2009.
- JANK, L. *et al.* Novas alternativas de cultivares de forrageiras e melhoramento para a sustentabilidade da pecuária. *In*: SIMPÓSIO DE ADUBAÇÃO E MANEJO DE PASTAGENS, 4.: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO ANIMAL A PASTO, 4., 2017, Dracena. **Anais [...]**. Sustentabilidade do sistema produtivo. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2017.
- JIANG, Q. *et al.* Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses in *Oenanthе javanica* (Bl.) DC. **PloS One**, v. 9, n. 3, p. e92262, 2014.
- JONES, C. *et al.* A comparison of differential gene expression in response to the onset of water stress between three hybrid *Brachiaria* genotypes. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 393, 2021.
- KHANNA-CHOPRA, R. *et al.* Proline—A key regulator conferring plant tolerance to salinity and drought. *In*: **Plant tolerance to environmental stress**. Boca Raton: CRC Press, 2019. p. 59-80.
- KARASAWA, M.M.G. **Diversidade reprodutiva de plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2009. 113 p.
- KAUR, G.; ASTHIR, B. J. B. P. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. **Biologia Plantarum**, v. 59, n. 4, p. 609-619, 2015.
- KHALID, M. F. *et al.* Impacts of abiotic stresses on growth and development of plants. *In*: **Plant tolerance to environmental stress**. Boca Raton: CRC Press, 2019. p. 1-8.
- KHAN, M. *et al.* Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 67-74, 2014.
- KLEPEK, Y.-S. *et al.* Arabidopsis POLYOL TRANSPORTER5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H<sup>+</sup>-symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose. **The Plant Cell**, v. 17, n. 1, p. 204-218, 2005.
- LIANG, W. *et al.* Plant salt-tolerance mechanism: A review. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 495, n. 1, p. 286-291, 2018.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MEENA, M. *et al.* Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. **Heliyon**, v. 5, n. 12, p. e02952, 2019.

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.

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, p. 218–229, 2007.

MOLINARI, H. B. C. *et al.* Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v.167, p.1375-1381, 2004.

NASIRZADEH, L. *et al.* Changes in antioxidant enzyme activities and gene expression profiles under drought stress in tolerant, intermediate, and susceptible wheat genotypes. **Cereal Research Communications**, v. 49, n. 1, p. 83-89, 2021.

MUNNS, R.; GILLIHAM, M. Salinity tolerance of crops—what is the cost?. **New Phytologist**, v. 208, n. 3, p. 668-673, 2015.

NUNES, S.G. *et al.* *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. In: SIMPAPASTO EMBRAPA/CNPQC, 4. **Anais [...]**. Campo Grande, MS, Brazil. 1984. Documentos Embrapa, 21.

PARIHAR, P. *et al.* Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 6, p. 4056-4075, 2015.

PARKASH, V.; SINGH, S. A review on potential plant-based water stress indicators for vegetable crops. **Sustainability**, v. 12, n. 10, p. 3945, 2020.

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. 776-783, 2016.

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.

PFÄFFL, 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.

RAMAKERS, C. *et al.* Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.

RAPOSO, A. *et al.* **Determinação do modo de reprodução em *Brachiara* spp. e *Panicum Maximum* usando microscopia por contraste de interferência em ovários clarificados.** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2019.



SAGE, R. F.; ZHU, XG. Exploiting the engine of C4 photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 9, p. 2989-3000, 2011.

SALARIATO, D. L. *et al.* Molecular phylogeny of the subtribe *Melinidinae* (*Poaceae*: *Panicoideae*: *Paniceae*) and evolutionary trends in the homogenization of inflorescences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, n. 1, p. 355-369, 2010.

SANTOS, Y. D. *et al.* Epigenetic Marks Associated to the Study of Nucleolar Dominance in *Urochloa* P. Beauv. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 38, n. 3, 2020.

SANTOS, T. B. *et al.* Physiological Responses to Drought, Salinity, and Heat Stress in Plants: A Review. **Stresses**, v. 2, n. 1, p. 113-135, 2022.

SHEN, Q. *et al.* Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. **The Plant Cell**, v. 7, p. 295-307, 1995.

SHEN, Q. *et al.* The stress-and abscisic acid-induced barley gene *HVA22*: developmental regulation and homologues in diverse organisms. **Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 327-340, 2001.

SILVA, F. L. B. *et al.* Validation of reference genes for real-time quantitative PCR in *Brachiaria* grass under salt stress. **Plant Gene**, v. 27, p. 100319, 2021.

SILVA, M. de A. *et al.* Pigmentos fotossintéticos e índice SPAD como descritores de intensidade do estresse por deficiência hídrica em cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 173181, 2014.

SILVER, N. *et al.* Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 33, 2006.

SILVEIRA, É. D. *et al.* Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual grass *Brachiaria brizantha*. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 84, 2009.

SORENG, R. J. *et al.* A worldwide phylogenetic classification of the *Poaceae* (*Gramineae*) II: An update and a comparison of two 2015 classifications. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 55, n. 4, p. 259-290, 2017.

STAM, M.; MOL, J. NM; KOOTER, J. M. The silence of genes in transgenic plants. **Annals of Botany**, v. 79, n. 1, p. 3-12, 1997.

SU, J. *et al.* Dehydration-stress-regulated transgene expression in stably transformed rice plants. **Plant Physiology**, v. 117, n. 3, p. 913-922, 1998.

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, p. 941–948, 2004.

SUN, Y. *et al.* Response of plants to water stress: a meta-analysis. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 978, 2020.

REDDY, P. S. *et al.* Proline over-accumulation alleviates salt stress and protects photosynthetic and antioxidant enzyme activities in transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 94, p. 104-113, 2015.  
SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 2, p. 89-97, 2010.

TAKAMORI, L. M. *et al.* Identification of endogenous reference genes for RT-qPCR expression analysis in *Urochloa brizantha* under abiotic stresses. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

TAKAMORI, L. M., **Transformação genética de *Urochloa brizantha* para tolerância ao déficit hídrico e validação de genes normalizadores para estresses abióticos**. 2018. 122p. Tese (Doutorado) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2018.

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.

THAKUR, P. *et al.* Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 429-443, 2010.

VALLE, C.B. *et al.* Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. In: CARNEIRO, V.T.C.; DUSI, D.M.A. (Ed.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. p.47-66.

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, p. 1–12, 2002.

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, p. 1367–1376, 2007.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, n. 4, p. 753-759, 2008.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v. 39, n. 1, p. 75–85, 2005.

WORTHINGTON, M. *et al.* A new genome allows the identification of genes associated with natural variation in aluminium tolerance in *Brachiaria* grasses. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 2, p. 302-319, 2021.

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.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, M. **Biologia Molecular Básica** - 5. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ZARGAR, S. M. *et al.* Impact of drought on photosynthesis: Molecular perspective. **Plant Gene**, v. 11, p. 154-159, 2017.

ZHAO, C. *et al.* Mechanisms of plant responses and adaptation to soil salinity. **The Innovation**, v. 1, n. 1, p. 100017, 2020.

ZHU, B. *et al.* Overexpression of a  $\Delta^1$ -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.

## ANEXOS

## ANEXO 1 – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA TERRA VEGETAL BIOTERRA®

pH	MO	P <sub>resina</sub>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	M	V
CaCl <sub>2</sub>	g dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>	-----mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----						%	%	
6,8	85,7	350	0	10,7	10,6	253,9	46,8	311,3	321,9	0	96,7

Fonte: Laboratório de Análise de Solos e Tecido Vegetal. Faculdade de Agronomia – UNOESTE-  
Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente/SP.

ANEXO 2 – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA TERRA VEGETAL BIOTERRA®  
(MICRONUTRIENTES)

B	Cu	Fe	Mn	Zn
-----mg dm <sup>-3</sup> -----				
0,94	3,1	138,1	2,9	10,1

Fonte: Laboratório de Análise de Solos e Tecido Vegetal. Faculdade de Agronomia – UNOESTE-  
Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente/SP.

## 4 CAPÍTULO 2

Artigo apresentado na íntegra, publicado na revista Plant Gene, volume 27, página 100319, 2021. DOI: 10.1016/j.plgene.2021.100319

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2352407321000494?via%3Dihub>

### **Validation of reference genes for real-time quantitative PCR in Brachiaria grass under salt stress**

Flávia Loyze Baldassarini Silva, Tiago Benedito dos Santos, Mayara de Oliveira Vidotto Figueiredo, Viviane Cacefo, Luiz Gonzaga Esteves Vieira, Alessandra Ferreira Ribas \*

<sup>a</sup> Molecular Genetics laboratory. Postgraduate Program in Agronomy, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

Corresponding author at: Universidade do Oeste Paulista, Brazil. E-mail address: [alessandraribas@unoeste.br](mailto:alessandraribas@unoeste.br) (A.F. Ribas).

