

SUPEREXPRESSÃO DO GENE *ROOTLESS CONCERNING CROWN AND SEMINAL ROOTS* DE MILHO EM TABACO

Mariana Lourenço Campolino¹

Sylvia Morais de Sousa²

RESUMO

A disponibilidade de fósforo (P) no solo é um dos fatores mais limitantes à produtividade agrícola em solos tropicais, uma vez que esse nutriente tem a menor eficiência de uso pelas plantas. As raízes exercem funções essenciais, sendo que o milho apresenta um sistema radicular complexo. O mutante *rtcs* (*rootless concerning crown and seminal roots*) de milho foi identificado por possuir apenas a raiz primária e suas laterais. O *Rtcs* codifica um fator de transcrição responsável pela iniciação das raízes seminais embrionárias e pós-embrionárias. Além disso, o *Rtcs* foi mais expresso no genótipo de milho eficiente na aquisição de P e sob baixo P. O objetivo deste trabalho é verificar se o gene *Rtcs* de milho é capaz de aumentar a superfície radicular e consequentemente a eficiência na aquisição de P em plantas de tabaco transgênicas. Para isso, o

gene *Rtcs* foi amplificado a partir da linhagem de milho L3 e clonado no vetor binário pMCG1005. A construção com o gene de interesse sob o promotor ubiquitina e o gene *Bar* como agente seletivo foi transferida para *Agrobacterium tumefaciens* EHA101, a fim de transformar as plantas de tabaco. Estas foram regeneradas a partir de calos selecionados em meio de enraizamento e suplementado Tioxin e fosfinotricina. PCR com primers com anelamento no promotor e *Rtcs* e para o gene *Bar* confirmaram a presença do transgene. Atualmente plantas transgênicas de tabaco estão em casa de vegetação e serão utilizadas para análise molecular e funcional de *Rtcs*.

Palavras-chave: Fósforo. Raiz. Plantas Transgênicas. Agrobactéria.

¹ Bióloga, Mestranda em Biotecnologia e Gestão da Inovação pelo Centro Universitário de Sete Lagoas. E-mail: mlcampolino@hotmail.com

² Bióloga, DSc., Pesquisadora em Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo, Professora do Mestrado Profissional em Biotecnologia e Gestão da Inovação do Centro Universitário de Sete Lagoas e da pós-graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas, MG. E-mail: sylvia.sousa@embrapa.br

1 INTRODUÇÃO

O futuro da agricultura visa o aumento da produtividade sem ocupar novas áreas, o que deve ocorrer preferencialmente aumentando a eficiência de absorção e utilização de água e nutrientes do solo e reduzindo a utilização de insumos. Portanto, o uso de linhagens eficientes no uso de água e nutrientes é imprescindível para a agricultura sustentável (LOBELL *et al.*, 2011). Um dos fatores mais limitantes para a produtividade é a disponibilidade de fósforo (P), uma vez que em solos tropicais este nutriente está pouco disponível para as plantas (BALIGAR E FAGERIA, 1997).

Vários são os mecanismos desenvolvidos pelas plantas para aumentar a captação de P, sendo que modificações na morfologia do sistema radicular são, particularmente, importantes para aumentar a eficiência na aquisição de P em plantas devido à baixa mobilidade do fósforo no solo (ZHU *et al.*, 2005). Atualmente, são poucos os genes clonados e caracterizados que sejam relacionados com a eficiência no uso de P e morfologia radicular. Dentre os genes relacionados a morfologia radicular, sabe-se que o gene *Rtcs* (*Rootless concerning crown and seminal roots*) em milho é mais expresso na linhagem mais eficiente para aquisição de fósforo (L3) do que na linhagem ineficiente (L22) em condições de baixo P (DE SOUSA *et al.*, 2012). O *Rtcs* desempenha papel central na iniciação de raízes seminais embrionárias e pós-embrionárias e o mutante desse gene tem apenas a raiz primária e as raízes laterais em milho. Estudos baseados em mapas de clonagem revelam que este gene está localizado no braço curto do cromossomo 1 e codifica uma proteína de domínio LOB. O gene *Rtcs* de milho é composto por dois exons, separados por um intron de 96 pb, e a sua proteína contém 244 aminoácidos (TARAMINO *et al.*, 2007). Além disso, foram encontradas 63 variantes da sequência do *Rtcs*, incluindo 44 *SNPs* e 19 *indels* e

