

## Clonagem da região promotora de genes *SbPSTOLI*<sup>1</sup>

Mateus Henrique Passos Cruz<sup>2</sup>, Beatriz de Almeida Barros<sup>3</sup>, Andrea Almeida Carneiro<sup>4</sup>, Jurandir Vieira de Magalhães<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Trabalho financiado pela Fapemig

<sup>2</sup> Estudante do Curso de Ciências Biológicas Bacharelado do Centro Universitário de Sete Lagoas-UNIFEMM, Bolsista PIBIC do Convênio Fapemig/CNPq/Embrapa

<sup>3</sup> Analista de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Milho e Sorgo

<sup>4</sup> Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

**Vigência da bolsa: 28 de fevereiro de 2018**

### Introdução

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é uma angiosperma da família Gramineae, que se destaca como um importante cereal, sendo o quinto mais produzido no mundo, depois do milho, do arroz, do trigo e da cevada (Diniz, 2010). Além disso, o sorgo é uma cultura que apresenta tolerância à seca e a outros estresses ambientais, o que a torna bastante adaptada para cultivo em regiões de clima quente e seco (Doubbia et al., 1993, 1998; Lost..., 1996). No Brasil, segundo a Conab (Companhia Nacional de Abastecimento), a safra 2016/2017 deve atingir uma produção de 1,87 milhões de toneladas em uma área plantada de 634,1 mil hectares (Acompanhamento..., 2017).

No entanto, embora apresente boa tolerância a estresses abióticos, uma das principais limitações para a produtividade agrícola do sorgo é a baixa disponibilidade de fósforo (P) presente na maioria dos solos tropicais. A adubação fosfatada é utilizada como medida mitigadora desse problema, mas aumenta significativamente os custos de produção (Runge-Metzger, 1975). Sendo assim, a caracterização de genes relacionados à eficiência no uso P e o desenvolvimento de culturas mais eficientes podem constituir alternativas promissoras para diminuição dos gastos com adubação, além de colaborar, substancialmente, para a sustentabilidade da agricultura mundial.

*Phosphorus uptake 1 (Pup1)* é um loco de característica quantitativa (*Quantitative Trait Loci*, QTL) localizado no cromossomo 12 de arroz, que está associado com alterações na morfologia radicular e na aquisição de P, controlando aproximadamente 80% da variação fenotípica para aquisição de P

(Wissuwa et al., 2002). Kasalath, a variedade doadora do loco *Pup1*, e a variedade Nipponbare, sensível à deficiência de P, foram os parentais de uma população segregante utilizada no mapeamento do loco *Pup1*. Utilizando mapeamento de alta resolução foi possível identificar um gene, *OsPupK46-2*, que codifica uma serina/treonina quinase que confere aumento no crescimento radicular, aumentando significativamente a produtividade de grãos sob deficiência de P no solo (Gamuyao et al., 2012). Esse gene foi denominado *Phosphorus-StarvationTolerance 1* ou *OsPSTOL1*, que aumenta a absorção de P por meio de um mecanismo que induz o crescimento inicial da raiz e o seu desenvolvimento (Gamuyao et al., 2012).

Em sorgo, buscas por meio de análise similaridade de sequências dos aminoácidos da proteína OsPSTOL1 indicaram a presença de aproximadamente 100 hits de possíveis homólogos no genoma. Dentre esses, seis genes denominados como *SbPSTOL1* foram selecionados com auxílio das ferramentas nblast e pblast. Os critérios para seleção foram E-value < e-35 e identidade > 50%. Além disso, os homólogos *SbPSTOL1* colocalizam com QTLs relacionados à morfologia radicular e ao aumento do desempenho do sorgo em condições de baixa disponibilidade de P (Hufnagel et al., 2014). Predições estruturais das proteínas demonstraram que o domínio quinase, característico de *OsPSTOL1*, está presente nas seis proteínas *SbPSTOL1*. No entanto, OsPSTOL1 é predito como sendo uma quinase citosólica, enquanto as proteínas de sorgo apresentam um domínio transmembrana e domínios extracelulares de interação com a parede celular (Hufnagel et al., 2014).

