

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  
MAIO DE 2020

SIMARA DA SILVA LOPES

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

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

SÃO JOÃO DEL REI  
MINAS GERAIS – BRASIL  
MAIO DE 2020

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)  
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L864a      Lopes, Simara da Silva.  
            Análise funcional do gene Pstoll de arroz e de  
            seus homólogos em milho e sorgo em plantas  
            transgênicas de tabaco / Simara da Silva Lopes ;  
            orientadora Sylvia Morais de Sousa Tinoco ;  
            coorientadora Andréa Almeida Carneiro. -- Sete  
            Lagoas, 2020.  
            81 p.

            Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em  
            Bioengenharia) -- Universidade Federal de São João  
            del-Rei, 2020.

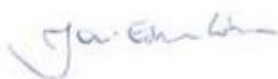
            1. Eficiência de P. 2. raiz. 3. transformação. 4.  
            superexpressão. 5. proteína quinase. I. Tinoco,  
            Sylvia Morais de Sousa, orient. II. Carneiro, Andréa  
            Almeida, co-orient. III. Título.

SIMARA DA SILVA LOPES

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

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

Aprovada em: 29 de Maio de 2020



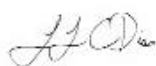
---

Dr. Joni Esrom Lima  
UFMG



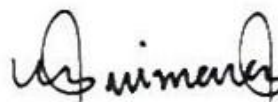
---

Dr. Evandro Novaes  
UFLA



---

Dr. Leonardo Lucas Carnevalli Dias  
UFSJ



---

Dra. Cláudia Teixeira Guimarães  
Embrapa/UFSJ



---

Dra. Sylvia Moraes de Sousa Tinoco  
Orientadora – Embrapa/UFSJ

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Norvalino e Luzia, aos meus irmãos  
Marildo, Suely e Silvana e ao meu  
companheiro/parceiro de vida Julian.*

## 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 e carinho.

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.

As minhas co-orientadoras, Dra. Andrea Almeida Carneiro e Dra. Cláudia Teixeira Guimarães, pelos valiosos ensinamentos teóricos e práticos, conselhos e sugestões. Os meus mais sinceros agradecimentos pela orientação profissional e pessoal.

A Bárbara, Mariana, Jéssica, Isabela, Gleyce e Rayanne, pelos auxílios e contribuições constantes, ensinamentos compartilhados e momentos de descontração que deixaram a jornada mais suave.

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 (DS). Universidade Federal de São João del Rei, Maio de 2020. 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-orientadoras: Dra. Andrea Almeida Carneiro e Dra. Cláudia Teixeira Guimarães.

## RESUMO

A baixa disponibilidade de fósforo (P) no solo é uma das maiores limitações para a produtividade das culturas, especialmente em solos tropicais. O gene *Phosphorus-Starvation Tolerance 1* (*OsPstol1*) codifica uma proteína quinase que aumenta a área da superfície radicular, a aquisição de P e a produtividade de grãos em arroz. Homólogos do *OsPstol1* foram identificados em sorgo e milho por mapeamento associativo e de QTL. A proteína OsPSTOL1 e ZmPSTOL3.06 são classificadas como quinases com receptor citoplasmático (RLCKs), e as proteínas SbPSTOL1, ZmPSTOL8.02 e ZmPSTOL8.05\_1 como proteínas quinases receptoras de membrana (RLKs), sendo que todas as proteínas apresentam o domínio serina-treonina quinase em comum. O objetivo deste trabalho foi analisar a função dos genes *OsPstol1* de arroz e seus homólogos em milho (*ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02* e *ZmPstol8.05\_1*) e sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*) por meio da superexpressão em tabaco. Os genes *Pstol1* foram clonados sob controle do promotor ubiquitina e o gene *Bar* como marcador de seleção e utilizados na transformação de tabaco via *Agrobacterium tumefaciens*. As dez proteínas preditas de tabaco com identidade entre 55% e 58% a OsPSTOL1 ficaram em um ramo separado das proteínas das gramíneas, apresentando diferentes combinações de domínios. A integração dos transgenes foi confirmada por PCR e após a obtenção de eventos cópia única e com expressão média e alta do transgene foram geradas linhagens homozigotas. Em meio de cultura com baixo P, as plantas superexpressando os genes *OsPstol1* e *ZmPstol3.06* apresentaram maior superfície radicular total, e as plantas superexpressando *Sb03g006765* maior superfície de raízes superfinais comparadas ao controle negativo. Sob alto P as plantas superexpressando os genes *ZmPstol8.02* e *Sb07g002840* apresentaram maior superfície radicular total e de raízes superfinais em relação ao controle negativo. Em condição de solo, as plantas superexpressando os genes *OsPstol1*,

*ZmPstol3.06*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765* apresentaram maior peso seco de parte aérea e altura de plantas sob baixo P e o conteúdo de P de parte aérea foi maior nos eventos *OsPstol1*, *ZmPstol3.06* e *Sb03g031690*. Além disso, as plantas superexpressando *OsPstol1* apresentaram peso seco de raiz superior ao controle sob alto P. Os resultados indicaram que o *Pstol1* e seus homólogos de milho e sorgo têm potencial para aumentar a superfície radicular, a aquisição de P e a produtividade em plantas dicotiledôneas.

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



LOPES, Simara da Silva (DS). Universidade Federal de São João del Rei, Maio de 2020. 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-orientadoras: Dra. Andrea Almeida Carneiro e Dra. Cláudia Teixeira Guimarães.

### ABSTRACT

The low phosphorus (P) availability in the soil is one of the greatest limitations for crop productivity, especially in tropical soils. The *Phosphorus-Starvation Tolerance 1* (*OsPstol1*) gene encodes a protein kinase that increases root surface area, P acquisition and grain yield in rice. *OsPstol1* homologs were identified in sorghum and maize by association and QTL mapping. The OsPSTOL1 and ZmPSTOL3.06 proteins are classified as receptor-type cytoplasmic kinases (RLCKs), and the SbPSTOL1, ZmPSTOL8.02 and ZmPSTOL8.05\_1 proteins as receptor-type protein kinases (RLKs), with all proteins having the serine-domain threonine kinase in common. The objective of this work was to analyze the function of rice *OsPstol1* and its maize (*ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02* and *ZmPstol8.05\_1*) and sorghum (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* and *Sb03g006765*) homologs overexpressing them in tobacco. The *Pstol1* genes were cloned under the control of the ubiquitin promoter and the *Bar* gene as a selection marker, and were used for tobacco transformation via *Agrobacterium tumefaciens*. The ten predicted tobacco proteins with an identity between 55% and 58% to OsPSTOL1 were in a separate branch from the grasses proteins, presenting different combinations of domains. The integration of the transgenes was confirmed by PCR and after obtaining single copy events with medium and high expression of the transgene, homozygous lines were generated. In culture medium with low-P, plants overexpressing the genes *OsPstol1* and *ZmPstol3.06* had a greater total root surface area, and plants overexpressing *Sb03g006765* showed a greater surface area of superfine roots compared to negative control. Under high-P, plants overexpressing the *ZmPstol8.02* and *Sb07g002840* genes had a greater root surface area of total and superfine roots compared to the depressing control. Under soil condition, plants overexpressing the genes *OsPstol1*, *ZmPstol3.06*, *Sb03g031690* presented higher dry weight of shoot and plant height under low P and the shoot P content was higher in *OsPstol1*, *ZmPstol3.06* and *Sb03g031690* events. Furthermore, plants overexpressing

*OsPstol1* showed higher root dry weight compared to the control under high P. The results indicated that rice *Pstol1* and its maize and sorghum homologs have the potential to increase root surface, P acquisition and productivity in dicot plants.

