

SUPEREXPRESSÃO DO GENE PHOSPHORUS STARVATION TOLERANCE 1 DE ARROZ (OSPSTOL1) EM TABACO

Patrícia Lages Silva Palhares¹
Simara da Silva Lopes²
Ubiraci Gomes de Paula Lana³
Meire de Cassia Alves⁴

Jurandir Vieira Magalhães⁵
Cláudia Teixeira Guimarães⁶
Andrea Almeida Carneiro⁷
Sylvia Moraes de Sousa⁸

RESUMO

O fósforo (P) é um dos macronutrientes mais limitantes às culturas nos solos brasileiros e com menor eficiência de uso pelas plantas. O gene *PHOSPHORUS-STARVATION TOLERANCE 1 (PSTOL1)* é uma proteína quinase que quando superexpressa aumenta a superfície radicular, a aquisição de P e a produtividade de arroz sob baixo P. Com o objetivo de verificar o efeito do *PSTOL1* de arroz em dicotiledôneas, este gene foi clonado no vetor pMCG1005, tendo o gene *BAR* como marcador de seleção. As plantas de tabaco Petit Havana foram geneticamente transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* e regeneradas dos calos selecionados. Os fragmentos do gene *BAR* (~400 pb) e do gene

OsPSTOL1 (~700 pb) foram amplificados por PCR confirmando a integração de ambos os genes nas plantas transformadas. Diversas plantas apresentaram uma cópia do transgene e aquelas que também tiveram expressão gênica significativa foram selecionadas para os experimentos sob baixo P. A superexpressão do gene *OsPSTOL1* aumentou significativamente a área de superfície sob baixo P, indicando que esse gene age em tabaco de maneira similar ao que ocorre em arroz.

Palavras-chave: *Nicotiana tabacum*. Raiz. Eficiência.

¹Graduada em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Sete Lagoas. E-mail: patriciaapalhares@gmail.com | ²Doutoranda em Bioengenharia pela Universidade Federal de São João del-Rei. E-mail: simarabrazil@yahoo.com.br. | ³Químico, DSc., Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Professor do Centro Universitário de Sete Lagoas. E-mail: ubiraci.lana@embrapa.br. | ⁴Bióloga, Mestre, Analista da Embrapa Milho e Sorgo. Eng.-Agrôn., Ph.D. E-mail: meire.alves@embrapa.br. ⁵Pesquisador em Genética da Embrapa Milho. E-mail: jurandir.magalhaes@embrapa.br. | ⁶Eng.-Agrôn., Ph.D., Pesquisadora em Genética da Embrapa Milho. E-mail: claudia.guimaraes@embrapa.br. | ⁷Bióloga, Ph.D., Pesquisadora em Biologia Celular da Embrapa Milho e Sorgo. E-mail: andrea.carneiro@embrapa.br. ⁸Bióloga, DSc., Pesquisadora em Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo, Professora do Mestrado Profissional em Biotecnologia e Gestão da Inovação do Centro Universitário de Sete Lagoas e da pós-graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas, MG. E-mail: sylvia.sousa@embrapa.br

1 INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um dos nutrientes mais limitantes para o crescimento das plantas e é essencial para o seu metabolismo (VANACE *et al.*, 2003). A morfologia e arquitetura radiculares são aspectos importantes para aumentar a absorção de P. Um maior volume e área radicular, aumentam a superfície de contato entre a raiz e o P e também aumentam a capacidade de associação com microrganismos da rizosfera (LYNCH; BROWN, 2012).

Um dos QTLs (Locos de Caracteres Quantitativos) de maior efeito na aquisição de P é o *Pup1* (*Phosphorus Uptake 1*) que foi identificado em uma variedade tradicional de arroz, *Kasalath* (eficiente na aquisição de P), e que está ausente no genoma de referência *Nipponbare* (ineficiente) (WISSUWA *et al.*, 1998). Esse locus responde por cerca de 80% da variabilidade fenotípica para características relacionadas com absorção de P em arroz (WISSUWA *et al.* 2002), aumentando a produtividade de duas a quatro vezes sob condições de estresse P (CHIN *et al.* 2010). O genoma referência *Nipponbare* apresenta uma deleção de genoma de ~90 kilo pares de bases (Kpb) em relação a variedade *Kasalath* (HEUER *et al.*, 2009), que corresponde ao locus *Pup1*, onde se encontra a proteína do tipo serina/treonina quinase, chamada *PHOSPHORUS STARVATION TOLERANCE 1* (*OsPSTOL1*) (GAMUYAO *et al.*, 2012). A superexpressão constitutiva do *OsPSTOL1* feita em duas variedades de arroz mostra o aumento da superfície radicular, absorção de P e de produção de grãos em até 60% (GAMUYAO *et al.*, 2012). O *OsPSTOL1* é expresso nos primórdios das raízes da coroa e nas células do parênquima seguindo o padrão de outros genes envolvidos no desenvolvimento radicular. Esses dados indicam que, o gene *PSTOL1* está relacionado com controle do desenvolvimento precoce e do crescimento radicular em arroz (GAMUYAO

