

# **Análise Funcional de Genes Relacionados à Morfologia Radicular de Milho e Sorgo em Plantas Transgênicas de Tabaco<sup>1</sup>**

Jessica Batista Torres de Araujo<sup>2</sup>, Simara da Silva Lopes<sup>3</sup>, Sylvia Morais de Sousa<sup>4</sup>

1 Trabalho financiado pelo CNPq/Fapemig

2 Estudante do Curso de Engenharia Agrônômica da Univ. Fed. de São João Del Rei, Bolsista PIBIC do Convênio Fapemig/CNPq/Embrapa/ FAPED

3 Estudante de mestrado em Bioengenharia pela Univ. Fed. de São João Del Rei

4 Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo

## **Introdução**

O milho e o sorgo são culturas extremamente importantes para a agricultura brasileira e têm um grande impacto na economia nacional. Dessa forma, o desenvolvimento de novas técnicas, produtos e serviços deve garantir ganhos de produtividade e reduzir o impacto ambiental visando à sustentabilidade da produção agrícola aliada à conservação do meio ambiente e dos recursos naturais (DUARTE et al., 2008). O milho e o sorgo têm uma grande eficiência na transformação da energia solar em energia química na forma de fotoassimilados e, conseqüentemente, têm grande potencial de produção. Em contrapartida, são culturas bastante exigentes e, para que atinjam o máximo do seu potencial, necessitam de condições favoráveis em todas as etapas de produção (DUARTE et al., 2008).

Os nutrientes são fatores limitantes para a produção de cereais, e o fósforo (P) é um dos macronutrientes mais importantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas, e o segundo mineral que mais limita a produção de grãos, depois do nitrogênio (ALVES, 2005). A deficiência de P nas plantas envolve uma miríade de respostas transcricionais, bioquímicas e fisiológicas que aumentam a habilidade da planta em adquirir P do solo e a eficiência com a qual a planta o utiliza internamente (LYNCH, 2007). Alterações morfológicas no sistema radicular aumentam a absorção de P com menor custo metabólico (LYNCH; BROWN, 2001; LYNCH, 2011). Um dos genes que modulam a morfologia radicular é o *Pstol 1* (*Phosphorus-starvationtolerance*), que codifica uma quinase, que quando superexpressa, aumenta o crescimento de raízes, a aquisição de P e a produtividade de grãos em arroz (GAMUYAO et al., 2012).

A Embrapa Milho e Sorgo tem projetos que visam a identificação de QTLs e genes que contribuam para o aumento de produção e maior estabilidade de produção em solos ácidos. Dentro desses projetos, foram identificados homólogos do *Pstol1* de arroz em milho (AZEVEDO, 2015) e sorgo (HUFNAGEL et al., 2014). As três proteínas

preditas de milho e as três de sorgo, com identidade superior a 70% com o *Pstol1* de arroz e que se colocaram com *clusters* de QTLs relacionados à morfologia radicular e eficiência na aquisição de P, foram selecionadas para serem estudadas. A colocalização com QTLs de morfologia radicular é uma importante evidência, uma vez que análises fenotípicas em solução nutritiva de linhagens semi-isogênicas de arroz, com e sem o gene *Pstol1*, demonstraram que sob tratamentos com baixo nível de P, o comprimento e a área de superfície radicular foram significativamente maiores nas plantas que carregavam o *Pstol1* (GAMUYAO et al., 2012). Portanto, o objetivo desse trabalho é verificar se os homólogos do *Pstol1* de arroz, milho e sorgo são capazes de aumentar a superfície radicular e, conseqüentemente, a eficiência na aquisição de P. Para tanto, esses genes foram superexpressos em tabaco, e esta superexpressão fornecerá informações relevantes sobre a potencialidade de aplicação da transgenia com base nos genes *Pstol1* para o aumento da aquisição de P em milho e em sorgo.

## **Material e Métodos**

### **Construção dos cassetes de expressão**

As regiões que codificam os genes *Pstol1* de arroz (pOsPST1), homólogos de milho (pZmPST1, pZmPST4 e pZmPST6) e homólogos de sorgo (pSbPST28, pSbPST31 e pSbPST67) foram sintetizadas e clonadas no vetor binário pMCG1005 pela empresa GenScript USA Inc.

