

Universidade Federal de São João del-Rei  
Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia

SIMARA DA SILVA LOPES

**ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE *PSTOL1* DE ARROZ E DE SEUS  
HOMÓLOGOS EM MILHO E SORGO EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE  
TABACO**

SÃO JOÃO DEL REI  
MINAS GERAIS – BRASIL  
FEVEREIRO DE 2016

SIMARA DA SILVA LOPES

**ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE *PSTOL1* DE ARROZ E DE SEUS  
HOMÓLOGOS EM MILHO E SORGO EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE  
TABACO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del Rei como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de “Magister Scientiae” (MS).

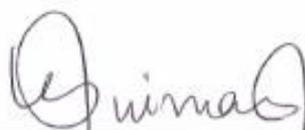
SÃO JOÃO DEL REI  
MINAS GERAIS – BRASIL  
FEVEREIRO DE 2016

SIMARA DA SILVA LOPES

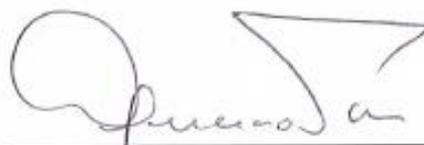
**ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE *PSTOL1* DE ARROZ E SEUS  
HOMÓLOGOS EM MILHO E SORGO EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE  
TABACO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del Rei como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de "Magister Scientiae" (MS).

Aprovada em: 24 de Fevereiro de 2016



Dra. Cláudia Teixeira Guimarães  
(Membro Interno)



Dr. Luciano Vilela Paiva  
(Membro Externo)

\_\_\_\_\_  
Dr. Newton Portilho Carneiro  
(Suplente)

\_\_\_\_\_  
Dr. Sylvia Moraes de Sousa Tinoco  
(Orientadora)

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Norvalino e Luzia e meus irmãos  
Marildo, Suely e Silvana.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças para seguir e me manter nos caminhos por mim escolhidos e por Ele abençoados.

Aos meus amados pais, Norvalino e Luzia, pelo incentivo silencioso e essencial nos caminhos que escolhi trilhar e pela compreensão de muitos períodos de ausência.

Aos meus queridos irmãos, Marildo, Suely e Silvana por compreenderem os períodos de ausência.

Ao Julian, por me incentivar e acreditar em mim, estar ao meu lado nos momentos decisivos e auxílios no meu trabalho.

A minha orientadora, Dra. Sylvia Moraes, que acreditou no meu potencial, pelo incentivo constante, pelos ensinamentos e paciência. Os meus mais sinceros agradecimentos pela orientação profissional e pessoal.

A minha co-orientadora, Dra. Andrea Almeida Carneiro, pelos valiosos ensinamentos teóricos e práticos, conselhos e sugestões. Os meus mais sinceros agradecimentos pela orientação profissional e pessoal.

A Barbara e Patrícia, pelos auxílios e contribuições constantes, e ensinamentos compartilhados.

Aos analistas e técnicos dos laboratórios da Embrapa Milho e Sorgo, Ubiraci, Beatriz, Meire, Gislene e Miguel, pelos valiosos ensinamentos.

Aos colegas de trabalho, funcionários e estudantes do Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo, que indiretamente contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

LOPES, Simara da Silva (MS). Universidade Federal de São João del Rei, Fevereiro de 2016. Título: **Análise funcional do gene *Pstol1* de arroz e de seus homólogos em milho e sorgo em plantas transgênicas de tabaco.** Orientadora: Dra. Sylvia Morais de Sousa Tinoco. Co-orientadora: Dra. Andrea Almeida Carneiro.

## RESUMO

A baixa disponibilidade de P é uma das maiores limitações para a produção agrícola em regiões tropicais. O gene *Phosphorus-Starvation Tolerance1* (*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 associação de sorgo 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 que foi superexpresso nas plantas selecionadas. Além disso, 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 a do gene *Pstol1* em plantas transgênicas de tabaco. As plantas de tabaco transgênico com os sete cassetes de expressão serão testadas para aumento da aquisição de P e produtividade de grãos em condições de baixo P.

**Palavras-chaves:** Eficiência de P; raiz; transformação; superexpressão.

LOPES, Simara da Silva (MS). Universidade Federal de São João del Rei, Fevereiro de 2016. Título: **Functional analysis of rice *Phosphorus Starvation Tolerance 1* gene and its sorghum and maize homologs in transgenic tobacco**. Orientadora: Dra. Sylvia Morais de Sousa Tinoco. Co-orientadora: Dra. Andrea Almeida Carneiro.

### ABSTRACT

Low phosphorus (P) availability in soil is a major constraint for crop production in tropical regions. *Phosphorus-Starvation Tolerance1* gene (*OsPstol1*) encodes a protein kinase involved in processes that enhance root surface, P acquisition and grain yield in rice under P deficiency. Homologs of *OsPstol1* in sorghum were identified by association mapping in two sorghum association panels and maize by QTL mapping. Aiming to validate the function of these genes, rice *OsPstol1* (control) and its maize (*ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02* and *ZmPstol8.05\_1*) and sorghum (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* and *Sb03g006765*) homologs were cloned downstream of ubiquitin promoter in pMCG1005 vector, using *Bar* gene as a selective marker. Tobacco *Petit Havana* plants were genetically transformed via *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 strain and regenerated from selected callus in shooting and rooting medium. Fragments of the *Bar* gene (~400 bp) and *Pstol1* gene (~700 bp) were amplified by PCR confirming integration of respective genes in the transformed plants. Several plants presented a copy of transgene, which was overexpressed in selected plants. Moreover, overexpression of *Pstol1* genes significantly enhanced vegetative plant growth and root surface area on low P, indicating that these genes act in a similar manner to *Pstol1* gene in transgenic tobacco plants. These transgenic tobacco plants harboring the seven different genetic cassettes are going to be tested for the enhancement of P acquisition and grain yield under low P conditions.

**Keywords:** P efficiency; root; transformation; overexpression.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Vetor binário pMCG1005 com o promotor ubiquitina no sítio de clonagem dos fragmentos e o marcador de seleção gene *Bar* sob promotor 4x35S.....13
- Figura 2 – Análise filogenética das proteínas quinases de arroz (*OsPSTOL1*), de milho (*ZmPSTOL8.05\_1*, *ZmPSTOL3.06* e *ZmPSTOL8.02*), de sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*) e de tabaco (*nt151610*, *nt165527*, *nt165497*, *nt182684*, *nt167932*, *nt165481*, *nt97611*, *nt165496*, *nt182685*).....21
- Figura 3 - Gel de agarose para visualização da inserção do plasmídeo com as construções de interesse em *Agrobacterium tumefaciens*.....22
- Figura 4 – Processo de transformação de tabaco: discos foliares transformados, calos em meio de seleção, desenvolvimento parte aérea, plântulas enraizando *in vitro*, plantas em casa vegetação, plantas em fase de florescimento.....23
- Figura 5 - Fragmentos amplificados por PCR para o gene *Bar* das plantas de tabaco transformadas e regeneradas com as construções de interesse.....25
- Figura 6 - Fragmentos amplificados por PCR para os genes específicos das plantas de tabaco transformadas e regeneradas com as construções de interesse.....26
- Figura 7 - PCR das plântulas de tabaco pMCG1005 Ev 7, *OsPstol1* Ev 6, *ZmPstol3.06* Ev 1 e *ZmPstol8.02* Ev 6 utilizando primers específicos para os genes de interesse.....30

Figura 8 - Expressão do gene marcador de seleção <i>Bar</i> em eventos transgênicos das construções pMCG1005, <i>OsPstol1</i> , <i>ZmPstol8.05_1</i> , <i>ZmPstol3.06</i> , <i>ZmPstol8.02</i> , <i>Sb03g031690</i> e <i>Sb03g006765</i> .....	32
Figura 9 - Expressão dos genes <i>Pstol1</i> em eventos transgênicos das construções <i>ZmPstol8.05_1</i> , <i>ZmPstol3.06</i> , <i>ZmPstol8.02</i> , <i>Sb03g031690</i> e <i>Sb03g006765</i> .....	32
Figura 10 - Vista lateral de plântulas de tabaco crescidas em meio de cultura sob baixo P.....	33
Figura 11 - Vista superior de plântulas de tabaco crescidas em meio de cultura sob baixo P.....	34
Figura 12 - Plântulas de tabaco individuais crescidas em meio de cultura sob baixo P.....	34
Figura 13 – Comprimento radicular total (cm) e área de superfície radicular total (cm <sup>2</sup> ) de plântulas de tabaco transgênico crescidas em meio de cultura sob baixo P por 5, 12 e 19 e 26 dias após a montagem dos experimentos.....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados para confirmar a inserção do transgene.....	16
Tabela 2 - Sequências dos primers e sondas utilizados nos ensaios de expressão gênica <i>Taqman</i> e <i>Sybr</i> das plantas transformadas com genes candidatos.....	19
Tabela 3 - Total de eventos transgênicos para cada gene candidato.....	27
Tabela 4 - Estimativas do número de cópias do transgene por qPCR calculado pelo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ em linhagens T <sub>0</sub> de tabaco.....	28

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
SUMÁRIO.....	x
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 FÓSFORO.....	1
1.2 EFICIÊNCIA NA AQUISIÇÃO DE FÓSFORO.....	2
1.3 SISTEMA RADICULAR E A AQUISIÇÃO DE FÓSFORO.....	3
1.4 PLANTAS TRANSGÊNICAS.....	5
1.5 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA VIA <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	6
1.6 <i>PSTOL1</i> ( <i>PHOSPHORUS-STARVATION TOLERANCE 1</i> ): GENE DE EFICIÊNCIA NA AQUISIÇÃO P EM ARROZ.....	7
1.6.1 <i>SbPstol1</i> .....	9
1.6.2 <i>ZmPstol1</i> .....	10
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>11</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
3.1 ÁRVORE FILOGENÉTICA DE PROTEÍNAS QUINASES DE ARROZ, MILHO, SORGO E TABACO.....	12
3.2 CLONAGEM DO GENE <i>PSTOL1</i> E SEUS HOMÓLOGOS EM MILHO E SORGO.....	12
3.3 TRANSFORMAÇÃO DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> COM OS GENES CANDIDATOS.....	14
3.4 TRANSFORMAÇÃO DE TABACO COM OS GENES CANDIDATOS.....	14
3.5 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS.....	15
3.6 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CÓPIAS DO TRANSGENE POR qPCR.....	16
3.7 TESTE DE SEGREGAÇÃO EM EVENTOS TRANSGÊNICOS.....	17

3.8 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS TRANSGENES POR qPCR.....	17
3.9 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO SISTEMA RADICULAR.....	19
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 ÁRVORE FILOGENÉTICA DE PROTEÍNAS QUINASES DE ARROZ, MILHO, SORGO E TABACO.....	21
4.2 TRANSFORMAÇÃO DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> COM OS GENES CANDIDATOS.....	22
4.3 TRANSFORMAÇÃO DE TABACO COM OS GENES CANDIDATOS.....	22
4.4 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS.....	24
4.5 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CÓPIAS DO TRANSGENE POR qPCR.....	27
4.6 TESTE DE SEGREGAÇÃO EM EVENTOS TRANSGÊNICOS.....	29
4.7 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS TRANSGENES POR qPCR.....	31
4.8 ANALISE MORFOLÓGICA DOS TRANSGÊNICOS.....	33
4.9 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO SISTEMA RADICULAR DOS EVENTOS TRANSGÊNICOS.....	35
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>43</b>
<b>ANEXO 1 - SEQUÊNCIAS DOS GENES <i>OsPstol1</i>, HOMÓLOGOS DE MILHO (<i>ZmPstol8.05_1</i>, <i>ZmPstol3.06</i> e <i>ZmPstol8.02</i>) E DE SORGO (<i>Sb07g002840</i>, <i>Sb03g031690</i> e <i>Sb03g006765</i>).....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXO 2 – MEIOS DE CULTIVO</b> .....	<b>56</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 FÓSFORO

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, fotossíntese, respiração e regulação de enzimas (Raghothama 1999). Entretanto, é o macronutriente menos acessível em muitos ecossistemas e sua baixa disponibilidade limita o crescimento das plantas, com impacto direto na produtividade de culturas agrícolas (Abel *et al.* 2002; Lynch 2011).

As plantas absorvem o P na forma de ortofosfato (Pi)  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$ , que está presente no solo em concentrações muito baixas, de 0,1–10  $\mu\text{M}$ , consideradas subótimas para as culturas. Além de sua baixa disponibilidade no solo, o P se torna pouco disponível para absorção pelas plantas, uma vez que em solos ácidos pode formar complexos insolúveis com cátions, em especial com ferro e alumínio (Vance *et al.* 2003). A forma de P preferencialmente absorvida pelas plantas é  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  na faixa ótima de pH de 4,5-5,0 (Raghothama 1999). O P é considerado um dos nutrientes com menor mobilidade no solo (Raghothama 1999), com maiores concentrações nas camadas superficiais do solo e pouca concentração nas camadas inferiores (Vance *et al.* 2003). O P é transportado para as raízes por difusão, um processo lento (Rengel 2001).

Como o P é um nutriente limitante em muitos solos para o crescimento das plantas, normalmente são aplicadas altas doses de fertilizantes fosfatados para minimizar os impactos de sua baixa disponibilidade nas culturas, com cerca de 90% do fosfato natural extraído destinado a fertilizantes para a agricultura. O P é um recurso não-renovável que tem seu pico de exploração estimado para 2030, o que irá aumentar os custos de produção por ele ser finito, principalmente em países em desenvolvimento (Vance & Chiou 2011). Nesse contexto, o desenvolvimento de cultivares mais eficientes na aquisição e utilização de P é necessário para viabilizar práticas agrícolas sustentáveis. Plantas eficientes para aquisição e utilização de P reduzem a necessidade de fertilizantes fosfatos,

principalmente em países em desenvolvimento, evitando sua aplicação excessiva e, conseqüentemente, aumentando a produtividade nesses locais (Vance & Chiou 2011).

## 1.2 EFICIÊNCIA NA AQUISIÇÃO DE FÓSFORO

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. Esses mecanismos podem ser agrupados em duas principais categorias: eficiência de aquisição, que é capacidade de absorver o nutriente do solo e eficiência de utilização interna, que é a capacidade de produzir matéria orgânica por unidade de nutriente absorvido (Rengel & Marschner 2005; Lambers *et al.* 2010).

A eficiência de utilização interna do P está relacionada a uma melhor utilização do P disponível, com modificações metabólicas envolvidas nesse processo, tais como: mobilização do P de partes senescentes da planta para tecidos com crescimento ativo, re-utilização do fosfato a partir de vacúolos, substituição de fosfolipídios por sulfo ou galactolipídios em membranas (Lambers *et al.* 2012; Vaneklaas *et al.* 2012; van de Wiel *et al.* 2016).

Os principais mecanismos ligados à eficiência de aquisição P são modificações de atributos morfológicos da raiz, modificações de características químicas na rizosfera, alterações de características fisiológicas de cinética de absorção, alterações em processos bioquímicos e interações com microrganismos, principalmente fungos micorrízicos (Marschner 1995; Lynch 1995; Ramaekers *et al.* 2010; Lynch & Brown 2012).

Para avaliar a importância relativa da eficiência na aquisição de P (EAQ) e utilização interna de P (EUTIL), 28 genótipos tropicais de milho foram cultivados em três ambientes com baixo P e dois ambientes com alto P (Parentoni & Souza Júnior 2008). Esses autores concluíram que em condições de campo, em solos com baixo P a EAQ foi duas vezes mais importante que a EUTIL, e em solos com alto P foi três vezes mais importante que a EUTIL.

Assim genótipos de plantas eficientes na absorção de P aumentam 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 (Rengel & Marschner 2005).

### 1.3 SISTEMA RADICULAR E A AQUISIÇÃO DE FÓSFORO

As raízes desempenham uma série de funções, como captação de água e nutrientes, ancoragem no solo, estabelecimento de interações bióticas na rizosfera. Portanto, mudanças no sistema radicular podem afetar diretamente a captação de água e nutrientes (Lopes-Bucio *et al.* 2003). Alterações no sistema radicular de plantas adaptadas a baixa disponibilidade de P incluem maior formação de raízes adventícias, menor diâmetro radicular, formação de raízes mais superficiais, formação de aerênquima, raízes laterais mais dispersas, maior biomassa, exsudação de ácidos orgânicos e fosfatases, micorrização, pelos radiculares mais longos e densos (Lynch 2007; Lynch 2011).

A arquitetura radicular, definida como a configuração espacial do sistema radicular ao longo do tempo, é essencial para o forrageamento da raiz em zonas distintas do solo e para competição entre raízes da mesma planta ou plantas vizinhas (Lynch 2007; Lynch 2011). Os principais processos que alteram a arquitetura do sistema radicular são divisão celular do meristema da raiz primária (células iniciais) que permite o crescimento indeterminado por adição de novas células à raiz, formação de raízes laterais que aumentam a capacidade de exploração do sistema radicular e formação de pelos radiculares que aumentam a superfície total da raiz primária e das raízes laterais (Lopes-Bucio *et al.* 2003).

No sistema radicular de monocotiledôneas e dicotiledôneas, a raiz primária é a primeira raiz a ser formada, derivada do tecido meristemático formado embrionariamente. As raízes primárias e maduras contêm tecido meristemático no ápice, que forma o conjunto de células meristemáticas que darão origem a outros tipos celulares da raiz (Dolan *et al.* 1993; Smith & Smet 2012). No entanto, a organização do tecido da raiz tem diferenças substanciais

entre *Arabidopsis thaliana*, uma dicotiledônea, e cereais, que são monocotiledôneas. De forma geral, os tecidos das raízes dos cereais são maiores e mais complexos. A raiz principal de cereais, como o milho e o arroz, tem de 10 a 15 camadas de células corticais em comparação com uma única camada de células nas raízes de *Arabidopsis*. Além disso, a população de células quiescentes é muito maior em milho, 800-1220 células, em comparação com as quatro de *Arabidopsis* (Hochholdinger & Zimmermann 2008; Smith & Smet 2012).

Ao contrário da raiz primária, as raízes laterais são pós-embrionárias. Em *Arabidopsis* e na maioria das dicotiledôneas, o periciclo (tecido localizado entre o cilindro vascular central e a endoderme) é o sítio de início das raízes laterais. Apesar das monocotiledôneas formarem raízes primária e lateral de forma semelhante às dicotiledôneas, seu sistema radicular é mais complexo, formando um sistema radicular “fibroso”, com vários tipos de raízes ramificadas, como as coronais, adventícias aéreas e seminais, que constituem a maior parte do sistema radicular. As raízes adventícias, presentes em mono e em dicotiledôneas, são pós-embrionárias e formadas na junção da raiz com parte aérea, para explorar as camadas superiores do solo, que são ricos em P (Smith & Smet 2012).