Os genes *SbPSTOL1* estão envolvidos em vias bioquímicas de respostas adaptativas ainda não completamente elucidadas. Assim, a caracterização funcional desses genes é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de engenharia genética que permitam o desenvolvimento de cultivares tolerantes a estresses abióticos. Dessa maneira, o objetivo desse trabalho é clonar a região promotora de um desses genes para futura caracterização funcional em *Setaria viridis*.

## **Material e Métodos**

### *Clonagem da região promotora*

A sequência da região promotora dos genes candidatos foi obtida do genoma de referência do sorgo, construído a partir da linhagem Btx623 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Foram obtidas sequências das regiões promotoras dos genes Sb07g002840, Sb03g006765 e Sb03g031690 (Hufnagel et al., 2014). Foram realizadas reações de PCR com a enzima KAPA DNA Polymerase (KapaBiosystem) para amplificar as regiões promotoras. A amplificação das regiões de interesse foi realizada utilizando-se 3 µL de DNA genômico (75 ng), 0,2 µL da Taq KAPA Polymerase, 0,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2,0 µL de tampão KAPA Taq Buffer 10x, 1,5 µL de DNTPs 1,0 µL de primer específico reverso, 1,0 µL de primer específico forward e 11,1 µL de H<sub>2</sub>O, totalizando 20 µL. As condições de amplificação foram as seguintes: temperatura de desnaturação de 94 °C por 2 minutos, seguindo-se 40 ciclos a 94 °C por 15 segundos, 55 °C por 20 segundos e 72 °C por 2 minutos e 30 segundos. A extensão final foi feita a 72 °C por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados em um gel de agarose 1% utilizando o corante GelRed™ (1:100).

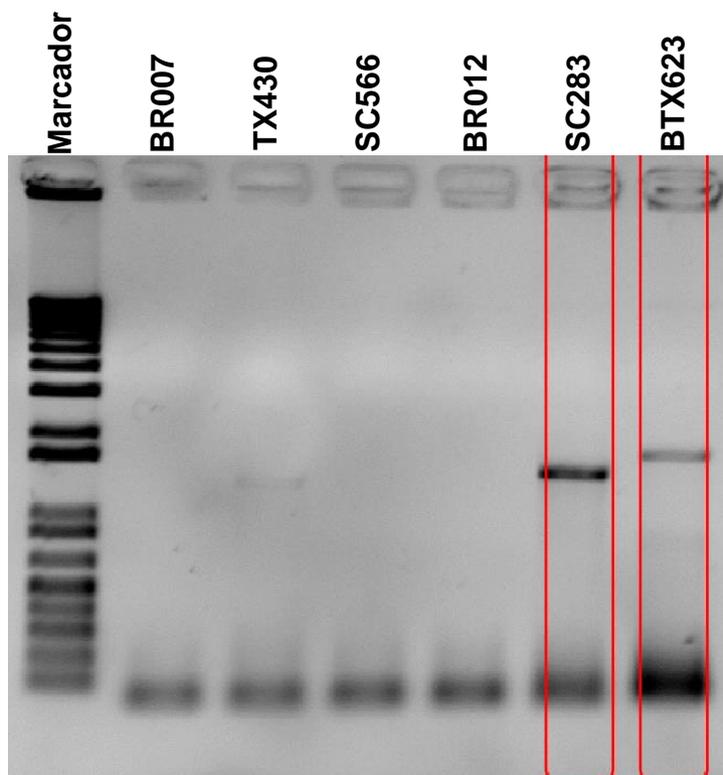
Para a clonagem, as reações de PCR foram purificadas e digeridas com as enzimas EcoRI e Bam HI de acordo com as recomendações do fabricante. O vetor utilizado foi o pTF102 (Paz et al., 2004), que foi clivado com as mesmas enzimas para liberação do promotor 35S. As regiões promotoras de interesse foram fusionadas ao gene repórter GUS do vetor.

