

## Superexpressão em tabaco do gene *Pstol1* de arroz e de seus homólogos em milho e sorgo

Simara da Silva Lopes<sup>(1)</sup>; Patrícia Lages Silva Palhares<sup>(2)</sup>; Ubiraci Gomes de Paula Lana<sup>(3)</sup>; Meire de Cassia Alves<sup>(3)</sup>; Jurandir Vieira Magalhães<sup>(4)</sup>; Claudia Teixeira Guimarães<sup>(4)</sup>; Andrea Almeida Carneiro<sup>(4)</sup>; Sylvia Morais de Sousa<sup>(4)</sup>.

<sup>(1)</sup>Estudante; Universidade Federal de São João Del-Rei; São João Del-Rei, Minas Gerais; simarabrazil@yahoo.com.br;

<sup>(2)</sup> Estudante; Centro Universitário de Sete Lagoas; <sup>(3)</sup>Analista; Embrapa Milho e Sorgo; <sup>(4)</sup>Pesquisador; Embrapa Milho e Sorgo.

**RESUMO:** A baixa disponibilidade de fósforo (P) é uma das maiores limitações para a produção agrícola em regiões tropicais. O gene *Phosphorus-Starvation Tolerance 1* (*OsPstol1*) codifica uma proteína quinase envolvida em processos que levam ao aumento da superfície radicular, aquisição de P e produtividade de grãos em arroz sob deficiência de P. Homólogos do *OsPstol1* foram identificados em sorgo por mapeamento associativo em dois painéis de diversidade e em milho por mapeamento de QTL. Com o objetivo de validar a função desses genes, *OsPstol1* de arroz (controle) e seus homólogos em milho (*ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02* e *ZmPstol8.05\_1*) e sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*) foram clonados sob o controle do promotor ubiquitina no vetor pMCG1005, tendo o gene *Bar* como marcador de seleção. Plantas de tabaco *Petit havana* foram geneticamente transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 e regeneradas pela seleção de calos em meio de indução de parte aérea e enraizamento. Fragmentos do gene *Bar* (~400 pb) e dos genes *Pstol1* (~700 pb) foram amplificados por PCR confirmando a inserção dos respectivos genes nas plantas transformadas. Diversas plantas apresentaram uma cópia do transgene e a superexpressão dos genes *Pstol1* aumentou o crescimento vegetativo da planta e a área de superfície radicular sob baixo P, indicando que esses genes atuam de forma semelhante ao gene *OsPstol1* em plantas transgênicas de tabaco.

**Termos de indexação:** Fósforo, transgênico, Agrobactéria.

### INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um nutriente chave no crescimento e desenvolvimento das plantas, com papel importante no metabolismo de energia, biossíntese de ácidos nucleicos e de membranas (Raghothama, 1999). Entretanto, é o macronutriente menos acessível em muitos ecossistemas e sua baixa disponibilidade limita o crescimento das plantas, com

necessidade de aplicação de altas doses de fertilizantes fosfatados para minimizar o impacto na produtividade das culturas agrícolas (Lynch, 2011).

O P é um recurso não-renovável que tem seu pico de exploração estimado para 2030 (Vance & Chiou, 2011), havendo necessidade do desenvolvimento de cultivares mais eficientes na aquisição e utilização de P para viabilizar práticas agrícolas sustentáveis.

As plantas desenvolveram uma série de mecanismos adaptativos a condições de baixo P para absorver quantidade suficiente desse nutriente para suas atividades metabólicas e seu crescimento (Lambers *et al.* 2010), com plantas eficientes na absorção de P aumentando a exploração do solo através de uma área de superfície maior e conversão de formas não disponíveis de nutrientes para formas disponíveis, que são importantes adaptações para absorção de nutrientes com pouca mobilidade no solo como o P (Rengel & Marschner, 2005).