A arquitetura radicular difere significativamente entre monocotiledôneas e dicotiledôneas, mas as principais características adaptativas para adquirir P são comuns a todas as espécies de plantas vasculares (Niu *et al.* 2012). Em *Arabidopsis* sob condições de baixo P, o sistema radicular é mais ramificado com redução da raiz primária e aumento do comprimento e número de raízes laterais (Lopes-Bucio *et al.* 2003; Pérez-Torres *et al.* 2008), enquanto no milho, há um alongamento das raízes axiais (seminais e nodais) e manutenção da densidade de raízes laterais, com alongamento destas e posterior retardo à medida que o estresse aumenta (Mollier & Pellerin 1999). O alongamento de raízes axiais é um comportamento exploratório, possibilitando explorar locais no solo ricos em P (Lynch 2007). O comprimento e o número de raízes laterais variam entre genótipos, com alguns aumentando e outros diminuindo o comprimento e o número dessas raízes em condições de baixo P (Zhu & Lynch 2004). O sistema radicular de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. var. *Petit Havana* SR-1) analisado em meio de cultura com baixo P após 28 dias de germinação, apresentou um

aumento na razão raiz:parte área, no comprimento total de raízes em função da maior atividade no ápice, mas um menor número de raízes laterais em comparação com plantas com suprimento suficiente de P (Foti *et al.* 2014). A análise do sistema radicular de plântulas de tabaco (variedades K326 e Xiang Yan No. 4) em diferentes estágios de desenvolvimento em solução nutritiva no sistema de *floating* sob diferentes concentrações de P em estágios iniciais e tardios do desenvolvimento das plântulas mostraram que sob deficiência de P há um aumento da superfície radicular do tabaco, por meio do aumento do comprimento, das raízes laterais e dos pelos radiculares (Zheng *et al.* 2013).

O controle genético da eficiência de aquisição de P é complexo e até o momento foram descritos poucos genes envolvidos no desenvolvimento do sistema radicular. Alguns genes envolvidos no desenvolvimento do sistema radicular em milho e *Arabidopsis* são *Rtcs* (*rootless concerning crown and seminal roots*) (Taramino *et al.* 2007), *Rum1* (*rootless with undetectable meristems 1*) (Woll *et al.* 2005), *Tir1* (*transport inhibitor response 1*) e *Arf19* (*auxin response factor 19*) (Pérez-Torres *et al.* 2008).

#### 1.4 PLANTAS TRANSGÊNICAS

Plantas transgênicas são obtidas por técnicas de engenharia genética, por meio da modificação de seu DNA, com a introdução de uma nova característica que não ocorre naturalmente na espécie. Um ou mais genes podem ser inseridos artificialmente, denominado transgene, de uma espécie de planta relacionada ou de uma espécie totalmente diferente. Os organismos geneticamente modificados resultantes da transformação podem apresentar características distintas, como resistência a herbicida, insetos, pragas, vírus, melhor qualidade nutricional, dentre outras (Rani & Usha 2013).

O estudo da função biológica de genes ou conjunto de genes pode ser realizado em plantas transgênicas. Por meio da superexpressão, é possível analisar membros de famílias gênicas individualmente, caracterizar a função de genes de organismos não modelos através da expressão heteróloga e identificar

genes que conferem tolerância ao estresse em plantas resultante da introdução de transgenes (Abdeeva *et al.* 2012).

As primeiras plantas transgênicas foram reportadas em 1983 (Fraley *et al.* 1983). Desde então, muitas proteínas foram expressas em plantas como tabaco, milho, tomate, batata, banana e alfafa (Austin *et al.* 1994). O tabaco (*Nicotiana tabacum*) e a *Arabidopsis thaliana* são as plantas modelos mais comumente transformadas (Rani & Usha 2013), pois apresentam métodos de transformação bem estabelecidos, fácil propagação e genomas bem estudados (Koorneef & Meinke 2010). Os métodos de transformação mais usados são biobalística e o mediado por *Agrobacterium tumefaciens*.

### 1.5 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA VIA *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobactérias são bactérias gram-negativas do solo com estilo de vida predominantemente saprófito (Bourras *et al.* 2015). A *Agrobacterium tumefaciens* é o agente causal da doença conhecida como galha de coroa (Smith & Townsend 1907), caracterizada por um crescimento neoplásico no local da infecção (Escobar & Dandekar 2003). A infecção ocorre através da transformação genética da célula hospedeira, com a transferência de um fragmento de DNA fita simples, o T-DNA (DNA de transferência) para o genoma hospedeiro, onde ocorre sua integração de forma estável (Bourras *et al.* 2015).

A transformação genética da célula hospedeira leva a uma reprogramação oncogênica, propiciando um ambiente favorável para o patógeno. A capacidade que a *Agrobacterium* tem de transferir o T-DNA para outros organismos é utilizada como uma ferramenta para a transformação genética de plantas (Pacurar *et al.* 2011; Bourras *et al.* 2015), de leveduras (Piers *et al.* 1996), de fungos filamentosos (Michielse *et al.* 2005) e de células humanas (Kunik *et al.* 2001).

Naturalmente, a *Agrobacterium* infecta plantas dicotiledôneas. Apesar de as monocotiledôneas não serem suas hospedeiras naturais (Binns & Thomashow, 1988; Bourras *et al.* 2015), é possível transformar cevada, trigo, triticale e milho, com uma eficiência na obtenção de plantas transgênicas

estáveis de 86%, 10%, 4% e 24%, respectivamente (Hensel *et al.* 2009). Existem muitos trabalhos com transformação genética de plantas via *Agrobacterium*, com o objetivo de torná-las mais resistentes/tolerantes a estresses bióticos e abióticos. Por exemplo, Jung *et al.* (2015) superexpressaram em arroz (*Oryza sativa*) o gene *BrUGE1* (UDP-glucose 4-epimerase) da couve chinesa (*Brassica rapa*). Esse gene codifica uma enzima com papel essencial na interconversão dos açúcares UDP-D-glucose (UDP-Glc) e UDP-D-galactose (UDP-Gal), envolvidas na biossíntese da parede celular. Plantas transgênicas de arroz superexpressando o gene *BrUGE1* aumentaram a tolerância ao estresse salino e à doença causada pela infecção da bactéria *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. Pei *et al.* (2012) superexpressaram em milho o gene *TsVP* da planta *Thellungiella halophila*, responsável pela codificação da enzima vacuolar H<sup>+</sup>-pirofosfatase, que mantém o pH vacuolar, proporciona energia para transporte no tonoplasto e estimula o transporte de auxina. Linhagens de milho com o transgene *TsVP* apresentaram maior crescimento radicular, maior conteúdo e concentração de fosfato (Pi) e maior produtividade de grãos.

Um sistema repórter visual para monitorar a deficiência de P em tempo real no tabaco foi desenvolvido por Liu *et al.* (2014), usando o gene *Purple* (*Pr*) da couve-flor (*Brassica oleracea var botrytis*), que produz antocianina e sob controle do promotor do gene do transportador de fosfato em arroz *OsPT6*. Plantas de tabaco transgênicas superexpressando o gene *Pr*, sob deficiência de P acumulam antocianina nas folhas, possibilitando o monitoramento do estresse desse nutriente com base em cores (inspeção visual) e também pela intensidade do espectro de reflexão do pigmento por sensoriamento remoto hiperespectral.

## 1.6 *PSTOL1* (*PHOSPHORUS-STARVATION TOLERANCE 1*): GENE DE EFICIÊNCIA NA AQUISIÇÃO P EM ARROZ

Há vários estudos descrevendo QTLs (*Quantitative Trait Loci*) para características radiculares (Wissuwa & Ae 2001; Zeng *et al.* 2003; Hund *et al.* 2004; Zhu *et al.* 2005; Loudet *et al.* 2005; Ochoa *et al.* 2006; Liu *et al.* 2008; Ruta *et al.* 2010), porém eles ainda são pouco utilizados como critério de seleção

nos programas de melhoramento, uma vez que eles possuem efeitos pequenos, são influenciados pelo ambiente e poucos genes candidatos controlando esses *loci* foram identificados.

O QTL de efeito maior para absorção de P em arroz é o *Pup1* (*Phosphorus uptake 1*), que está associado ao aumento da superfície radicular e a eficiência na aquisição de P em arroz (Ni *et al.* 1998; Wissuwa & Ae 2001; Wissuwa *et al.* 1998). Em trabalhos com uma população de mapeamento derivada de Kasalath (eficiente na aquisição de P) e Nipponbare (ineficiente). Wissuwa *et al.* (2002) indicaram que *Pup1* responde por cerca de 80% da variabilidade fenotípica para características relacionadas com absorção de P em arroz. Gamuyao *et al.* (2012) identificaram o gene responsável pelo loco *Pup1*, *Phosphorus-starvation tolerance 1* (*Pstol1*), que codifica uma proteína quinase envolvida no desenvolvimento precoce do sistema radicular de arroz em condições de baixo P, na variedade tradicional Kasalath e ausente no genoma de referência do arroz (Nipponbare).

A superexpressão constitutiva da região codificante do gene *Pstol1* (35S::*Pstol1*) foi feita nas variedades modernas irrigadas de arroz IR64 e Nipponbare, que naturalmente não possuem o gene *Pstol1*. Análises fenotípicas em duas regiões com solos com baixo P mostraram que alta expressão do transgene aumentou a produtividade de grãos em mais que 60% em ambas as variedades de arroz. O peso seco de raiz, o total de P e o peso de grãos foram maiores em linhagens IR64 com alta expressão do transgene em comparação com plantas não transgênicas ou com baixa expressão do transgene em condições de baixo P. De forma semelhante o peso de grãos e o total de P foram maiores nas linhagens transgênicas de Nipponbare em relação às plantas controle ou com baixa expressão (Gamuyao *et al.* 2012).

A análise fenotípica de linhagens IR64 superexpressando o gene *Pstol1* foi feita em solução nutritiva, tratamentos de baixo (10  $\mu$ M) e alto P (100 $\mu$ M). Sob ambos os tratamentos, o comprimento total de raiz e a área de superfície foram significativamente maiores em plântulas transgênicas. Experimentos com linhagens semi-isogênicas (NILs IR64 e IR74) com e sem o loco *Pup1* também foram feitos, mostrando um significativo aumento no crescimento radicular sob alto e baixo P (Gamuyao *et al.* 2012).

Para analisar a expressão do gene *Pstol1* durante o desenvolvimento radicular, o gene repórter da  $\beta$ -glucoronidase (GUS) foi expresso em plantas transgênicas IR64 sob controle do promotor nativo do *Pstol1*. Expressão de GUS foi detectada no meristema, onde são formadas as raízes da coroa, principais constituintes do sistema radicular em arroz. No meristema radicular, a expressão de GUS foi restrita aos primórdios das raízes da coroa e células do parênquima fora do cilindro vascular periférico, padrão semelhante ao de outros genes envolvidos no desenvolvimento radicular. Esses dados indicam que, o gene *Pstol1* é um regulador do desenvolvimento precoce e do crescimento da raiz em arroz (Gamuyao *et al.* 2012).

#### 1.6.1 *SbPstol1*

Utilizando ferramentas de genômica comparativa, foi realizada uma busca por homólogos do gene *OsPstol1* no genoma de sorgo (*Sorghum bicolor*) por meio do mapeamento associativo utilizando dois painéis de associação de sorgo fenotipados para absorção de P, morfologia e arquitetura do sistema radicular em hidroponia, além da produtividade de grãos e do acúmulo de biomassa sob condições de baixo P no Brasil e/ou Mali. Seis genes candidatos *SbPSTOL1* foram identificados codificando proteínas preditas com identidade superior a 50% em relação ao *OsPstol1* (Hufnagel *et al.* 2014).

A validação por mapeamento de QTL biparental foi realizada em população de RILs proveniente de genótipos de sorgo contrastantes para absorção de P (BR007 x SC283). QTLs para morfologia radicular foram encontrados para os genes candidatos *Sb03g006765* (diâmetro de raiz e peso seco), *Sb03g031690* (comprimento de raiz, área de superfície radicular e volume de raízes finas) e *Sb07g002840* (peso seco de raiz e diâmetro radicular). Além disso, também houve forte associação dos genes *Sb03g006765* e *Sb03g031690* com características de arquitetura radicular (Hufnagel *et al.* 2014).

Os resultados encontrados por Hufnagel *et al.* (2014) sugerem que os genes *Sb03g006765*, *Sb03g031690* e *Sb07g002840* possuem um papel mais

geral no sistema radicular, alterando a morfologia e a arquitetura radicular, com ganho na produtividade em condições de baixo P.

### 1.6.2 *ZmPstol1*

Seis genes candidatos a homólogos do gene *OsPstol1* de arroz foram identificados no genoma do milho (*Zea mays*) (Azevedo *et al.* 2015). O mapeamento de QTL em uma população de RILs proveniente de dois genótipos contrastantes para aquisição de P (L3 x L22), com modelos para características simples (MIM) e múltiplas (MT-MIM) permitiu a identificação de treze regiões genômicas associadas a características de raiz, acúmulo de biomassa, teor de P em plântulas de milho.

Quatro genes (*ZmPstol3.06*, *ZmPstol4.05*, *ZmPstol8.02* e *ZmPstol8.05\_1*) co-localizaram com QTLs para características de raiz, acúmulo de biomassa e teor de P e dentre eles três genes (*ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02* e *ZmPstol8.05\_1*) foram mais expressos na raiz do que na parte aérea em condições de baixo P (Azevedo *et al.* 2015). Além disso, tiveram expressão gênica maior na linhagem parental doadora dos alelos favoráveis. 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 a área de superfície radicular foram significativamente maiores nas plantas que carregavam o *Pstol1* (Gamuyao *et al.* 2012).

## 2 OBJETIVO

Superexpressar em tabaco os genes *OsPstol1* e seus homólogos de milho e sorgo visando verificar a funcionalidade quanto ao aumento da superfície radicular.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ÁRVORE FILOGENÉTICA DE PROTEÍNAS QUINASES DE ARROZ, MILHO, SORGO E TABACO

Utilizando a sequência de aminoácidos do OsPstol1 (BAK26566) foram realizadas buscas contra banco de dados do genoma de tabaco ([http://solgenomics.net/organism/Nicotiana\\_tabacum/genome](http://solgenomics.net/organism/Nicotiana_tabacum/genome)) usando BLASTp.

As nove proteínas preditas de tabaco com mais de 50% de identidade foram selecionadas e alinhadas utilizando o software ClustalX versão 1.83 (Thompson *et al* 1997). O alinhamento incluiu as proteínas preditas do *Pstol1* de arroz, de milho (*ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02* e *ZmPstol8.05\_1*) e de sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*). As sequências de aminoácidos foram analisadas pelo método *Neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987) utilizando o programa NEIGHBOR (PHYLIP, Phylogeny Inference Package version 3.57c; Felsenstein 1993) e distâncias PAM (Dayhoff *et al.* 1978), obtidas com o programa PRODIST (PHYLIP). O *bootstrap* na análise *Neighbor-joining* foi feita com o programa SEQBOOT (PHYLIP). As árvores foram visualizadas com o programa TREEVIEW (Page 1996).

#### 3.2 CLONAGEM DO GENE PSTOL1 E DE SEUS HOMÓLOGOS EM MILHO E SORGO

As regiões codificantes do gene *Pstol1* de arroz (*OsPstol1*– 975pb), dos homólogos de milho (*ZmPstol3.06* – 1026 pb, *ZmPstol8.02* – 1332 pb e *ZmPstol8.05\_1* – 1128 pb) e de sorgo (*Sb07g002840* – 1815pb, *Sb03g031690* – 1938 pb e *Sb03g006765* – 1821 pb) 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>) (FIG 1). 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 (FIG. 1). As sequências utilizadas foram BAK26566 para arroz (Gamuyao *et al.* 2012), *ZmPstol8.02* e *ZmPstol8.05\_1* provenientes da linhagem de milho L22 e *ZmPstol3.06* da linhagem de milho L3, sequenciadas por Negri (2015) e *Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765* que foram sintetizadas com base no genoma referência de sorgo BTx623 (Anexo 1).

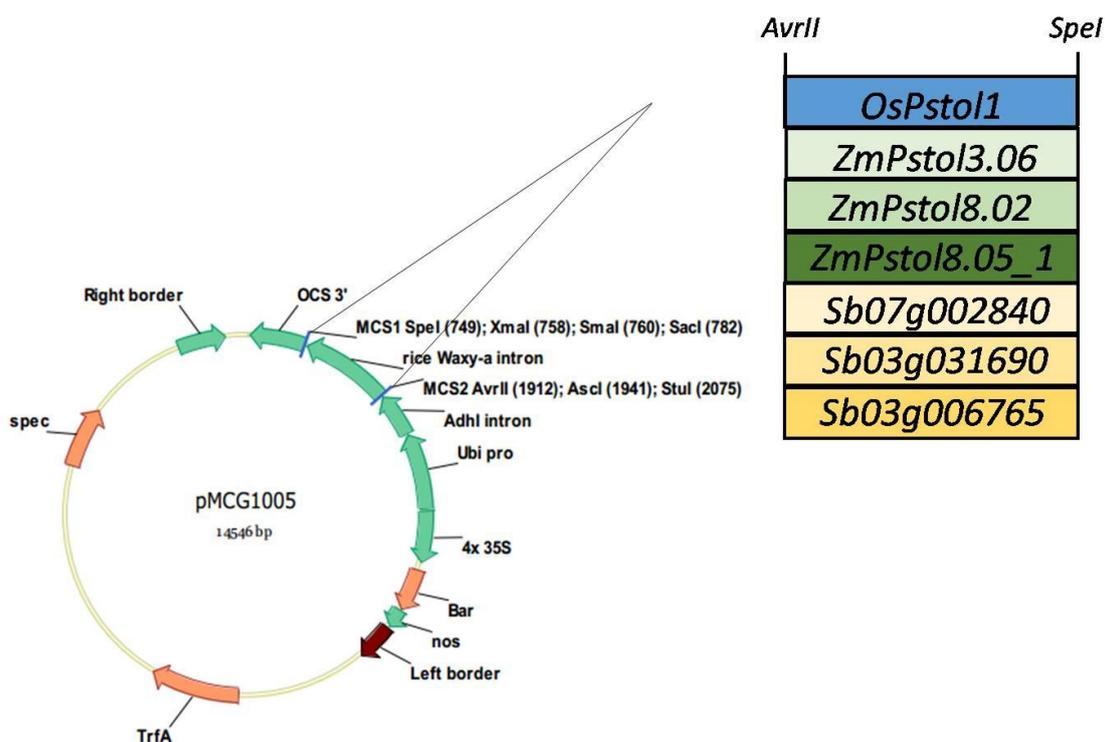


Figura 1 - Vetor binário pMCG1005 com o promotor ubiquitina no sítio de clonagem dos fragmentos e o marcador de seleção gene *Bar* sob promotor 4x35S, regiões codificantes dos genes *OsPstol1*, homólogos de milho (*ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02* e *ZmPstol8.05\_1*) e de sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*) sintetizadas e clonadas nos sítios *AvrII* e *SpeI*.