### **ABSTRACT**

Salinity is one of the most important abiotic stresses that affect plant yield. Quantitative gene expression using real-time PCR (RT-qPCR) is a powerful tool to measure the transcriptional changes that occur in plant tissues under stress. For valid RT-qPCR analysis, normalization against the appropriate reference genes is essential for data accuracy. Despite the importance of Brachiaria grass (syn. *Urochloa*) as a tropical forage; there are no studies on the stability of reference genes under salt stress in this species. This study aimed to evaluate the stability of seven candidate reference genes: Actin 12; eukaryotic initiation factor 4A; elongation factor 1-  $\alpha$ ; tubulin  $\alpha$ -5; tubulin  $\beta$ -6; ubiquitin-conjugating enzyme and glucose-6-phosphate dehydrogenase for quantitative real-time PCR assays in *Urochloa brizantha* under salt stress. Total RNA was extracted from shoots and roots of plants cultivated in a hydroponic system containing 200 mM NaCl during 0, 6, 12, and 24 h for RT-qPCR analysis. We used the RefFinder web tool to establish a comprehensive

rank for gene stability. Eukaryotic initiation factor 4A ranked as the most stable gene for both tissues followed by tubulin  $\alpha$ -5 (shoots) and actin12 (roots) while tubulin beta-6 and glucose-6-phosphate dehydrogenase were the least stable genes for shoots and roots, respectively. The most and the least stable genes were then used to normalize the relative expression of a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter (*NHX*) gene. The relative quantification of this gene varied according to the internal controls (most stable, least stable housekeeping genes), confirming the choice of the reference genes.

#### 4.1 Introduction

Brazil ranks second in world livestock with 232 million head of cattle (Zia *et al.*, 2019). Most of the Brazilian bovine herd is raised on pasture mainly with *Brachiaria* forage grasses. *Urochloa* (syn. *Brachiaria*) P. Beauv sp. belongs to the Poaceae family, Panicoideae subfamily, and Paniceae tribe and counts with approximately 100 species (Soreng *et al.*, 2017). Among them, *U. brizantha* accounts for 50% of the cultivated pasture area, which represents approximately 51.4 million hectares (Embrapa, 2017).

The greater recognition of the importance of pastures to improve production sustainability and the rational use of livestock production factors has led to an increased interest in molecular studies on *Urochloa spp.* in recent years. The main research themes are related to understanding the reproductive systems of this agamic complex (Silveira *et al.*, 2009; Vigna *et al.*, 2016; Koehler *et al.*, 2020), responses to abiotic stresses (Takamori *et al.*, 2017; Worthington *et al.*, 2021), development of molecular marks for forage quality (Silva *et al.*, 2013; Hanley *et al.*, 2020), epigenetic marks (Santos *et al.*, 2020) and chloroplast sequencing (Pessoa-Filho *et al.*, 2017). Recently, the complete genome of *U. ruziziensis*, a sexual diploid species, has been published (Worthington *et al.*, 2021) and is now a reference, opening new opportunities for molecular approaches in this genus.

Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) is one of the most reliable methods to assess gene expression at the transcriptional level (Bustin *et al.*, 2009). This confidence is due to high sensitivity, specificity, reproducibility and high performance in the quantification of gene expression (Derveaux *et al.*, 2010; Pombo *et al.*, 2017). To ensure accuracy, data normalization using internal reference genes is the most effective and easiest method (Huggett *et*

*al.*, 2005; Guenin *et al.*, 2009; Kozera and Rapacz, 2013). A suitable reference gene must fit into some criteria, among them: stable expression level in different experimental conditions, low variability among tissues and physiological status of the organism, and comparable threshold cycle with the target gene (Kozera and Rapacz, 2013). In this sense, the best reference gene must be stable, irrespective of experimental conditions, cell types, tissues and development stage (Wong and Medrano, 2005). To select the most stable reference gene in several organisms and the specific experimental condition, different algorithms and statistical methods such as geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), NormFinder (Andersen *et al.*, 2004)), BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004), and the  $\Delta\text{Ct}$  method (Silver *et al.*, 2006) were developed. RefFinder is a web-based tool that calculates the stability of the reference genes by assigning an individual weight to each of the four methods cited above to establish a comprehensive rank of gene stability using the geometric mean of all methods (Xie *et al.*, 2012).

The first study to select reference genes in *U. brizantha* aimed to evaluate the stability of a panel of genes in different tissues. In that study, ubiquitin conjugated enzyme was selected as the most stable gene (Silveira *et al.*, 2009). This same reference gene has been used to normalize the relative transcription levels of genes differentially expressed between a diploid sexual and facultative apomictic tetraploid accession of *U. brizantha* (Silveira *et al.*, 2012) and *U. humidicola* (Vigna *et al.*, 2016) and genes related to somatic embryogenesis in *U. brizantha* (Koehler *et al.*, 2020). Our group was the first to evaluate gene stability in *U. brizantha* under different abiotic stresses (Takamori *et al.*, 2017), which enabled the selection of *EF1- $\alpha$* , *EF1- $\alpha$*  or *UbiCo* and *eIF4a* as the most stable genes for heat, cold, and drought stresses, respectively.

Salinity is another major abiotic stress that affects plant growth, development, and yield due to ionic and osmotic pressures (Kumar *et al.*, 2017). In Brazil, inland salt flats are present in drought-affected areas of the northeast region (NE) either due to the effects of low rainfall, high water deficits, and careless irrigation management (Costa, 2010). Therefore, plant species with improved tolerance to salinity have great potential to produce forage/fodder on these inland salt flats of NE Brazil. After undergoing salt stress, plants increase the generation of ROS (Reactive Oxygen Species) which can lead to oxidative stress (Isayenkov and Maathuis, 2019). Plants can trigger different physiological and biochemical

mechanisms to deal with salt stress, including changes in morphology, anatomy, water content, photosynthesis, hormones, ion distribution and biochemical changes (Zhang and Dai, 2019; Arif *et al.*, 2020). In addition, tolerance to salinity can activate and alter the expression of countless genes from different functional groups responsible for minimizing the deleterious effects of that stress (Munns and Gilliam, 2015).

The goal of this study was to evaluate a panel of seven reference genes (*ACT12* - Actin 12; *eIF4a* - eukaryotic initiation factor 4A; *EF1- $\alpha$*  - elongation factor 1-alpha;  *$\alpha$ -TUB5* - Tubulin alpha-5;  *$\beta$ -TUB6* - Tubulin beta-6; *UbiCo* - Ubiquitin-conjugating enzyme and *GAPDH* - Glucose-6-phosphate dehydrogenase) for gene stability in *U. brizantha* cv. Marandu under salt stress. Additionally, to validate the experiment, the quantitative expression of a sodium/hydrogen antiporter ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter - *NHX*) gene was normalized against the most and the least stable genes ranked by RefFinder. The selection of the appropriate reference gene in *U. brizantha* under salt stress provides new information to investigate the relative expression of candidate genes involved in the response of Brachiaria grass to salt stress conditions.

## 4.2 Materials and methods

### 4.2.1 Experimental conditions

Seeds of *U. brizantha* cv. Marandu, an apomictic and tetraploid ( $2n = 4 \times = 36$ ) cultivar, were sown in a tray containing a commercial substrate (Bioterra™) and irrigated daily in a greenhouse. After 11 days, select plants of uniform size (approximately 3 cm high) were transferred to a hydroponic system using 1.8 L pots with three plants/pot containing the nutrient solution (1/2 Hoagland's nutrient solution at pH 5.6 to 6.0 (Hoagland and Arnon, 1950) with constant aeration. The solution was replaced every seven days and the pH was monitored. After 14 days of plant adaptation to the nutrient solution, salt stress was imposed by adding 200 mM NaCl. Shoots and roots were collected at different sampling times (0, 6, 12, and 24 h) after exposition to the salt stress. The experimental design was composed of four different treatments (0, 6, 12, and 24 h after NaCl addition) with three biological replicates by



treatments. The shoots and roots were separated immediately immersed in liquid nitrogen and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.2 Total RNA extraction and cDNA synthesis

Frozen samples (shoots and roots) were macerated in liquid nitrogen for total RNA extraction using Pure Link Plant™ RNA Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). To eliminate contamination with genomic DNA, samples were treated with the Turbo DNase enzyme (Ambion™). The RNA quality was checked in Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) and by 1.2% agarose gel electrophoresis. The first-strand cDNA was synthesized from two  $\mu\text{g}$  of total RNA using SuperScript IV First-Strand cDNA Synthesis Reaction™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The reaction was incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 20 min with two units (1  $\mu\text{L}$ ) of RNase H for removal of template RNA. All procedures followed the manufacturer's instructions. Final cDNA products were diluted 1:5 before using in RT-qPCR reactions.