O gene *Phosphorus-Starvation tolerance 1* (*Pstol1*) está relacionado a maior eficiência na aquisição de P em plantas de arroz em condições de baixo P. A análise fenotípica em solução nutritiva com plantas de arroz superexpressando o gene *Pstol1* indicaram que este gene é um regulador do desenvolvimento precoce e do crescimento radicular (Gamuyao *et al.* 2012). Três proteínas preditas de sorgo com identidade superior a 50% com o *Pstol1* de arroz (BAK26566) foram identificadas por Hufnagel *et al.* (2014) pela fenotipagem de dois painéis de associação de sorgo para absorção de P, morfologia e arquitetura do sistema radicular em hidroponia e produtividade de grãos e acúmulo de biomassa em condições de baixo P. Além disso, foram validados por mapeamento de QTL em uma população biparental, mostrando um papel geral dos homólogos de sorgo na morfologia e arquitetura do sistema radicular e co-localização com QTLs relacionados a estas características. Azevedo *et al.* (2015) identificaram através de mapeamento por QTL para morfologia radicular, acúmulo de biomassa e teor de P em população de RILs em solução nutritiva três genes de milho que co-localizaram com

QTLs para estas características, e em análise de expressão gênica foram mais expressos na raiz que na parte aérea. A co-localização 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 área de superfície radicular foram significativamente maiores nas plantas que expressam o *Pstol1* (GAMUYAO *et al.*, 2012). Portanto, o objetivo deste trabalho é superexpressar em tabaco os genes *OsPstol1* e seus homólogos de milho e sorgo visando verificar a funcionalidade quanto ao aumento da superfície radicular e aquisição de P.

## MATERIAL E MÉTODOS

As regiões codificantes do gene *Pstol1* de arroz, dos homólogos de milho (*ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02* e *ZmPstol8.05\_1*) e de sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*) (Hunfnagel *et al.*, 2014; Azevedo *et al.*, 2015) foram sintetizadas e clonadas nos sítios *AvrII* e *SpeI* no vetor binário pMCG1005 (*Iowa State University Plant Transformation Facility*) pela empresa GenScript USA Inc. (<http://www.genscript.com>). O vetor pMCG1005 tem o promotor ubiquitina para regulação e expressão dos genes candidatos e o marcador de seleção para planta é o gene *Bar* sob promotor 4x35S.

Os cassetes de expressão contendo as regiões codificantes dos genes *Pstol1* foram inseridos em *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 por eletroporação e após confirmação de sua correta inserção por PCR foi feita transformação de discos foliares de *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana* via *Agrobacterium tumefaciens*. Plantas transgênicas foram regeneradas por seleção com o herbicida PPT (fosfinotricina) em meio de cultura de indução de parte aérea e enraizamento e transferidas para casa de vegetação, onde passaram por nova seleção com PPT e as que sobreviveram foram multiplicadas. A confirmação da inserção dos genes *Pstol1* e marcador de seleção foi feita através de PCR com DNA genômico extraído de cada linhagem usando o método de Sanghai-Maroo *et al.* (1984), utilizando um *primer* senso na região promotora e um *primer* complementar à região codificadora do gene de interesse e *primers* específicos para o gene *Bar*.

A estimativa do número de cópias do transgene inseridas no genoma do tabaco foi feita por qPCR usando o método SYBR Green, utilizando DNA genômico em uma concentração de 20ng/μL, conforme Zhang *et al.* (2014) e Barros *et al.* (2011). Os níveis de expressão relativa foram quantificados pela equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001).

Sementes de eventos transgênicos de tabaco foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 6% e

germinadas em frascos com meio de cultura MS ½ (Murashige & Skoog, 1986) polimerizado com ágar Sigma, sob tratamento de baixo P (97 μM de P). Após 56 dias de germinação as plântulas foram fotografadas para análise morfológica e coletadas para extração de RNA total com kit Plant RNeasy (Qiagen). As análises de PCR quantitativo (qPCR) foram realizadas utilizando a metodologia *Taqman* e SYBR Green e a expressão gênica relativa calculada conforme o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001).