sete proteínas diferentes do gene *Rtcs* quando analisadas 73 linhagens de milho da China (ZHANG *et al.*, 2013), porém não é conhecido o seu efeito em dicotiledôneas. A partir disso, o objetivo deste trabalho foi produzir plantas transgênicas superexpressando o gene *Rtcs* de milho para verificar se esse gene é capaz de aumentar a superfície radicular e consequentemente a eficiência na aquisição de P em tabaco.

2 METODOLOGIA

2.1 Construção dos cassetes de expressão

O gene *Rtcs* foi amplificado a partir do RNA de raiz da linhagem de milho L3, eficiente para aquisição de fósforo (DE SOUSA *et al.*, 2012), proveniente do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo. O gene *Rtcs* foi amplificado, sequenciado e clonado com primers *RtcsF1*: A CCTAGGATGACGGGGTTTCGGGTCAC e *RtcsR1*: ACTAGTTTACGAGCGATGGTTCAGGT desenhados com base na linhagem B73 de milho. A região codificante foi amplificada a partir do cDNA de raiz milho, cujo RNA foi extraído com o kit Plant RNeasy (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante e a síntese do cDNA será realizada utilizando-se 1 µg de RNA total, previamente tratados com DNase I, utilizando o kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription" (Life Technologies, CA). Os fragmentos amplificados foram subclonados no vetor PGEMT-Easy (Promega), sequenciados e clonados no vetor binário pMCG1005 nos sítios *AvrII* e *SpeI*. A construção contendo o gene de interesse sob o promotor ubiquitina e o gene bar como agente seletivo foi transferida *Agrobacterium tumefaciens* EHA101.

2.2 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com o gene *Rtcs*

Para a inserção do cassete de expressão na *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 foram descongeladas células eletrocompetentes e adicionado o vetor binário para a eletroporação. Posteriormente foi colocado 1,0 ml de meio YEP sem antibiótico e essa mistura foi incubada por 2 horas a 28°C com agitação, centrifugada e 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 permaneceram incubadas a 28 °C por três dias. Posteriormente, foi isolada uma colônia de cada construção gênica, que foi incubada a 28°C durante 18 horas em meio YEP líquido contendo antibióticos (LIN,1995). O DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina, de acordo com SAMBROOK & RUSSEL (2001).

2.3 Transformação de tabaco com os genes candidatos

As plântulas de *Nicotiana tabacum* cv. *Petit havana* utilizadas para transformação foram mantidas *in vitro*, e, com aproximadamente 5 cm de altura foram utilizadas para a transformação via *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101. A cultura de *Agrobacterium* contendo as construções gênicas entraram em contato com discos de folhas de tabaco (explantos) em uma placa de petri, durante 1 minuto. Após serem agitados, os explantes foram transferidos para o meio PSM (*Shooting Medium*), sem antibiótico ou agente de seleção por 48 horas a 24-26°C em uma câmara de crescimento iluminada. Após esse período, os explantes foram transferidos para meio PSM suplementado com 100 mg/L tioxin. Após sete dias foram transferidos para um novo meio PSM + antibiótico + 1 mg/L

PPT e esse subcultivo foi feito a cada sete dias até o aparecimento dos calos e diferenciação das folhas. As plântulas isoladas (com cerca de 1 cm de comprimento) foram transferidas para meio de enraizamento PRM + antibiótico, suplementado com 1 mg/L PPT. As plântulas transformadas e enraizadas foram transferidas para o solo.