#### 4.2.3 Reference genes

In this work, we used seven reference genes previously described for *U. brizantha* and listed in Table 1. The pairs of primers used to amplify the fragments of actin 12 (*ACT12*), eukaryotic initiation factor 4A (*eIF4a*), elongation factor 1-alpha (*EF1- $\alpha$* ), tubulin alpha-5 (*TUB5*), tubulin beta-6 ( *$\beta$ -TUB6*), and ubiquitin-conjugating enzyme (*UbiCo*) were obtained from Takamori *et al.* (2017) and glucose-6-phosphate dehydrogenase gene (*BbrizGAPDH*) from Silveira *et al.* (2009).

#### 4.2.4 RT-qPCR analysis

Amplification reactions were performed using 5  $\mu\text{l}$  of SYBR Green reaction mix, 0.4  $\mu\text{l}$  of each the forward and reverse primers (5  $\mu\text{M}$ ), together with 1.0  $\mu\text{l}$  of the cDNA (1:5 diluted) and 10  $\mu\text{l}$  of autoclaved Milli-Q water. Reaction mix without any cDNA was included as negative control for each primer pair. The reaction mixes were cycled in the StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) as followed: an initial hold of 2 min at  $95^{\circ}\text{C}$ , 40 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 30 s and  $60^{\circ}\text{C}$  for 30 s during which the fluorescence data were collected. For each gene and treatment (0, 6, 12 and 24 h under salt stress), there were three biological replicates. RT-qPCR assays were conducted with two technical replicates. The Cq

average of all treatments (0, 6, 12, and 24 h) in shoots or roots were used to calculate gene stability for each reference gene.

#### 4.2.5 Reference genes stability and validation

RefFinder web-based tool (Xie *et al.*, 2012) available online (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/#>) was used to establish a comprehensive rank the stability of the seven candidate genes (Table 1). To validate the rank provided by RefFinder, we analyzed the relative expression of the salt stress-responsive gene Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (*NHX*).

Since there is no *U. brizantha* genome on the public database, we used a strategy based on gene orthology to design a primer pair for amplification of the *UbNHX* gene. Firstly, we searched for a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (*NHX1*) gene in the *Arabidopsis thaliana* genome available on The Arabidopsis Information Resource (TAIR: [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). This sequence was used as a query for orthologous *NHX* gene search in six species of the Panicoideae (same family of *U. brizantha*) in the Phytozome database (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>); (Goodstein *et al.*, 2012). Putative *NHX* genes were identified in six species including *Panicum halli* (B04943.1), *P. virgatum* (Ba00176.1), *Setaria viridis* (2G434900.1), *S. italica* (2G422800.1), *Sorghum bicolor* (002G408100.1) and *Zea mays* (Zm00008a029574). The coding region sequences (CDS) from these genes were aligned by ClustalW software (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>), to verify the conservation among the Panicoideae species. Then, the CDS sequence from *Panicum halli* (B04943.1) was blasted against the scaffolds sequences of *U. ruziziensis* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=ruziziensis>) and also used to design a pair of primers (5'-ATCTCTCTCGGTGCCATAGCA-3' and 5'-GCTCCAATTGCAAGGAAATCC-3') using Primer3Plus software (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>); Untergasser *et al.*, 2007). This pair of primers was evaluated for possible dimers and hairpins using Multiple Primer Analyzer (<https://www.thermofisher.com/multiple-primer-analyzer.html>). Primer-Blast against the Panicoideae family in NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) was performed to verify primer specificity. Primer amplification efficiency was calculated by the LinRegPCR program (Ramakers *et al.*, 2003), using a cDNA bulk of all samples using technical triplicates. The transcriptional activity of *NHX* in *U. brizantha* under salt stress (0, 6, 12 and 24 h) was calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method

(Livak and Schmittgen, 2001), using the two most and the least stable gene selected by RefFinder. Statistical analysis was performed by *t-test* (\*  $p < 0.05$ ) between means of the treatment without NaCl (0 h) and hours after NaCl addition for the most and the least stable reference genes selected by RefFinder.

### 4.3 Results

In this work, we evaluate the stability at the transcriptional level of seven reference genes (*ACT12*, *eIF4a*, *EF1- $\alpha$* ,  *$\beta$ -TUB6*,  *$\alpha$ -TUB5*, *UbiCo* and *GAPDH*) in shoots and roots of *U. brizantha* submitted to salt stress (Fig. 1). All pairs of primers showed a single amplification from the right size (Supplementary Fig. S1) The amplification efficiencies of these primers were previously described by Takamori *et al.* (2017) and Silveira *et al.* (2009) ranging from 96% (*UbiCo*) to 103% ( *$\beta$ -TUB6*) indicating that they were suitable for quantitative real-time PCR. Quantification cycles (Cq) (or cycle threshold - Ct) were determined for each pair of primers in shoots and roots of *U. brizantha* (Fig. 2). In our experiments, the lower Cq (18.8) was detected for *UbiCo* and  *$\beta$ -TUB6* genes in leaves and roots, respectively while the *GAPDH* gene presented the greater Cq in leaves (30.6) and roots (32.6) (Fig. 2).

Gene stability was assayed using different methods and algorithms (geNorm, BestKeeper, NormFinder, and  $\Delta$ CT). The index values for each method are shown on Table 2. In our work, using geNorm, most reference genes showed M values lower than 1.5 cutoff proving to be appropriate to normalization, except  *$\beta$ -TUB6* in shoots (1.68) and *GAPDH* in roots (1.61) (Table 2). In the BestKeeper method, only the *eIF4a* gene was considered stable in roots (0.93) while in shoots, in addition to *eIF4a* (0.98), the  *$\alpha$ -TUB5* (0.82) and *GAPDH* (0.8) were also considered stable genes (Table 2). For both NormFinder and  $\Delta$ Ct methods, the top two most stable genes were *eIF4a* and *Act12* in roots and *eIF4a* and  *$\alpha$ -TUB5* in shoots (Table 2).

Considering all four methods mentioned above, the top three on gene stability were *eIF4a*,  *$\alpha$ -TUB5*, *UbiCo* in shoots, and *eIF4a*, *Act12*, *UbiCo* in roots although the rank positions were variable (Table 2). The exception was the *GAPDH* gene that ranked first for BestKeeper and third for NormFinder in shoots (Table 2).

For all methods, the least stable gene was  $\beta$ -*TUB6* (shoots) and *GAPDH* (roots), except for BestKeeper that ranked  $\beta$ -*TUB6* in roots (Table 2).

Eukaryotic initiation factor 4A (*eIF4a*) gene was ranked first the in both tissues by the RefFinder web tool. The second most stable gene was  $\alpha$ -*TUB5* and *ACT12* in shoots and roots, respectively while ubiquitin conjugate enzyme (*UbiCo*) ranked third in both tissues (Table 2, Fig. 3). The least stable genes were  $\beta$ -*TUB6* in shoots and *GAPDH* in roots (Table 2, Fig. 3).

A pair of primers to amplify a fragment of 80 bp from the *NHX* gene (Supplementary Fig.) was designed to validate the experiment. This pair of primers showed an amplification efficiency of 107.4%. Until now, there is no genome available for *U. brizantha*, we have used the sequences from *Panicum halli* to primer design. The amplicon was blasted against *U. ruziziensis* scaffolds (Worthington *et al.*, 2021) and returned a single sequence (ID: CM027119.1) with 91% of identity, showing that the sequences of *NHX* gene are highly conserved among Panicoideae species. The conservation among the species *Urochloa sp.* has been shown since a single primer for *Actin12* gene was used to normalize the relative expression of 45S rDNA gene in root and leaf tissues of *U. brizantha* and *U. ruziziensis* (Santos *et al.*, 2020).

The relative expression of *NHX* gene in shoots and roots of *U. brizantha* under salt stress was normalized against the two most stable genes, the geometric means of both genes and the least stable genes ranked by RefFinder (Fig. 4). In shoots, the expression pattern was very similar when normalized with the two most stable genes (*eIF4a* and  $\alpha$ -*TUB5*) and with the geometric means of both genes (Fig. 4A). An increase in gene expression of approximately 10-fold was observed at 6 h of salt stress followed by a decrease in expression (~3-fold) at 12 and 24 h compared to the calibrator (0 h). When the data were normalized with the least stable gene ( $\beta$ -*TUB6*) the same profile was observed at 6 h. However, at 12 h the expression decreased 0.5-fold in comparison to the 0 h treatment (Fig. 4A). In roots, the expression of *NHX* gene was downregulated by 5-fold after 12 h under salt stress. The same expression pattern was detected when the transcripts were normalized with the first (*eIF4a*), the second (*ACT12*), and with the geometric means of these both better-ranked genes selected by the RefFinder method. Using the least stable gene (*GAPDH*), after 24 h of salt stress the expression of the *NHX* gene presented to

the same level as observed in the 0 h treatment (Fig. 4B) showing a different profile when compared to normalization with the most stable reference genes.