A caracterização morfológica do sistema radicular de eventos transgênicos de tabaco foi feita com plântulas sob tratamento de baixo P. Após a germinação, duas plântulas uniformes foram transferidas para placas de Petri com dimensões de 150mm x 25mm, três repetições por evento. Os experimentos foram realizados em câmara de crescimento com temperatura diurna média de  $27 \pm 3$  °C, noturna de  $20 \pm 3$  °C e fotoperíodo de 12 horas.

O sistema radicular das plântulas de tabaco foi avaliado semanalmente em diferentes aspectos utilizando-se o escâner Epson XL 10000 e os dados analisados com o software WinRhizo v. 4.0 (Regent Systems, Quebec, Canadá), sendo quantificadas as características radiculares de acordo com de Sousa *et al.* (2012).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

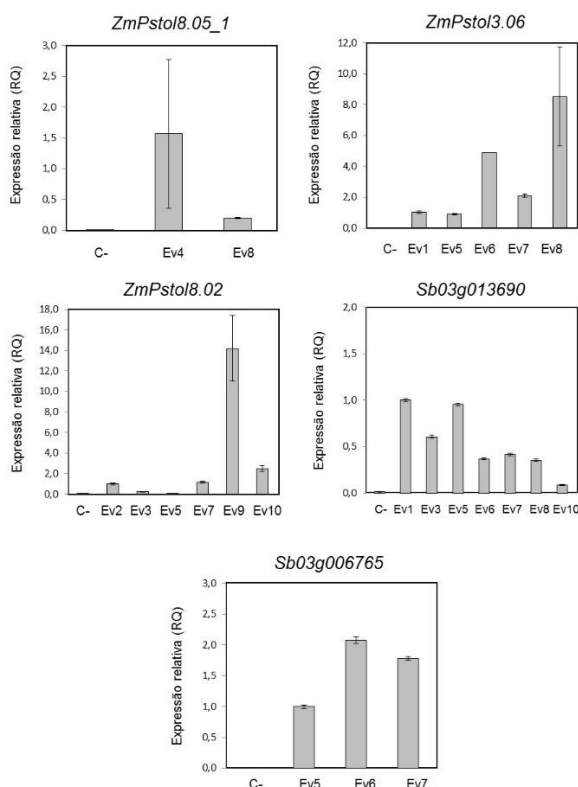
As plantas selecionadas em casa de vegetação com herbicida PPT foram testadas quanto à inserção dos genes de interesse por PCR. Todas as plantas avaliadas apresentaram o fragmento amplificado por PCR do gene *Bar*. Para a presença do inserto gene específico não foram observados os mesmos resultados, com total de plantas inferior ao do gene *Bar*, o que pode ser explicado pela deleção do gene específico durante o processo de transformação (Sha *et al.* 2004).

O número de cópias do transgene foi calculado pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001), comparando-se cada amostra desconhecida com o DNA de evento que continha uma única cópia do transgene. Como esperado, o tabaco não transformado não apresentou amplificação para o gene *Bar*. Eventos transformados apresentaram inserção de uma a três cópias do transgene. O número de cópias pode influenciar os níveis de expressão e a estabilidade genética dos genes exógenos e endógenos. Portanto, a inserção de uma única cópia do transgene é desejável, pois esses eventos são geneticamente estáveis (Gadeleta *et al.* 2011). Dados semelhantes foram encontrados por Yuan *et al.* (2007) e Yang *et al.* (2013) em tabaco e algodão, respectivamente.