### 3.3 TRANSFORMAÇÃO DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* COM OS GENES CANDIDATOS

A inserção do cassete de expressão em *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (Hood *et al.* 1986) foi feita pela adição do vetor binário em células eletrocompetentes via 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 ressuspensa em 200 µL de meio YEP. Foram plaqueados 50 µL dessa suspensão em meio YEP sólido com os antibióticos canamicina, espectinomicina e clorofenicol. As placas foram incubadas a 28 °C por três dias. Uma colônia de cada construção gênica foi isolada e 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 & Russel (2001). Foi aplicado 1,0 µL do DNA plasmidial em gel de agarose 0,8% para confirmar a transformação.

### 3.4 TRANSFORMAÇÃO DE TABACO COM OS GENES CANDIDATOS

As plântulas de *Nicotiana tabacum* cv. *Petit havana*, mantidas *in vitro*, e com aproximadamente 5 cm de altura foram utilizadas para a transformação via *Agrobacterium tumefaciens*. As culturas de *Agrobacterium* contendo as construções gênicas UBI::pMCG1005::NOS, UBI::OsPstol1::NOS, UBI::ZmPstol3.06::NOS, UBI::ZmPstol8.02::NOS, UBI::Zmpstol8.05\_1::NOS, UBI::Sb07g002840::NOS, UBI::Sb03g031690::NOS e UBI::Sb03g006765::NOS foram colocadas em contato com discos foliares de tabaco em uma placa de Petri, durante 1 minuto. Após serem agitados, os explantes foram transferidos para o meio PSM (Shooting Medium – Anexo 2), 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 100 mg/L tioxin. Após sete dias foram transferidos para um novo meio PSM + antibiótico + 1 mg/L PPT (fosfotricina) e subcultivadas a cada

sete dias até que calos aparecessem e ocorresse a diferenciação das folhas. As plântulas foram isoladas (com cerca de 1 cm de comprimento) e transferidas para meio de enraizamento PRM (Anexo 2) + antibiótico suplementado com 1 mg/L PPT. As plântulas transformadas e enraizadas foram transferidas para o solo. Nova seleção com herbicida PPT foi feita borrifando solução de 1mg/ml sobre as folhas das plantas em casa de vegetação. Plantas resistentes ao herbicida permaneceram verdes, enquanto plantas sensíveis apresentaram folhas com coloração amarelada e morreram.

### 3.5 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS

Com o intuito de verificar a inserção dos cassetes de expressão nas linhagens transgênicas de tabaco regeneradas foram realizadas reações de PCR utilizando 10 ng/ $\mu$ L de DNA genômico extraído de cada linhagem usando o método de Saghai-Marooof *et al.* (1984), 10  $\mu$ M primer direto, 10  $\mu$ M primer reverso, tampão 10X, dNTP's 2,5  $\mu$ M, *Taq* DNA Polimerase Platinum Invitrogen 500 U, DMSO 20% e água ultra pura para um volume final de 20  $\mu$ L de reação. As condições do ciclo no termociclador foram: 94 °C durante 2 minutos, seguido de uma ciclagem de 35 vezes: 94 °C por 20 segundos para desnaturação da dupla fita de DNA, 62°C por 30 segundos para anelamento dos primers e 72 °C por 30 segundos para extensão, terminando com 72°C por 5 minutos. Para a amplificação do DNA genômico foram utilizados um primer senso na região promotora e um primer complementar à região codificadora do gene de interesse (TAB. 1).

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados para confirmar a inserção do transgene.

Primers	Sequências 5' - 3'	Tamanho fragmento
ubi_127_F	GTGTTTAGCAAGGGCGAAAA	
pOsPST1_580_R	TCAGATGGCACAGTTTGCTC	707 pb
pSbPST28_540_R	CAGCGGGTAGGTAAGCAAGA	667 pb
pSbPST 31_594_R	TTGGTAGGGCACCTCTGAAG	721 pb
pSbPST67_611_R	CACTCCACGAGAAACCCATT	738 pb
pZmPST1_606_R	TAGGTATTCGAGCCCTCTGG	733 pb
pZmPST4_543_R	GGCCAATCCAAAGTCAGAGA	670 pb
pZmPST6_609_R	CCATCCTAAAACCTGCCTTCG	736 pb
Bar F1	AGAAACCCACGTCATGCC	427 pb
Bar R1	GTGGTTGACGATGGTGCA	

### 3.6 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CÓPIAS DO TRANSGENE POR qPCR

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens de linhagens transgênicas T<sub>0</sub> de acordo com Saghai-Marroof *et al.* (1984) e usado a uma concentração de 20ng/μL. As reações de PCR quantitativo foram conduzidas no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando o kit Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) seguindo as recomendações do fabricante. A estimativa do número de inserções do transgene no genoma de tabaco foi feita conforme Barros *et al.* (2011) e Zhang *et al.* (2014). Como referência de cópia única foram usados os primers para o gene *Axi1* (SUBR *et al.* 2006) de tabaco e para o transgene, primers do gene *Bar* (marcador de seleção no cassete de transformação, sequências: bar-F 5'ACAGCGACCACGCTCTTGA3' e bar-R5'GCTCTACACCCACCTGCTGA3').

Inicialmente, a estimativa do número de cópias do transgene foi calculada para amostras aleatórias de cada construção gênica utilizando a fórmula  $2^{Ct_{\text{reference}} - Ct_{\text{transgene}}}$ , onde não é preciso uma linhagem calibradora com cópia única do transgene (Zhang *et al.* 2014). A partir dessa análise, uma amostra com cópia única do transgene foi selecionada como calibradora e usado o método de Barros *et al.* (2011), no qual se utiliza a equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen 2001), para quantificar níveis de expressão relativa.

A reação foi composta por 2,5 µL de DNA genômico 20ng/µL, 5 µL do reagente Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,6 µL de cada primer e 1,3 µL de água ultra pura. As condições do termociclador foram: 95 °C por 20 segundos uma vez, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos.

### 3.7 TESTE DE SEGREGAÇÃO EM EVENTOS TRANSGÊNICOS

Sementes de eventos transgênicos de tabaco foram germinadas em meio MS (Murashige & Skoog 1962) sem agente de seleção. Plântulas com 20-35 dias após a germinação foram usadas para extração de DNA genômico pelo método de Saghai-Marooof *et al.* (1984). Reação de PCR para confirmar presença e ausência dos genes de interesse e padrões de segregação mendeliana foi feita, utilizando-se as mesmas condições descritas no item 2.4 e os primers TAB. 1.

A análise de segregação foi feita usando o teste de  $\chi^2$  em que os valores observados foram comparados com os valores teóricos correspondentes para a integração de uma ou mais cópias do transgene (Tizaoui & Kchouk 2012).

### 3.8 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS TRANSGENES POR qPCR

Sementes de eventos transgênicos de tabaco foram desinfetadas com hipoclorito de sódio 6% por 5 minutos, lavadas com água destilada e germinadas em frascos com meio de cultura MS ½ (Murashige & Skoog – Anexo 2) polimerizado com ágar Sigma, sob tratamento de baixo P (97 µM de P).

O RNA total foi extraído de plântulas inteiras de tabaco (57 dias após germinação) utilizando o kit Plant RNeasy (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante. A concentração do RNA foi determinada pela leitura de absorbância a 260, 280 e 320 nm e a qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 2%. 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).

As análises de PCR quantitativo (qPCR) foram realizadas no equipamento ABI7500 utilizando a metodologia *Taqman* e SYBR Green, segundo as recomendações do fabricante. Foi utilizado um par de primers 18S ribossomal TaqMan® (Life Technologies, Reino Unido) e um par de primers 18S ribossomal SYBR Green como controle endógeno e primers específicos para os genes *Bar*, *OsPstol1*, *ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02*, *ZmPstol8.05\_1*, *Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765* (TAB. 2). A reação para o ensaio *Taqman* foi composta por 2,0 µL do ensaio (primer e sonda), 10 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life Technologies, Reino Unido), 6,0 µL de água ultra pura e 2,0 µL de cDNA. As condições do termociclador foram: 50 °C por 2 minutos, seguida por um aquecimento de 95 °C por 10 minutos por uma única vez e, depois, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. A reação para o ensaio com Syber Green foi composta por 2,5 µL de cDNA, 5 µL do reagente Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1,0µL de cada primer (exceto para primer do gene *Bar*, 0,6µL ) e 1,3 µL de água ultra pura. As condições do termociclador foram: 95 °C por 20 segundos uma vez, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos.

A expressão gênica relativa foi calculada conforme o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak & Schmittgen , 2001) utilizando a seguinte equação:

$$ER = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Onde:

ER = expressão relativa

$$\Delta\Delta Ct = Ct_{\text{gene - alvo}} - Ct_{\text{normalizador}}$$

Ct = “Thresholdcycle”, ciclo em que a fluorescência do alvo se torna significativamente maior que o “ruído” (“background”)

Tabela 2 - Sequências dos primers e sondas utilizados nos ensaios de expressão gênica *Taqman* e *Sybr* das plantas transformadas com genes candidatos.

Primers	Sequências 5' - 3'	Ensaio usado
Bar F	ACAGCGACCACGCTCTTGA	<i>Sybr</i>
Bar R	GCTCTACACCCACCTGCTGA	
OsPstol1-F	GTTTGTGGTGCATACTCGT	<i>Sybr</i>
OsPstol1-R	GGTTCCTCAAAAACAGAAGATG	
Sb03g006765 F	CGCCGACGATGAACATCTC	<i>Sybr</i>
Sb03g006765 R	TGGCTCTGCTGAAGACGAA	
Sb07g002840 F	CACCAGCCTCGATTTTCATACAA	<i>Sybr</i>
Sb07g002840 R	AGCCGCACCGGAAGTAGAC	
Sb03g013690 F	CGCTCCTCCTTGCTGTCTTG	<i>Sybr</i>
Sb03g013690 R	TGTAATCGTCGTCGGAAGGAT	
ZmPstol8.05_1 F	ATCAAAAAGAAAAGAAGCAGCA	<i>Taqman</i>
ZmPstol8.05_1 R	AAGGATGTGAGAATGACTAGACAC	
ZmPstol8.05_1 Sonda	AACGGCAACAGCACCAACAATAGG	
ZmPstol3.06 F	AGTATCAGCAGGACTTGTCATG	<i>Taqman</i>
ZmPstol3.06 R	CGCCCTCTTGGATCCTTG	
ZmPstol3.06 Sonda	CAAGCAGAACCCCGTCAGTGTC	
ZmPstol8.02 F	CAGGAATTTCACTGCAACTAGACGACCA	<i>Taqman</i>
ZmPstol8.02 R	CCGTCACCTTTGGAGTCATG	
ZmPstol8.02 Sonda	TGGTTTTCAAGGGAAGGCTAG	

### 3.9 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO SISTEMA RADICULAR

As sementes de tabaco foram germinadas em placas de Petri convencionais com meio de cultura MS ½ sob tratamento de baixo P (97 µM de P). Após a germinação, foram selecionadas duas plântulas uniformes por placa com três repetições que foram transferidas para placas de Petri com dimensões de 150mm x 25mm com o mesmo meio. Os experimentos foram realizados em câmara de crescimento com temperatura diurna média de 27 ± 3 °C, noturna de 20 ± 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 equipado com unidade de luz adicional (TPU) e os dados analisados com o software WinRhizo v. 4.0 (Regent Systems, Quebec, Canadá), sendo quantificadas as seguintes características radiculares, comprimento total (cm), área projetada (cm<sup>2</sup>),

superfície total ( $\text{cm}^2$ ), média de diâmetro (mm), comprimento total por metro cúbico de solo, ( $\text{cm}/\text{m}^3$ ), volume total ( $\text{cm}^3$ ), número de pontas, número de intersecções, número de ramificações. Além de comprimento de raiz (C), área de superfície (AS), área projetada (AP), volume (V) e número de pontas (P) dividido nos seguintes diâmetros  $0,0 < X \leq 1,0$  e  $1,0 < X > 4,5$  (de Sousa *et al.* 2012).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ÁRVORE FILOGENÉTICA DE PROTEÍNAS QUINASES DE ARROZ, MILHO, SORGO E TABACO

A análise filogenética feita pelo método Neighbour-Joining entre as proteínas PSTOL1 preditas de tabaco com identidade maior do que 55% com a OsPSTOL1, as proteínas de arroz, milho e sorgo mostrou que as proteínas de tabaco se agruparam separadamente das demais (FIG. 2). Todas as proteínas apresentam o domínio serina-treonina quinase em comum, porém apresentam diferenças nas sequências e por isso a inserção dos genes heterólogos em plantas de tabaco provavelmente não deve silenciar os genes *Pstol1*.

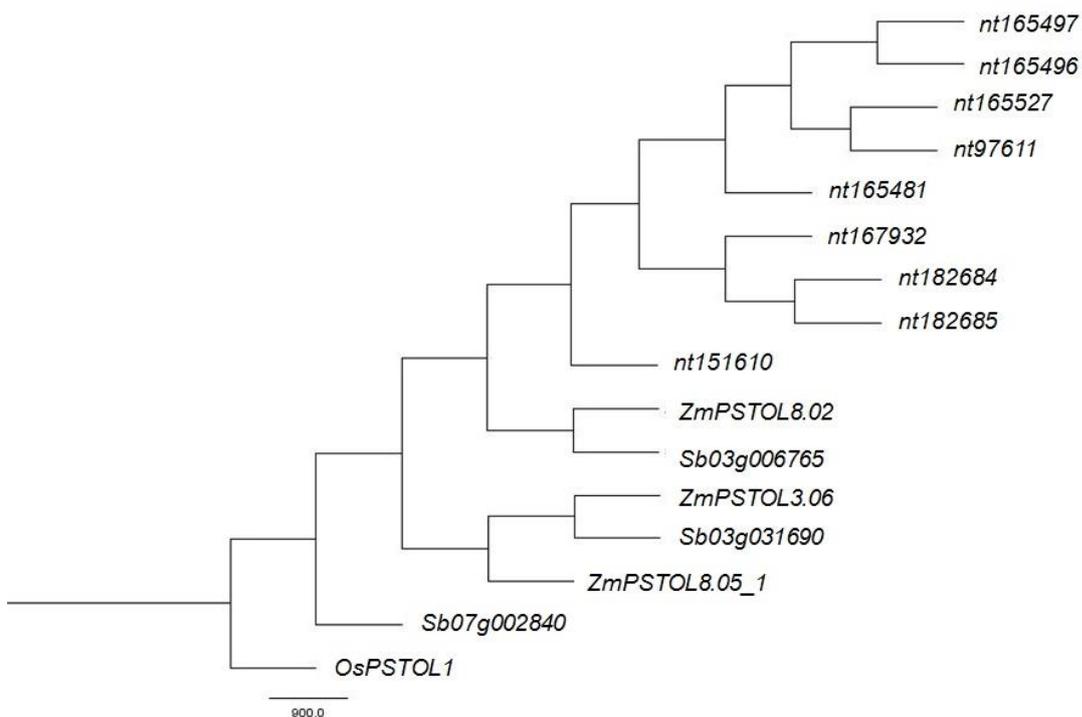


Figura 2 - Análise filogenética das proteínas quinases de arroz (*OsPSTOL1*), de milho (*ZmPSTOL8.05\_1*, *ZmPSTOL3.06* e *ZmPSTOL8.02*), de sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*) e de tabaco (*nt151610*, *nt165527*, *nt165497*, *nt182684*, *nt167932*, *nt165481*, *nt97611*, *nt165496*, *nt182685*). A análise filogenética das proteínas foi feita pelo método Neighbour-Joining.

## 4.2 TRANSFORMAÇÃO DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* COM OS GENES CANDIDATOS

Os genes de interesse (*OsPstol1*, *ZmPstol8.05\_1*, *ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02*, *Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*) foram corretamente inseridos em *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101, uma vez que o padrão de bandas do vetor pMCG1005 foi confirmado, conforme observado na FIG. 3.

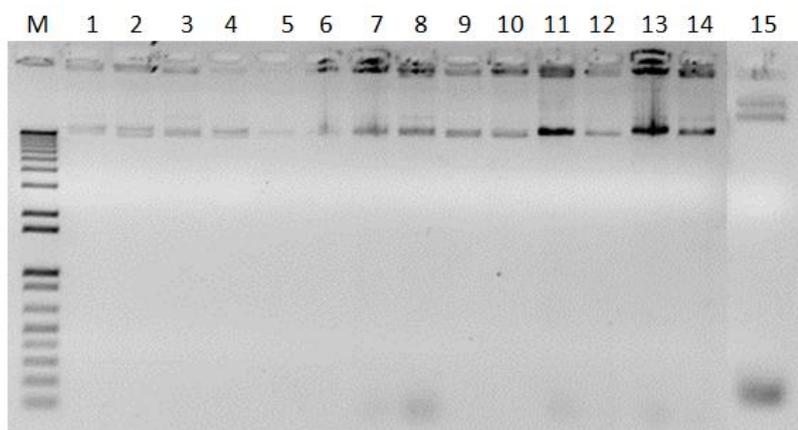


Figura 3 - Gel de agarose para visualização da inserção do plasmídeo com as construções de interesse em *Agrobacterium tumefaciens*. M – Marcador molecular 1kb Ladder (Invitrogen); 1 - *OsPstol1* colônia 1; 2 - *OsPstol1* colônia 2; 3 - *ZmPstol8.05\_1* colônia1; 4 - *ZmPstol8.05\_1* colônia 2 ; 5 - *ZmPstol3.06* colônia 1; 6 - *ZmPstol3.06* colônia 2; 7 - *ZmPstol8.02* colônia 1; 8 - *ZmPstol8.02* colônia 2; 9 - *Sb07g002840* colônia 1; 10 - *Sb07g002840* colônia 2; 11 - *Sb03g031690* colônia 1;12 - *Sb03g031690* colônia 2; 13 - *Sb03g006765* colônia 1; 14 - *Sb03g006765* colônia 2 e 15 - pMCG1005 vazio.