et al., 2012). Devido ao potencial de uso do *OsPSTOL1* como regulador na formação do sistema radicular o objetivo deste trabalho foi verificar se o gene *OsPSTOL1* é capaz de aumentar a superfície radicular em plantas transgênicas de tabaco.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A sequência BAK26566 foi utilizada como molde para a síntese do gene *OsPSTOL1* segundo o programa NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (GAMUYAO *et al.*, 2012). O gene *OsPSTOL1* foi clonado nos sítios *AvrII* e *SpeI* no vetor binário pMCG1005 pela empresa GenScript USA Inc. (<http://www.genscript.com>). O vetor pMCG1005 tem o promotor ubiquitina e o gene *BAR* como marcador de seleção sob o promotor 4x35S. A *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 (HOOD et al. 1986) contendo os cassetes de transformação 35S::*OsPSTOL1*::NOS e 35S::NOS (vetor vazio, controle) foi utilizada para transformação de plântulas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Petit Havana*), que foram selecionadas com o herbicida PPT (fosfotricina), subcultivadas a cada sete dias até ocorrer diferenciação para calos e posteriormente folhas. As plântulas enraizadas foram transferidas para solo em casa de vegetação. Uma nova seleção com herbicida PPT foi feita borrifando a solução nas folhas (LOPES, 2016).

A inserção dos cassetes de expressão nas plantas transgênicas de tabaco regeneradas foi feita por PCR e o DNA genômico extraído de acordo com Saghai-Marouf *et al.* (1984), utilizado um *primer* direto na região promotora da Ubiquitina (UBI_127_F: 5'GTGTTTAGCAAGGGC-GAAAA3') e um *primer* reverso na região codificadora do *OsPSTOL1* (p*OsPSTOL1*_580_R: 5'TCAGATGGCACAGTTTGCTC3'), que

gerou um fragmento de 707 pb e um par de primers para o gene *BAR* (*BAR_F1*: 5'AGAAACCCACGTCATGCC3' e *BAR_R1*: 5'GTGGT-TGACGATGGTGCA3'), que gerou um fragmento de 427 pb.

Foi extraído DNA genômico de folhas jovens de linhagens T0 de tabaco para estimar o número de cópias de acordo com Lopes(2016). Como referência de cópia única, foram usados os primers para o gene *AXII* (SUBR et al. 2006) e *BAR* (*BAR-F* 5'ACAGCGACCACGCTCTT-GA3' e *BAR-R5'*GCTCTACACCCACCTGCTGA3'). O evento cópia única foi a amostra ZmPSTOL1_8.02Ev.6 (LOPES, 2016).

As sementes dos eventos transgênicos de tabaco T1 foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 6% e germinadas em frascos com meio de cultura MS ½ força e polimerizado com ágar sob baixo P (Sigma, 97 µM de P) em câmara de crescimento com temperatura diurna média de 27 ± 3 °C, noturna de 20 ± 3 °C e fotoperíodo de 12 horas. Uma parte das plântulas foram coletadas após 57 dias para extração de RNA o kit Plant RNeasy (Qiagen). A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se 1 µg de RNA total, previamente tratados com DNase I, utilizando o kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription" (Applied Biosystems, CA). Posteriormente foi feita análises de PCR quantitativo (qPCR), realizadas no equipamento ABI7500 utilizando a metodologia SYBR Green. Foi utilizado um par de primers 18S ribossomal SYBR Green como controle endógeno e primers específicos para os genes *BAR* (*BAR-F*: ACAGC-GACCACGCTCTTGA e *BAR-R*: GCTCTACACCCACCTGCTGA) e *OsPSTOL1* (*OsPSTOL1-F*: GTTTGTGGTGCATACAAC-TCGT e *OsPSTOL1-R*: GGTTCCTCAAAAACAGAAGATG). A expressão gênica relativa foi calculada conforme o método 2-ΔΔCT (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A outra parte das plântulas foi crescida em placas de Petri (90 x 15mm) e o sistema radicular foi escaneado após 57 dias com o escâner Epson XL 10000 equipado com unidade de luz adicional (TPU) e os dados analisados com o software WinRhizo v. 4.0 (Regent Systems, Quebec, Canadá), sendo quantificado o comprimento

de radicular total e de raízes com 0-0,5 mm e maiores do que 0,5 mm de diâmetro (DE SOUSA et al., 2012).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