#### *Transformação em Escherichia coli MACH T1R (E.coli)*

As reações de ligação obtidas foram utilizadas para transformar *Escherichia coli* (*E. coli*) MACH1 T1R (Invitrogen) por meio de choque térmico (Sambrook et al., 1989). As colônias transformadas foram identificadas por meio de PCR de colônias e confirmadas por meio de sequenciamento. As colônias positivas foram inoculadas em meio CircleGrow líquido contendo espectinomicina (100 µg/mL) e cultivadas a 37 °C/ 150 rpm/ overnight (ON). A extração do DNA plasmidial das bactérias inoculadas foi feita com o kit de extração Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. A reação de sequenciamento foi feita com 300 ng de DNA plasmidial com o kit BigDye® Terminator v3.1 (CycleSequencing Kit, AppliedBiosystems) e analisada em sequenciador automático de DNA.

## Resultados e Discussão

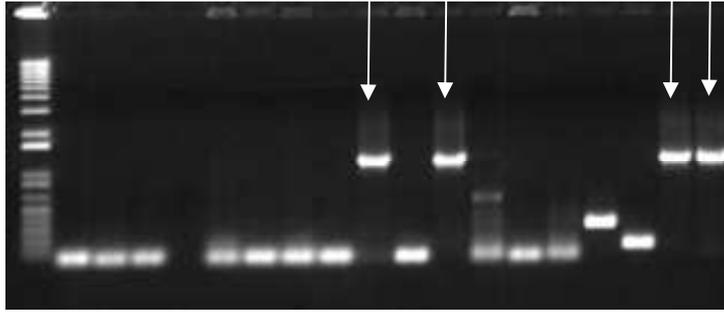
Foram desenhados primers para amplificar dois mil pares de bases (pb) à montante do gene *SbPSTOL1*, Sb03g031690 que, espera-se, deve corresponder à sua região promotora. A Figura 1 mostra que obtivemos sucesso na amplificação de uma banda de tamanho esperado a partir de DNA genômico da linhagem de sorgo Btx623.



**Figura 1** - Perfil de amplificação das regiões genômicas do gene Sb03g031690 de diferentes genótipos de sorgo (acima). Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%. Marcador de massa molecular (1 Kb Plus).

Os primers para amplificação das regiões genômicas foram desenhados a partir da sequência do genoma de referência da linhagem Btx623 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Portanto, nos casos em que não houve amplificação, ou quando a banda amplificada não correspondeu ao tamanho esperado (por exemplo, no caso do genótipo SC283), variações alélicas podem ter ocasionado pareamento imperfeito dos primers e ausência de amplificação correta da região-alvo.

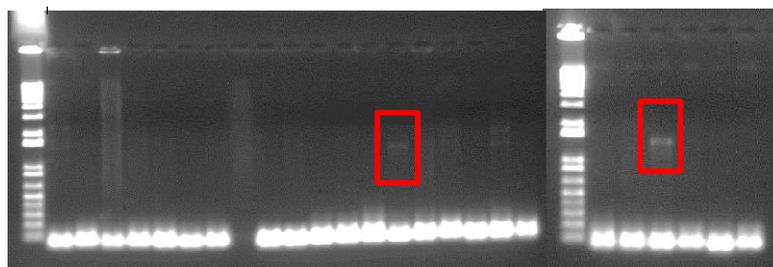
Após clonagem dos produtos de PCR, reações de PCR de colônia foram conduzidas para confirmação da presença de insertos de tamanhos esperados. A Figura 2 mostra que foram obtidas quatro colônias com insertos de 2.000 pares de bases, indicando sucesso na clonagem da região promotora do gene Sb03g031690 da linhagem de sorgo, Btx623.



**Figura 2** - Confirmação da clonagem da região promotora do gene Sb03g031690 da linhagem Btx623 por PCR de colônia. O DNA plasmidial foi extraído de *E. coli* MACH1 T1R e amplificado com primers específicos para a região promotora para confirmação da presença do inserto. Foram obtidas quatro colônias positivas (destacadas com as setas), isto é, contendo insertos do tamanho esperado (~2000 pb). Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1%. A primeira canaleta contém o marcador de massa molecular (1 Kb Plus).