## 4.3 TRANSFORMAÇÃO DE TABACO COM OS GENES CANDIDATOS

Após a inserção dos cassetes de expressão na *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101, foi feita a transformação dos discos foliares a partir de plântulas de tabaco cultivadas *in vitro* (FIG. 4A) e o material foi selecionado com

herbicida fosfinotricina (PPT) (FIG. 4B) para selecionar os calos resistentes. Conforme pode ser observado na FIG. 4B, os calos resistentes exibem coloração esverdeada, enquanto os susceptíveis apresentam coloração marrom. O subcultivo dos explantes foi feito até o aparecimento dos calos e diferenciação das folhas (FIG. 4C). As plântulas foram isoladas, transferidas para meio de enraizamento (FIG. 4D) e transferidas para vasos com solo em casa de vegetação (FIG. 4E). As plantas foram selecionadas com herbicida PPT em casa de vegetação e as plantas sobreviventes foram testadas quanto a inserção do cassete de expressão e multiplicadas (FIG. 4F e 4G)

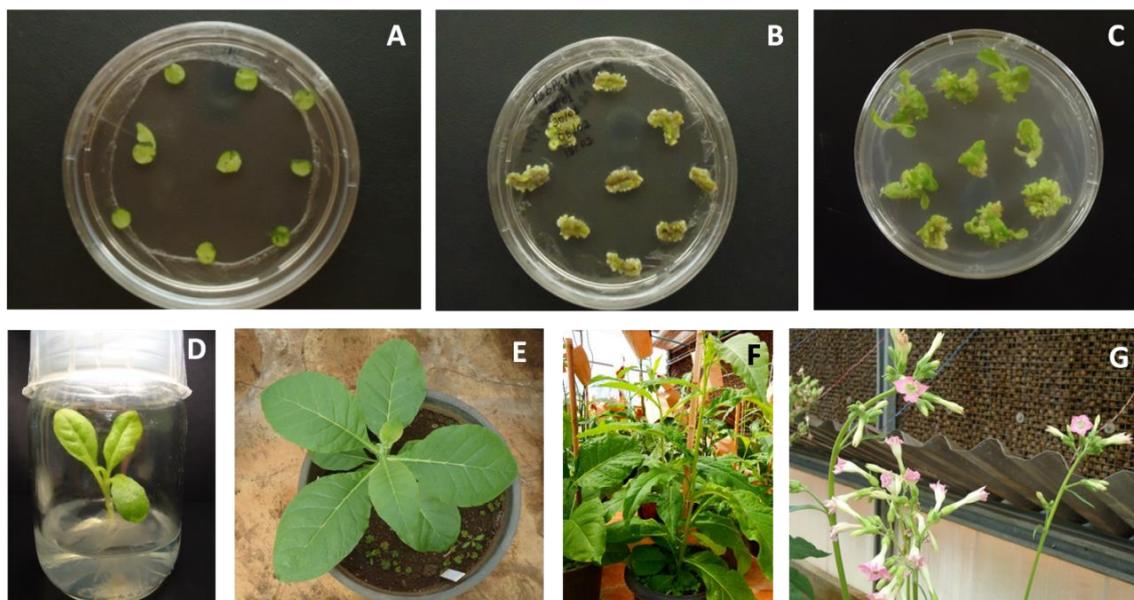


Figura 4 – Processo de transformação de tabaco. A- Discos de folha de tabaco no meio MS sólido com *Agrobacterium tumefaciens* com as construções pMCG1005-*OsPstol1*, *ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02*, *ZmPstol8.05\_1*, *Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*. B- Estágios iniciais da formação de calos no meio de seleção (fosfinotricina – 1.0 µM PPT), C- Desenvolvimento da parte aérea sob seleção, D- Plântula de tabaco enraizando *in vitro*, E- Planta de tabaco em pote com solo na casa de vegetação, F- Tabaco transgênico crescendo na casa de vegetação, G- Tabaco florescendo.

#### 4.4 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS

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, indicando a presença do gene *Bar* (FIG. 5). Já para a presença do inserto gene específico (FIG. 6), foram observadas cinco plantas positivas de quatorze avaliadas para *OsPstol1*, oito positivas de onze avaliadas para *ZmPstol8.05\_1*, seis positivas de seis avaliadas para *ZmPstol3.06*, sete positivas de sete avaliadas para *ZmPstol8.02*, oito positivas de oito avaliadas para *Sb03g031690* e dez positivas de dez avaliadas para *Sb03g006765*. A construção *Sb07g002840* apresentou apenas duas plantas transformantes em um total de sete avaliadas. Número total de eventos transgênicos por construção pode ser observado na TAB. 3 e quase todos os eventos estão representados nos géis da FIG. 5 e 6.

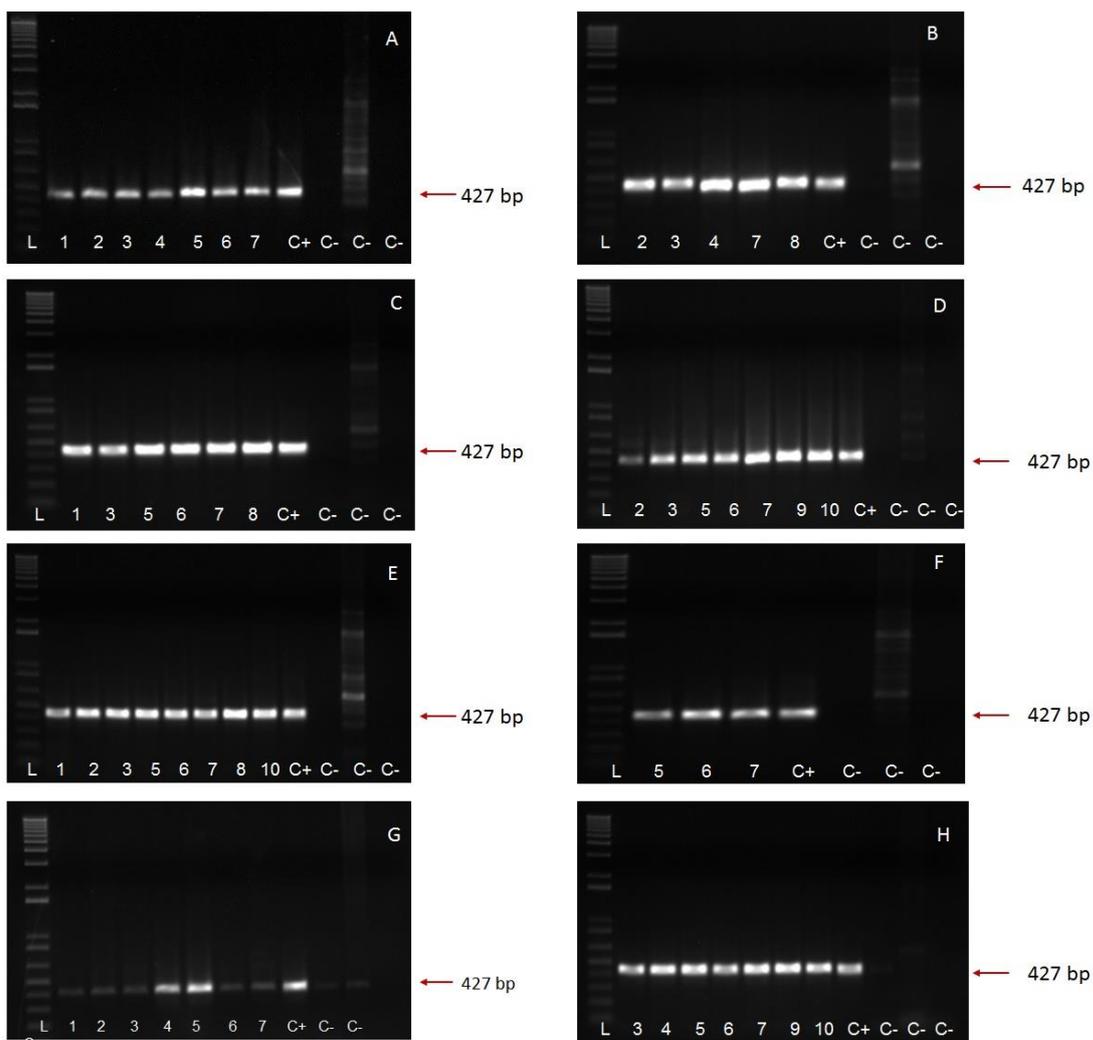


Figura 5 – Fragmentos amplificados por PCR para o gene *Bar* das plantas de tabaco transformadas e regeneradas com as construções de interesse. (A) *OsPstol1*, (B) *ZmPstol8.05\_1*, (C) *ZmPstol3.06*, (D) *ZmPstol8.02*, (E) *Sb03g031690*, (F) *Sb03g006765*, (G) *Sb07g002840*, (H) pMCG1005. L - 1 kb Plus Ladder (Invitrogen), 1 a 10 - Plantas regeneradas da transformação com *Agrobacterium tumefaciens*, C+: Controle positivo (plasmídeo), C-: Controle negativo (planta de milho selvagem, planta de tabaco selvagem e branco da reação – sem DNA, respectivamente). As setas indicam o tamanho do fragmento amplificado.

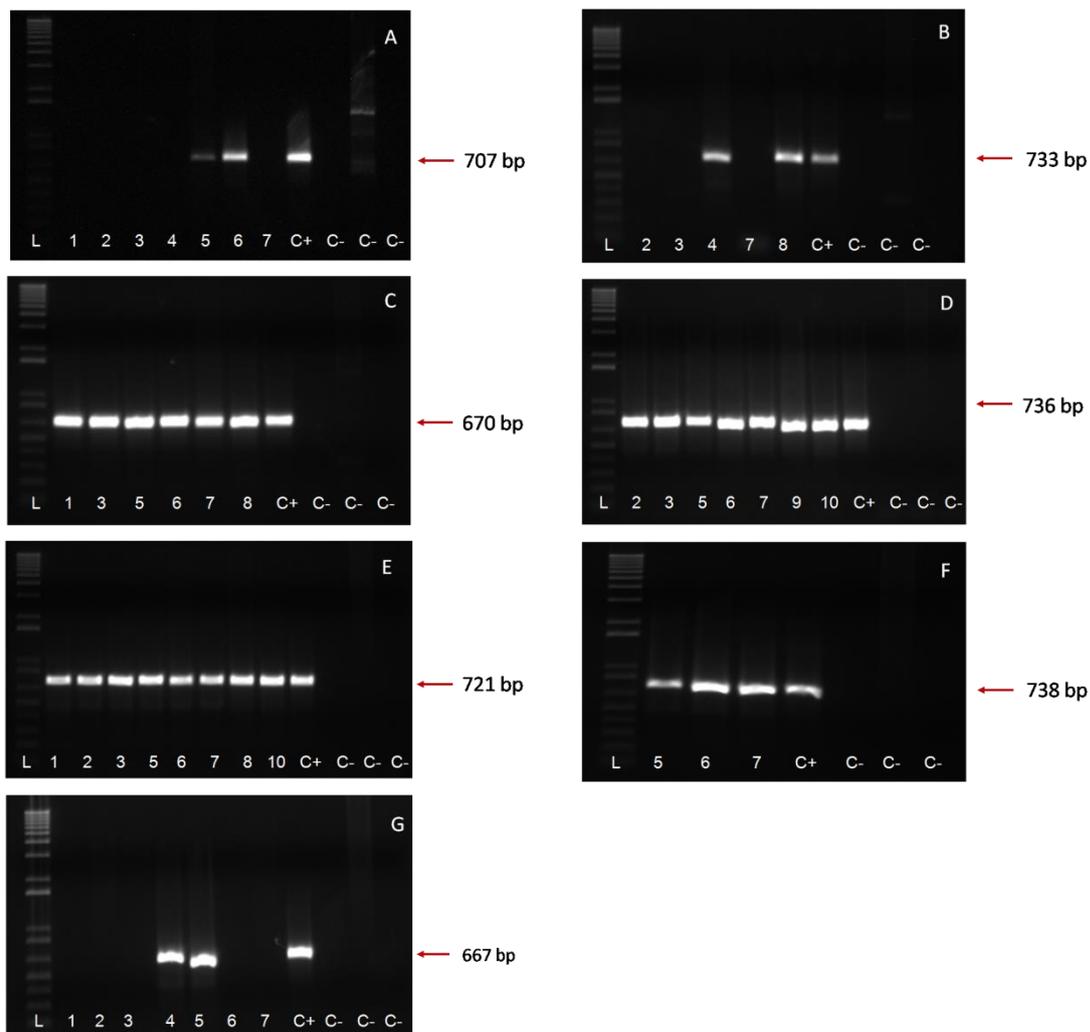


Figura 6 - Fragmentos amplificados por PCR para os genes de interesse das plantas de tabaco transformadas e regeneradas com as construções de interesse. (A) *OsPstol1*, (B) *ZmPstol8.05\_1*, (C) *ZmPstol3.06*, (D) *ZmPstol8.02*, (E) *Sb03g031690*, (F) *Sb03g006765*, (G) *Sb07g002840*. L - 1 kb Plus Ladder (Invitrogen), 1 a 10 - Plantas regeneradas da transformação com *Agrobacterium tumefaciens*, C+: Controle positivo (plasmídeo), C-: Controle negativo (planta de milho selvagem, planta de tabaco selvagem e branco da reação – sem DNA, respectivamente). As setas indicam o tamanho do fragmento amplificado. Os números em vermelho indicam as plantas positivas quanto a inserção do transgene.

Tabela 3 - Total de eventos transgênicos para cada gene candidato.

Construções	Total de eventos
pMCG1005 (4x35S::Bar::NOS)	7
UBI::OsPstol1::NOS	5
UBI::ZmPstol3.06::NOS	6
UBI::ZmPstol8.02::NOS	7
UBI::ZmPstol8.05_1::NOS	8
UBI::Sb07g002840::NOS	2
UBI::Sb03g031690::NOS	8
UBI::Sb03g006765::NOS	10

#### 4.5 ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CÓPIAS DO TRANSGENE POR qPCR

O número de cópias do transgene foi calculado pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , comparando-se cada amostra desconhecida com o DNA do evento 6 de *ZmPstol8.02*, que continha uma única cópia do transgene, confirmada pelo teste de segregação com proporção mendelina 3:1 neste evento. Como esperado, o tabaco não transformado não apresentou amplificação para o gene *Bar*. Eventos transformados apresentaram inserção de uma a três cópias do transgene conforme mostrado na TAB. 4.

Tabela 4 - Estimativas do número de cópias do transgene por qPCR calculado pelo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  em linhagens T<sub>0</sub> de tabaco.

Amostras	Nº de cópias ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	Segregação e valor $\chi^2$
Tabaco não transgênico	0,00	
pMCG1005 Ev. 3	0,52	
pMCG1005 Ev. 4	0,98	
pMCG1005 Ev. 5	2,70	
pMCG1005 Ev. 6	0,50	
pMCG1005 Ev. 7	1,12	3:1 (1,33)
pMCG1005 Ev. 9	0,39	
pMCG1005 Ev. 10	0,45	
<i>OsPstol1</i> Ev. 5	0,79	
<i>OsPstol1</i> Ev. 6	1,17	3:1 (0,85)
<i>OsPstol1</i> Ev. 11	1,72	
<i>OsPstol1</i> Ev. 21	0,80	
<i>OsPstol1</i> Ev. 22	0,80	
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.4	0,44	
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.8	0,62	
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.10	0,39	
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.11	0,32	
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.13	0,57	
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.14	0,39	
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.15	0,39	
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.16	0,34	
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.1	1,33	1:0 (7,33)
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.3	0,40	
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.5	1,35	
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.6	0,71	
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.7	0,55	
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.8	0,70	
<i>ZmPstol8.02</i> Ev.2	0,24	
<i>ZmPstol8.02</i> Ev.3	0,84	
<i>ZmPstol8.02</i> Ev. 5	0,39	
<i>ZmPstol8.02</i> Ev. 6	1,00	3:1 (0,01)
<i>ZmPstol8.02</i> Ev.7	1,54	
<i>ZmPstol8.02</i> Ev.9	1,37	
<i>ZmPstol8.02</i> Ev.10	0,70	
<i>Sb07g002840</i> Ev.4	0,49	
<i>Sb07g002840</i> Ev.5	0,44	
<i>Sb03g031690</i> Ev.1	0,52	
<i>Sb03g031690</i> Ev.2	0,37	
<i>Sb03g031690</i> Ev.3	0,58	
<i>Sb03g031690</i> Ev.5	0,41	
<i>Sb03g031690</i> Ev.6	0,40	
<i>Sb03g031690</i> Ev.7	0,83	
<i>Sb03g031690</i> Ev.8	0,32	
<i>Sb03g031690</i> Ev.10	0,42	
<i>Sb03g006765</i> Ev.5	0,72	
<i>Sb03g006765</i> Ev.6	0,74	
<i>Sb03g006765</i> Ev.7	0,96	
<i>Sb03g006765</i> Ev.12	1,00	
<i>Sb03g006765</i> Ev.13	0,59	
<i>Sb03g006765</i> Ev.19	0,69	
<i>Sb03g006765</i> Ev.20	0,83	
<i>Sb03g006765</i> Ev.21	0,94	
<i>Sb03g006765</i> Ev.29	0,80	
<i>Sb03g006765</i> Ev.30	0,66	

#### 4.6 TESTE DE SEGREGAÇÃO EM EVENTOS TRANSGÊNICOS

O teste de segregação foi feito por meio de reação de PCR (FIG.7) com os eventos pMCG1005 Ev. 7, *OsPstol1* Ev. 6, *ZmPstol3.06* Ev.1 e *ZmPstol8.02* Ev. 6, que apresentaram uma cópia do transgene no experimento descrito no item 4.5. Para o evento pMCG1005 Ev. 7 do total de dezesseis plântulas quatorze foram positivas para o gene específico e duas negativas (FIG.7A), no evento *OsPstol1* Ev. 6 (FIG.7B) de dezenove plântulas dezesseis foram positivas e três negativas, evento *ZmPstol3.06* Ev.1(FIG.7C) de vinte e duas plântulas todas foram positivas e evento *ZmPstol8.02* Ev. 6 (FIG.7D) de dezenove plântulas quatorze foram positivas e cinco negativas.

Teste de  $\chi^2$  foi feito nas plântulas com indivíduos positivos e negativos para o gene específico, obtendo valores de qui-quadrado a  $p < 0,05$  menores que o tabelado (3,481), mostrando que a segregação nesses eventos segue padrões de segregação Mendelianos 3:1.