Therefore, as demonstrated, the normalization of quantitative relative expression using unstable reference genes leads to the misinterpretation of transcriptional data in plants of *U. brizantha* under salt stress.

#### 4.4 Discussion

Plant's response to salt stress involves complex mechanisms in transcriptional and translational levels, hormonal regulation, changes in morphology and anatomy (Behera and Hembram, 2020). To understand the mechanisms of tolerance to salt stress, one of the most prevalent methods is to quantify the gene expression profile using RT-qPCR due to its high sensitivity, efficiency, specificity, and accuracy (Jiang *et al.*, 2014; Joseph *et al.*, 2018). Comparison between the quantification cycle (Cq) of the target gene and the most stable reference genes under a specific condition give us a more reliable estimate of relative gene expression (Kozera and Rapacz, 2013). Cq values refer to the PCR cycle where the arbitrary threshold is overtaken by the fluorescent signal of reporter dye, which means the greater Cq, the lower amount of amplicon on the sample, and vice versa (Schmittgen and Livak, 2008). The Cq suitable for a reference gene should not be lower than 15 or greater than 30 (Wan *et al.*, 2010). In our study, all reference genes showed an appropriate Cq except for the *GAPDH* gene, mainly in the root samples (32.6) (Fig. 2).

Different methods were used to calculate the rank of stability. The lower index values indicate the most stable genes (Yang *et al.*, 2020). In our work, the results presented some variation in ranking position depending on the method used. While geNorm considered most reference genes tested appropriate to normalization, BestKeeper considered stable only *eIF4a* in roots and *eIF4a*,  $\alpha$ -*TUB5* and *GAPDH* in shoots. NormFinder and  $\Delta$ Ct method showed identical ranking in root and some divergences in the shoot, but the top two most stable genes (*eIF4a* and  $\alpha$ -*TUB5*) and the least stable one (*GAPDH*) were the same in both methods. This variation in ranking positions is frequent due to the differences in the input data and algorithm used to calculate gene stability in each method (Kozera and Rapacz, 2013). GeNorm calculates stability values (M value) by the geometric mean of a normalization factor

of a particular gene compared to all other reference genes tested, values below 1.5 are suitable for normalization (Vandesompele *et al.*, 2002). BestKeeper uses the raw Ct data to calculate the coefficient of variance, standard deviation (CV  $\pm$  SD), and the coefficient of correlation (r) to rank gene expression stability. SD values lower than one are acceptable as stable reference genes (Pfaffl *et al.*, 2004). NormFinder directly estimates intra- and intergroup expression variation and a confidence interval to establish a stability value (SV) for a set of reference genes (Andersen *et al.*, 2004)). On the other hand, in comparative the  $\Delta$ Ct method, raw Ct values are the input data to calculate gene stability by pairwise comparisons (Silver *et al.*, 2006). The stability of each reference gene in both methods is inversely proportional to its average standard deviation.

BestKeeper, presented the most divergent rank compared to other methods. This fact has been observed in several species and experimental conditions, including abiotic stresses (Wang *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014; Kiarash *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2017a; Zhang *et al.*, 2020). As can be seen in this work, the method and the algorithm of choice greatly influence the selection of reference genes (Kozera and Rapacz, 2013). Therefore, it is important to evaluate the gene stability employing different methods, tissues, and experimental conditions before initiating the quantitative expression measurements.

The RefFinder web-tool gives a different weight to each of the four method cited above, ( $\Delta$ CT, BestKeeper, NormFinder, and geNorm), to calculate the geometric mean and to establish a comprehensive rank for gene stability (Xie *et al.*, 2012). In our work, RefFinder ranked *eIF4a* gene as the most stable gene in shoots and roots followed by  $\alpha$ -*TUB5* and *ACT 12* in shoot, roots, respectively as second place and *UbiCo* ranked third for stability in both tissues (Fig. 3). The least stable genes ranked by RefFinder were  $\beta$ -*TUB6* and *GAPDH* in shoots and roots, respectively (Fig. 3). The *eIF4a* proteins belong to the DEAD-box RNA helicase family and are involved in the initiation of translation of many eukaryotic mRNAs (Bush *et al.*, 2016). Similar to our results was found in the halophyte species, *Sesuvium portulacastrum* under salt stress, where *eIF4A* and  $\alpha$ -*TUB* genes were classified as the most stable in shoots and ubiquitin-conjugating enzyme E2 gene in roots (Nikalje *et al.*, 2018). The *eIF4a* gene was also reported as the most stable in leaves of annual Ryegrass (*Lolium multiflorum*) submitted to salt stress (Wang *et al.*, 2015). On the other hand, in rice leaves (*Oryza sativa* L.) under salt *eIF4a* was one

of the least stable genes (Moraes *et al.*, 2015). In our work, the second place on ranking stability were  $\alpha$ -*TUB5* and *ACT12* in shoot and roots, respectively (Fig. 3). These genes also were found to be stable to normalization in other species under salts stress such as in garlic clove (*Allium sativum*) (Wang *et al.*, 2019). Actin was one of the most stable reference genes for salt stress treatment in *Betula platyphylla*, a hardwood species (Li *et al.*, 2019).

The least stable genes ranked by RefFinder were  $\beta$ -*TUB6* and *GAPDH* in shoots and roots, respectively (Fig. 3). Under salt stress, identical results were observed in *Sesuvium portulacastrum* where these two genes were ranked at the worst for normalization (Nikalje *et al.*, 2018). *GAPDH* was also the least stable candidate reference gene in different abiotic stresses in *Betula platyphylla* (Li *et al.*, 2019), in *Allium sativum* (Wang *et al.*, 2019) and in *Avena sativa* under salt stress (Duan *et al.*, 2020). On the other hand, the *GAPDH* was considered the most stable reference genes in *Triticum durum* (Kiarash *et al.*, 2018) and in *Saccharum spp.* (Guo *et al.*, 2014) under salt stress. The stability of the *GAPDH* as a reference gene has been very variable from the most to the least stable gene depending on the species, experimental condition and tissue (Kozera and Rapacz, 2013). The *EF1- $\alpha$*  gene was among the least stable gene for both tissue (Fig. 3) as well as in annual Ryegrass (*Lolium multiflorum*) (Wang *et al.*, 2015). However, for other species under salt stress it has been classified as one of the most stable gene as in *Cucumis sativus* (Migocka and Papierniak, 2011), in the halophyte species *Salicornia europaea* (Xiao *et al.*, 2015), in *Pennisetum glaucum* L. (Shivhare and Lata, 2016) and in *Avena sativa* (Duan *et al.*, 2020).

As we can note from above, gene's stability under salt stress is very variable. Different experimental conditions can affect genes stability such as plant species, salt concentration, stress duration, tissue, age etc. Moreover, in general, reference genes belong to multi-gene family with different isoforms, therefore the stability could be variable (Xiao *et al.*, 2015). Thus, the value of each gene, as a normalizer must be assess case-by-case. Due to all multiple factors that can interfere in the gene stability, the validation of reference gene's stability under specific experimental conditions is necessary to use them as normalizers. In our work, to validate the most stable reference genes selected by RefFinder, we assessed the relative expression of a gene encoding a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter protein (*NHX*) in shoots and roots of *U. brizantha* plants under salt stress. Antiporter's *NHX* genes are

responsible for maintaining sodium/potassium homeostasis during salt stress by exchanging either  $\text{Na}^+$  or  $\text{K}^+$  for  $\text{H}^+$  and influencing the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio (Van Zelm *et al.*, 2020). These genes are localized in the tonoplast and its accumulation influences sodium sequestration in the vacuole (Van Zelm *et al.*, 2020). This gene also mediates the  $\text{K}^+$  retention in the cytosol and the vacuole of root cells, acting together with other regulatory mechanisms to provide an ionic balance among intracellular cell compartments (Liu *et al.*, 2017).

To increase the accuracy of relative gene expression, the employment of at least two different reference genes should be preferred (Nicot *et al.*, 2005). However, if a single reference gene proves to be stable in previously similar experimental conditions it could also be suitable for normalization (Thellin *et al.*, 1999). The expression pattern of the *NHX* gene in *U. brizantha* under salt stress was very similar when normalized with the first, the second and or with the geometric means of the two most stable genes in shoots and roots (Fig. 4).