O inserto presente no DNA plasmidial dessas colônias foi sequenciado. O alinhamento da sequência obtida com a sequência da região promotora do gene Sb03g031690 confirmou a correspondência completa entre as duas sequências e, assim, o sucesso da clonagem.

Procedeu-se então à transformação de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 10 com o DNA plasmidial contendo os insertos de interesse. A Figura 3 mostra que foram obtidas duas colônias de *A. tumefaciens* contendo a região promotora do gene Sb03g031690 no DNA plasmidial.



**Figura 3** - Confirmação da presença de insertos contendo a região promotora do gene Sb03g031690 da linhagem Btx623 em DNA plasmidial isolado de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 10. As colônias contendo DNA plasmidial que deram origem aos produtos de amplificação marcados em vermelho possuem inserto do tamanho esperado (2000 pb). Amostras foram analisadas em gel de agarose 1%. A primeira canaleta contém o marcador de massa molecular (1 Kb Plus).

## Conclusão

Houve sucesso na amplificação da região promotora do gene Sb03g031690 e na clonagem em *Agrobacterium tumefaciens* no vetor apropriado para análises da atividade do promotor. Esses resultados permitem agora a transformação de *Setaria viridis* com a construção contendo essa região genômica fusionada ao gene repórter, GUS. A análise dos eventos transgênicos de setaria permitirá o estudo detalhado do promotor do gene Sb03g031690, incluindo a obtenção de padrões teciduais de expressão, dentre outros aspectos.

## Referências

ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA [DE] GRÃOS: safra 2017/18: primeiro levantamento. Brasília, DF: Conab, v. 5, out. 2017. 114 p.

DINIZ, G. M. M. **Produção de sorgo (*Sorghum bicolor* L. moench) aspectos gerais**. 2010. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

DOUMBIA, M. D.; HOSSNER, L. R.; ONKEN, A. B. Sorghum growth in acid soils of West Africa: variations in soil chemical properties. **Arid Soil Research Rehabilitation**, v. 12, n. 2, p. 179-190, 1998.

DOUMBIA, M. D.; HOSSNER, L. R.; ONKEN, A. B. Variable sorghum growth in acid soils of subhumid West Africa. **Arid Soil Research Rehabilitation**, v. 7, p. 335-346, 1993.

GAMUYAO, R.; CHIN, J. H.; PARIASCA-TANAKA, J.; PESARESI, P.; CATAUSAN, S.; DALID, C.; SLAMET-LOEDIN, I.; TECSON-MENDOZA, E. M.; WISSUWA, M.; HEUER, S. The protein kinase Pst11 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. **Nature**, London, v. 488, p. 535-539, 2012.

HUFNAGEL, B.; SOUSA, S. M.; ASSIS, L.; GUIMARÃES, C. T.; LEISER, W.; AZEVEDO, G. C. Duplicate and conquer: multiple homologs of PHOSPHORUS-STARVATION TOLERANCE1 enhance phosphorus acquisition and sorghum performance on low-phosphorus soils. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 166, n. 2, p. 659-677, 2014.

LOST crops of Africa: grains. Washington: National Academies Press, 1996. v. 1, 386 p.

PAZ, M. M.; SHOU, H.; GUO, Z.; ZHANG, Z.; BANERJEE, A. K.; WANG, K. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. **Euphytica**, Wageningen, v. 136, n. 2, p. 167-179, 2004.

RUNGE-METZGER, A. Closing the eye: obstacles to efficient P management for improved global security. In: TIESSSEN, H. (Ed.). **Phosphorus in the global environment: transfers, cycles and management**. Chichester: John Wiley, 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v. 1.

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**, Berlin, v. 105, p. 890-897, 2002.

### Literatura Recomendada

EMBRAPA Milho e Sorgo. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/noticias/mostranoticia.php?codigo=593>>. Acesso em: 13 jan. 2018.

FURTINI NETO, A. E.; VALE, F. R. do; RESENDE, A. V. de; GUILHERME, R. L. G.; GUEDES, G. A. de A. **Fertilidade do solo**. Lavras: UFLA, 2001. 261 p.