Foi realizado um ensaio de expressão com o gene *Bar* para verificar presença de transcritos em eventos transgênicos de tabaco para as construções

pMCG1005, *OsPstol1*, *ZmPstol8.05\_1*, *ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*. A expressão do gene *Bar* foi variável entre os eventos e entre as construções. Não houve correlação entre os níveis de expressão e o número de cópias do gene *Bar*. A expressão está provavelmente relacionada com o local de integração do transgene no genoma vegetal (Joyce *et al.* 2014), que pode ser em regiões promotoras de genes transcricionalmente ativos (Bourras *et al.* 2015), diferentes regiões do genoma e forma aleatória (Gelvin & Kim, 2007).

Além da expressão do gene *Bar*, foram analisados os níveis de expressão dos transcritos para os genes específicos (*ZmPstol8.05\_1*, *ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*) (Figura 1). Nesse caso, também houve variação da expressão gênica entre eventos individuais. Todos os eventos expressaram os genes *Pstol1*, com exceção de eventos que apresentaram valores muito baixos de expressão.



**Figura 1** - Expressão dos homólogos de milho e sorgo do gene *Pstol1* em eventos transgênicos das construções *ZmPstol8.05\_1*, *ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*. A expressão gênica relativa foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

Análise morfológica de plântulas contendo as construções *OsPstol1* Ev. 5, *ZmPstol8.05\_1* Ev. 8, *ZmPstol3.06* Ev. 5, *ZmPstol8.02* Ev. 3, *Sb03g031690* Ev. 1 e *Sb03g006765* Ev. 6 mostrou maior

crescimento vegetativo e radicular (Figura 2) do que as plântulas controle (pMCG1005 -vetor vazio).

As plântulas contendo as construções *ZmPstol3.06* Ev. 5 e *ZmPstol8.02* Ev. 3 mostraram crescimento superior às demais construções (Figura 2). As construções *ZmPstol8.05\_1* Ev. 8, *Sb03g031690* Ev. 1 e *Sb03g006765* Ev. 6 tiveram crescimento similar, superior ao controle e ao *OsPstol1* Ev. 5, e inferior as construções *ZmPstol3.06* Ev. 5 e *ZmPstol8.02* Ev. 3 (Figura 2). A proteína OsPSTOL1 de arroz está associada ao desenvolvimento e crescimento precoce do sistema radicular e aquisição de P (Gamuyao *et al.* 2012). Há evidências de associação entre *SbPstol1*, crescimento radicular e produção em campo de sorgo (Hunfnagel *et al.* 2014) e co-localização entre *ZmPstol1* e características radiculares (Azevedo *et al.* 2015).

Na caracterização morfológica do sistema radicular foi observada diferença entre comprimento e área de superfície entre os eventos controles (pMCG1005) e eventos dos genes *OsPstol1*, *ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*, mas os resultados fenotípicos ainda não são conclusivos, uma vez que as plantas ainda estão no início do desenvolvimento.



**Figura 2** - Plântulas de tabaco individuais crescidas em meio de cultura sob baixo P. Da esquerda para direita: pMCG1005 Ev. 10 (controle), *OsPstol1* Ev. 5, homólogos de milho (*ZmPstol8.05\_1* Ev. 8, *ZmPstol3.06* Ev. 5 e *ZmPstol8.02* Ev. 3) e homólogos de sorgo (*Sb03g031690* Ev. 1 e *Sb03g006765* Ev. 6).