It has been reported that the relative expression of *NHX1* genes in glycophytes and halophytes plants is higher in shoots than in roots (Nawaz *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017b), similarly to the results observed in our experiment. Halophytes plants present a stronger expression of *NHX1* and other genes related to salt tolerance than glycophytes (Nawaz *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017b). In the halophytic species, *Rhizophora apiculata*, the expression of *NHX* gene was significantly up-regulated in plants under salt stress with an expression peak at 12 h (Saddhe *et al.*, 2018). Although the *Urochloa* spp. are classified as glycophytes, the studies on gene expression related to salt stress could be a useful strategy to select genotypes more adapted to the salt flats commonly found in low annual rainfall (500–800 mm) areas of the northeast region of Brazil.

#### 4.5 Conclusion

Among the seven genes assayed for quantitative analyses of gene expression by RT-qPCR in *U. brizantha* plants under salt stress conditions, the comprehensive ranking by RefFinder indicated that *eIF4a*,  *$\alpha$ -TUB5*, and *UbiCo* were the most suitable reference genes for shoots samples, while *eIF4a*, *ACT12*, and *UbiCo* were the most stable genes in roots. To ensure the reliability of the results, we selected the gene encoding the *UbNHX* protein, regarded as a key player in the



sequestration of sodium ( $\text{Na}^+$ ) into vacuoles to avert ion toxicity in the cytosol of plants under salinity stress, as the target gene. The *UbNHX* relative gene expression against the most stable genes in shoots and roots samples demonstrated consistent results, which will facilitate future elucidation of gene regulation under salinity conditions in this species. Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2021.100319>.

### **Author's contribution**

A.F.R. proposed and planned the experiments; F.L.B.S and V.C accomplished stress experiments at the greenhouse and evaluated the data; F.L.B.S and M.V.O.F supported the RT-qPCR assays. A.F.R, F.L.B.S and T.B.S wrote the manuscript; V.C and L.G.E.V critically reviewed the manuscript. All authors agree with manuscript submission.

### **Declaration of Competing Interest**

The authors declare no conflict of interest.

### **Acknowledgments**

“This study was supported by Grant n° 2013/04819-4 São Paulo Research Foundation (FAPESP). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001”.

### **References**

- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Ørntoft, T.F., 2004. 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 Res.* 64 (15), 5245–5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>.
- Arif, Y., Singh, P., Siddiqui, H., Bajguz, A., Hayat, S., 2020. Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: an omic approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* 156, 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.042>.

Behera, L.M., Hembram, P., 2020. Advances on plant salinity stress responses in the post-genomic era: a review. *J. Crop. Sci. Biotechnol.* 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12892-020-00072-3>.

Bush, S. M., Pierrat, O., Nibau, C., Mikitova, V., Zheng, T., F, M. K., Vlachonasios, K., Mayberry, L. K., Browning, K. S., Doonan, J. H, 2016. eIF4A RNA helicase associates with Cyclin-dependent protein kinase A in proliferating cells and is modulated by phosphorylation. *Plant Physiol.* 172 (1), 128–140. doi:<https://doi.org/10.1104/pp.16.00435>.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Vandesompele, J., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55 (4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

Costa, D.F.S., 2010. Análise fitoecológica do manguezal e ocupação das margens do estuário hipersalino. Mossoró (RN, Brasil). Master thesis, Natal. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, p. 75.

Derveaux, S., Vandesompele, J., Hellems, J., 2010. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods.* 50 (4), 227–230. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.11.001>.

Duan, Z.L., Han, W.H., Yan, L., Wu, B., 2020. Reference gene selections for real time quantitative PCR analysis of gene expression in different oat tissues and under salt stress. *Biologia Platarum* 64, 838–844. <https://doi.org/10.32615/bp.2020.153>.

EMBRAPA. Technological Solutions, 2017. *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. <https://www.embrapa.br/en/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/863/brachiaria-brizanthacv-marandu>. Accessed in 08/12/ 20.

Goodstein Shu S., DM., Howson R., Neupane R., Hayes RD., Fazo J., Mitros T., Dirks W., Hellsten, U., Putnam, N., Rokhsar, DS., 2012. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* D1178–D1186. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>. Epub 2011 Nov 22. PMID: 22110026; PMCID: PMC3245001.

Guenin, S., Mauriat, M., Pelloux, J., Van Wuytswinkel, O., Bellini, C., Gutierrez, L., 2009. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *J. Exp. Bot.* 60 (2), 487–493. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern305>.

Guo, J., Ling, H., Wu, Q., Xu, L., Que, Y., 2014. The choice of reference genes for assessing gene expression in sugarcane under salinity and drought stresses. *Sci. Rep.* 13 (4), 7042. <https://doi.org/10.1038/srep07042>.

Hanley, S.J., Pellny, T.K., de Vega, J.J., Castiblanco, V., Arango, J., Eastmond, P.J., Heslop-Harrison, J.S., 2020. Allele mining in diverse accessions of *Urochloa* and *Megathyrsus* spp. tropical grasses to improve forage quality and reduce environmental impact. *bioRxiv.* <https://doi.org/10.1101/2020.12.09.418087>, 2020.12.09.418087.

- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California agricultural experiment station 347 (2nd edit).
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A., 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes & Immunity*. 6 (4), 279–284. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>.
- Isayenkov, S.V., Maathuis, F.J., 2019. Plant salinity stress: many unanswered questions remain. *Front. Plant Sci.* 10, 80. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>.
- Jiang, Q., Wang, F., Li, M.Y., Ma, J., Tan, G.F., Xiong, A.S., 2014. Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses in *Oenanthе javanica* (Bl.) DC. *PLoS one* 9 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092262> e92262.
- Joseph, J.T., Poolakkalody, N.J., Shah, J.M., 2018. Plant reference genes for development and stress response studies. *J. Biosci.* 43 (1), 173–187. <https://doi.org/10.1007/s12038-017-9728-z>.
- Kiarash, J.G., Wilde, H.D., Amirmahani, F., Moemeni, M., Zaboli, M., Nazari, M., Moosavi, S.S., Jamalvandi, M., 2018. Selection and validation of reference genes for normalization of qRT-PCR gene expression in wheat (*Triticum durum* L.) under drought and salt stresses. *J. Genet.* 97 (5), 1433–1444. <https://doi.org/10.1007/s12041-018-1042-5>.
- Koehler, A.D., Irsigler, A.S.T., Carneiro, V.T.C., Cabral, G.B., Rodrigues, J.C.M., Gomes, A.C.M.M., Togawa, R.C., Costa, M.M.C., Martinelli, A.P., Dusi, M.A.D., 2020. SERK genes identification and expression analysis during somatic embryogenesis and sporogenesis of sexual and apomictic *Brachiaria brizantha* (Syn. *Urochloa brizantha*). *Planta* 252, 39. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03443-w>.
- Kozera, B., Rapacz, M., 2013. Reference genes in real-time PCR. *J. Appl. Genet.* 54 (4), 391–406. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>.
- Kumar, J., Singh, S., Singh, M., Srivastava, P.K., Mishra, R.K., Singh, V.P., Prasad, S.M., 2017. Transcriptional regulation of salinity stress in plants: A short review. *Plant Gene.* 11, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.04.001>.
- Li, Z., Lu, H., He, Z., Wang, C., Wang, Y., Ji, X., 2019. Selection of appropriate reference genes for quantitative real-time reverse transcription PCR in *Betula platyphylla* under salt and osmotic stress conditions. *PLoS ONE* 14, 12 e0225926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225926>.
- Liu, X., Cai, S., Wang, G., Wang, F., Dong, F., Mak, M., Shabala, S., 2017. Halophytic NHXs confer salt tolerance by altering cytosolic and vacuolar K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> in Arabidopsis root cell. *Plant Growth Regul.* 82 (2), 333–351. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0262-7>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. *Methods.* 25 (4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