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

## DELINEAMENTO DA TESE

Esta tese é constituída por dois capítulos e está subdividida da seguinte maneira:

Referencial bibliográfico, abordando os seguintes temas da tese: importância do fósforo, eficiência no uso de fósforo, sistema radicular e a aquisição de fósforo, plantas transgênicas, transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, proteínas quinases em plantas, genes *Pstol1* e os genes *Pstol1* de arroz, milho e sorgo.

Capítulo 1, que corresponde ao artigo científico “*Auxin independent1 (Axi1)* as an endogenous gene for copy number determination in transgenic tobacco” publicado na revista Crop Breeding and Applied Biotechnology (CBAB).

Capítulo 2, que corresponde ao artigo em preparação “Genes *Phosphorus-starvation tolerance 1* de arroz, milho e sorgo são capazes de aumentar a superfície radicular e biomassa de tabaco transgênico”.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

**Figure 1** - Dissociation curve when *Axi1* primers (A) were used. The standard curve for the *Axi1* gene cloned in a plasmid with 100 000, 10 000, 1000, and 100 copies is in red and the *Axi1* gene in the *N. tobacco* genome is in blue. There were three biological and three technical replicates (Nt 1–3, rep 1–3) (B).  $R^2$ : 0.992 and Efficiency (%): 93.055.....29

**Figure 2** - Experimental workflow.....30

**Figure 3** - **(A)** Representation of the interspecific hybridization that occurred 400 000–800 000 years ago between *N. sylvestris* and *N. tomentosiformis*, which generated *N. tabacum*. **(B)** PCR analysis of the tobacco *Axi1* gene origin. **L)** 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), **1)** *N. sylvestris*, **2)** *N. tomentosiformis*, **3)** *N. tabacum*, **4)** Negative control (Water); **5)** Positive control (pGEM®-T Easy Vector with the *Axi1* gene). Red arrow indicates the amplified *Axi1* fragment (975 pb).....31

### CAPÍTULO 2

**Figura1** - Vetor binário pMCG1005 para transformação com os genes de interesse. Genes de arroz *OsPstol1* (BAK26566), milho (*ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02* e *ZmPstol8.05\_1*) e sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*) foram sintetizados e clonados nos sítios *AvrII* e *SpeI* sob o promotor da ubiquitina com o *Bar* como gene de seleção sobre o promotor4x35S.....37

**Figura 2** - Análise filogenética e domínios das proteínas de arroz (OsPSTOL1), de trigo (TaPSTOL1), de milho (*ZmPSTOL3.04*, *ZmPSTOL3.06*, *ZmPSTOL4.05*, *ZmPSTOL8.02*, *ZmPSTOL8.05\_1* e *ZmPSTOL8.05\_2*), de sorgo (*Sb03g006765*, *Sb03g031670*, *Sb03g031680*, *Sb03g031690*, *Sb03g031700* e *Sb07g002840*) e de tabaco (Nt151613, Nt182684, Nt182685, Nt97611, Nt165496, Nt165497, Nt165481, Nt165527, Nt167932, Nt75469). A análise filogenética das proteínas foi feita pelo

método da máxima verossimilhança baseado na matriz do modelo JTT com 1000 bootstraps.....44

**Figura 3** - Comprimento radicular total (cm) de plantas de tabaco gerações T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> de cinco a dez semanas sob tratamento de baixo (A) e alto P (B) de eventos do controle (pMCG1005) e eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz, milho e sorgo.....50

**Figura 4** - Sistema radicular de plantas de tabaco homozigotas após dez semanas sob tratamento de baixo P de eventos do controle (pMCG1005) e eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz (*OsPstol1*), milho (*ZmPstol8.05\_1*, *ZmPstol3.06* e *ZmPstol8.02*) e sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*).....53

**Figura 5** - Sistema radicular de plantas de tabaco homozigotas após dez semanas sob tratamento de alto P de eventos do controle (pMCG1005) e eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz (*OsPstol1*), milho (*ZmPstol8.05\_1*, *ZmPstol3.06* e *ZmPstol8.02*) e sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*).....54

**Figura 6** - Plantas de tabaco homozigotas do controle (pMCG1005) e de eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz, milho e sorgo após 146 dias sob tratamento de baixo P em casa de vegetação. A: pMCG1005 (controle), B: *OsPstol1*, C: *ZmPstol8.05\_1*, D: *ZmPstol3.06*, E: *ZmPstol8.02*, F: *Sb07g002840*, G: *Sb03g031690* e H :*Sb03g006765*.....57

**Figura 7** - Plantas de tabaco homozigotas do controle (pMCG1005) e de eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz, milho e sorgo após 85 dias sob tratamento de alto P em casa de vegetação. A: pMCG1005 (controle), B: *OsPstol1*, C: *ZmPstol8.05\_1*, D: *ZmPstol3.06*, E: *ZmPstol8.02*, F: *Sb07g002840*, G: *Sb03g031690* e H :*Sb03g006765*.....58

**Figura 8** - Correlação de Person com médias dos eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz, milho e sorgo para características de morfologia radicular, peso seco da parte aérea, peso seco de raiz, altura de plantas, conteúdo de P da parte aérea e expressão gênica relativa (RQ) em baixo P.....60

**Figura 9** - Correlação de Person com médias dos eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz, milho e sorgo para características de morfologia radicular, peso seco da parte aérea, peso seco de raiz, altura de plantas, conteúdo de P da parte aérea e expressão gênica relativa (RQ) em alto P.....61

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Table 1</b> - Copy number, segregation, and $\chi^2$ results (3,481; $p < 0.05$ ) for tobacco transgenic event T1 .....	30
--	----

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1</b> – Oligonucleotídeos e sondas utilizados nos ensaios de expressão gênica <i>Taqman</i> e <i>SYBR</i> das plantas transformadas com genes <i>Pstol1</i> .....	41
---	----

<b>Tabela 2</b> - Eventos transgênicos de tabaco ( $T_0$ ) confirmados por PCR para os genes <i>Bar</i> e <i>Pstol1</i> .....	45
---	----

<b>Tabela 3</b> - Estimativas do número de cópias do transgene <i>Bar</i> em linhagens $T_0$ de tabaco por qPCR calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando o gene <i>Axi1</i> como controle endógeno.....	46
--	----

<b>Tabela 4</b> - Segregação mendeliana e valores $\chi^2$ para eventos transgênicos de tabaco $T_1$ obtendo valores menores que o tabelado (3,481) ( $p < 0,05$ ).....	47
---	----

<b>Tabela 5</b> - Zigosidade de eventos transgênicos de tabaco <i>Pstol1</i> e controle (pMCG1005) nas gerações $T_2$ e $T_3$ .....	48
---	----