### **Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com os genes candidatos**

Para a inserção do cassete de expressão na *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 foram descongeladas células eletrocompetentes e foi adicionado o vetor binário para a eletroporação. Posteriormente foi colocado 1,0 ml de meio YEP sem antibiótico e essa mistura foi incubada por 2 horas a 28 °C com agitação, centrifugada e ressuspendida em 200 µl de meio YEP. Foram plaqueados 50µl dessa suspensão em meio YEP sólido com os antibióticos canamicina, espectinomicina e clorofenicol. As placas foram incubadas a 28 °C por três dias. Posteriormente, foi isolada uma colônia de cada construção gênica, que foi incubada a 28 °C durante 18 horas em meio YEP líquido contendo antibióticos (LIN, 1995). O DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina, de acordo com Sambrook e Russel (2001). Foi aplicado 1,0 µl do DNA plasmidial em gel de agarose 0,8% para confirmar a transformação.

## **Transformação de tabaco com os genes candidatos**

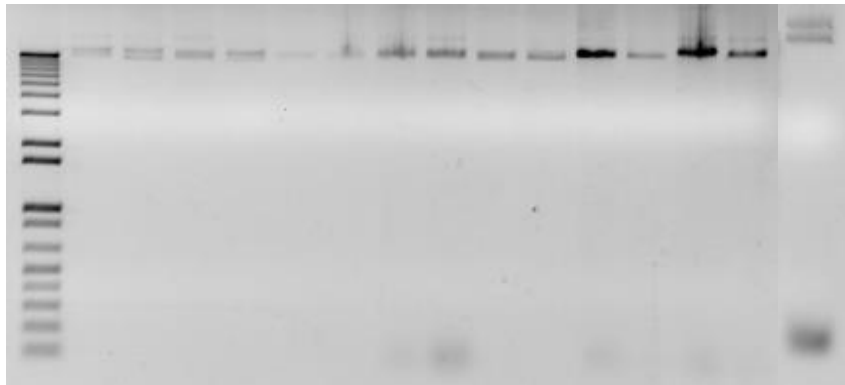
As plântulas de *Nicotiana sp* utilizadas para transformação foram mantidas *in vitro*, e, com aproximadamente 5 cm de altura, foram utilizadas para a transformação via *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101. A cultura de *Agrobacterium* contendo as construções gênicas pMCG1005, pOsPST1, pZmPST1, pZmPST4, pZmPST6, pSbPST28, pSbPST31 e pSbPST67 foi colocada em contato com discos de folhas de tabaco (explantes) em uma placa de petri, durante 1 minuto. Após serem agitados, os explantes foram transferidos para o meio PSM (Shooting Medium), sem antibiótico ou agente de seleção por 48 horas a 24-26 °C em uma câmara de crescimento iluminada. Após esse período os explantes foram transferidos para meio PSM suplementado com 250 mg/L tioxina. Após sete dias foram transferidos para um novo meio PSM + antibiótico + 2 mg/L PPT e esse subcultivo está sendo feito a cada sete dias até o aparecimento dos calos e diferenciação das folhas.

## **Resultados e Discussões**

As construções gênicas pOsPST1, pZmPST1, pZmPST4, pZmPST6, pSbPST28, pSbPST31 e pSbPST67 foram corretamente inseridas em *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101, uma vez que o padrão de bandas do vetor pMCG1005 foi confirmado, conforme foi observado na Figura 1.

Foi feita a transformação dos discos foliares a partir de plântula de tabaco cultivadas *in vitro* (Figura 2A) com as construções gênicas de interesse e o material está sob seleção do herbicida fosfinotricina (PPT) (Figura 2B), a fim de se selecionar os calos resistentes. Conforme pode ser observado na Figura 2C, os calos resistentes exibem coloração esverdeada, enquanto os susceptíveis apresentam coloração marrom. O subcultivo será feito até o aparecimento dos calos e diferenciação das folhas. Posteriormente, as plântulas serão isoladas, transferidas para meio de enraizamento e transferidas para o solo. As plantas positivas para inserção do transgene serão multiplicadas e testadas quanto a funcionalidade do gene *Pstol1*.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