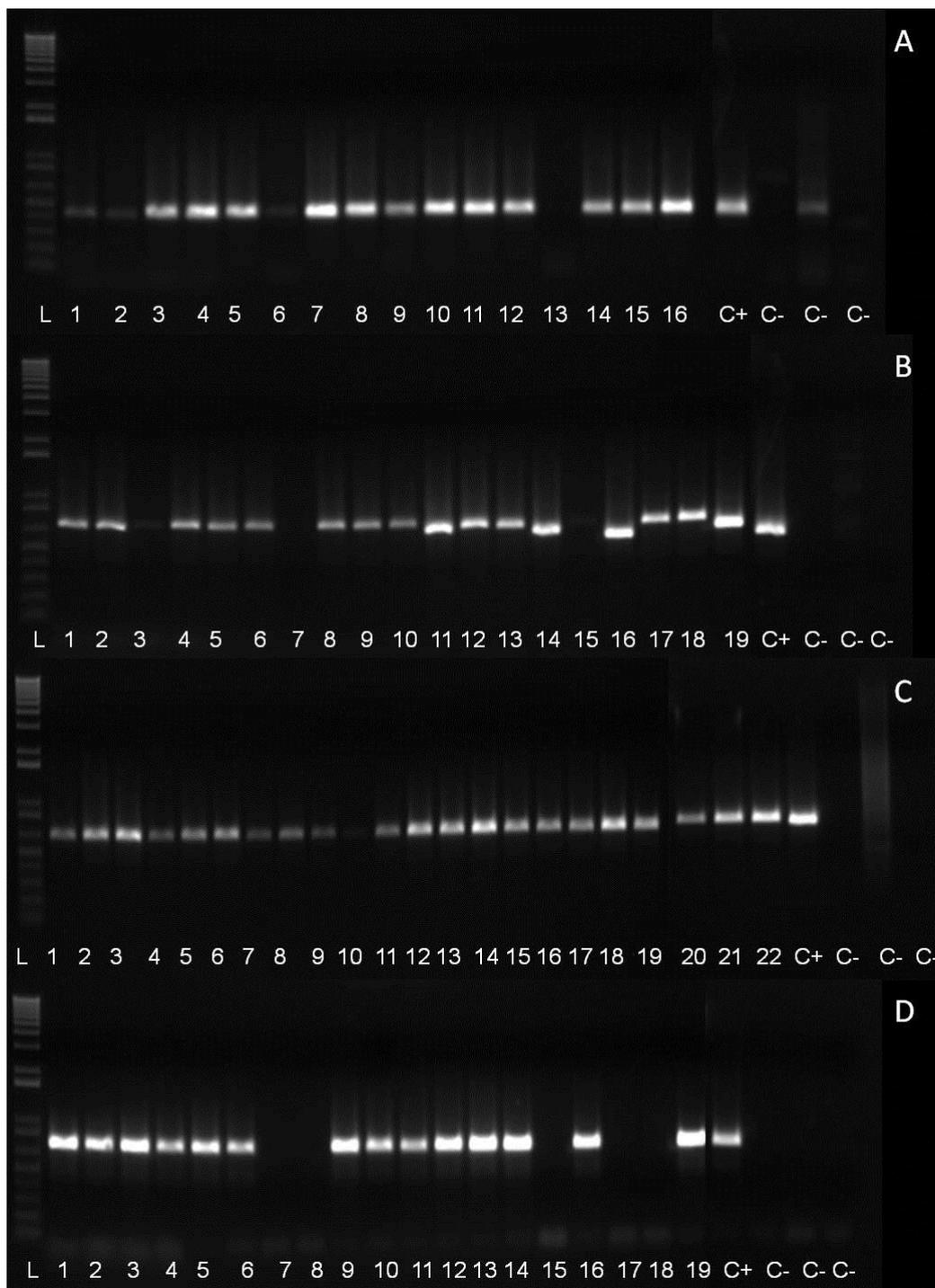


Figura 7 - PCR das plântulas de tabaco *OsPstol1* Ev. 6, *ZmPstol3.06* Ev.1 e *ZmPstol8.02* Ev. 6 utilizando primers específicos para os genes de interesse. L - 1 kb Plus Ladder (Invitrogen), 1 a 16 (A), 1 a 19 (B), 1 a 22 (C), 1 a 19 (D) – Plântulas crescidas em meio MS sem agente de seleção, C+: Controle positivo (planta positiva para o gene), C-: Controle negativo (planta de milho selvagem, planta de tabaco selvagem e branco da reação – sem DNA, respectivamente). Os números em vermelho indicam as plantas positivas por PCR.

#### 4.7 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS TRANSGENES POR qPCR

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 (FIG. 8). Os eventos pMCG1005 Ev. 4, *OsPstol1* Ev. 6 e *ZmPstol8.02* Ev. 3 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 e o número de cópias do gene *Bar*.

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*) (FIG. 9). Nesse caso, também houve variação da expressão gênica entre eventos individuais. Os eventos quatro e oito de *ZmPstol8.05\_1* mostraram padrão de expressão do gene *Pstol1* semelhante ao *Bar*. Todos os eventos expressaram os genes *Pstol1*, com exceção dos eventos *ZmPstol8.02* Ev. 3 e *ZmPstol8.02* Ev. 5, que apresentaram valores muito baixos de expressão.

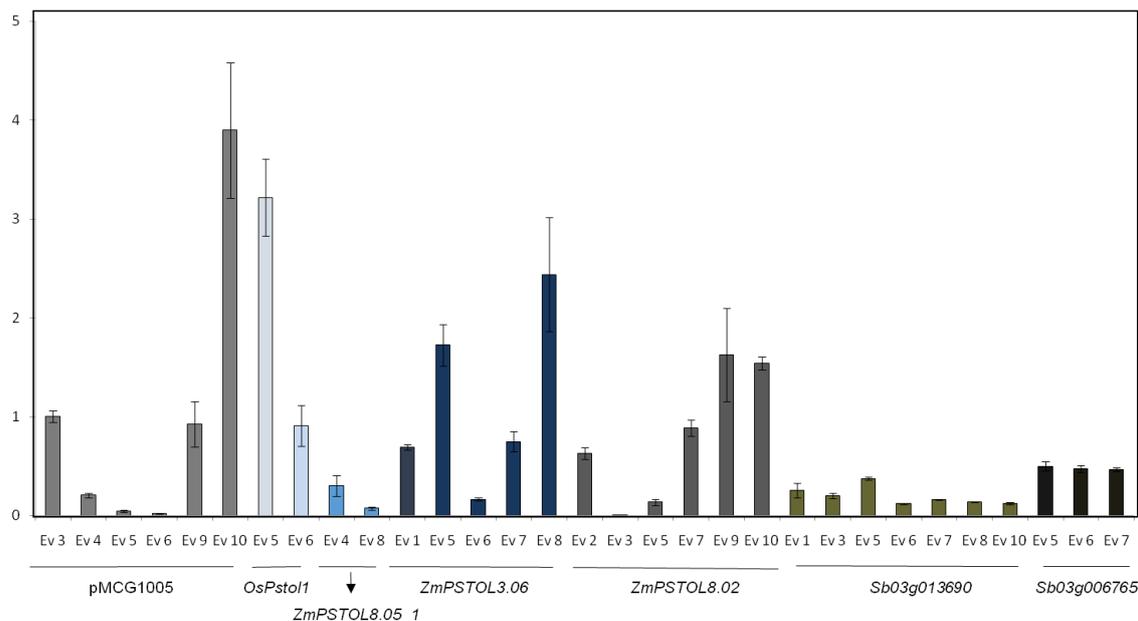


Figura 8 - Expressão do gene marcador de seleção *Bar* em eventos transgênicos das construções pMCG1005, *OsPstol1*, *ZmPstol8.05\_1*, *ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02*, *Sb03g013690* e *Sb03g006765*. A expressão gênica relativa foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . As barras de erro correspondem a SEM de 3 repetições técnicas com 20 plantas cada.

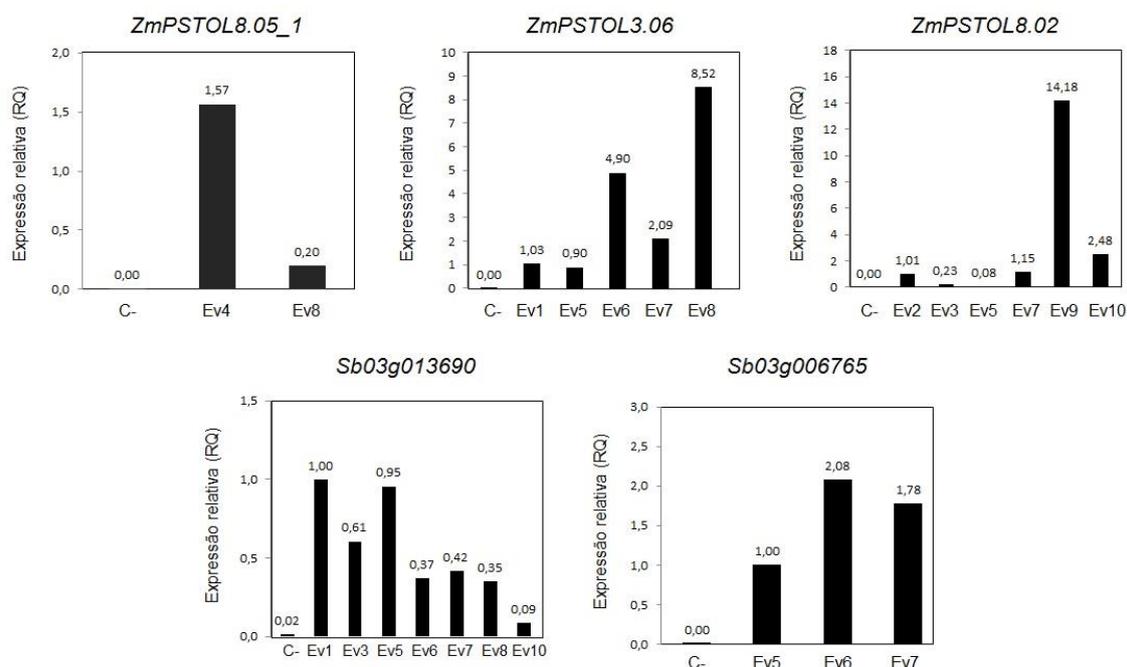


Figura 9 - Expressão dos genes *Pstol1* em eventos transgênicos das construções *ZmPstol8.05\_1*, *ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02*, *Sb03g013690* e *Sb03g006765*. A expressão gênica relativa foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

#### 4.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS TRANSGÊNICOS

Plântulas de tabaco com as construções gênicas pMCG1005 Ev. 10 (controle), *OsPstol1* Ev. 5, *ZmPstol8.05\_1* Ev. 8, *ZmPstol3.06* Ev. 5, *ZmPstol8.02* Ev. 3, *Sb03g031690* Ev. 1 e *Sb03g006765* Ev. 6 foram fotografadas antes da coleta de material para os ensaios de expressão gênica (FIG. 10, FIG. 11 e FIG. 12). As plântulas contendo construções *OsPstol1* Ev. 5, *ZmPstol8.05\_1* Ev. 8, *ZmPstol3.06* Ev. 5, *ZmPstol8.02* Ev. 3, *Sb03g031690* Ev. 1 e *Sb03g006765* Ev. 6 mostraram maior crescimento vegetativo (FIG. 10 e 11) e radicular (FIG. 12) do que as plântulas controle (vetor vazio). As plântulas contendo as construções *ZmPstol3.06* Ev. 5 e *ZmPstol8.02* Ev. 3 mostraram crescimento superior as demais construções (FIG. 10, FIG. 11 e FIG. 12). 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 (FIG. 10, FIG. 11 e FIG. 12).

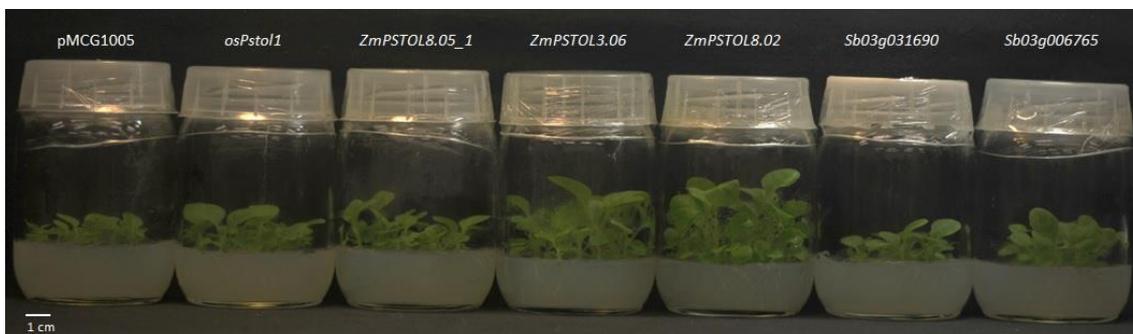


Figura 10 - Vista lateral das plântulas de tabaco crescidas em meio de cultura sob baixo P. Da esquerda para direita: pMCG1005 Ev. 10 (controle), *OsPstol1* Ev. 5, homólogos de milho (*ZmPstol8.05\_1* Ev. 8, *ZmPstol3.06* Ev. 5 e *ZmPstol8.02* Ev. 3) e homólogos de sorgo (*Sb03g031690* Ev. 1 e *Sb03g006765*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

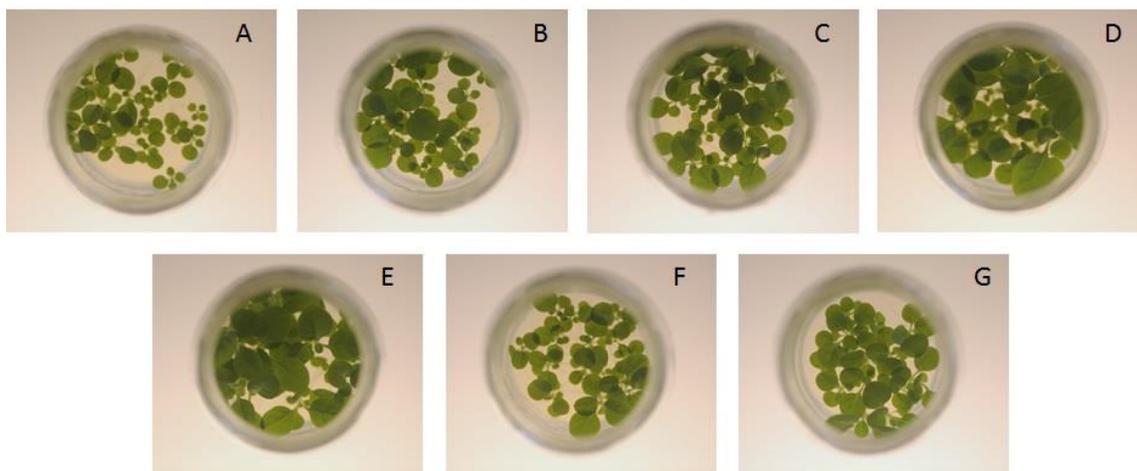


Figura 11- Vista superior das plântulas de tabaco crescidas em meio de cultura sob baixo P. A) pMCG1005 Ev. 10 (controle); B) *OsPstol1* Ev. 5; homólogos de milho: (C) *ZmPstol8.05\_1* Ev. 5, D) *ZmPstol3.06* Ev. 8 e E) *ZmPstol8.02* Ev. 3; homólogos de sorgo: (F) *Sb03g031690* Ev. 1 e G) *Sb03g006765* Ev. 6.



Figura 12 - 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).

#### 4.9 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO SISTEMA RADICULAR DOS EVENTOS TRANSGÊNICOS

Plântulas de tabaco dos eventos transgênicos foram crescidas em placas de petri com meio de cultura sob baixo P e o sistema radicular foi escaneado semanalmente. Foram medidos diversos parâmetros radiculares, sendo representados o comprimento radicular total e a área de superfície total durante um mês (FIG. 13). 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.

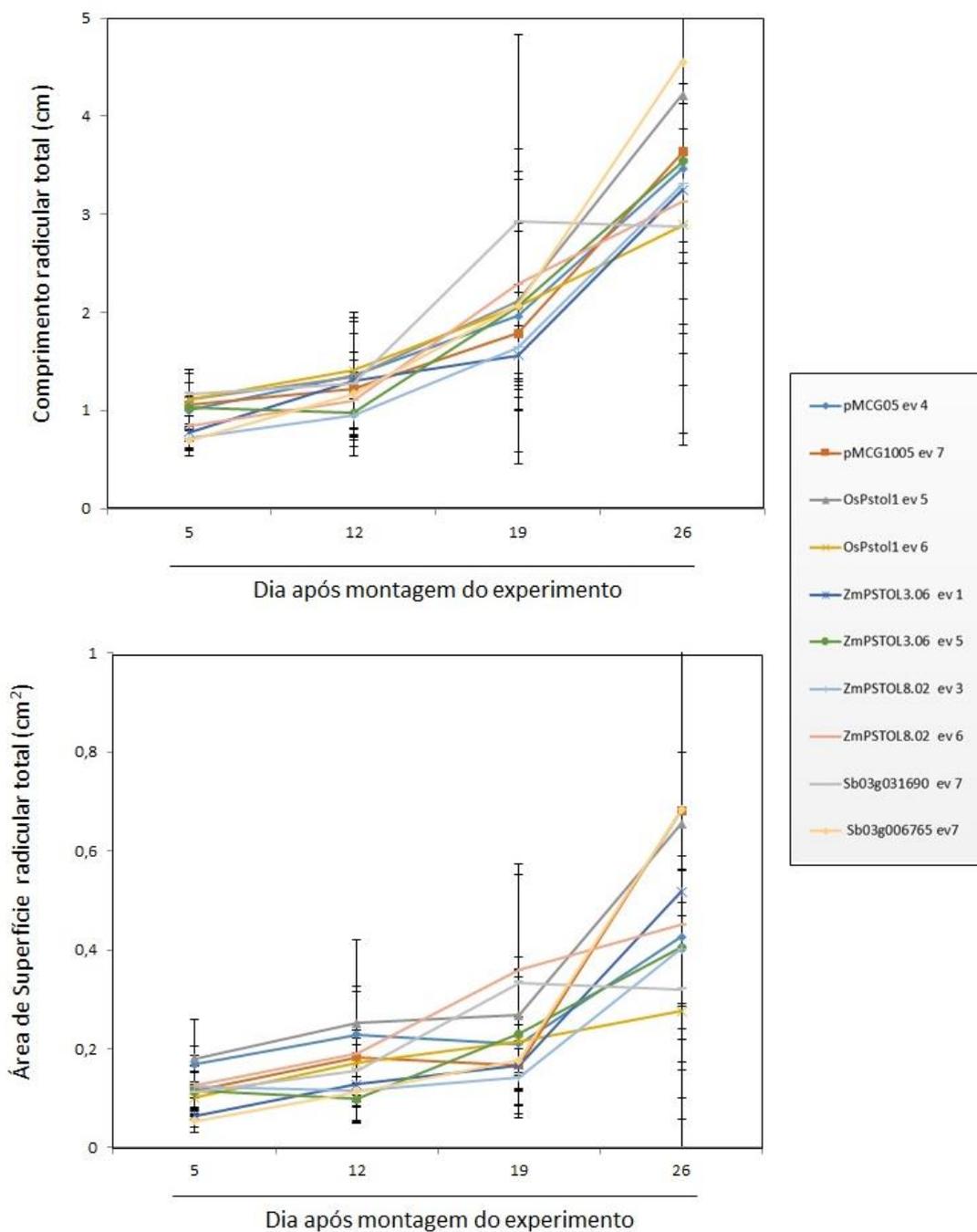


Figura 13 - Comprimento radicular total (cm) e área de superfície radicular total (cm<sup>2</sup>) de plântulas de tabaco transgênico crescidas em meio de cultura sob baixo P por 5, 12 e 19 e 26 dias após a montagem dos experimentos. As barras de erro correspondem a SEM de 3 repetições técnicas com duas plantas cada.