<b>Tabela 6</b> – Expressão relativa de eventos transgênicos homozigotos ( $T_3$ e $T_4$ ) de tabaco <i>Pstol1</i> e controle em condições de baixo e alto P.....	49
---	----

**Tabela 7** - Comprimento radicular total (cm), área de superfície total (cm<sup>2</sup>), área de superfície de raízes superfinas (diâmetro 0 – 0,5 mm) (cm<sup>2</sup>) e área de superfície de raízes finas (diâmetro >0,5 mm) (cm<sup>2</sup>) de plantas de tabaco gerações T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> do controle (pMCG1005) e de eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz, milho e sorgo após dez semanas sob tratamento de baixo e alto P em meio de cultura.....52

**Tabela 8** - Peso seco de parte aérea (g), peso seco de raiz (g), conteúdo de P da parte aérea (g) e altura de plantas (cm) de plantas de tabaco gerações homozigotas do controle (pMCG1005) e de eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz, milho e sorgo após 146 dias sob tratamento de baixo P em casa de vegetação.....56

**Tabela 9** - Peso seco de parte aérea (g), peso seco de raiz (g), conteúdo de P da parte aérea (g) e altura de plantas (cm) de plantas de tabaco gerações homozigotas do controle (pMCG1005) e de eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz, milho e sorgo após 85 dias sob tratamento de alto P em casa de vegetação.....56



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>DELINEAMENTO DA TESE</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xiii
<b>1 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO</b> .....	1
1.1 IMPORTÂNCIA DO FÓSFORO.....	1
1.2 EFICIÊNCIA NO USO 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 PROTEÍNAS QUINASES EM PLANTAS.....	8
1.7 <i>PHOSPHORUS-STARVATION TOLERANCE 1 (PSTOL1)</i> .....	9
1.7.1 <i>OsPSTOL1</i> .....	10
1.7.2 <i>SbPSTOL1</i> .....	11
1.7.3 <i>ZmPSTOL1</i> .....	13
<b>2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	14
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	25
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	26
<b>ABSTRACT</b> .....	26
<b>INTRODUCTION</b> .....	26
<b>MATERIAL AND METHODS</b> .....	27
Cloning the <i>Axi1</i> gene.....	27
Determination of the <i>Axi1</i> gene copy number in the tobacco genome.....	27
Confirmation of the <i>Axi1</i> parental donor.....	28
Tobacco transformation with the pMCG1005 vector.....	28
Copy number quantification of the transgenic tobacco events.....	28
Segregation test in transgenic tobacco plants.....	29
<b>RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	29
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	32
<b>REFERENCES</b> .....	32
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	34

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	34
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
<b>Construção da árvore filogenética e análise dos domínios de proteínas quinases de tabaco e gramíneas</b> .....	35
<b>Geração de plantas de tabaco com os genes <i>Pstol1</i> de arroz, milho e sorgo</b> .....	36
<b>Análise de zigosidade de eventos transgênicos de tabaco por PCR semiquantitativo</b> .....	38
<b>Análise de zigosidade de eventos transgênicos de tabaco por PCR em tempo real (qPCR)</b> .....	39
<b>Análise de expressão dos transgenes por PCR em tempo real</b> .....	39
<b>Caracterização morfológica do sistema radicular</b> .....	41
<b>Avaliação fenotípica de eventos transgênicos de tabaco <i>Pstol1</i> em casa de vegetação sob condições contrastantes de P</b> .....	42
<b>Análises de dados</b> .....	42
<b>RESULTADOS</b> .....	43
<b>Proteínas quinases de tabaco agrupam separadamente das proteínas PSTOL1 das gramíneas</b> .....	43
<b>Caracterização molecular dos eventos transgênicos de tabaco</b> .....	45
<b>Caracterização fenotípica de eventos transgênicos de tabaco <i>Pstol1</i> mostra aumento do sistema radicular e biomassa</b> .....	49
<b>Correlação entre as características de morfologia radicular, produtividade e expressão gênica</b> .....	59
<b>DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69
<b>4 CONCLUSÃO GERAL</b> .....	78
<b>ANEXO 1 – MEIOS DE CULTIVO</b> .....	79

## 1 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

### 1.1 IMPORTÂNCIA DO 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; Summerhays *et al.* 2017). Entretanto, o P é um macronutriente pouco 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 baixas concentrações, consideradas subótimas para o cultivo agrícola (Vance *et al.* 2003). Além disso, 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; Chapin *et al.* 2011; Daneshgar *et al.* 2018). A forma de P preferencialmente absorvida pelas plantas é  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e sua maior disponibilidade ocorre na faixa de pH de 6,0-7,0, onde sua fixação é minimizada (Munroe 2018). O P é considerado um dos macronutrientes com menor mobilidade no solo (Raghothama 1999; Munroe 2018), com maiores concentrações nas camadas superficiais do solo e baixa concentração nas camadas inferiores (Vance *et al.* 2003; Malhotra *et al.* 2018).

Como o P é um nutriente limitante em muitos solos para o crescimento das plantas, normalmente são aplicadas altas doses de fertilizantes fosfatados. Cerca de 90% do fosfato natural extraído é destinado a fertilizantes para a agricultura, e sendo o P um recurso não-renovável, com pico de exploração estimado para 2070, os custos de produção irão aumentar, principalmente em países em desenvolvimento (Cordell *et al.* 2011; Daneshgar *et al.* 2018). Nesse contexto, o desenvolvimento de cultivares mais eficientes no uso de P, juntamente com práticas agrícolas são necessários para viabilizar a produção agrícola.

## 1.2 EFICIÊNCIA NO USO 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 absorção do nutriente (aquisição) e eficiência com que o nutriente absorvido pela planta é utilizado para produzir grãos (utilização) (Moll *et al.* 1982).

As modificações metabólicas envolvidas na eficiência de utilização de P são 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; Veneklaas *et al.* 2012; van de Wier *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). 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.

A maior eficiência na aquisição de P ocorre aumentando o forrageamento para locais ricos em P (solo superficial) e pelo aumento da solubilização de P. Uma maior produção de raízes nodais e com ângulos mais superficiais, maior densidade de raízes laterais, maior comprimento e densidade de pelos radiculares, associação com fungos micorrízicos arbusculares e uma maior solubilização de P feita por exsudados, principalmente carboxilatos, protons e fosfatases, podem aumentar a eficiência na absorção de P (Richardson *et al.* 2011; Lynch 2019).

### 1.3 SISTEMA RADICULAR E A AQUISIÇÃO DE FÓSFORO

As raízes desempenham uma série de funções, como absorção de água e nutrientes, ancoragem no solo, estabelecimento de interações bióticas na rizosfera. Portanto, mudanças no sistema radicular podem afetar diretamente a absorção de água e nutrientes (López-Bucio *et al.* 2003). 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 com raízes de plantas vizinhas (Lynch 2007; Lynch 2011; Shahzad & Amtmann 2017). Em solos com baixo P, a arquitetura do sistema radicular mostra adaptações para exploração do solo superficial com consequente aumento da aquisição de P. As mudanças que ocorrem são: aumento do número e comprimento de raízes, ângulos de raízes mais superficiais, aumento do número e comprimento de pelos radiculares e formação de raízes proteóides (Bates & Lynch 2001; Lynch & Brown 2001; Rubio *et al.* 2003; Shane & Lambers 2005; Wang *et al.* 2010; Flavel *et al.* 2014; Nestler & Wissuwa 2016; Kawa *et al.* 2016; Morris *et al.* 2017)

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 dão 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, contendo cerca de 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).