- Migocka, M., Papierniak, A., 2011. Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. *Mol. Breed.* 28, 343–357. <https://doi.org/10.1007/s11032-010-94870>.
- Moraes, G.P., Benitez, L.C., do Amaral, M. N., Vighi, I. L., Auler, P. A., da Maia, L. C., Bianchi, V. J., & Braga, E. J. B., 2015. Evaluation of reference genes for RT-qPCR studies in the leaves of rice seedlings under salt stress. *Genet. Mol. Res.* 14 (1), 2384–2398. <https://doi.org/10.4238/2015.March.27.24>.
- Munns, R., Gilliam, M., 2015. Salinity tolerance of crops—what is the cost? *New Phytol.* 208 (3), 668–673. <https://doi.org/10.1111/nph.13519>.
- Nawaz, I., Iqbal, M., Hakvoort, H.W., Bliet, M., de Boer, B., Schat, H., 2014. Expression levels and promoter activities of candidate salt tolerance genes in halophytic and glycophytic Brassicaceae. *Environ. Exp. Bot.* 99, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.10.006>.
- Nicot, N., Hausman, J.F., Hoffmann, L., Evers, D., 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 56 (421), 2907–2914. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri285>.
- Nikalje, G.C., Srivastava, A.K., Sablok, G., Pandey, G.K., Nikam, T.D., Suprasanna, P., 2018. Identification and validation of reference genes for quantitative real-time PCR under salt stress in a halophyte, *Sesuvium portulacastrum*. *Plant Gene.* 13, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.11.003>.
- Pessoa-Filho, M., Martins, A.M., Ferreira, M.E., 2017. Molecular dating of phylogenetic divergence between *Urochloa* species based on complete chloroplast genomes. *BMC Genomics* 18 (1), 516. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3904-2>.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper—excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26 (6), 509–515. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47>.
- Pombo, M.A., Zheng, Y., Fei, Z., Martin, G.B., Rosli, H.G., 2017. Use of RNA-seq data to identify and validate RT-qPCR reference genes for studying the tomato-pseudomonas pathosystem. *Sci. Rep.* 7, 44905. <https://doi.org/10.1038/srep44905>.
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H.L., Moorman, A.F., 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* 339 (1), 62–66. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01423-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01423-4).
- Saddhe, A.A., Malvankar, M.R., Kumar, K., 2018. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in halophytic plant *Rhizophora apiculata*. *PeerJ.* 6, e5226 <https://doi.org/10.7717/peerj.5226>.
- Santos, Y.D., Pereira, W.A., de Paula, C.M.P., Rumel, G.C., Lima, A.A., ChalfunJunior, A., Sobrinho, F.S., Techio, V.H., 2020. Epigenetic Marks associated to the study of Nucleolar dominance in *Urochloa* P. Beauv. *Plant Molecular Biology Reports.* 38, 380–393. <https://doi.org/10.1007/s11105-020-01203-4>.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nat. Protoc.* 6, 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.

- Shivhare, R., Lata, C., 2016. Selection of suitable reference genes for assessing gene expression in pearl millet under different abiotic stresses and their combinations. *Sci. Rep.* 6, 23036. <https://doi.org/10.1038/srep23036>.
- Silva, P.I.T., Martins, A.M., Gouvea, E.G., Pessoa-Filho, M., Ferreira, M.E., 2013. Development and validation of microsatellite markers for *Brachiaria ruziziensis* obtained by partial genome assembly of Illumina single-end reads. *BMC Genomics* 14, 17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-17>.
- Silveira, E.D., Alves-Ferreira, M., Guimarães, L.A., da Silva, F.R., de Campos Carneiro, V. T., 2009. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual grass *Brachiaria brizantha*. *BMC Plant Biol.* 9 (1), 84. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-84>.
- Silveira, E.D., Guimarães, L.A., de Alencar Dusi, D.M., Silva, F.R., Martins, N.F., Costa, M. M.C., Alves-Ferreira, M., Carneiro, V.T.C., 2012. 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 Rep.* 31, 403–416. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1175-y>.
- Silver, N., Best, S., Jiang, J., Thein, S.L., 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* 7 (1), 33. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-33>.
- Soreng, R.J., Peterson, P.M., Romaschenko, K., Davidse, G., Teisher, J.K., Clark, L.G., Zuloaga, F.O., 2017. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) II: an update and a comparison of two 2015 classifications. *J. Syst. Evol.* 55 (4), 259–290. <https://doi.org/10.1111/jse.12262>.
- Takamori, L.M., Pereira, A.V.C., Souza, G.M., Vieira, L.G.E., Ribas, A.F., 2017. Identification of endogenous reference genes for RT-qPCR expression analysis in *Urochloa brizantha* under abiotic stresses. *Sci. Rep.* 7 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09156-7>.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Heinen, E., 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.* 75 (2–3), 291–295. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00163-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00163-7).
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A., 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research* 35 (suppl\_2), W71–W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>.
- Van Zelm, E., Zhang, Y., Testerink, C., 2020. Salt tolerance mechanisms of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 71, 403–433. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100005>.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3 (7). <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034> research0034–1.
- Vigna, B.B., de Oliveira, F.A., de Toledo-Silva, G., da Silva, C.C., do Valle, C.B., de Souza, A.P., 2016. Leaf transcriptome of two highly divergent genotypes of *Urochloa*

*humidicola* (Poaceae), a tropical polyploid forage grass adapted to acidic soils and temporary flooding areas. *BMC Genomics* 17 (1), 910. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3270-5>.

Wan, H., Zhao, Z., Qian, C., Sui, Y., Malik, A.A., Chen, J., 2010. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. *Anal. Biochem.* 399, 257–261. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.12.008>.

Wang, M., Wang, Q., Zhang, B., 2013. Evaluation and selection of reliable reference genes for gene expression under abiotic stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Gene* 530 (1), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.07.084>.

Wang, X., Ma, X., Huang, L., Zhang, X., 2015. Identification of the valid reference genes for quantitative RT-PCR in annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) under salt stress. *Molecules*. 20, 4833–4847. <https://doi.org/10.3390/molecules20034833>.

Wang, G., Tian, C., Wang, Y., Wan, F., Hu, L., Xiong, A., Tian, J., 2019. Selection of reliable reference genes for quantitative RT-PCR in garlic under salt stress. *PeerJ* 7, e7319. <https://doi.org/10.7717/peerj.7319>.

Wong, M.L., Medrano, J.F., 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 39 (1), 75–85. <https://doi.org/10.2144/05391RV01>.

Worthington, M., Perez, J.G., Mussurova, S., Silva-Cordoba, A., Castiblanco, V., Arango, J.A.C., Jones, C., Fernandez-Fuentes, N., Skot, L., Dyer, S., Tohme, J., Di Palma, F., Arango, J., Armstead, I., De Vega, J.J., 2021. A new genome allows the identification of genes associated with natural variation in aluminium tolerance in *Brachiaria* grasses. *J. Exp. Bot.* 72 (2), 302–319. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa469>.

Xiao, X., Wu, X., Ma, J., Li, P., Li, T., Yao, Y., 2015. Systematic assessment of reference genes for RT-qPCR across plant species under salt stress and drought stress. *Acta Physiol. Plant.* 37, 186. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1922-8>.

Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., Zhang, B., 2012. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol. Biol.* 80 (1), 75–84. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2>.

Yang, Z., Wang, K., Aziz, U., Zhao, C., Zhang, M., 2020. Evaluation of duplicated reference genes for quantitative real-time PCR analysis in genome unknown hexaploid oat (*Avena sativa* L.). *Plant Methods* 16 (1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00679-1>.

Zhang, Q., Dai, W., 2019. Plant response to salinity stress. In: Dai, W. (Ed.), *Stress Physiology of Woody Plants*. CRC Press, Boca Raton, pp. 155–173.

Zhang, Y., Han, X., Chen, S., Zheng, L., He, X., Liu, M., Qiao, G., Wang, Y., Zhuo, R., 2017a. Selection of suitable reference genes for quantitative real-time PCR gene expression analysis in *Salix matsudana* under different abiotic stresses. *Sci. Rep.* 7, 40290. <https://doi.org/10.1038/srep40290>.

Zhang, W.D., Wang, P., Bao, Z., Ma, Q., Duan, L.J., Bao, A.K., Wang, S.M., 2017b. SOS1, HKT1; 5, and NHX1 synergistically modulate Na<sup>+</sup> homeostasis in the

halophytic grass *Puccinellia tenuiflora*. *Front. Plant Sci.* 8, 576.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00576>.

Zhang, Z., Li, C., Zhang, J., Chen, F., Gong, Y., Li, Y., Su, Y., Wei, Y., Zhao, Y., 2020. Selection of the Reference Gene for Expression Normalization in *Papaver somniferum* L. under Abiotic Stress and Hormone Treatment. *Genes* 11, 124.  
<https://doi.org/10.3390/genes11020124>.

Zia, M., Hansen, J., Hjort, Kim., & Valdes., 2019. Brazil Once Again Becomes the World's Largest Beef Exporter. Available in: <https://www.ers.usda.gov/amber-waves/2019/july/brazil-once-again-becomes-the-world-s-largest-beef-exporter>.

Table 1 Description of the reference genes evaluated for stability in *U. brizantha* plants under salt stress.