## 5 DISCUSSÃO

A deficiência de P ocorre em metade das terras agrícolas do mundo, o que impacta diretamente a produtividade das culturas, uma vez que este nutriente é essencial para seu crescimento, desenvolvimento e reprodução (Raghothama 1999; Abel *et al.* 2002; Lynch 2011). As plantas são capazes de alterações em seu sistema radicular, que incluem mudanças na arquitetura e na morfologia radicular, abrangendo uma maior área de superfície e assim absorvendo maior quantidade de P que se encontra nas camadas superficiais do solo (Marschner 1995; Lynch 1995; Rengel & Marschner 2005; Lynch 2007; Ramaekers *et al.* 2010; Lynch 2011; Lynch & Brown 2012). A identificação de genes relacionados com características do sistema radicular e eficiência na aquisição de P são importantes, uma vez que podem ser usados em programas de melhoramento para desenvolvimento de cultivares mais eficientes na aquisição de P e de outros nutrientes. O gene *Pstol1*, identificado em arroz, está relacionado ao desenvolvimento precoce de raízes em condições de baixo P e a eficiência de aquisição P (Gamuyao *et al.* 2012). Homólogos desse gene foram identificados em milho (Azevedo *et al.* 2015) e em sorgo (Hufnagel *et al.* 2014) por meio de mapeamento associativo e de QTL, porém há necessidade de validar as suas funções.

A árvore filogenética construída com as nove proteínas preditas de tabaco com identidade entre 55% e 58% a OsPSTOL1, e as demais proteínas de arroz, milho e sorgo mostrou que as proteínas de tabaco ficaram em um ramo separado das proteínas das gramíneas. Esses dados indicam que os genes *Pstol1* de arroz e seus homólogos de milho e sorgo inseridos em tabaco, provavelmente não serão silenciados. Tal fato é esperado quando o gene inserido no genoma vegetal possui homologia com algum gene endógeno (Vendruscolo 2003). O processo de silenciamento gênico envolve a interação de sequências homólogas de DNA ou RNA, no qual o RNA participa do silenciamento pós-transcricional, onde ocorre a degradação de mRNAs homólogos no citoplasma e do silenciamento transcricional, que está relacionado com o bloqueio da transcrição por um RNA antisense proveniente do próprio

DNA, causando metilação da região promotora no núcleo (Fagard & Vaucheret 2000; Vaucheret *et al.* 2001; Vendruscolo 2003).

A superexpressão constitutiva do *OsPstol1*, dos homólogos de milho (*ZmPstol8.05\_1*, *ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02*) e de sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690*, *Sb03g006765*) foi feita em plantas transgênicas de tabaco para verificar a funcionalidade desses genes em relação ao aumento da superfície radicular. Eventos transgênicos foram obtidos para todas as construções gênicas, mas com apenas dois eventos transformantes para o gene *Sb07g002840*. O conteúdo de CG dos genes analisados foi similar, o que não seria um parâmetro para justificar a redução no número de transformantes. No entanto, o gene *Sb07g002840*, diferentemente do *Sb03g031690* e *Sb03g006765* não tem o domínio WAK\_ASSOC na região C-terminal (Hunfnagel *et al.* 2014). O domínio WAK está relacionado à proteína de parede celular e pode funcionar como sensor, possivelmente percebendo as alterações ambientais e alterando o conteúdo de pectina, estrutura e atividade biológica da parede celular (Kanneganti & Gupta 2008). Já foi mostrado que proteínas WAK-quinases são necessárias para o alargamento normal das células e, além disso, em cevada e em arroz genes com esse domínio afetaram o crescimento radicular (Kanneganti & Gupta 2008, 2011; Kaur *et al.* 2013).

Do total de plantas analisadas para inserção do gene específico nas construções UBI::*OsPstol1*::NOS e UBI::*ZmPstol8.05\_1*::NOS, nem todas as plantas foram confirmadas para a presença o gene específico, mas apenas para o gene de seleção ao herbicida PPT, indicando que o método de seleção usado foi eficiente. A inserção do gene *Bar*, mas não do gene *Pstol1* 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).

A estimativa do número de cópias de linhagens transgênicas de tabaco por PCR em tempo real para o gene *Bar* mostrou a 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 cópia do transgene é desejável, pois eventos com cópia única são

geneticamente estáveis (Gadeleta *et al.* 2011). Resultados semelhantes com transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* foram encontrados em duas linhagens transgênicas de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi com inserção de uma cópia do transgene *AtWBC* (*Arabidopsis thaliana* ATP binding cassette (ABC) transporter) (Yuan *et al.* 2007) e em noventa e duas linhagens T<sub>0</sub> de algodão com inserção de uma a quatro cópias do gene *nptII* (*neomycin phosphotransferase tip II*) (Yang *et al.* 2013). Em comparação com a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, na transformação por biobalística ocorre integração de um grande número de cópias do transgene no genoma vegetal, o que pode levar ao silenciamento do transgene (Vyacheslavova *et al.* 2012).

Os transgenes são herdados sexualmente como uma característica dominante (Christou *et al.* 1989), com herança na proporção Mendeliana de 3:1 quando presentes em cópia única no genoma hospedeiro (Tizaoui & Kchouk 2012). O teste de segregação em eventos transgênicos mostrou segregação Mendeliana 3:1, confirmando inserção de uma cópia do transgene nesses eventos. Estudos de segregação em plantas T<sub>1</sub> de tabaco transgênico para o gene *NptII* mostrou segregação Mendeliana 3:1 em evento com cópia única do transgene, assim como para linhagens T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> desse evento (Tizaoui & Kchouk 2012). Em três linhagens de soja transgênica com inserção de cópia única do transgene houve herança Mendeliana para os genes *Gus* e *Bar* até a geração T<sub>5</sub> (Yong *et al.* 2006).

A expressão do transgene foi variável entre eventos e entre as construções para o gene *Bar* e entre eventos para os genes específicos, não sendo diretamente relacionada com o número de cópias, mas provavelmente relacionada com local de integração do transgene no genoma vegetal (Joyce *et al.* 2013). A integração do T-DNA de *Agrobacterium* ocorre preferencialmente em regiões promotoras de genes transcricionalmente ativos (Bourras *et al.* 2015), em diferentes regiões do genoma e também de forma aleatória (Gelvin & Kim 2007). Em *Arabidopsis*, a distribuição da integração do T-DNA foi observada em regiões codificantes, regiões não codificantes, regiões intergênicas, sequência repetitivas, incluindo regiões de centrômero e telômero, grande rDNA e 5S rDNA repetidos (Gelvin & Kim 2007). O pMCG1005 Ev.5 apresentou estimativa de número de cópia igual a 2,70 e mostrou baixa expressão do gene *Bar* para este

evento. A baixa expressão do transgene foi relacionada com alto número de cópias em tomate (Jorgensen *et al.* 1987) e em petúnia (Jones *et al.* 1987). Linhagens T<sub>0</sub> de arroz transgênico com alto número de cópias para o transgene *gusA* mostraram redução nos níveis de expressão do gene *gusA* (Vain *et al.* 2002).

A análise morfológica de plântulas de eventos transgênicos submetidas a condições de baixo P contendo as construções UBI::*OsPstol1*::NOS, UBI::*ZmPstol8.05\_1*::NOS, UBI::*ZmPstol3.06*::NOS, UBI::*ZmPstol8.02*::NOS, UBI::*Sb03g031690*::NOS e UBI::*Sb03g006765*::NOS mostraram crescimento vegetativo e radicular superior ao das plantas controles (vetor vazio). Plântulas dos eventos das construções UBI::*ZmPstol3.06*::NOS e UBI::*ZmPstol8.02*::NOS se destacaram em relação as demais construções, apresentando crescimento superior. Proteínas quinases do tipo receptoras (RLKs) formam a maior família gênica em plantas e contém um domínio citoplasmático serina/treonina quinase. As RLKs regulam diversos processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas (Osakabe *et al.* 2013). 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). Além disso, quinases identificadas em *Arabidopsis* regulam o crescimento de pelos radiculares em resposta ao estresse de P (Lan *et al.* 2013).

A análise fenotípica do sistema radicular de plântulas de tabaco transgênicas em baixo P mostrou uma tendência a ter diferenças no comprimento total e na área de superfície total em relação às plântulas controle (vetor vazio). Experimentos controles com tabaco convencional (dados não mostrados) indicaram que são necessários cerca de 60 dias para visualizar o sistema radicular completo do tabaco em meio de cultura, o que irá evidenciar a diferença fenotípica entre os transgenes. Plantas de tabaco não transgênico em meio de cultura sob baixo P e em diferentes estágios de desenvolvimento em solução nutritiva no sistema de *floating* também sob baixo P apresentaram aumento na razão raiz:parte área e no comprimento total de raízes e redução do número de raízes laterais em comparação com plantas com suprimento

suficiente de P e um aumento da superfície radicular de tabaco, por meio do aumento do comprimento, raízes laterais e pelos radiculares (Foti *et al.* 2014; Zheng *et al.* 2013). O aumento no comprimento e na área de superfície radicular, que levaram a um aumento da aquisição de P e produção de grão foram observadas entre linhagens transgênicas de arroz superexpressando o gene *OsPstol1* sob baixo P (Gamuyao *et al.* 2012). Até o momento, há indícios que a inserção dos genes homólogos do *OsPstol1* de milho e sorgo em plantas transgênicas de tabaco leva a um aumento da superfície radicular e do crescimento vegetativo, embora mais estudos sejam necessários.

## 6 CONCLUSÃO

Linhagens transgênicas de tabaco superexpressando os genes *OsPstol1* de arroz e seus homólogos de milho (*ZmPstol8.05\_1*, *ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02*) e de sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690*, *Sb03g006765*) foram geradas com sucesso. Os eventos positivos tiveram um baixo número de cópias do transgene e expressaram os genes para o marcador de seleção e os genes específicos. A caracterização morfológica dos eventos transgênicos mostrou um aumento no crescimento vegetativo em relação ao controle (vetor vazio) e no comprimento e área de superfície radicular, mas como as plântulas se encontram em estado inicial de desenvolvimento os dados fenotípicos ainda não são conclusivos. Dessa forma serão necessários novos experimentos em condições de laboratório e casa de vegetação com as linhagens dos eventos transgênicos gerados e com as próximas gerações para validar a função dos homólogos de milho e sorgo do gene *OsPstol1* no desenvolvimento do sistema radicular e aquisição de P.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, S.; TICCONI, C. A.; DELATORRE, C. A. (2002) Phosphate sensing in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 115: 1–8.
- ABDEEVA, I.; ABDEEV, R.; BRUSKIN, S.; PIRUZIAN, E. (2012) Transgenic Plants as a Tool for Plant Functional Genomics. In: ÇİFTIÇ, Y. Ö. Agricultural and Biological Sciences "Transgenic Plants - Advances and Limitations", ISBN 978-953-51-0181-9.
- AUSTIN, S.; BINGHAM, E. T.; KOEGELF, R. G.; MATHEW, D. E.; SHAHAN, M. N.; STRAUBF, R. J.; BURGESS, R. R. (1994) An Overview of a Feasibility Study for the Production of Industrial Enzymes in Transgenic Alfalfa. *Annals New York Academy of Sciences*, 234-244.
- 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. (2015) 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.
- 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. (2011) Estimativa do Número de Inserções de Transgenes em milho por PCR quantitativo (qPCR). (Circular Técnica).
- BOURRAS, S.; ROUXEL, T.; MEYER, M. (2015) *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer: How a plant pathogen hacks the nuclei of plant and nonplant organisms. *Phytopathology*, 1-14.
- BINNS, A. N.; THOMASHOW, M. F. (1998) *Agrobacterium* infection and transformation of plants. *Ann. Rev. Microbial*, 42:575-606.
- CHRISTOU, P.; SWAIN, F.W.; YANG, N. S.; McCABE, D. E. (1989) Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:7500-7504.
- DAYHOFF, M.O.; SCHWARTZ, R.M.; ORCUTT, B.C. (1978). In: Dayhoff, MO Eds. Atlas of protein sequence and structure, Vol 5, Suppl 3. National Biochemical Research Foundation, Silver Spring, MD, pp 345-352.

- 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. (2012) A role for root morphology and related candidate genes in P acquisition efficiency in maize. *Functional Plant Biology*, 39:925-935.
- DOLAN, L.; JANMAAT, K.; WILLEMSSEN, V.; LINSTED, P.; POETHIG, S.; ROBERTS, K.; SCHERES, B. (1993) Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*, 119:71–84.
- ESCOBAR, M. A.; DANDEKAR, A. M. (2003) *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *TRENDS in Plant Science*, 8:380-386.
- FAGARD, M.; VAUCHERET, H. (2000) (Trans) genes silencing in plants: How many mechanisms? *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 51:167-194.
- FELSENSTEIN, J. (1993). PHYLIP (phylogeny inference package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington Seattle, WA
- FRALEY, R.T.; ROGERS, S.G.; HORSCH, R.B.; SANDERS, P.R.; FLICK, J.S., ADAMS, S.P.; BITTNER, M.L.; BRAND, L.A.; FINK, C.L.; FRY, J.S.; GALLUPPI, G.R.; GOLDBERG, S.B.; HOFFMANN, N.L. ; WOO, S.C. ( 1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 4803-4807.
- FOTI, M.; DHO, S.; FUSCONI, A. (2014) Root plasticity of *Nicotianatabacum* in responseto phosphorus starvation. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology:Official Journal of the Societa Botanica Italiana*, DOI:10.1080/11263504.2014.986245.
- GADELETA, A.; GIANCASPRO, A.; CARDONE, M. F.; BLANCO, A. (2011) Real-time PCR for detection of precise transgene copy number in durum wheat. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 16:652-688.
- 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. (2012) The protein kinase *Pstol1* from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. *Nature* ,488:535-541.
- GELVIN, S. B.; KIM, S. I. (2007) Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration and transgene expression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1769:410–421.

- 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. (2014) Duplicate and Conquer: Multiple Homologs of PHOSPHORUS-STARVATION TOLERANCE1 Enhance Phosphorus Acquisition and Sorghum Performance on Low-Phosphorus Soils. *Plant Physiology*, 166:659 - 677.
- HENSEL, G.; KASTNER, C.; OLESZCZUK, S.; RIECHEN, J.; KUMLEHN, J. (2009) *Agrobacterium*-Mediated Gene Transfer to Cereal Crop Plants: Current Protocols for Barley, Wheat, Triticale, and Maize. *International Journal of Plant Genomics*, 1-9.
- HOOD, E. E.; HELMER, G. L.; FRALEY, R.T.; CHILTON, M. D. (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *Journal of Bacteriology*, 168(3):1291-1301.
- HUND, A.; FRACHEBOUD, Y.; SOLDATI, A.; FRASCAROLI, E.; SALVI, S.; STAMP, P. (2004) QTL controlling root and shoot traits of maize seedlings under cold stress. *Theor. Appl. Genet.* 109, 618–629.
- HOCHHOLDINGER, F.; ZIMMERMANN, R. (2008) Conserved and diverse mechanisms in root development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 11:70–74.
- JONES, J.D.G.; GILBERT, D.E.; GRADY, K.L.; JORGENSEN, R.A. (1987) T-DNA structure and gene expression in petunia plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *Mol. Gen. Genet.*, 207:478–485.
- JORGENSEN, R.; SNYDER, C.; JONES, J.D.G. (1987) T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed with *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives, *Mol. Gen. Genet.*, 207:471–477.
- JOYCE, P.; HERMANN, S.; O'CONNELL, A.; DINH, Q.; SHUMBE, L.; LAKSHMANAN, P. (2014) Field performance of transgenic sugarcane produced using *Agrobacterium* and biolistics methods. *Plant Biotechnology Journal*, 12:411–424.
- JUNG, Y. J.; KYOUNG, J. H.; NOU, I. S.; CHO, Y. G.; KANG, K. K. (2013) Molecular characterization of the UDP-glucose 4-epimerase (*BrUGE*) gene

- family in response to biotic and abiotic stress in Chinese cabbage (*Brassica rapa*). *Plant Biotechnol Rep*, 1-12.
- KANNEGANTI, V.; GUPTA, A. K. (2008) Wall associated kinases from plants: an overview. *Physiol Mol Biol Plants*, 14: 109–118.
- KANNEGANTI, V.; GUPTA, A. K. (2011) RNAi mediated silencing of a wall associated kinase, OsiWAK1 in *Oryza sativa* results in impaired root development and sterility due to anther indehiscence: wall associated kinases from *Oryza sativa*. *Physiol Mol Biol Plants*, 17: 65–77.
- KAUR, R.; SINGH, K.; SINGH, J. (2013) A root-specific wall-associated kinase gene, HvWAK1, regulates root growth and is highly divergent in barley and other cereals. *Funct Integr Genomics*, 13: 167–177
- KOORNNEEF, M.; MEINKE, K. (2010) The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant Journal*, 61:909–921.
- KUNIK, T.; TZFIRA, T.; KAPULNIK, Y.; GAFNI, Y.; DINGWALL, C.; CITOVSKY, C. (2001) Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98: 1871–1876.
- LAMBERS, H.; BRUNDRETT, M. C.; RAVEN, J. A.; HOPPER, S. D. (2010) Plant mineral nutrition in ancient landscapes: high plant species diversity on infertile soils is linked to functional diversity for nutritional strategies. *Plant Soil*, 334:11–31.
- LAMBERS, H.; CAWTHRAY, G. R.; GIAVALISCO, P.; KUO, J.; LALIBERTE, E.; PEARSE, S. J.; SCHEIBLE, W. R.; STITT, M.; TESTE, F.; TURNER B. L. (2012) Proteaceae from severely phosphorus-impooverished soils extensively replace phospholipids with galactolipids and sulfolipids during leaf development to achieve a high photosynthetic phosphorus-use-efficiency. *New Phytol*, 196:1098–1108
- LAN, P.; LI, W.; SCHMIDT, W. (2013) Genome-wide co-expression analysis predicts protein kinases as important regulators of phosphate deficiency-induced root hair remodeling in Arabidopsis. *BMC Genomics*, 14: 210
- LI, Y.; GU, M.; ZHANG, X.; ZHANG, J.; FAN, H.; LI, P.; LI, Z.; XU, G. (2014) Engineering a sensitive visual-tracking reporter system for real-time monitoring phosphorus deficiency in tobacco. *Plant Biotechnology Journal*, 12: 674–684.