Monocotiledôneas e dicotiledôneas respondem de formas diferentes às concentrações de P no solo. Um estudo com 16 espécies, dentre elas cereais como o milho e sorgo, legumes (alfafa e soja e cebolas: cebolinha e cebolinha alho) mostrou diversidade nas repostas às condições contrastantes de P no solo dentro de uma espécie ou entre todas as espécies em relação à morfologia radicular, associação com fungos micorrízicos e exsudados radiculares. Em condições de baixo P, espécies com raízes mais finas (ex: milho, sorgo) mostraram aumento de ramificação radicular e comprimento de raízes de primeira ordem, enquanto espécies de raízes mais grossas não mostraram diferença (ex: *Vigna radiata*, *Pisum sativum*). Sob alto P, todas as espécies que são colonizadas por fungos micorrízicos mostraram diminuição na colonização, embora espécies com raízes mais grossas apresentassem maior taxa de colonização quando comparadas com plantas com raízes mais finas, que mostram menor taxa de colonização. Para exsudados radiculares, sob condições de baixo P, houve menor exsudação em plantas com raízes mais finas, com diferentes taxas entre cada espécie estudada (Wen *et al.* 2019).

Plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* e tabaco (*Nicotiana tabacum*) têm sido utilizadas para compreender respostas e mecanismos relacionados à deficiência de P. Em *Arabidopsis thaliana* sob condições de baixo P, os níveis de auxina no ápice da raiz são aumentados, facilitando a síntese de auxina mediada por *Taa1* (*tryptophan aminotransferase of arabidopsis1*) e o seu transporte dependente do transportador de influxo de auxina (*Aux1*). Esse aumento de auxina leva à indução do ativador transcricional *Arf19* no ápice radicular, resultando na indução dos fatores de transcrição *Rsl2* (*root hair defective 6-like 2*) e *Rsl4* (*root hair defective 6-like 4*) nas zonas de alongamento e diferenciação, respectivamente, promovendo o alongamento dos pelos radiculares (Bhosale *et al.* 2018). Quando cultivadas em meio de cultura com baixo P plântulas de *Arabidopsis thaliana* mostram um aumento no número de células corticais, com consequente

aumento de células epidérmicas, onde são formados os pelos radiculares (Janes *et al.* 2018).

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, apresenta um aumento na razão raiz:parte aérea, 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 sob diferentes concentrações de P em estágios iniciais e tardios do desenvolvimento das plântulas mostram 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 alguns genes envolvidos no desenvolvimento do sistema radicular em milho e *Arabidopsis* são *Rum1* (*rootless with undetectable meristems 1*) (Woll *et al.* 2005), *Rtcs* (*rootless concerning crown and seminal roots*) (Taramino *et al.* 2007), *Bige1* (*Big embryo 1*) (Suzuki *et al.* 2015), *ZmPht1* (phosphate transporters) (Liu *et al.* 2016), *ZmRAP2.7* (AP2 transcription factor) (Li *et al.* 2019), *Tir1* (*transport inhibitor response 1*) e *Arf19* (*auxin response factor 19*) (Pérez-Torres *et al.* 2008), *Pip5k* (*phosphatidyl inositol phosphate 5-kinase*) (Wada *et al.* 2015), *AtDro1* (*deeper rooting 1*) (Guseman *et al.* 2017) e *Exocyst70A3* (exocytosis factor) (Ogura *et al.* 2019).

#### 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. O transgene corresponde a um ou mais genes que podem ser inseridos artificialmente de uma espécie de planta ou de uma espécie totalmente diferente, que não são sexualmente compatíveis. 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 e/ou silenciamento, é possível analisar membros de famílias gênicas individualmente ou em conjunto, caracterizar a função de genes de organismos através da expressão heteróloga e identificar genes que conferem tolerância a diversos tipos de estresses (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 de dicotiledôneas 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, no entanto, apesar das monocotiledôneas não serem suas hospedeiras naturais (Binns & Thomashow, 1988; Bourras *et al.* 2015), é possível seu uso em protocolos de transformação genética de 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. O gene *TsVP*, responsável pela codificação da enzima vacuolar H<sup>+</sup>- pirofosfatase, mantém o pH vacuolar, proporciona energia para transporte no tonoplasto e estimula o transporte de auxina da planta *Thellungiella halophila*. Quando superexpresso em milho apresenta maior crescimento radicular, conteúdo e concentração de fosfato e produtividade de grãos (Pei *et al.* 2012).

Um sistema repórter para monitorar a deficiência de P em tempo real no tabaco foi testado usando o gene *Purple (Pr)* da couve-flor (*Brassica oleracea var botrytis*), que produz antocianina 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 (Liu *et al.* 2014).

Linhagens de tabaco superexpressando o gene do transportador de fosfato *OsPT8* de arroz aumentam significativamente a concentração total de P em condições suficientes de P, a biomassa em condições de deficiência de P e também o acúmulo de selênio (Se) em condições suficientes de P em relação ao tipo selvagem. O aumento na aquisição de P e Se em linhagens transgênicas de tabaco tornam o gene *OsPT8* promissor para reduzir a fertilização com esses nutrientes e obter plantas de tabaco enriquecidas com Se (Song *et al.* 2017).

## 1.6 PROTEÍNAS QUINASES EM PLANTAS

Proteínas quinases são enzimas que catalisam a transferência de fosforil de MgATP para cadeias laterais serina/treonina e tirosina nas proteínas (Wang & Cole 2014). A especificidade das proteínas quinases serina/treonina é parcialmente determinada por interações com alguns resíduos próximos ao resíduo que recebe o grupo fosfato, formando o motivo quinase substrato (Bradley & Beltrao 2019). Grande parte dessas proteínas são proteínas da membrana plasmática, mas existem também as que são quinases associadas à parede (WAKs) ligadas à fração de pectina da parede celular (Lim *et al.* 2015) e as citoplasmáticas que não possuem ligação à membrana plasmática (Zhang *et al.* 2014; Ye *et al.* 2017).

Proteínas quinases tipo receptoras (RLKs) são proteínas quinases serina/treonina com importante papel em vias de sinalização que regulam desenvolvimento, resistência a doenças, sinalização hormonal e auto-incompatibilidade em plantas (Ye *et al.* 2017). As RLKs possuem um domínio catalítico de proteína quinase, um transmembranar e um extracelular de ligação ao ligante (Walker 1994; Greeff *et al.* 2012). O domínio catalítico de proteína quinase é intracelular e o centro da cascata de sinalização, que transmite sinais abaixo do sinal recebido. O domínio transmembrana transmite o sinal através da conexão dos domínios extracelular e intracelular para o domínio intracelular, e o domínio extracelular de ligação ao ligante é o centro de combinação dos sinais (Ye *et al.* 2017).