2.4 Identificação da inserção dos transgenes

Com o intuito de verificar a inserção dos cassetes de expressão nas linhagens transgênicas de tabaco regeneradas, uma PCR foi realizada utilizando 10 ng/µl de DNA genômico extraído de cada linhagem usando o método de Saghai-Marooof *et al.* (1984). Para a amplificação do DNA genômico foram utilizados, respectivamente, um oligonucleotídeo senso junto à região promotora, e um oligonucleotídeo complementar a região codificadora do gene de interesse e outro para o gene *Bar* (Tabela 1).

Tabela 1. Nome e sequência dos primers utilizados para confirmação da inserção do transgene e o tamanho do fragmento esperado.

Nome Primer	Sequências	Tamanho fragmento
Ubi_F Rtcs_R	gtgttagcaaggcgaaaa ttacgagcgatggttcaggt	862 pb
Bar_F Bar_R	agaaaccacgtcatgcc tgccaccatcgtaaccac	427 pb

Fonte: dados da pesquisa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene *Rtcs* foi amplificado a partir do cDNA de raiz das linhagens L3, eficiente na aquisição de fósforo sendo obtido um fragmento de 735 pb, conforme esperado e descrito por Taramino *et al.* (2007). O fragmento foi subclonado no vetor PGEM T-Easy (Promega) e a inserção do gene foi confirmada por digestão com *EcoRI*. Foram encontradas três colônias positivas para *Rtcs*-L3. Os insertos positivos foram sequenciados e comparados com a sequência do gene *Rtcs* da linhagem B73 (EF051735). No alinhamento das sequências *Rtcs*-B73 e *Rtcs*-L3 foram observados alguns SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) que não levaram a alteração da sequência de proteína. Após o sequenciamento do gene *Rtcs* no vetor de subclonagem PGEM T-Easy, foi realizada a digestão desses vetores juntamente com o vetor pMCG1005 vazio com a enzima *AvrII* e *SpeI* para clonagem no vetor de transformação. Foram obtidas quatro colônias positivas para UBI::*RtcsL3*::NOS, que foram re-sequenciadas. As construções UBI::*RtcsL3*::NOS, foram inseridas corretamente em *A. tumefaciens* e confirmadas por PCR utilizando o gene de seleção *Bar*.

Foi feita a transformação dos discos foliares a partir de plântula de tabaco cultivadas *in vitro* (Figura 1) com as construções gênicas de interesse e o material foi selecionado com o herbicida fosfotricina (PPT) (Figura 1AB) a fim de selecionar os calos resistentes. Conforme pode ser observado na Figura 1C, os calos resistentes exibem coloração esverdeada, enquanto os susceptíveis apresentam coloração marrom. O subcultivo foi feito até o aparecimento dos calos e diferenciação das folhas (Figura 1D). As plântulas isoladas foram transferidas para o solo (Figura 1EF) e estão em estágio de florescimen-

to (Figura 1G). As plantas de tabaco transgênicas (*Rtcs* L3) foram confirmadas através de PCR com primers para ubiquitina e o *Rtcs* e (Figura 2A) *Bar* (Figura 2B).

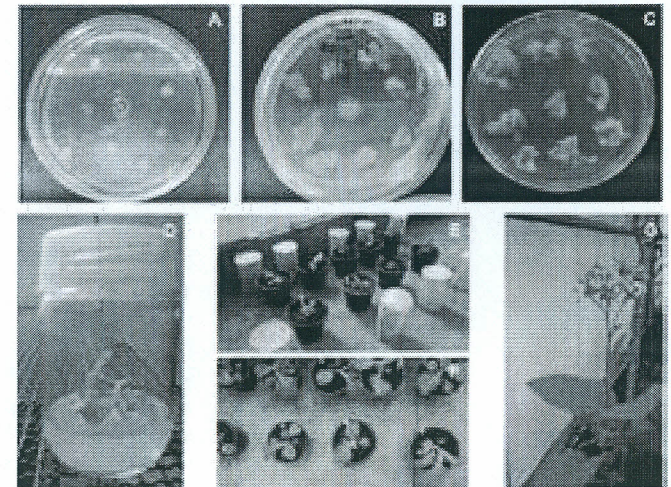


Figura 1. Processo de transformação de tabaco. A- Discos de folha de tabaco no meio MS sólido com *Agrobacterium tumefaciens* com as construções pMCG1005- *Rtcs* L3 e L22. B- Estágios iniciais da formação de calos no meio de seleção, C- Desenvolvimento da parte aérea sob seleção, D- Plântula de tabaco enraizando *in vitro*, E e F- Planta de tabaco em pote com solo na casa de vegetação, G- Tabaco florescendo.