- LIN, J.; ASSAD-GARCIA, N.; KUO, J. (1995) Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells. *Plant Science*, 109:171-177.
- LIU, J.C.; LI, J.S.; CHEN, F.J.; ZHANG, F.S.; REN, T.H.; ZHUANG, Z.J.; MI, G. H. (2008) Mapping QTLs for root traits under different nitrate levels at the seedling stage in maize (*Zea mays* L.). *Plant Soil*, 305:253–265.
- LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the 2-ddCt. Method. *Methods*, 25:402-408.
- LYNCH, J.P. (1995) Root architecture and plant productivity. *Plant Physiology*, 109:7–13.
- LYNCH, J. P. (2007) Roots of the second green revolution. *Aust J Bot*,55: 493–5122.
- LYNCH, J.P. (2011) Root Phenotypes for Enhanced Soil Exploration and Phosphorus Acquisition: Tools for Future Crops. *Plant Physiology*, 156:1041–1049.
- LYNCH, J. P.; BROWN, K. M. (2012) New roots for agriculture: exploiting the root phenome. *Philosophical Transaction*, 367:1598-1604.
- LÓPEZ-BUCIO, J.; CRUZ-RAMÍREZ, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6:280–287.
- LOUDET, O.; GAUDON, V.; TRUBUIL, A.; DANIEL-VEDELE, F. (2005) Quantitative trait loci controlling root growth and architecture in *Arabidopsis thaliana* confirmed by heterogeneous inbred family. *Theor. Appl. Genet.* 110, 742–753.
- MARSCHNER, H. (1995) Mineral nutritional of higher plants. 2nd edn. Academic Press, Boston.
- MICHIELSE, C. B.; HOOYKAAS, P. J. J.; van den HONDEL, C. A. M. J. J.; RAM, A. F. J. (2005) *Agrobacterium* -mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr Genet* , 48: 1-17.
- MOLLIER, A.; PELLERIN, S. (1999) Maize root system growth and development as influenced by phosphorus deficiency. *Journal of Experimental Botany* ,50:487–497.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. (1962) Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays With Tobacco Tissue Culture. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473-497.
- NEGRI, B. F. (2015) Caracterização funcional dos homólogos do gene *Pstol1* de arroz em milho. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Universidade Federal de São João Del-Rei, São João Del-Rei.
- NI, J.J.; WU, P.; SENADHIRA, D.; HUANG, N. (1998) Mapping QTLs for phosphorus 706 deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 97:1361-1369.
- NIU, I. F.; CHAI, R. S.; JIN, L. G.; WANG, H.; TANG, C. X.; ZHANG, Y. S. (2012) Responses of root architecture development to low phosphorus availability: a review. *Annals of Botany*, 1-18.
- OCHOA, I.E., BLAIR, M.W., LYNCH, J.P. (2006) QTL analysis of adventitious root formation in common bean under contrasting phosphorus availability. *Crop Science*, 46:1609-1621.
- OSAKABE, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; HINOZAKI, K.; TRAN, L. S. P. (2013) Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 2:445-458.
- PACURAR, D. I.; THORDAL-CHRISTENSEN, H.; PACURAR, M. L.; PAMFIL, D.; BOTEZ, C.; BELLINI, C. (2011) *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 76:76-81.
- PAGE, R.D. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.*, 12(4):357-358.
- PARENTONI, S.N.; SOUZA-JUNIOR, C.L. DE. (2008) Phosphorus acquisition and internal utilization efficiency in tropical maize genotypes. *Pesq. Agropec. Bras.*, 43:893-901.
- PIERS, K. L.; HEATH, J. D.; LIANG, X.; STEPHENS, K. M.; NESTER, E.W. (1996) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:1613-1618.
- PEI, L.; WANG, J.; LI, K.; LI, Y.; LI, B.; GAO, F.; YANG, A. (2012) Overexpression of *Thellungiella halophila* H<sup>+</sup> pyrophosphatase Gene Improves Low

- Phosphate Tolerance in Maize. *PLOS ONE*, 7(8): e43501. doi:10.1371/journal.pone.0043501.
- PEÉREZ-TORRES, C. A.; LÓPEZ-BUCIO, J.; CRUZ-RAMÍREZ, A. 2008. Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *The Plant Cell*, 20: 3258–3272.
- RAGHOTHAMA, K. G. (1999) Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50:665-693.
- RAMAEKERS, L.; REMANS, R.; RAO, I. M.; BLAIR, M. W.; VANDERLEYDEN, J. (2010) Strategies for improving phosphorus acquisition efficiency of crop plants. *Field Crops Research*. 117:169-176.
- RANI, S. J.; USHA, R. (2013) Transgenic plants: Types, benefits, public concerns and future. *Journal of Pharmacy Research*, 6:879-883.
- RENGEL, Z. (2001) Genotypic differences in micronutrient use efficiency in crops. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32: 1163–1186.
- RENGEL, Z.; MARSCHNER, P. (2005) Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytologist*, 168: 305–312.
- RUTA, N.; LIEDGENS, M.; FRACHEBOUD, Y.; STAMP, P.; HUND, A. (2010) QTLs for the elongation of axile and lateral roots of maize in response to low water potential. *Theor. Appl. Genet.*, 120:621–631.
- SAGHAI-MAROOF, M.A., SOLIMAN, K.A., JORGENSEN, R.A., ALLARD, R.W. (1984) Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:8014-8018.
- SAITOU, N.; NEI, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4(4):406:425.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, v. 1, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SCHULZ, P.; HERDE, M.; ROMEIS, T. (2013) Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development. *Plant Physiol*, 163: 523–530.

- SHA, Y.; LI, S.; PEI, Z.; LUO, L.; TIAN, Y.; HE, C. (2004) Generation and flanking sequence analysis of a rice T-DNA tagged population. *Theor Appl Genet*, 108:306–314.
- ŠUBR, Z.; NOVÁKOVÁ, S.; DRAHOVSKÁ, H. (2006) Detection of transgene copy number by analysis of the T<sub>1</sub> generation of tobacco plants with introduced *P3* gene of potato virus A. *Actavirologica*, 50:135 – 138.
- SMITH, S.; DE SMET, I. (2012) Root system architecture: insights from *Arabidopsis* and cereal crops. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 367, 1441–1452.
- SMITH, E.F.; TOWNSEND, C.O. (1907) A plant-tumor of bacterial origin. *Science*, 24, 671–673.
- TARAMINO, G., SAUER, M., STAUFFER, J.L., MULTANI, D., NIU, X., SAKAI, H., HOCHHOLDINGER, F. (2007) The maize (*Zea mays* L.) RTCS gene encodes a LOB domain protein that is a key regulator of embryonic seminal and post-embryonic shoot-borne root initiation. *The Plant Journal*, 50:649-659.
- TIZAOUI, K.; KCHOUK, M. E. (2012) Genetic approaches for studying transgene inheritance and genetic recombination in three successive generations of transformed tobacco. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 3, 640-649.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25: 4876-4882
- VAIN, P.; JAMES, V. A.; WORLAND, B.; SNAPE, J. W. (2002) Transgene behaviour across two generations in a large random population of transgenic rice plants produced by particle bombardment. *Theor Appl Genet*, 105:878–889.
- VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, 157:423-447.
- VANCE, C.P., CHIOU, T.J. (2011) Phosphorus focus editorial. *Plant Physiology*, 156:987-988.
- van de WIEL, C. C. M.; van der LINDEN, C. G.; SCHOLTEN, O. E. (2016) Improving phosphorus use efficiency in agriculture: opportunities for breeding. *Euphytica*, 207:1–22

- VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; FAGARD, M. (2001) Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science*, 114:3083-3091.
- VIJ, S.; GIRI, J.; DANSANA, P. K.; KAPOOR, S.; TYAGI, A. K. (2008) The Receptor-Like Cytoplasmic Kinase (OsRLCK) Gene Family in Rice: Organization, Phylogenetic Relationship, and Expression during Development and Stress. *Molecular Plant*, 5:732–750.
- VENDRUSCOLO, E C G. Silenciamento gênico e transgênicos. *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*.31: 8-13, 2003.
- VENEKLAAS, E. J.; LAMBERS, H.; BRAGG, J.; FINNEGAN, P. M.; LOVELOCK, C.E.; PLAXTON, W. C.; PRICE, C. A.; SCHEIBLE, W. R.; SHANE, M. W.; WHITE, P. J.; RAVEN, J. A. (2012) Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants. *New Phytol*, 195:306–320.
- VYACHESLAVOVA, A. O.; BERDICHEVETS, I. N.; TYURIN, A. A.; SHIMSHILASHVILI, Kh. R.; MUSTAFAEV, O. N.; GOLDENKOVA-PAVLOVA, I. V. (2012) Expression of Heterologous Genes in Plant Systems: New Possibilities. *Russian Journal of Genetics*, 11(48):1067–1079.
- WISSUWA, M.; YANO, M.; AE, N. (1998) Mapping of QTLs for phosphorus-deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 777-783.
- WISSUWA, M.; AE, N. (2001) Further characterization of two QTLs that increase phosphorus uptake of rice (*Oryza sativa* L.) under phosphorus deficiency. *Plant and Soil*, 237:275-286.
- WISSUWA, M.; WEGNER, J.; AE, N.; YANO, M. (2002) Substitution mapping of *Pup1*: a major QTL increasing phosphorus uptake of rice from a phosphorus-deficient soil. *Theor Appl Genet*, 105: 890-897.
- WOLL, K.; BORSUK, L. A.; STRANSKY, H.; NETTLETON, D.; SCHNABLE, P. S.; HOCHHOLDINGER, F. (2005) Isolation, Characterization, and Pericycle-Specific Transcriptome Analyses of the Novel Maize Lateral and Seminal Root Initiation Mutant *rum1*. *Plant Physiology*, Vol. 139, pp. 1255–12.
- YANG, X.; LI, F.; ZHANG, X.; LIU, K.; WANG, Q.; ZHANG, J.; LIU, C.; ZHU, Z.; SHAN, G.; CHIN, C. K.; FANG, W. (2013) Integration and Characterization of T-DNA Insertion in Upland Cotton. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 49 (2): 51–57.

- YONG, Z.; BAO-YU, Y.; SHI-YUN, C. (2006) Inheritance Analysis of Herbicide-Resistant Transgenic Soybean Lines. *Acta Genetica Sinica*, 33 (12):1105–1111.
- YUAN, J. S.; BURRIS, J.; STEWART, N. R.; MENTEWAB, A.; STEWART JR., C. N. (2007) Statistical tools for transgene copy number estimation based on real-time PCR. *BMC Bioinformatics*, 8.
- ZHANG, Y.; LIU, Y.; ZHANG, J.; WANG, G.; WANG, J.; LIU, J. (2015) Assessment of transgene copy number and zygosity of transgenic maize overexpressing *Cry1le* gene with SYBR® Green qRT-PCR. *In Vitro Cell.Dev.Biol. - Plant*, 51:125–134.
- ZHENG, X.; ZHANG, Z.; CHEN, X.; JIA, Z.; YI, J.; SU, Y. (2013) Responses of root morphology and architecture to phosphorus deficiency at seedling stage of tobacco (*Nicotiana tabacum*) growth. *Australian Journal of Crop Science*, 7(13):1967-1972.
- ZHENG, B.S.; YANG, L.; ZHANG, W.P.; MAO, C.Z.; WU, Y.R.; YI, K.K.; LIU, F. Y.; WU, P. (2003) Mapping QTLs and candidate genes for rice root traits under different water-supply conditions and comparative analysis across three populations. *Theor. Appl. Genet.* 107:1505–1515.
- ZHU, J.; Lynch, J. P. (2004) The contribution of lateral rooting to phosphorus acquisition efficiency in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Functional Plant Biology*, 31:949–958.
- ZHU, J., KAEPLER, S.M., LYNCH, J.P. (2005) Mapping of QTLs for lateral root branching and length in maize (*Zea mays* L.) under differential phosphorus supply. *Theor. Appl. Genet.*, 111:688-695.

**ANEXO 1 –SEQUÊNCIAS DOS GENES *OsPstol1*, HOMÓLOGOS DE MILHO  
(*ZmPstol8.05\_1*, *ZmPstol3.06* e *ZmPstol8.02*) E DE SORGO (*Sb07g002840*,  
*Sb03g031690* e *Sb03g006765*)**

>*OsPstol1*- 975pb

ATGCTGCTGTGCCAGCGCGAGCAAAAACGCGCCGCGCATTGAAAGCTTCTGCGAGAAACAGGAAACCAGCAACCCGAAACGCTATA  
CCCTGAGCGAAGTGAACGCATGACCAAAAAGCTTTGGCGATAAACTGGGCGCGCGGCTTTGGCACCGGTATAAAGGCAGCCTGGC  
GGATGGCCCGGAAAATTGCGGTGAAAATGCTGAAAATACCAAAAGCGGATGGCGAAGAATTTATTAACGAAGTGGCGGGCATTAGCAAAA  
ACCAGCCATATTAACGTGGTGAACCTGCTGGGCTTTAGCCTGCAGGGCAGCAAAACGCGCGCTGATTATGAATATATGCCGAACGGCA  
GCCTGGATCGCTATAGCTTTGGCGATAGCAGCGTGCAGGGCGATAACACCCTGAGCTGGGATCGCCTGTTTAAACATTATTGTGGGCAT  
TGGCGCGGCGCTGGAATATCTGCATTGCCATTGCAACATTTCGATTGTGCATTTTGTATTTAAACCCGAGAACATTCTGCTGGCGCAG  
GATTTTGGCCGAAAATTAGCGATTTTGGCCTGAGCAAACTGTGCCATCTGAAAGAAAGCCGATTAGCATTAACGGCCTGCGCGGCA  
CCCCGGGCTATATTGCGCCGGAAGTGTTTAGCCGCGAGTATGGCAGCGCAGCAGCAAAAGCGATGTGTATAGCTATGGCATGGTGGT  
GCTGGAAATGGCGGGCGCAAAAAAACATTAACGTGAGCACCGGCGAGCAGCAGCAAAATTTTCCGAGTGGCTGTATGATAACCTG  
GATCAGTTTTGCTGCCCCGACCGCGAAATTAGCAGCCAGACCACCGATCTGGTGGCAAAATGGTGGTGGTGGGCTGTGGTGCATTC  
AGCTGGTGGCCGACCGATCGCCGAGCATGCCGGAAGTGTGGAAATGCTGGAAAGCAACGGCCGCGATCTGCCCTGCCCGCAAAAG  
CCTGTGA

>*ZmPstol8.05\_1*- 1128pb

ATGGGGATGTGGAAGTTTCTCCACAGGGAAAAAATCTCCTCCGACGGGATCAAAAAGAAAAGAAGCAGCACCTATTGTTGGTGTCTG  
TTGCCGTTGCATTCTGTGTCTAGTCATTCACATCCTTCTTGGCTTGTAGATATGGTTTGGCTTCCCTTCAAATCGAAGAACAACC  
AGGGACAAGGATTGAGTCTTCTCACAGAAGAACGAGAGCATAACATCCGAAAAGATACACCTACGCGGACGTTGAAAAGAATGACAAAA  
TCCTTCGCTGTGAAGCTAGGCCAAGGTGGGTTTGGTGTGTATACAAGGCAGCCTCCACGATGGCCGACAGGTAGCAGTCAAGATGC  
TCAAGGACACCAAGGTGACGGCGAGGAATTCATGAACGAGGTGGCTAGCATCAGCAGGACTTCTCATGTCAACGTGACACTTCT  
AGGGTTTTGCTTGAAGGGTCGAAAAGAGCACTGATCTACGAGTACATGCCCAATGGTTCGCTCGAAAGGTATGCCCTCACCGGTGAC  
ATGAACAGTGAGAATTTGCTAACCTGGGAAAGACTATTTGACATAGCAATGGCACGGCCAGAGGGCTCGAATACCTACCCGGGGAT  
GCAACTCGGATCGTGCATTTTGCATCAAGCCACACAACATCTGTTAGACCAGGATTTCTGCCCTAAGATCTCTGACTTTGGACT  
GGCCAAGCTATGTCTGAACAAGAGAGCGCTATCTCCATTGTTGGCGCAAGAGGGACGATAGGGTATATCGCCCCGAGGTCTACTCA  
AAGCAATTTGGAACAATAAGCAGCAAGTCTGATGTCTATAGCTATGGGATGATGGTCCCTTGAGATGGTTGGAGCAAGGGACAGGAATA  
CAAGCGCAGATAGTGACCATAGCAGCAATATTTCCCTCAGTGGCTTTATGAGCATTTGGACGACTATTGTGTTGGTGTCTCCGAGAT  
TAATGGTGAACACAGAGCTCGTGAGGAAGATGATAGTTGTAGGTCTGTGGTGCATACAAGTGAATCCGACTGATCGACCAACAATG  
ACGAGAGTCTCGAGATGTTGGAAGGGAGCACAAAGTAATCTAGAGTTGCCACCCAGAGTTCTTTTGGAGCTGA