Proteínas quinases realizam fosforilação reversível de proteínas, um importante mecanismo na regulação de vias que permitem as plantas tolerarem/sobreviverem às condições ambientais adversas (Chae *et al.* 2010). Essas proteínas percebem sinais moleculares que irão permitir as plantas responderem a fatores bióticos e abióticos no ambiente para estabelecer relações simbióticas com microrganismos benéficos, ativar respostas imunes contra microrganismos fitopatogênicos e responder ao estresse abiótico (Liang & Zhou 2018).

Como exemplos de proteínas quinases envolvidas em respostas às condições contrastantes de P podemos citar o gene de *Arabidopsis thaliana Botrytis-induced kinase1 (Bik1)*, uma quinase tipo receptora localizada na

membrana plasmática, envolvida na resposta ao estresse de P e na resistência ao fungo *Botrytis cinerea* (Zhang *et al.* 2016). Além disso, proteínas quinases com potencial papel no desenvolvimento e crescimento de pelos radiculares sob estresse de P foram identificadas em análise de co-expressão de proteínas quinases com proteínas fosfatases no genoma de raízes de *Arabidopsis* sob estresse e condições suficientes de P (Lan *et al.* 2013).

### 1.7 PHOSPHORUS-STARVATION TOLERANCE 1 (PSTOL1)

Há vários estudos descrevendo QTLs (*Quantitative Trait Loci*) para características radiculares (Liu *et al.* 2008; Ruta *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2014; Burton *et al.* 2014; Salvi *et al.* 2016), porém eles ainda são pouco utilizados como critério de seleção nos programas de melhoramento, uma vez que eles possuem efeitos pequenos 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 à eficiência na aquisição de P (Ni *et al.* 1998; Wissuwa *et al.* 1998; Wissuwa & Ae 2001). Trabalhos com uma população de mapeamento derivada de Kasalath (eficiente na aquisição de P) e Nipponbare (ineficiente) indicam que o *Pup1* responde por cerca de 80% da variabilidade fenotípica para características relacionadas com absorção de P em arroz (Wissuwa *et al.* 2002). O sequenciamento do loco *Pup1* em Kasalath mostrou um transposon com uma deleção de ~90 Kb no genoma de referência do arroz Nipponbare e de outras variedades de arroz deficientes no uso de P (Heuer *et al.* 2009).

Em arroz o gene presente no loco *Pup1* é o *Phosphorus-starvation tolerance 1* (*Pstol1*) (Gamuyao *et al.* 2012). Homólogos deste gene foram encontrados em sorgo e milho por meio de genômica comparativa e possuem alta similaridade de sequência de proteínas com *OsPstol1* (Hufnagel *et al.* 2014; Azevedo *et al.* 2015).

Novos alelos do gene *Pstol1* para eficiência na aquisição de P foram encontrados nas espécies selvagens do germoplasma de arroz *Oryza rufipogon*

usando marcadores SSR e sequência do gene *OsPstol1*. Dentre os 53 polimorfismos encontrados (52 SNPs e 1 mutação não senso), há 17 haplótipos, dos quais 8 tem diferenças significativas no comprimento radicular e peso quando crescidos em condições contrastantes de P. O acesso *O. rufipogon* IRGC 106506 apresenta maior peso de raiz e conteúdo de P quando comparado com o controle, sendo potencial doador para cultivares elite de arroz (Neelam *et al.* 2017).

O gene *TaPstol* de trigo, localizado no braço curto do cromossomo 5A, codifica uma proteína quinase putativa e compartilha alto nível de similaridade com *OsPstol1*. *TaPstol* controla características agrônômicas importantes como alteração do crescimento radicular em condições de baixo P e aumento do conteúdo de P no grão. Além disso, modula o tempo de florescimento e tamanho do grão em trigo (Milner *et al.* 2018).

### 1.7.1 *OsPSTOL1*

O gene responsável pelo loco *Pup1*, *Phosphorus-starvation tolerance 1* (*Pstol1*) codifica uma proteína quinase envolvida no desenvolvimento precoce do sistema radicular de arroz em condições de baixo P, presente na variedade tradicional *Kasalath* e ausente no genoma de referência do arroz Nipponbare (Gamuyao *et al.* 2012). *OsPstol1* possui sequência de aminoácidos com alta similaridade com a família de receptor serina/treonina quinase LRK10L-2, mas como não possui extensão amino-terminal presente nessa família, foi classificado como receptor tipo quinase citoplasmática (Dardick *et al.* 2007; Vij *et al.* 2008).

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*. As análises fenotípicas em duas regiões com solos com baixo P mostram que a alta expressão do transgene aumenta 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 são maiores em linhagens IR64 com alta expressão do transgene em comparação com plantas não transgênicas ou com a baixa expressão do transgene em condições de baixo P. De forma semelhante, o peso de grãos e o total de P são maiores nas

linhagens transgênicas de *Nipponbare* em relação às plantas controle ou com baixa expressão (Gamuyao *et al.* 2012).

Linhagens IR64 superexpressando o gene *Pstol1* e linhagens semi-isogênicas (NILs) de arroz com (IR64) o gene *Pstol1* tem maior comprimento e área de superfície em solução nutritiva com baixo e alto de P (Gamuyao *et al.* 2012). A expressão do gene repórter da  $\beta$ -glucuronidase (GUS) sob controle do promotor nativo do *Pstol1* ocorre no meristema, onde são formadas as raízes da coroa, principais constituintes do sistema radicular em arroz. No meristema radicular, a expressão de GUS está restrita aos primórdios das raízes da coroa e células do parênquima fora do cilindro vascular periférico, padrão semelhante à de outros genes envolvidos no desenvolvimento radicular. Esses dados indicam que o gene *Pstol1* é um regulador do desenvolvimento precoce do crescimento da raiz em arroz (Gamuyao *et al.* 2012).

### 1.7.2 *SbPSTOL1*

Foram identificados seis homólogos ao *OsPstol1* em sorgo (*Sorghum bicolor*) com identidade superior a 55% (Hufnagel *et al.* 2014). Semelhante ao *OsPSTOL1*, todas as seis proteínas *PSTOL1* de sorgo (*SbPSTOL1*) têm um domínio serina/treonina quinase e são RLKs membros da família de proteínas quinase1 da raiz do milho (*CRPK1*) (Takezawa *et al.* 1996).

Dois painéis de associação de sorgo foram usados para o mapeamento associativo com SNPs para os seis genes *SbPstol1* (*Sb03g006765*, *Sb03g031670*, *Sb03g031680*, *Sb03g031690*, *Sb03g031700* e *Sb07g002840*) no Brasil no Subconjunto do Painel de Associação de Sorgo (SAPst) para produção de grãos em solo e morfologia radicular, absorção de P e acúmulo de biomassa em hidroponia, e na África no Painel de Associação da África Ocidental (WAP) para biomassa e absorção de P em solo, ambos em condições de baixo P. No SAPst há associação de SNPs dos genes *Sb03g006765* e *Sb03g031690* com diâmetro radicular e área de superfície radicular, enquanto dois SNPs *Sb03g031690* estão fracamente associados ao volume de raízes finas. No WAP para as mesmas características e SNPs, múltiplos SNPs dentro de *Sb03g006765* foram detectados

para concentração e conteúdo de P na parte aérea além do acúmulo de biomassa em perfilho único. Para *Sb03g031690* foram detectadas associações quanto ao conteúdo de P e características de acúmulo de biomassa (Hufnagel *et al.* 2014).