GRANT, C. A.; FLATEN, D. N.; TOMASIEWICZ, D. J.; SHEPPARD, S. C. **A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta**. Piracicaba: POTAFOS, 2001. (Informações Agronômicas, n. 95).

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**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 456-457, 2009.

JAIN, A.; VASCONCELOS, M. J.; RAGHOTHAMA, K. G.; SAHI, S. V. Molecular mechanisms of plant adaptation to phosphate deficiency. **Plant Breeding Review**, Berlin, v. 29, n. 4, p. 359-419, 2007.

LAMBERS, H.; SHANE, M. W.; CRAMER, M. D.; PEARSE, S. J.; VENEKLAAS, E. J. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. **Annals of Botany**, London, v. 98, n. 4, p. 693-713, June 2006.

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

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd ed. London: Academic Press, 1995.

MARTINS, P. K.; NAKAYAMA, T. J.; RIBEIRO, A. P.; CUNHA, B. A. D. B. D.; NEPOMUCENO, A. L.; HARMON, F. G.; KOBAYASHI, A. K.; MOLINARI, H. B. C. *Setaria viridis* floral-dip: a simple and rapid Agrobacterium-mediated transformation method. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 61-63, 2015.

NARANG, R. A.; BRUENE, A.; ALTMANN, T. Analysis of phosphate acquisition efficiency in different Arabidopsis accessions. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 124, p. 1786-1799, 2000.

OZTURK, L.; EKER, S.; TORUN, B.; CAKMAK, I. Variation in phosphorus efficiency among 73 bread and durum wheat genotypes grown in a phosphorus-deficient calcareous soil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 269, p. 69-80, 2005.

PARFITT, R. L. Anion adsorption by soils and soil materials. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 30, p. 1-50, 1978.

RAGHOTHAMA, K. G.; KARTHIKEYAN, A. S. Phosphate acquisition. **Plant and Soil**, The Hague, v. 274, n. 1, p. 37-49, 2005.

RICHARDSON, S. A.; SLOAN, R. G.; SOLIMAN, M. T.; TUNA, I. Accrual reliability, earnings persistence and stock prices. **Journal of Accounting and Economics**, Amsterdam, v. 39, n. 3, p. 437-485, 2005.

TABOSA, J. N.; TAVARES, J. A.; REIS, O. V. dos; SIMPLÍCIO, J. B.; LIMA, J. M. P. de; CARVALHO, H. W. L. de; NASCIMENTO, M. M. A. do. Potencial do sorgo granífero em Pernambuco e no Rio Grande do Norte: resultados obtidos com e sem irrigação. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 27.; SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, SPODOPTERA FRUGIPERDA, 3.; WORKSHOP SOBRE MANEJO E ETIOLOGIA DA MANCHA BRANCA DO MILHO, 2008, Londrina. **Agroenergia, produção de alimentos e mudanças climáticas: desafios para milho e sorgo: trabalhos e palestras**. [Londrina]: IAPAR; [Sete Lagoas]: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 1 CD-ROM.

TEIXEIRA, P. E. G.; TEIXEIRA, P. P. M. Potencial nutritivo da silagem de sorgo. In: WORKSHOP SOBRE PRODUÇÃO DE SILAGEM NA AMAZÔNIA, 1., 2004, Belém. **Anais**. Belém: Universidade Federal Rural, 2004. p. 83-100.

WANG, X.; SHEN, J.; LIAO, H. Acquisition or utilization, which is more critical for enhancing phosphorus efficiency in modern crops? **Plant Science**, Limerick, v. 179, p. 302-306, 2010.

WISSUWA, M.; AE, N. Further characterization of two QTLs that increase phosphorus uptake of rice (*Oryza sativa* L.) under phosphorus deficiency. **Plant and Soil**, The Hague, v. 237, p. 275-286, 2001.

WISSUWA, M.; YANO, M.; AE, N. Mapping of QTLs for phosphorus- deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 5/6, p. 777-783, 1998.