**Figura 1:** Gel de agarose para visualização da inserção do plasmídeo pMCG1005 com os genes de interesse em *A. tumefaciens*. M – Marcador molecular 1kb Ladder (Invitrogen); 1 - pOsPST1 colônia 1; 2 - pOsPST1 colônia 2; 3 - pZmPST1 colônia 1; 4 - pZmPST1 colônia 2 ; 5 - pZmPST4 colônia 1; 6 - pZmPST4 colônia 2; 7 - pZmPST6 colônia 1; 8 - pZmPST6 colônia 2; 9 - pSbPST28 colônia 1; 10 - pSbPST28 colônia 2; 11 - pSbPST31 colônia 1; 12 - pSbPST31 colônia 2; 13 - pSbPST67 colônia 1; 14 - pSbPST67 colônia 2 e 15 - pMCG1005 vazio.



**Figura 2:** Transformação de tabaco com genes de interesse. A) plantas de *Nicotiana* sp mantidas *in vitro*, B) Discos foliares sob seleção do herbicida PPT, C) Calos sob seleção do herbicida.

## Conclusão

As construções pMCG1005, pOsPST1, pZmPST1, pZmPST4, pZmPST6, pSbPST28, pSbPST31 e pSbPST67 foram inseridas corretamente na *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101, as transformações de tabaco foram realizadas e os calos estão sob seleção do herbicida PPT.

## Referências

ALVES, V. M. C. Mechanisms of plant adaptations to low phosphorus conditions. In: WORKSHOP, 2005, Brasília, DF. **Advances in improving acid soil adaptation of tropical crops and forages, and management of acid soil**. Cali: CIAT, 2005. p. 3-4. Disponível em: <[http://webapp.ciat.cgiar.org/forrajes/pdf/acid\\_soils\\_brazil\\_workshop\\_abstracts\\_05.pdf](http://webapp.ciat.cgiar.org/forrajes/pdf/acid_soils_brazil_workshop_abstracts_05.pdf)>. Acesso em: 20 maio 2010.

AZEVEDO, G. C. **Identificação de genes associados com a eficiência na aquisição de fósforo em milho, com foco nos genes PSTOL1, STR1 e STR2**. 2015. 128 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DUARTE, J. de O.; CRUZ, J. C.; GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J. Economia da produção. In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 4. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de produção, 2).

GAMUYAO, R.; CHIN, J. H.; TANAKA, J. P.; PESARESI, P.; CATAUSAN, S.; DALID, C.; ISLAMET-LOEDIN, I.; TECSON-MENDOZA, E.M.; WISSUWA, M.; HEUER, S. The protein kinase *Pstoll* from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. **Nature**, London, v. 488, p. 535-541, 2012.

HUFNAGEL, B.; SOUSA, S. M. de; ASSIS, L.; GUIMARAES, C. T.; LEISER, W.; AZEVEDO, G. C.; NEGRI, B.; LARSON, B. G.; SHAFF, J. E.; PASTINA, M. M.; BARROS, B. A.; WELTZIEN, E.; RATTUNDE, H. F. W.; VIANA, J. H.; CLARK, R. T.; FALCÃO, A.; GAZAFFI, R.; GARCIA, A. A. F.; SCHAFFERT, R. E.; KOCHIAN, L. V.; MAGALHAES, J. V. Duplicate and conquer: multiple homologs of phosphorus starvation tolerance enhance phosphorus acquisition and sorghum performance on low-phosphorus soils. **Plant Physiology**, Washington, v. 166, p. 659-677, 2014.

LIN, J. J. Electrotransformation of agrobacterium. **Methods in Molecular Biology**, New York, v. 47, p. 171-178, 1995.

LYNCH, J. P.; BROWN, K. M. Topsoil foraging – an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. **Plant and Soil**, The Hague, v. 237, p. 225-237, 2001.

LYNCH, J. P. Roots of the second Green Revolution. **Australian Journal of Botany**, Victoria, v. 55, p. 493-512, 2007.

LYNCH, J. P. Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops. **Plant Physiology**, Washington, v. 156, p. 1041-1049, 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.