A validação por mapeamento de QTL biparental em população de RILs proveniente de genótipos de sorgo contrastantes para absorção de P (BR007 eficiente e SC283 ineficiente na absorção de P) identificou QTLs para morfologia radicular para os genes *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 há forte associação dos genes *Sb03g006765* e *Sb03g031690* com características de arquitetura radicular como *bushiness* (razão do número máximo de raízes dividido pelo número médio de raízes), centróide (posição vertical do centro de massa do sistema radicular inteiro), número médio de raízes e comprimento específico da raiz (Hufnagel *et al.* 2014).

Os resultados de 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. O mapeamento de QTL para múltiplas características confirmou QTLs pleiotrópicos subjacentes a alterações na morfologia do sistema radicular e na produtividade de grãos para os genes *SbPstol1* (Bernardino *et al.* 2019). O gene *Sb03g006765* e o grupo de quatro genes que incluem o gene *Sb03g031690* estão próximos de QTLs para produtividade de grãos e área de superfície de raízes finas, e o gene *Sb07g002840* próximo de QTLs para produtividade de grãos e diâmetro radicular (Bernardino *et al.* 2019). Além disso, as proteínas dos genes *Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765* possuem um domínio transmembrana, um domínio C terminal de receptor quinase associado à parede nas proteínas *Sb03g031690* e *Sb03g006765* e um domínio de ligação GUB\_WAK apenas na proteína *Sb03g006765*. Portanto, os genes *Sb03g006765*, *Sb03g031690* e *Sb07g002840* foram selecionados para superexpressão em tabaco.

### 1.7.3 *ZmPSTOL1*

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) identificou treze regiões genômicas associadas a características de morfologia radicular, acúmulo de biomassa e conteúdo de P em plântulas de milho. Neste mapeamento em adição aos marcadores SSR e SNPs seis genes *ZmPstol1* homólogos do gene *OsPstol1* foram usados para predição de suas posições físicas (Azevedo *et al.* 2015).

As seis proteínas (*ZmPstol3.04*, *ZmPstol3.06*, *ZmPstol4.05*, *ZmPstol8.02*, *ZmPstol8.05\_1* e *ZmPstol8.05\_2*) preditas no genoma do milho homólogas ao *OsPstol1* compartilham mais de 55% de identidade de sequência de aminoácidos. Todas as proteínas ZmPSTOL1 possuem domínios conservados de ligação a ATP e serina/treonina quinase como OsPSTOL1 (Azevedo *et al.* 2015). As proteínas de milho ZmPSTOL4.05, ZmPSTOL8.02, ZmPSTOL8.05\_1 e ZmPSTOL8.05\_2 foram classificadas por Azevedo *et al.* (2015) como quinases do tipo receptoras (RLKs), com domínio transmembranar e domínio quinase intracelular (Shiu & Bleeker 2001; Vij *et al.* 2008) e ZmPSTOL3.04 e ZmPSTOL3.06 como quinases citoplasmáticas do tipo receptor (RLCKs), com domínio quinase intracelular, mas ausente o domínio transmembrana (Vij *et al.* 2008).

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 na linhagem parental doadora dos alelos favoráveis (L22 para *ZmPstol8.02* e *ZmPstol8.05\_1* e L3 para *ZmPstol3.06*), e 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 (Azevedo *et al.* 2015). O gene *ZmPstol8.02* co-localiza com QTLs para comprimento de raiz, área de superfície de raiz, razão raiz: parte aérea e conteúdo P, e os genes *ZmPstol8.05\_1*, *ZmPstol4.05* e *ZmPstol3.06* co-localizam com QTLs para comprimento de raiz, diâmetro de raiz e razão raiz: parte aérea, respectivamente.

A co-localização com QTLs de morfologia radicular e a maior expressão na raiz do que na parte aérea em condições de baixo P na linhagem parental doadora dos alelos favoráveis são importantes evidências de que esses genes podem atuar

de forma semelhante ao *OsPstol1*, e dessa forma os genes *ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02* e *ZmPstol8.05\_1* foram selecionados para superexpressão em tabaco.

## 2 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: ÇIFTIÇ, 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.; BURGESSC, R.R. (1994). An Overview of a Feasibility Study for the Production of Industrial Enzymes in Transgenic Alfalfa. *Annals New York Academy of Sciences* 721: 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.
- BATES, T.R.; LYNCH, J.P. (2001). Root hairs confer a competitive advantage under low phosphorus availability. *Plant and Soil* 236: 243–250.
- BERNARDINO, K.C.; PASTINA, M.M.; MENEZES, C.B.; DE SOUSA, S.M.; MACIEL, L.S.; CARVALHO JR, G.; GUIMARÃES, C.T.; BARROS, B.A.; COSTA e SILVA, L.; CARNEIRO, P.C.S.; SCHAFFERT, R.E.; KOCHIAN, L.V.; MAGALHÃES, J.V. (2019). The genetic architecture of phosphorus efficiency in sorghum involves pleiotropic QTL for root morphology and grain yield under low phosphorus availability in the soil. *BMC plant biology* 19: 87.