Gene	GeneBank Accession number	Forward/reverse primers (5' – 3')	Amplicon (bp)
<i>ACT12</i> Actin 12	JG436709.1	GGGTGGAGAGAGATTGCAGGTTA GGGAACTGAGGCAACCACAGA	85 <sup>a</sup>
<i>eIF4a</i> eukaryotic initiation factor 4A	EZ000622	CAGGTGTCCCTGGTCATCAACTAT GAAACGACCTCTACGACCAATGC	81 <sup>a</sup>
<i>EF1-α</i> elongation factor 1-alpha	EZ000623	CAAGGCTGCTGCCAAGAAGA CTGCAAGAACCAGCCTTGAACA	111 <sup>a</sup>
<i>α-TUB5</i> Tubulin alpha-5	GE617477	CGTGTGCATGATCAGCAACA GCGCTTGGCGTACATCAGAT	85 <sup>a</sup>
<i>β-TUB6</i> Tubulin beta-6	JG436975.1	GTACCAGGACGCAACTGCTGAT GAAATCTGCCTGCCCTAGAAGCT	119 <sup>a</sup>
<i>UbiCo</i> Ubiquitin- conjugating enzyme	GE617481.1	CATCTGCTCCCTGCTGACTGA GCCGGTCCGTCTTGTACATATG	80 <sup>a</sup>
<i>GAPDH</i> Glucose-6- phosphate dehydrogenase	GE617483	TGAATCTAGTCCATCCGCTTG TCATCAGGCAGGGAAGCTA	124 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Takamori *et al.* (2017).

<sup>b</sup> Silveira *et al.* (2009).



Table 2 Classification of candidate reference genes in shoots and roots of *U. brizantha* under salt stress according to stability values.

Genes	RefFinder		ΔCT		BestKeeper		Normfinder		Genorm	
	Ranking order	Geomean of ranking values	Ranking order	Average of standard deviation (STDEV)	Ranking order	Standard deviation [+/- CP]	Ranking order	Stability value	Ranking order	Stability value (M)
<b>Shoots</b>										
<i>eIF4a</i>	1	1.73	1	1.39	3	0.98	1	0.598	2	0.974
<i>α-TUB5</i>	2	2.38	2	1.51	2	0.82	2	0.848	3	1.131
<i>UbiCo</i>	3	2.94	3	1.63	5	1.09	5	1.265	1	0.735
<i>GAPDH</i>	4	3.08	4	1.67	1	0.8	3	1.15	5	1.49
<i>ACT 12</i>	5	3.13	5	1.69	4	1.07	6	1.283	1	0.735
<i>EF1-α</i>	6	5.18	6	1.71	6	1.34	4	1.218	4	1.374
<i>β-TUB6</i>	7	7.0	7	2.15	7	1.44	7	1.906	6	1.68
<b>Roots</b>										
<i>eIF4a</i>	1	1.41	2	1.35	1	0.93	2	0.722	1	0.664
<i>ACT 12</i>	2	1.73	1	1.25	3	1.16	1	0.325	2	0.746
<i>UbiCo</i>	3	2.06	3	1.36	2	1.04	3	0.775	1	0.664
<i>α-TUB5</i>	4	4.23	4	1.56	4	1.34	4	1.013	4	1.121
<i>EF1-α</i>	5	4.95	5	1.66	6	1.68	5	1.308	3	0.944
<i>β-TUB6</i>	6	6.24	6	2.0	7	1.76	6	1.688	5	1.417
<i>GAPDH</i>	7	6.44	7	2.09	5	1.43	7	1.808	6	1.61

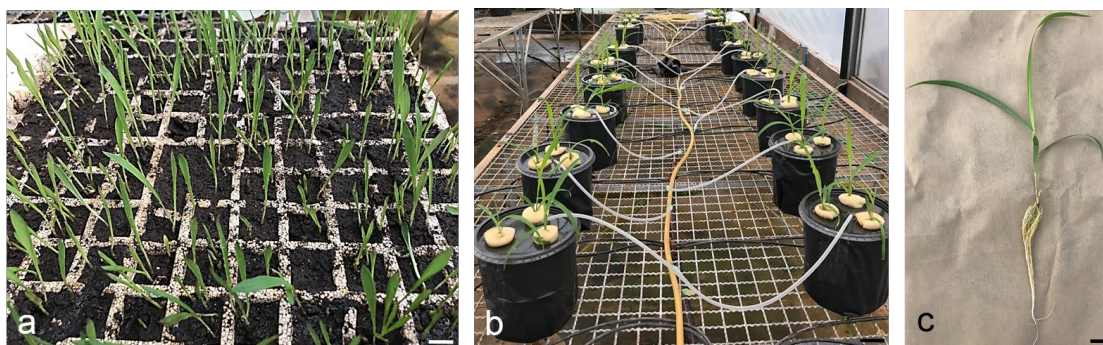


Fig. 1. Salt stress experiment in the greenhouse. (A) *U. brizantha* seeds germinated in commercial substrate and daily irrigated with tap water. (B) Plants transferred to the hydroponic system with  $\frac{1}{2}$  Hoagland's nutrient solution and constant aeration (C) Plant for sampling. Scale bars: A = 2 cm, B = 3 cm and C = 1 cm, respectively.

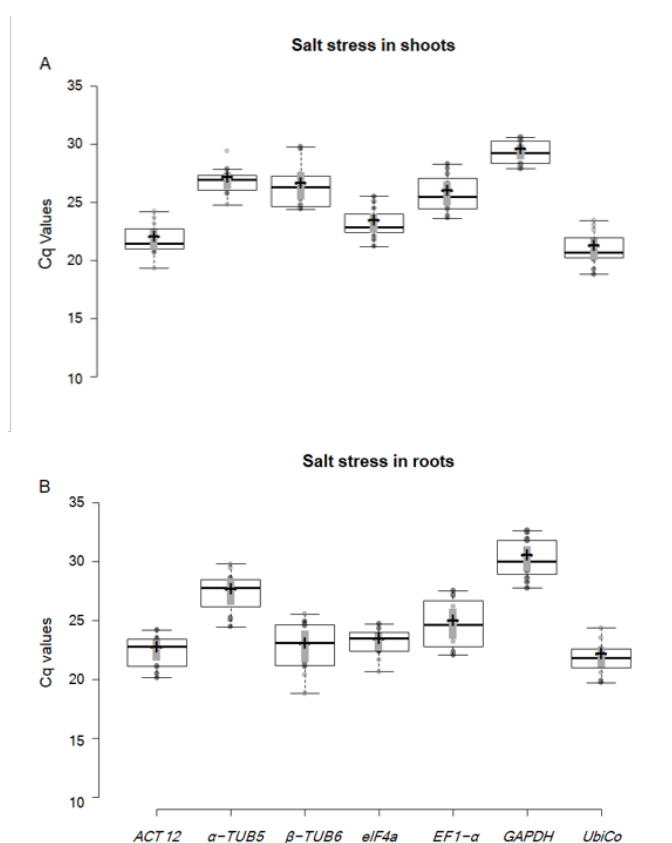


Fig. 2. Cq average of all treatments (0, 6, 12 and 24 h) in shoots or roots of *U. brizantha* plants under salt stress. The Boxplot graph shows the median values as lines in the boxes and bars show the upper and lower limits. Box limits indicate the 25th and 75th percentiles as determined by R software. Whiskers extend 1.5 times the interquartile range from the 25th and 75th percentiles, outliers are represented by dots; crosses represent sample means; bars indicate 95% confidence intervals of the means; width of the boxes is proportional to the square root of the sample size; data points are plotted as open circles.  $n = 12$  sample points. The graph was generated by the BoxPlotR: a web-tool available on: <http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/>

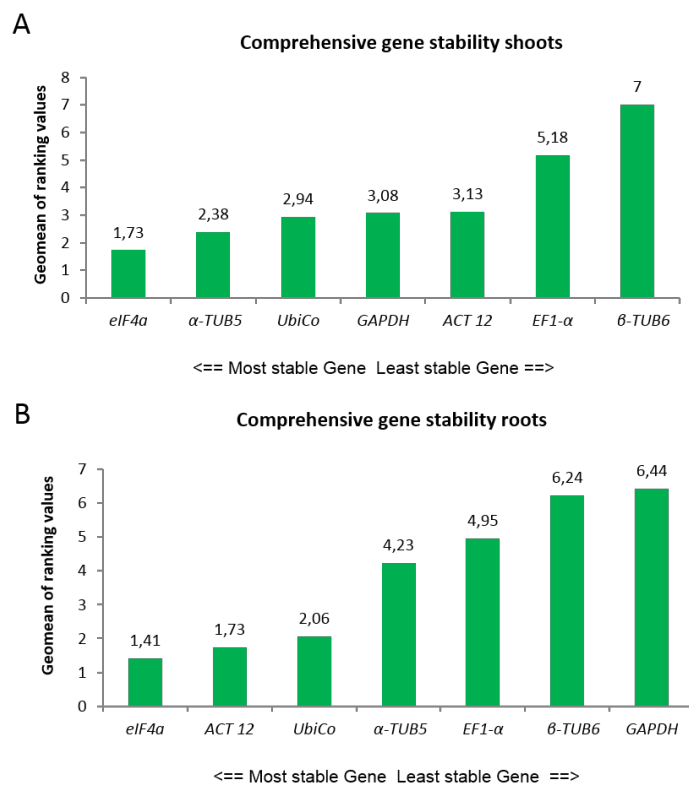


Fig. 3. Comprehensive rank of gene stability calculated by RefFinder web-tool. Shoots (A) and roots (B).