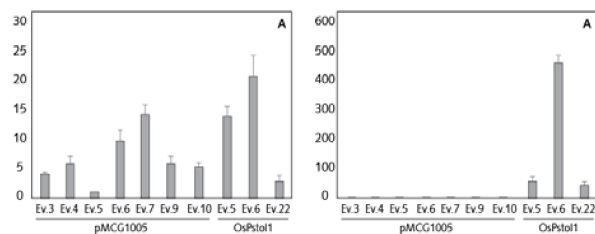
Foram obtidos quatorze eventos transgênicos para a construção com o vetor vazio (pMCG1005) e cinco eventos para a construção UBI::*OsPSTOL1*::NOS. Todas as plantas geradas e selecionadas com PPT apresentaram PCR positivo para a presença do gene, indicando que o método de seleção foi eficiente. Já para a presença do *OsPSTOL1* foram observadas cinco plantas positivas das quatorze plantas avaliadas. A inserção do gene *BAR*, mas não do gene *OsPSTOL1* pode ser explicada pela deleção do gene específico durante o processo de transformação (SHA et al., 2004). Esse evento é pouco frequente, uma vez que o gene específico foi clonado junto à borda direita do T-DNA e a amplificação de junções do T-DNA da borda direita tendem a permanecer sem deleções com localização de todos os sítios internos de clivagem (YANG et al., 2013). O número de cópias do transgene com base no gene *BAR* mostrou que dos sete eventos do pMCG1005 e dos cinco eventos do *OsPSTOL1*, apenas dois eventos, um do grupo controle (pMCG1005 Ev. 5) e outro do gene específico (*OsPSTOL1* Ev. 11), apresentaram mais de uma cópia.

A expressão do gene *BAR* foi variável entre eventos individuais e também entre as duas construções (Figura 1). Os três eventos *OsPSTOL1* apresentaram expressão do transgene, sendo que o evento 6, apresentou maior expressão. Os eventos controles (pMCG1005) não apresentaram expressão do gene *OsPSTOL*, como esperado. Os eventos pMCG1005 Ev. 4 e *OsPSTOL1* Ev. 6 apesar de apresentarem estimativa de número de cópias igual ou próximo de um, não apresentaram níveis de expressão semelhantes entre si ou entre eventos da mesma construção com estimativa de número de cópias inferior a um. Não

houve correlação entre os níveis de expressão dos genes e o número de cópias do gene *BAR*. A variação de expressão pode ter sido afetada pelo local de integração no genoma, o que pode acontecer tanto nas transformações via *Agrobacterium* quanto via biobalística (GARRIDO et al., 2004; JOYCE et al., 2014).

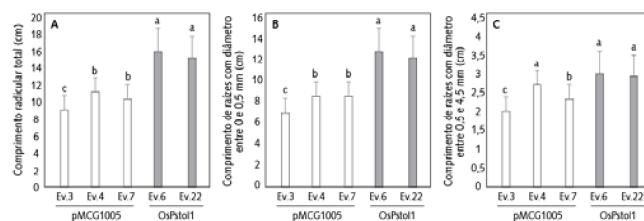
A caracterização morfológica das plantas superexpressando *OsPSTOL1* mostrou diferença significativa entre comprimento total e comprimento de raízes entre 0 e 0,5 mm entre os eventos controles (pMCG1005) e eventos *OsPSTOL1* e uma diferença menos consistente no comprimento de raízes maiores do que 0,5 mm (FIGURAS 2 e 3). Raízes finas foram observadas em maior quantidade nas placas com os eventos *OsPSTOL1*, com destaque o evento 6. Os resultados em tabaco corroboram o fenótipo observado nas plantas superexpressando o *OsPSTOL1* em arroz (GAMUYAO et al., 2012), sendo observado em ambos os casos um aumento do crescimento do comprimento radicular.

Figura 1 – Expressão relativa (RQ) do gene marcador de seleção *Bar* (A) e *OsPSTOL1* (B) em eventos transgênicos de tabaco. A expressão gênica relativa foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. As barras de erro correspondem a SEM de 3 repetições técnicas com 20 plântulas cada.



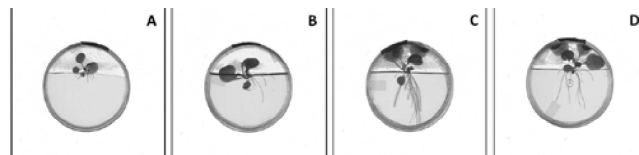
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 2 – Comprimento radicular total (A), de raízes com diâmetro em 0 e 0,5 mm (B) e maior do que 0,5 mm (C) (cm) de plântulas de tabaco transgênico crescidas em meio de cultura sob baixo P por 57 dias após a montagem dos experimentos. As barras de erro correspondem a SEM de seis repetições técnicas. As barras com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste t de Student (LSD) ($p < 0,05$).