- BHOSALE, R.; GIRI, J.; PANDEY, B. K.; GIEHL, R. F.; HARTMANN, A.; TRAINI, R.; TRUSKINA, J.; LEFTLEY, N.; HANLON, M.; SWARUP, K. (2018). A mechanistic framework for auxin dependent *Arabidopsis* root hair elongation to low external phosphate. *Nat. Commun.* 9: 1409.
- 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. Microbiol* 42: 575-606.
- BRADLEY, D.; BELTRAO, P. (2019). Evolution of protein kinase substrate recognition at the active site. *PLoS Biol* 17.
- BURTON, A.L.; JOHNSON, J.M.; FOERSTER, J.M.; HIRSCH, C.N.; BUELL, C.R.; HANLON, M.T.; KAEPLER, S.M.; BROWN, K.M.; LYNCH, J.P. (2014). QTL mapping and phenotypic variation for root architectural traits in maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 127: 2293–2311.
- CHAE, L.; CHEONG, Y.H.; KIM, K-N.; PANDRY, G.K.; LUAN, S. (2010). Protein kinases and phosphatases for stress signal transduction in plants. In: PAREEK, A.; SOPORY, S.K.; BOHNERT, H.J.; GOVINDJEE, eds. *Abiotic stress adaptation in plants: physiological, molecular and genomic foundation*. Dordrecht: Springer 123–163.
- CHAPIN, F.S.III.; MATSON, P.A.; VITOUSEK, P. (2011). *Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology*. New York, NY: Springer Science & Business Media.
- CORDELL, D.; WHITE, S.; LINDSTRÖM, T. (2011). Peak phosphorus: The crunch time for humanity? *The Sustainability Review*.
- DANESHGAR, S.; CALLEGARI, A.; CAPODAGLIO, A.G.; VACCARI, D. (2018). The potential phosphorus crisis: resource conservation and possible escape technologies: a review. *Resources* 7: 37.
- DARDICK, C.; CHEN, J.; RICHTER, T.; OUYANG, S.; RONALD, P. (2007). The rice kinase database. A phylogenomic database for the rice kinome. *Plant Physiol.* 143: 579–586.
- 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.
- FLAVEL, R.J.; GUPPY, C.N.; TIGHE, M.K.; WATT, M.; YOUNG, I.M. (2014). Quantifying the response of wheat (*Triticum aestivum* L) root system architecture to phosphorus in an Oxisol. *Plant Soil* 385: 303–310.
- 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 *Nicotiana tabacum* in response to 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.
- 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.
- GREEFF, C.; ROUX, M.; MUNDY, J.; PETERSEN, M. (2012). Receptor-like kinase complexes in plant innate immunity. *Front Plant Sci* 3: 264–270.
- GUSEMAN, J.M.; WEBB, K.; SRINIVASAN, C.; DARDICK, C. (2017). DRO1 influences root system architecture in *Arabidopsis* and *Prunus* species. *Plant J.* 89: 1093–1105.
- HUFNAGEL, B.; De SOUSA, S.M.; ASSIS, L.; GUIMARÃES, C.T.; LEISER, W.; AZEVEDO, G.C.; NEGRI, B.F.; 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.
- HEUER, S.; LU, X.; CHIN, J.H.; TANAKA, J.P.; KANAMORI, H.; MATSUMOTO, T.; DE LEON, T.; ULAT, V.J.; ISMAIL, A.M.; YANO, M.; WISSUWA, M. (2009). Comparative sequence analyses of the major quantitative trait locus phosphorus uptake 1 (*Pup1*) reveal a complex genetic structure. *Plant Biotechnology Journal* 7: 456–471.
- HOCHHOLDINGER, F.; ZIMMERMANN, R. (2008). Conserved and diverse mechanisms in root development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 11: 70–74.
- JANES, G.D.; WANGENHEIM, V.; COWLING, S.; KERR, I.; BAND, L. A.; FRENCH, P.; BISHOPP, A. (2018). Cellular patterning of *Arabidopsis* roots under low phosphate conditions. *Front. Plant Sci.* 9: 735.
- KAWA, D.; JULKOWSKA, M.M.; SOMMERFELD, H.M.; TER HORST, A.; HARING, M.A.; TESTERINK, C. (2016). Phosphate-dependent root system architecture responses to salt stress. *Plant Physiology* 172: 690–706.
- 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, J.; CHEN, F.; LI, Y.; LI, P.; WANG, Y.; MI, G.; YUAN, L. (2019). *ZmRAP2.7*, an AP2 transcription factor, is involved in maize brace roots development. *Front. Plant Sci.* 10: 820
- LIANG, X.; ZHOU, J.M. (2018). Receptor-Like Cytoplasmic Kinases: Central Players in Plant Receptor Kinase-Mediated Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69: 267–299.
- LIM, C.W.; YANG, S.H.; SHIN, K.H.; LEE, S.C.; KIM, S.H. (2015). The *AtLRK10L1.2*, *Arabidopsis*, ortholog of wheat LRK10, is involved in ABA-mediated signaling and drought resistance. *Plant Cell Rep* 34: 447–455.
- 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.
- LIU, 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.
- LIU, F.; XU, Y.; JIANG, H.; JIANG, C.; DU, Y.; GONG, C.; WANG, W.; ZHU, S.; HAN, G.; CHENG, B. (2016). Systematic identification, evolution and expression analysis of the *Zea mays* *PHT1* gene family reveals several new members involved in root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *International Journal of Molecular Sciences* 17: 930.
- 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: 493–512.
- LYNCH, J.P.; BROWN, K.M. (2001). Topsoil foraging – an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant and Soil* 237: 225–237
- 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.
- LYNCH, J.P. (2019). Root phenotypes for improved nutrient capture: An underexploited opportunity for global agriculture. *New Phytol.* 223: 548–564.

- 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.
- MALHOTRA, H.; VANDANA, SHARMA, S.; PANDEY, R. (2018). Phosphorus Nutrition: plant growth in response to deficiency and excess. In: HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M.; OKU, H.; NAHAR, K.; HAWRYLAK-NOWAK, B. (eds) *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance*. Springer, Singapore, p. 171-190.
- 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.
- MILNER, M.J.; HOWELLS, R.M.; CRAZE, M.; BOWDEN, S.; GRAHAM, N.; WALLINGTON, E.J. (2018). A PSTOL-like gene, TaPSTOL, controls a number of agronomically important traits in wheat. *BMC plant biology* 18: 115-129.
- MOLL, R.H.; KAMPRATH E.J.; JACKSON, W.A. (1982). Analysis and Interpretation of Factors Which Contribute to Efficiency of Nitrogen Utilization. *Journal Series of the North Carolina*, North Car- Agric. Res. Service, Raleigh, NC 27650.
- MOLLIER, A.; PELLERIN, S. (1999). Maize root system growth and development as influenced by phosphorus deficiency. *Journal of Experimental Botany* 50: 487–497.
- MORRIS, E.C.; GRIFFITHS, M.; GOLEBIOWSKA, A.; MAIRHOFER, S.; BURRHERSEY, J.; GOH, T.; VON WANGENHEIM, D.; ATKINSON, B.; STURROCK, C.J.; LYNCH, J.P.; VISSENBERG, K.; RITZ, K.; WELLS, D.M.; MOONEY, S.J.; BENNETT, M.J. (2017). Shaping 3D root system architecture. *Curr. Biol.* 27: R919–R930.
- MUNROE, J. (2018). Soil Fertility Handbook, Publication 611, 3rd edition.
- NEELAM, K.; THAKUR, S.; NEHA, YADAV, I.S.; KUMAR, K.; DHALIWAL, S.S.; SINGH, K. (2017). Novel alleles of *Phosphorus-Starvation Tolerance 1* gene (PSTOL1) from *Oryza rufipogon* confers high phosphorus uptake efficiency. *Frontiers in Plant Science* 8: 508.

- NESTLER, J.; WISSUWA, M. (2016). Superior root hair formation confers root efficiency in some, but not all, rice genotypes upon P deficiency. *Frontiers in Plant Science* 7: 1935.
- 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.
- OGURA, T.; GOESCHL, C.; FILIAULT, D.; MIREA, M.; SLOVAK, R.; WOLHRAB, B.; SATBHAI, S.B.; BUSCH, W. (2019). Root system depth in *Arabidopsis* is shaped by *EXOCYST70A3* via the dynamic modulation of auxin transport. *Cell* 178: 400–412.
- 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.
- 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.
- PÉREZ-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.
- 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: e43501. doi:10.1371/journal.pone.0043501.
- 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.