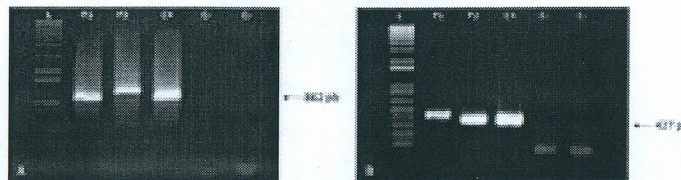


Figura 2. PCR com os genes *RtcS* e *Bar* das plantas de tabaco transformadas e regeneradas com as construções de interesse. A) Amplificação dos fragmentos com o gene *RtcS*. B) Amplificação dos fragmentos com o gene *Bar*. L: 1 kb Plus Ladder (Invitrogen), P1 e P2: Plantas transgênicas de tabaco com a construção UBI::RtcS::L3::NOS, C+: Plasmídeo pMCG1005 com UBI::RtcS::L3::NOS, C-: Planta de tabaco não transformada e Branco da reação (sem DNA). A seta indica o tamanho do fragmento obtido.

4 CONCLUSÃO

Foram obtidas duas plantas de tabaco transgênicas contendo o gene *RtcS* que serão utilizadas para análise molecular e funcional quanto ao aumento do sistema radicular, da aquisição de P e produção.

REFERÊNCIAS

BALIGAR, V. C.; FAGERIA, N. K. Nutrient use efficiency in acid soils: nutrient management and plant use efficiency. In: MONIZ, A.C., *et al.* (Ed.) Plant-soil interactions at low pH: sustainable agriculture and forestry production. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 75-95, 1997.

DE SOUSA, S. M.; CLARK, R.; MENDES, F.; DE OLIVEIRA, A.; DE VASCONCELOS, M. J.; PARENTONI, S. N.; KOCHIAN, L.; GUIMARÃES, C.; MAGALHÃES, J. A role for root morphology and related candidate genes in P acquisition efficiency in maize. *Functional Plant Biology*, 39:925-935, 2012.

LIN, J.; ASSAD-GARCIA, N.; KUO, J. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells. *Plant Science*, 109:171-177, 1995.

LOBELL, D. B.; SCHLENKER, W.; COSTA-ROBERTS, J. Climate trends and global crop production since 1980. *Science*, 333:616-620, 2011.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. A.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:8014-8018, 1984.

SAMBROOK J, RUSSELL D. W. 'Molecular cloning. A laboratory manual', Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

TARAMINO, G.; SAUER, M.; STAUFFER, J. L.; MULTANI, D.; NIU, X.; SAKAI, H.; HOCHHOLDINGER, F. The maize (*Zea mays* L.) RTCS gene encodes a LOB domain protein that is a key regulator of embryonic seminal and postembryonic shoot-borne root initiation. *The Plant Journal*, 50:649–659, 2007.

ZHANG, E.; YANG, Z.; WANG, Y.; HU, Y.; SONG, X.; XU, C. Nucleotide polymorphisms and haplotype diversity of RTCS gene in China elite maize inbred lines. *PLoS ONE*, 8(2): e56495. doi:10.1371/journal.pone.0056495, 2013.

ZHU, J.; MICKELSON, S. M.; KAEPLER, S. M.; LYNCH, J. P. Detection of quantitative trait loci for seminal root traits in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown under differential phosphorus levels. *Theor. Appl. Genet.*, 13:1-10, 2006.