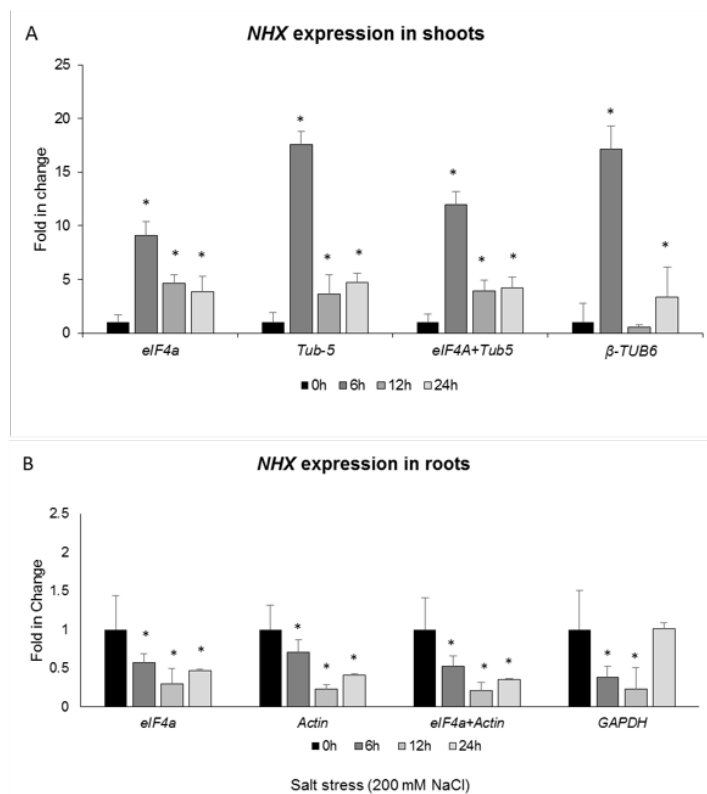


Fig. 4. Relative expression of NHX gene in shoots (A) and roots (B) of *U. brizantha* under salt stress. Statistical analysis was performed by t-test (\*  $p < 0.05$ ) between means of the treatment without NaCl (0 h) and hours after NaCl addition for the most and the least stable reference genes selected by RefFinder. Bars represent the means and standard errors of three biological replicates each one was technical replicates twice.

## ANEXO - NORMAS DA PUBLICAÇÃO

### GUIDE FOR AUTHORS

#### *Your Paper Your Way*

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

*Plant Gene* publishes papers that focus on the **regulation, expression, function and evolution of genes** in plants, algae and other photosynthesizing organisms (e.g., cyanobacteria), and plant-associated microorganisms.

*Plant Gene* strives to be a diverse plant journal and topics in multiple fields will be considered for publication. Although not limited to the following, some general topics include: Gene discovery and characterization Gene regulation in response to environmental stress (e.g., salinity, drought, etc.) Genetic effects of transposable elements Genetic control of secondary metabolic pathways and metabolic enzymes. Herbal Medicine - regulation and medicinal properties of plant products. Plant hormonal signaling. Plant evolutionary genetics, molecular evolution, population genetics, and phylogenetics. Profiling of plant gene expression and genetic variation Plant-microbe interactions (e.g., influence of endophytes on gene expression; horizontal gene transfer studies; etc.) Agricultural genetics - biotechnology and crop improvement

Plant Gene encourages submission of novel manuscripts that present a reasonable level of analysis, functional relevance and/or mechanistic insight. *Plant Gene* also welcomes papers that have predominantly a descriptive component but improve the essential basis of knowledge for subsequent functional studies, or provide important confirmation of recently published discoveries.

### *Types of article*

#### Full length articles

Organization should be Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, and References.

#### Minireviews

The journal encourages the submission of concise, highly focused review articles summarizing recent progress in very active areas of research involving the analysis of genetics.

**Short Communications** are brief papers that make a specific well-documented point. In general, a Communication should include no more than four figures and tables. The text will be continuous, with technical and methodological detail printed in the legend to the tables and figures.

Manuscripts that do not meet the general criteria or standards for publication in Plant Gene will be immediately returned to the authors, without detailed review.

#### *Contact details for submission*

Articles for Plant Gene should be submitted via the journal's online submission and editorial system at <https://www.editorialmanager.com/PLANTGENE/default.aspx>.

Customer support is available 24/7:

Please use our help site at: <https://service.elsevier.com>. Here you will be able to learn more about the online submission and editorial system via interactive tutorials, explore a range of problem solutions via our knowledgebase, and find answers to frequently asked questions. You will also find our 24/7 support contact details should you need any assistance from one of our customer service representatives.

For questions on the submission and reviewing process, please contact the Editorial Office at [atplantgene@elsevier.com](mailto:atplantgene@elsevier.com).

#### *Pre-Submission Enquiries*

Please note that we do not do pre-submission check of the manuscripts before they are submitted to the Editorial System. Please check if the content of the paper is

according to the Aims and Scope of the journal and submit the same in our Editorial System. We will review and will get back to you with the comments.

### *Submission checklist*

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

E-mail address

Full postal address

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

Include keywords

All figures (include relevant captions)

All tables (including titles, description, footnotes)

Ensure all figure and table citations in the text match the files provided

Indicate clearly if color should be used for any figures in print *Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable) *Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'

All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including theInternet)

A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare

Journal policies detailed in this guide have been reviewed

Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

### *Ethics in publishing*

Please see our information on Ethics in publishing.

### *Studies in humans and animals*

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms sex and gender should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

### *Informed consent and patient details*

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author but copies should not be provided to the journal. Only if specifically requested by the journal in exceptional circumstances (for example if a legal issue arises) the author must provide copies of the consents or evidence that such consents have been obtained. For more information, please review the Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.



### *Declaration of interest*

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

### *Submission declaration and verification*

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright- holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossrefSimilarity Check.

### *Preprints*

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

### *Use of inclusive language*

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as

"primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

### *Author contributions*

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example

### *Changes to authorship*

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### *Article transfer service*

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

### *Copyright*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is

required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

### ***Author rights***

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

#### *Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

#### *Role of the funding source*

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

#### *Open access*

Please visit our Open Access page for more information.

#### *Elsevier Researcher Academy*

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

#### *Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's Author Services.

### *Submission*

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

### *Submit your article*

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/PLANTGENE/default.aspx>.

### *Suggesting reviewers*

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential reviewers.

You should not suggest reviewers who are colleagues, or who have co-authored or collaborated with you during the last three years. Editors do not invite reviewers who have potential competing interests with the authors. Further, in order to provide a broad and balanced assessment of the work, and ensure scientific rigor, please suggest diverse candidate reviewers who are located in different countries/ regions from the author group. Also consider other diversity attributes e.g. gender, race and ethnicity, career stage, etc. Finally, you should not include existing members of the journal's editorial team, of whom the journal are already aware.

Note: the editor decides whether or not to invite your suggested reviewers.

### *Additional information*

#### PREPARATION

#### *Queries*

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our Support Center.

#### *Peer review*

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's

usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. More information on types of peer review.

### *Article structure*

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

#### *Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2),

etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

#### *Essential title page information*

**Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

**Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

**Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

**Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### *Highlights*

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: example Highlights.

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

#### *Abstract*

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### *Keywords*

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### *Abbreviations*

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### *Acknowledgements*

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### *Formatting of funding sources*

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### *Units*

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### *Footnotes*

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### *Artwork*

#### *Image manipulation*

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

#### *Electronic artwork* *General points*

Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

Embed the used fonts if the application provides that option.

Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.

Number the illustrations according to their sequence in the text.

Use a logical naming convention for your artwork files.

Provide captions to illustrations separately.

Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.

Submit each illustration as a separate file.

Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.



Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;

Supply files that are too low in resolution;

Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites). Further information on the preparation of electronic artwork.

#### *Illustration services*

Elsevier's Author Services offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### *Tables*

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the

data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

## *References*

### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

*Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;

*Two authors:* both authors' names and the year of publication;

*Three or more authors:* first author's name followed by '*et al.*' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999)... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer *et al.* (2010) have recently shown ...'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*.19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S., 2020. Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

#### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

#### *Video*

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide

text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### *Data visualization*

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

### *Supplementary material*

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

### *Research data*

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

### *Data linking*

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

### *Mendeley Data*

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

### *Data in Brief*

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all upon publication (watch this video describing the benefits of publishing your data in *Data in Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an open access fee is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your *Data in Brief* data article.

### *Data statement*

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

*Additional information*

## AFTER ACCEPTANCE

*Online proof correction*

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

*Offprints*

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

*Additional information*

## AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.