## CONCLUSÕES

Foram geradas com sucesso linhagens transgênicas de tabaco superexpressando os genes *OsPstol1* de arroz e seus homólogos de milho e de sorgo com baixo número de cópias dos transgenes e maior crescimento radicular e vegetativo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Embrapa e a Fapemig pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, G. C.; CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; NEGRI, B.F.; HUFNAGEL, B.; COSTA E SILVA, L.; MAGALHAES, J. V.; GARCIA, A. A. F.; LANA, U. G. P.; SOUSA, S. M.; GUIMARAES, C. T. Multiple interval QTL mapping and searching for *PSTOL1* homologs associated with root morphology, biomass accumulation and phosphorus content in maize seedlings under low-P. **BMC Plant Biology**, 10.1186/s12870-015-0561-y, 2015.
- BARROS, B. A.; LANA, U. G. P.; POSSA, K. F.; ANDRADE, L. C. S. S.; SILVA, V. L.; LOPES, F. A.; CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; MAGALHAES, J. V.; GUIMARAES, C. T. Estimativa do Número de Inserções de Transgenes em milho por PCR quantitativo (qPCR). (**Circular Técnica**), 2011.
- BOURRAS, S.; ROUXEL, T.; MEYER, M. Agrobacterium tumefaciens gene transfer: How a plant pathogen hacks the nuclei of plant and nonplant organisms. **Phytopathology**, p.1-14, 2015.
- DE SOUSA, S.M.; CLARK, R.T.; MENDES, F.F.; e OLIVEIRA, A.C.; VASCONCELOS, M.J.V.; PARENTONI, S.N.; KOCHIAN, L.V.; GUIMARÃES, C.T.; MAGALHÃES, J.V. A role for root morphology and related candidate genes in P acquisition efficiency in maize. **Functional Plant Biology**, v.39, p.925-935, 2012.
- GADELETA, A.; GIANCASPRO, A.; CARDONE, M. F.; BLANCO, A. Real-time PCR for detection of precise transgene copy number in durum wheat. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.16, p.652-688, 2011.
- 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 Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. **Nature**, v.488, p.535-541, 2012.
- GELVIN, S. B.; KIM, S. I. Effect of chromatin upon Agrobacterium T-DNA integration and transgene expression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1769, p.410-421, 2007.
- HUFNAGEL, B.; de SOUSA, S. M.; ASSIS, L.; GUIMARÃES, 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.; MAGALHÃES, J. V. Duplicate and Conquer: Multiple Homologs of PHOSPHORUS-STARVATION TOLERANCE1 Enhance Phosphorus Acquisition and Sorghum Performance on Low-Phosphorus Soils. **Plant Physiology**, v.166, p.659 – 677, 2014.
- 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.
- LAMBERS, H.; BRUNDRETT, M. C.; RAVEN, J. A.; HOPPER, S. D. Plant mineral nutrition in ancient landscapes: high plant species diversity on infertile soils is linked to functional diversity for nutritional strategies. **Plant Soil**, v.334, p.11-31, 2011.
- LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct. Method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.
- LYNCH, J.P. Root Phenotypes for Enhanced Soil Exploration and Phosphorus Acquisition: Tools for Future Crops. **Plant Physiology**, v.156, p.1041-1049, 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Tobacco Tissue Culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.665-693, 1999.
- RENGEL, Z.; MARSCHNER, P. Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. **New Phytologist**, v.168, p.305-312, 2005.
- SHA, Y.; LI, S.; PEI, Z.; LUO, L.; TIAN, Y.; HE, C. Generation and flanking sequence analysis of a rice T-DNA tagged population. **Theor Appl Genet**, v.108, p.306-314, 2004.
- 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 population dynamics. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.81, p.8014-8018, 1984.
- VANCE, C.P., CHIOU, T.J. Phosphorus focus editorial. **Plant Physiology**, v.156, p.987-988, 2011.
- 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 J. Genet. Plant Breed**, v.49, p.51-57, 2013.
- YUAN, J. S.; BURRIS, J.; STEWART, N. R.; MENTEWAB, A.; STEWART JR., C. N. Statistical tools for transgene copy number estimation based on real-time PCR. **BMC Bioinformatics**, v.8, 2007.
- ZHANG, Y.; LIU, Y.; ZHANG, J.; WANG, G.; WANG, J.; LIU, J. Assessment of transgene copy number and zygosity of transgenic maize overexpressing Cry1le gene with SYBR® Green qRT-PCR. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v.5, p.125-134, 2015.



# XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

"Milho e Sorgo: inovações,  
mercados e segurança alimentar"

---