>*ZmPstol3.06* - 1026pb

ATGCTGCCATTCAAATCGAAGGACGAACCAAGGATCGAGTCTTTTCTACAGAAGAACGGGAACTGCATCCAAAAGATACACCTACG  
CAGATGTGAAAAGATGACAAGATCCTTCACCGAGAAGCTAGGCCAAGGTGGGTTCCGGAGCCGTGTACAGAGGCAGCCTCCACGATGG  
CCGCCAGGTAGCAGTCAAGATGCTAAAGGACACCAAGGCGATGGCGAGGAATTCATGAACGAGGTGGCCAGTATCAGCAGGACTTGT  
CATGTCAACATCGTGACACTGACGGGGTCTGCTTGAAGGATCCAAGAGGGCGCTTGTTTACGAGTACATGCCAATGGTTCGCTTG  
AAAGGTACGCCTTCAGGGTCGAAAACACACTGAGCTGGGAGAAACTGTTTTGACGTAGCAGTGGCACGGCCAGAGGACTCGAGTATCT  
CCACCGGGGATGCAACACTCCAATCGTGCATTTTCGACATCAAGCCGCACAACATCTGTTAGACCAGGATTTCTGCCCTAAGATCTCT  
GACTTTGGATTGGCCAAGCTATGCCGAACAAGCGAGTAGTGTCTCCATTGTTGGCGCAGAGGGACAGTAGGTTACATCGCCC  
CGGAGGTTTACTCAAAGCAATTCGGAGTAGTAAGTAGCAAGTCCGACGTCTATAGCTATGGAATGATGGTGTGATGGTGGGGC  
AAGGGACAAGAGTACAAGTGCAGATAGTGAGCGTAGTAGCCAGTATTTCCCTCAGTGGATCTATGAACATTTGGACGACTACTGTGTC  
AGTGTCTCTGAGGTTGATGGTGGGACTACAGAGCTCGTGAGGAAGATGATAGTTGTAGGTATGTGGTGCATACAGTTGATCCCAACGG  
ACCGGCCAACAATGAGTAGAGTCTCGAGATGCTGGAAGGAAGCAGAGTAATCTGGAATTGCCACCCAAAGTTCTGTTGAGCTGGCA  
AGCTAGCATAGATGTTTTCTATTAAGACCCCAACTAATCAAAGTTATATAAATTAG

>*ZmPstol8.02*- 1332pb

ATGGATATGATCGTGCAACCATGTTTTGCACTGTAGACTGCATCGTTCACATAGTGAATTTGAAAAGGGAATGAGATAGGAGATA  
TGATGGGTACCAAGGGAATGGCAGGAAGATTCCACTAATAGTTTCGATTTTCAGTGGCTGCAAGCTTGTCTCTACCATGTATATATGT  
GTTGGTATGGCATAGGCAAAAACCTGGAGTTTTTCTATGCAAGAAGACCAGCAGTCCATAGAAGAGAACATTTGAGGCCCTAATATTA  
GCACATGGATCACTAGCTCCAAAAGGTACAGGTAAGTACAGAAATAACATCTTCTTAAATATTAAGCTTGGGGAAGGTG  
GTTATGGCATGGTTTTCAAGGGAAGGCTAGATGATGGTCTGTAGTTGCAGTGAATTTCTGCAATGACTCCAAAGGTGACGGTGGAGGA  
GTTTGTGAACGAGTTATGAGTATTGGCAGGACATCACACATTAATATCGTTAGCTTATTTGGGTTTTGTTTGGAAAGGCTCAAAGCGG  
GCCCTAATATATGAGTATATGTCAAATGGTTCCTTTGGATAAGTATATATACACAGAGAATCCGAAGGCAGTTTTAGGATGGGATAAGC  
TCTATACCATAGCAATTTGGGATTTGCTAGAGGGTTGGAATACTTGCACCACAGTTGTAATACACGCATAGTCCATTTGCACATCAAGCC  
TCAAAATATCTTCTGGATCAGAACTTTCAACCAAGATTGCTGATTTTGGTTTGGCCAAGTTGTGTCATATGAAAGAGAGCAAGCTT  
TCTATGACTGGTGGCAGAGGTACGCTGGGTTTCATAGCTCCTGAAGTGCATCTCGGACATTCGGGGTGTTTTCAACAAAAGCAGACG  
TTTTAGTTATGGAATGATGCTGTAGAGATGGTTGGAGGCGAATAAATGTTAACTCAGCGGCTCAAGAGTCAAGTGAAGGATGATTT  
TCCACATTTGATTTACCACCACTTTGGCCAAGAGGATGGACTGCAGGCGTGTGAGGTCACACGTGAAAATGAAGGGATCGCAAAAAA  
CTGAGTGTGATTGGCCTATCGTGCATCAAATATTAACCAATGCATCGCCCTACCATCGGAAAGGTGCAATGGAATGTTTCGAGAGAGGAT

CGGATGAACTGGACATGCCACCAAGGCAAAACTTCAGCCAAATATTCGAAGATCCAGTACACAGTTTGAATGCGGAAACCATGAGCAT  
GATTAGTGGCACCACAAAGCAAAGCTTATAGTGAAGTGCTAAAGATGAAGGAGATAAGCGTCGTGAACTCAAAAAACATACAACGGTTG  
CCAACCTCTGTAA

>*Sb07g002840*- 1815 pb

ATGCCACAGTCTCTTATCATATGTCTCCTCCTCCTCCTCCTCGCCGCCGCGGCACCGCAGACGCGCGCCGCGGAGCCGACTGCA  
GCGTCGGTATGGGCTGCGACCTCGCGTTGGGCTCATACTACATCTCCCGGAACCAGAACCTGACCTACATATCGAGCCTCTTCGGCAT  
CGACGACTACCACACCTCGCGCCTACAACACAGGCTACACCAGCTCGATTTTCATACAAGTCGGCAGTCGCATCAACGTCTACTTC  
CGGTGCGGCTGCCTGACGCTCCCATTCGCGCCTTCTCCACCTACCTCGCCGGATCCTTCCCTACGTGGTCTCGCAAGGAGAAACCT  
ACGCCAGCGTCGCGGCCGAGTTCACACAACCTCACCACGGCCACCTTGCTGACGCCCGCCCCAGCAGCGACAACGACTTCAACGGCGT  
TCTCGACGCCGCGCGGTGGAACGTACCGTACCTGCTCGCCGCAACGCCGACGTGTGCGCGCCGACTACAGGTTCTTGCTT  
ACCTACCCGCTGGGTGACGGGGAGCGCCAAACTCCGTCGCGCCGAGCCATGGACTGTCGTCTCCGGCAGAGCTAGACCTGTTTCAGGA  
GGTATAACCCCGCTGCGGACAGCGTCAAGGAAGGAGAGGTCGTATATCCCTCTCAAAGATGGCTACTATAATGGAATAATCGCAC  
GAGCAATGGTCCAAGCAAAACCAAGAAAGTCATCATAATAAGTGCTATTGCTGGCACCTCCGGCCTACTGGGGGCAAGCGTAATCCTT  
CTGTTGTTCTCCTCTGGTACAAGAAATATATGGCATGCTGCCATGGCAAAAGTGGTCAAGGAATGCTCCAAGGATTGAATCTTTCC  
TACAAAAACAAGAACTTACACCCCTAAAAGGTACAGTTATCAAGATGTGAGAAGATGACCAAATCTTTTGTCTACAAGCTTGCCCA  
AGGTGGATATGGAGCTGTCTACAGAGGCAACCTGGCTGATGGCCGTGAGATAGCTGTCAAGACACTGAAGGACACTGAGGGTGTATGGC  
GAGGACTTCAATGAATGAGGTGGCTAGCATCAGCAGAACATCTCATGTTAACATTTGTTACTCTCTTAGGGTTCTGCCTGCAAGGGAGAA  
AAAGAGCTTAATCTATGATACATGCCTAATGGTTTCGTCGAGAGATATACGTTTGAAGTATGCTGCCGAAGGAGCAACAGCTCT  
ATGTTGGGATAAACTTTTTGAGATTGTTATCGAAATCGCAGCAGGAGTGGAGTATCTCCACAATGGCTGCCACACCCGATTTGTGCAT  
TTTTGACATCAAACCTCAAAATATTCTTCTAGATCAAACTTCTGCCCAAAGATCTCAGATTTTGGGTAGCAAAGTGTGCCAACAAA  
AACAGAGCAAAATCTCCATGGTCGGGATGAGAGGCACGATAGGCTACATAGCTCCTGAAGTATTCAACAGAAAGCTATGGAGCAGTGAG  
CAACAAGTCAGATGTGTATAGTTATGGTATGATGGTTCTCGAGATGGTCGGGGCAAGAAAACAAATTGATGTTGGCATAGACACTAGC  
AGCAATATTTCCCGCGGTGGTTGTACGACAAATGGATCAGTTCTGTGGCGCCACCATCTCTGAGATCGGAAGCGACACCACAGAAC  
TTGTGAGGAAGATGATCATTGTTGGCTTGTGGTGTATACAGTTAAGACCTATAGATCGGCCATCCATGAGCAAAGTCTTGAATGTT  
GGAGAGCAACACTTCGGATTTGCAGTTGCCACCGAAGGCCTTTTGGACCAGCTAA

>*Sb03g031690*- 1938 pb

ATGGCCCTCTGCTCGCTACGCCGCCACCGGCTGCCGCTGCCGCTCCTCCTTGCTGTCTTGTTTGCCGCTTCCCGCGGCGATCCTTCCG  
ACGACGATTACAAGTACAACCCCTCCATATGCAAGCTCCAACCATACGCATGCGGCAAGTGAATATCAGCTACCCGTTCTATCTTTC  
CAATGAAACGGCAGATGTCTTGGCAACAGCAACTCCTCCTGCGGCTACCCTGGGCTGGCAATCGACTGTGTGGACGACAAGTATCCC  
ACCATGCAACTTGGCAGCAGCAGCAGCAGCACAGGCTACTACTCGTACAAGTGACGGGCATCAATTACAATTACAACAGCTTCACCA  
TCTCCTCGTCGACCCGGATGTGCTCGATGATCAGAGCAGCTGCCATGGGTCGACCACAACGTCACCGTTTCGCCAACCTTGTGGCT  
GAGCTCAGAGTACACCGTTGGTTACCTCCTCTTCTCGCCAACTGCTCCGTCGCCACCGTCCCTGGACAGCTACCATCCAGCCGATT  
GCATGTGCAAGCGCAGGTTGGTGTAGATGATTATCTTTGTGATTCCTTCAGAGGTGCCCTACCAAAATTTATCGCAGGATTGCAAG  
AAGTTACCAAGTCCCGGTGCTTTCAGAACGCTCCTGCAGATGAATTCGAGTGAGCACAACGGGTATAGGAACGTTCTCAAACA  
GGGTTTCCAGTTGGAACCTCAACTTGAAGCCGAGACCCGAAGAGTGACCAAGTGCAGACATCTAGTGGACGGTGTGCTACAGCAGC  
GGTGGGGAATTTGAGGCTTGTCTGTGCACCAGCGGCGAGCGCACGGCCAGGAATGCACCAACCGTGACGGGCATCAATGGGATATA  
AAATGTATATATTGCAAGCACATTGTCCCTTCTACTTCTGTGTCTACTTATCCCGCCTATTCCTGGCTCGCAAATATGGTTTGGT  
CTGCATTAACGGAAGGAAGAACCAATGATCAAGTCTTTCTGCAAAAGAAATGGAACCTACATACAAAAGATACACTTATGCAGAA  
GTAAAAGAAATGACAATGCTTTTTCTGAAAAGCTAGGACAAGGTGGTTTTGGTGTATGATACAGAGGCAGCCTCTCGGACGGCGGT  
AGGTAGCAGTCAAGATGCTAAAGGACCCCAAGGTTGATGGGGAGGAATTCATGAATGAGGTGTCCAGCATTAGCAGAACTTCACATGT  
CAATGTTGTTATGCTACAGGATTTTGGTGGAAAGTCCAAAAGGCACTCATATGAGTACATGCCTAATGGTTTCACTTGAAGG  
TATGCTTCAATAGCAACATGAACAACCAAAATCTCTAGTTGGGAGAAATTTTGCATAGCAATGGCATCGCTAGAGGACTTG  
AATATCTCCACCGGATGCAATACTCGCATAGTGCATTTTGTATACAAACCCACAACATTTTATAGATCATGATTTCTGTCCCAA  
GATTTCTGATTTTGGATTAGCCAACTATGCCAAATAAAGAGAGTGCCATTTCCATTGCCGGTGCAGAGGAACAATAGGCTACATT  
GCACCTGAGGTGTTCTCAAGCAATTCGGAACAGTCAGTAGCAAGTCAGATGCTATAGTTATGGAAATGATGGTCTTGGATGGTTG  
GGGCAAGGGGCAAAAATATGAATGCAGATAGTGAATCTAGCAGCCAAATTTCCCTCAGTGGATTTATGAACATTTGGATGACTACTG  
TATCAGTGTCTTCTGAGGTTAACAGTGAGACCACAGAGCTCGTGAGAAAGATGATAGTGGTAGGTTTGTGGTGTATACAAGTTATACCA  
ACCGATCGTCCAACAATGACTAAAGTCTGTGAGATGCTAGAAGGAAGCACAAGTAATCTTGAGCTGCCACCAAAAGTATCCAGATTT  
GA

>*Sb03g006765*) - 1821pb

ATGCAACCGCTCTTGGTGTGCTACTCGCTCCTTCTCCTCCTCCTCGCCCGCGGCCAGTGCAGAGTGTGCTCAGGCTGCTGGCCCA  
AGGCGTGCAGGGAGCTCAACATCACCTACCGTTCCTGGCTGGAGGAGCCCGCAAGCCGCTGCGGATCGCCGCTCCTCAAGCTCAA  
GTGACAGCAGCAACCGCGCTTCTGACCAATCCGTGTACAGGCGTACGAGGTGCTCAGCATCTTCCCCAGCAACAAATCCTTCCAT  
GTGGTGGACCACAACCTCCCGCTCGACACCGGCTGCCACCGCCGACGATGAACATCTCGCTCTTCTCGCCAGGACGTTCTGCTTCA  
GCAGAGCAATAAGGAGTGTCTTCTTGGCAAGTGCACGGGGGTTCTACGCGGGCAACTCGACTGGGTTCCATAGCTGGCCCTG  
CGACAACGATTTCTTCTGCTCGGCTCGCGGACTGCGGGGATCTCGAGCAGCGGCATCCAGGGCGGCATCCACAAGGCTGCTCCTT  
AGTGTCTGCGGGTCTCGGGGCTCCTGATGGAATGGGGATGGTACATCGCTAGCATGAATAAAGGGTTTCTCGTGGAGTGAACG  
GGGTGCCAGGGGATTGCCCAAGTGCATGGCAAGCGGGGGAATGCAGTACGACGGCGACAACGGCACAAGTTTGCCTGTGATTG  
CTCTGGTGGCAAGTGCAGTGTCAACGGGAATGACAGGAAGATAACACTAATAGTTTCAATTTCAAGTGTGCAAGCTTGTCTTACCA  
TGTATATATGTTGATATGGCATAGACAAAACCTAAGGTTTCTTCTATGCAAGAAAGACCAGCAGGACCATAGAAGAGAACATTGAGG  
CCGTACTACTAGCACATGGATCACTAGCTCCAAAAGATACAAGTACTCAGAATTAACAAGATAACATCTCCCTTAATAATAAGCT  
TGGGGAAGGTGGTTATGGCATGGTTTTCAGAGGAAGGCTAGATGACGGTCTGTTGTTGCAAGTAAATCTTGCATGACTCCAAAGG  
GATGGTGGAGGTTTGTGAACGAGGTTATGAGTATTGGCAGGACATCACATTAATATTGTTAGCTTGTGGGTTTGTGGTGAAG

GCTCAAAGCGGGCCCTAATATATGAGTATATGCCAAATGGTTCTTTGGATAAGTACATATACTCAGAGAATCCTAAGGCAATTTTAGG  
ATGGGATAAGCTTTATACCATAGCAATTGGGATCGCTCGAGGGTTGGAATACTTGCACCATAGTTGTAATACACGCATAGTCCATTTTC  
GACATCAAGCCTCCAAATATCCTTCTAGATCAAACTTTCACCCAAAGATTGCTGATTTTGGTTTGGCCAAGTTGTGCCGTTTGAAGG  
AGAGTAAGCTTTCATGACCGGTGCTAGAGGAACACCTGGGTTTATAGCTCCTGAAGTGCACTCTCGAAGTTTCGGAGTTGTTTCAAC  
AAAAATCAGATGTTTATAGTTATGGAATGATGTGCTAGAGATGGTTGGAGGCAGAAAAATGTAAATCATTGGCTCAAGAGTCAAGT  
GAAAAATATTTCCACATTGGATTTATGACCACTTTGGTCAAGATGATGGGTTACCAGCATGTGAAGTGACAAGTAAAAATGAAGGAA  
TCGCCAAAAAATGAGTGTGATTGGCCTATGGTGCATTCAAATACTACCAATGCATCGTCTACCATAGGAAAGGTCTTGGAAATGTT  
TGATAGAGGTTTGGATGAACTAGACATGCCACCAAGGCAAACTTCAGTGAATATGTAA

**ANEXO 2 - MEIOS DE CULTIVO****PSM (1 Litro)**

4,3 g	MS sais ou 10 mL de cada uma das soluções estoques do meio MS
30 g	sacarose (3%)
1 mL	B-5 vitaminas
0,5 mL	NAA (estoque 1 mM)
1 mL	BA (estoque 4mM)

Ajuste o pH para 5.7

8 g	ágar
-----	------

Autoclave, esfrie a 55°C, adicione os antibióticos e agentes de seleção desejados e distribua em placas de Petri.

**B5 vitaminas (100 mL)**

10g	myo-inositol
1 g	tiamina-HCl
0,1g	ácido nicotínico
0,1g	piridoxina

Estoque a -20 °C. Use 1 mL/L de meio.

**PRM (1 Litro)**

2,15 g MS sais ou 5 mL de cada uma das soluções estoques do meio MS

15 g sacarose

1 mL B-5 vitaminas

Ajuste o pH para 5.6

9g ágar

Autoclave, esfrie a 55 °C, adicione os antibióticos e agentes de seleção desejados e distribua em frascos.

**MS (1 Litro)**

4,3 g MS sais ou 10 mL de cada uma das soluções estoques do meio MS

30 g sacarose

Ajuste o pH para 5.8

9 g ágar

Autoclave, esfrie a 55 °C, adicione MS vitaminas, os antibióticos e agentes de seleção desejados e distribua em placas de Petri ou frascos.

**Solução de sais de MS**

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. (1962) Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497.

<b>Chemical</b>	<b>Concentration (g/liter stock)</b>
Nitrate stock	
Ammonium nitrate, $\text{NH}_4\text{NO}_3$	165.0
Potassium nitrate, $\text{KNO}_3$	190.0
Sulfate stock	
Magnesium sulfate, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37.0
Manganous sulfate, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.69
Zinc sulfate, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.86
Cupric sulfate, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025
Halide stock	
Calcium chloride, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44.0
Potassium iodide, KI	0.083
Cobalt chloride, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025
PBMo stock	
Potassium phosphate, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	17.0
Boric acid, $\text{H}_3\text{BO}_3$	0.620
Sodium molybdate, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025
NaFeEDTA stock	
Ferrous sulfate, $\text{FeSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.784
Ethylenediamineteraacetic acid, disodium salt, $\text{Na}_2\text{EDTA}$	3.724