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 3 – Plântulas de tabaco individuais crescidas em meio de cultura sob baixo P. A, B e C) pMCG1005 eventos 4 e 7, respectivamente. D, E e F) *OsPSTOL1* eventos 6 e 22, respectivamente.



Fonte: Dados da pesquisa.

4 CONCLUSÃO

Linhas transgênicas de tabaco cópia única superexpressando o gene OsPSTOL1 apresentaram um aumento no comprimento radicular e crescimento vegetativo.

REFERÊNCIAS

- CHIN J.H.; LU X.; HAEFELE S.M.; GAMUYAO R.; ISMAIL A.; WISSUWA M.; HEUER S. Development and application of gene-based markers for the major rice QTL *Phosphorus uptake 1*. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 120, p.1073–1086, 2010.
- DE SOUSA, S. M.; CLARK, R. T.; MENDES, F. F.; OLIVEIRA, A. C.; VASCONCELOS, M. J. V.; PARENTONI, S. N.; KOCHIAN, L. V.; GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V. A role for root morphology and related candidate genes in P acquisition efficiency in maize. *Functional Plant Biology*, Victoria, v. 39, p. 925–935, 2012.
- GAMUYAO, R.; CHIN, J. H.; TANAKA, J. P.; PESARESI, P.; CA-TAUSAN, S.; DALID, C.; LOEDIN, I. S.; MENDOZA, E. M. T.; WISSUWA, M.; HEUER, S. The protein kinase *Pstol1* from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. *Nature*, Washington, v. 488, p. 535–541, 2012.
- GARRIDO, H. S.; TRAVELLA, S.; BILHAM, L. J.; HARWOOD, W. A.; SNAPE, J. W. The distribution of transgene insertion sites in barley determined by physical and genetic mapping. *Genetics*, v. 167, p. 1371–1379, 2004.
- HEUER, S.; LU, X.; CHIN, J.H.; TANAKA, J.P.; KANAMORI, H.; MATSUMOTO, T.; DE LEON, T.; ULAT, V.J.; ISMAIL, A.M.; YANO, M.; WISSUWA, M. Comparative sequence analyses of the major quantitative trait locus phosphorus uptake 1 (Pup1) reveal a complex genetic structure. *Plant Biotechnology Journal*, v. 7, p. 456–471, 2009.
- HOOD, E. E.; HELMER, G. L.; FRALEY, R.T.; CHILTON, M. D. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *Journal of Bacteriology*, v.168, p.1291–130, 1986.
- JOYCE, P.; HERMANN, S.; O'CONNELL, A.; DINH, Q.; SHUMBE, L.; LAKSHMANAN, P. Field performance of transgenic sugarcane produced using *Agrobacterium* and biolistics methods. *Plant biotechnology journal*, v.12, p. 411–424, 2014.
- LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ Method. *Methods*, v. 25, p. 402–408, 2001.
- LOPES, S. S. Análise funcional do gene *pstol1* de arroz e de seus homólogos em milho e sorgo em plantas transgênicas de tabaco. Dissertação de Mestrado, UFSJ, São João del Rei, 2016.
- LYNCH, J. P.; BROWN, K. M. New roots for agriculture: exploiting the root phenome. *Philosophical Transaction*, London, v. 367, p.1598–1604, 2012.
- SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. A.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and popula-

tion dynamics. *National Academy of Sciences*, v.81, p.8014-8018, USA, 1984.

SHA, Y.; LI, S.; PEI, Z.; LUO, L.; TIAN, Y.; HE, C. Generation and flanking sequence analysis of a rice T-DNA tagged population. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 108, p. 306-314, 2004.

ŠUBR, Z.; NOVAKOVA, S.; DRAHOVSKÁ, H. Detection of transgene copy number by analysis of the T1 generation of tobacco plants with introduced P3 gene of potato virus A. *Acta virologica*, v. 50, p. 135-138, 2006.

VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a non-renewable resource. *New Phytologist*, Oxford, v. 157, p. 423-447, 2003.

WISSUWA, M.; YANO, M.; AE, N. Mapping of QTLs for phosphorus-deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, v. 97, p. 777-783, 1998.

WISSUWA, M.; WEGNER, J.; AE, N.; YANO, M. Substitution mapping of Pup1: a major QTL increasing phosphorus uptake of rice from a phosphorus-deficient soil. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 105, p. 890-897, 2002.

YANG, X.; LI, F.; ZHANG, X.; LIU, K.; WANG, Q.; ZHANG, J.; LIU, C.; ZHU, Z.; SHAN, G.; CHIN, C. K.; FANG, W. Integration and Characterization of T-DNA Insertion in Upland Cotton. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 49 (2), p. 51-57, 2013.