- RAGHOTHAMA, K.G. (1999). Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 665-693.
- RANI, S.J.; USHA, R. (2013). Transgenic plants: Types, benefits, public concerns and future. *Journal of Pharmacy Research* 6: 879-883.
- 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.
- RICHARDSON, A.E.; LYNCH, J.P.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; SMITH, F.A.; SMITH, S.E.; HARVEY, P.R.; RYAN, M.H.; VENEKLAAS, E.J.; LAMBERS H.; OBERSON, A.; CULVENOR, R.A.; SIMPSON, R.J. (2011). Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant and Soil* 349: 121–156.
- RUBIO, G.; LIAO, H.; YAN, X.; LYNCH, J.P. (2003). Topsoil foraging and its role in plant competitiveness for phosphorus in common bean. *Crop Science* 43: 598-607.
- 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.
- SALVI, S.; GIULIANI, S.; RICCIOLINI, C.; CARRARO, N.; MACCAFERRI, M.; PRESTERL, T.; OUZUNOVA, M.; TUBEROSA, R. (2016). Two major quantitative trait loci controlling the number of seminal roots in maize co-map with the root developmental genes *rtcs* and *rum1*, *J. Exp. Bot.* 67: 1149–1159.
- SHAHZAD, Z.; AMTMANN, A. (2017). Food for thought: how nutrients regulate root system architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 39: 80–87.
- SHANE, M.W.; LAMBERS, H. (2005). Cluster roots: a curiosity in context. *Plant and Soil* 274: 99–123.
- SHIU, S.H.; BLEECKER, A.B. (2001). Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10763–8.
- SONG, Z.P.; SHAO, H.; HUANG, H.G.; SHEN, Y.; WANG, L.Z; WU, F.Y.; HAN, D.; SONG, J.; JIA, H. (2017). Overexpression of the phosphate transporter gene *OsPT8*, improves the Pi and selenium contents in *Nicotiana tabacum*. *Environmental and Experimental Botany* 137:158–165.

- SMITH, E.F.; TOWNSEND, C.O. (1907). A plant-tumor of bacterial origin. *Science* 24: 671–673.
- SMITH, S.; DE SMET, I. (2012). Root system architecture: insights from *Arabidopsis* and cereal crops. *Phil. Trans. R. Soc. B* 367: 1441–1452.
- SUMMERHAYS, J.S.; JOLLEY, V.D.; HILL, M.W.; HOPKINS, B.G. (2017). Enhanced phosphorus fertilizers (Carbond P® and Avail®) supplied to maize in hydroponics. *Journal of Plant Nutrition* 20: 2889-2897
- SUZUKI, M.; SATO, Y.; WU, S.; KANG, B.H.; MCCARTY, D.R. (2015). Conserved functions of the MATE transporter BIG EMBRYO1 in regulation of lateral organ size and initiation rate. *Plant Cell* 27: 2288–2300.
- TAKEZAWA, D.; PATIL, S.; BHATIA, A.; POOVAIAH B.W. (1996). Calcium-dependent protein kinase genes in corn roots. *J Plant Physiol* 149: 329–335
- 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.
- 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
- 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.
- 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. *Mol Plant*. 1: 732–50.



- WADA, Y.; KUSANO, H.; TSUGE, T.; AOYAMA, T. (2015). Phosphatidyl inositol phosphate 5-kinase genes respond to phosphate deficiency for root hair elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 81: 426–437.
- WALKER, J.C. (1994). Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Mol Biol* 26(5): 1599–1609.
- WANG, X.R.; SHEN, J.B.; LIAO, H. (2010). Acquisition or utilization, which is more critical for enhancing phosphorus efficiency in modern crops? *Plant Sci* 179: 302–306
- WANG, Z.; COLE P.A. (2014). Catalytic mechanisms and regulation of protein kinases. *Methods Enzymol.* 548: 1–21.
- WEN, Z.; LI, H.; SHEN, Q.; TANG, X.; XIONG, C.; LI, H.; PANG, J.; RYAN, M.H.; LAMBERS, H.; SHEN, J. (2019). Tradeoffs among root morphology, exudation and mycorrhizal symbioses for phosphorus-acquisition strategies of 16 crop species. *New Phytologist* 223: 882– 895.
- 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* 139: 1255–1267.
- YE, Y.; DING, Y.; JIANG, Q.; WANG, F.; SUN, J.; ZHU, C. (2017). The role of receptor-like protein kinases (RLKs) in abiotic stress response in plants. *Plant Cell Rep.* 36: 235–242.
- ZHANG, Z.; LIAO, H.; LUCAS, W.J. (2014). Molecular mechanisms underlying phosphate sensing, signaling, and adaptation in plants. *J. Integr. Plant Biol.* 56: 192-220.

- ZHANG, P.Y.; ZHANG, Z.H.; WANG, J.; CONG, B.L.; CHEN, K.S.; LIU S.H. (2014). A novel receptor-like kinase (*PnRLK-1*) from the *Antarctic Moss Pohlia nutans* enhances salt and oxidative stress tolerance. *Plant Mol Biol Rep* 33:1156–1170.
- ZHANG, H.; HUANG, L.; HONG, Y.; SONG, F. (2016). *BOTRYTIS-INDUCED KINASE1*, a plasma membrane-localized receptor-like protein kinase, is a negative regulator of phosphate homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 16: 152.
- 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: 1967-1972.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a funcionalidade dos genes *Pstol1* quanto ao aumento da superfície radicular, aquisição de fósforo e produção de biomassa por meio da expressão heteróloga em tabaco.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

##### 3.2.1 Capítulo 1

Estabelecer uma metodologia para estimar o número de cópias de transgenes em plantas de tabaco usando PCR em tempo real e o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

##### 3.2.1 Capítulo 2

Avaliar as modificações morfológicas do sistema radicular e o desempenho em baixo e alto P de plantas de tabaco transformadas com os genes *OsPSTOL1*, *SbPSTOL1* e *ZmPSTOL1*.

## CAPÍTULO 1

Artigo publicado na revista Crop Breeding and Applied Biotechnology (CBAB).



## ARTICLE

## Auxin independent1 (*Axi1*) as an endogenous gene for copy number determination in transgenic tobacco

Simara da Silva Lopes<sup>1</sup>, Jéssica Fabiane da Veiga Costa<sup>2</sup>, Beatriz de Almeida Barros<sup>3</sup>, Andrea Almeida Carneiro<sup>3</sup> and Sylvia Morais de Sousa<sup>1, 2, 3\*</sup>

Crop Breeding and Applied Biotechnology  
20(2): e289220212, 2020  
Brazilian Society of Plant Breeding.  
Printed in Brazil  
<http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332020v20n2a28>

**Abstract:** Determining the copy number is important because it can greatly influence the expression level and genetic stability of transgenes. This study aimed to establish a methodology that can estimate the transgene copy number in tobacco (*Nicotiana tabacum*) using the Auxin independent1 (*Axi1*) gene as an endogenous control. Tobacco c.v. Petit Havana plants were transformed via *Agrobacterium tumefaciens* with a pMCG1005 vector that contained *Bar* as a selective gene. Oligonucleotide efficiency was determined and a qPCR using the  $2^{-\Delta Ct}$  and  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  methods was performed. *Bar* was the target gene and *Axi1* was the endogenous control in five transgenic tobacco events. The results showed that the *Axi1* gene was donated by the maternal parent *N. sylvestris* when interspecific hybridization occurred between *N. sylvestris* and *N. tomentosiformis*. The copy number results agreed with the segregation ratios for the *Bar* gene in T1 plants, which confirmed that *Axi1* is a single copy gene that can be used as an endogenous control.

**Keywords:** *Bar*, *Nicotiana tabacum*, real-time PCR, segregation, transgene

### INTRODUCTION

Genetic engineering incorporates new genes into transgenic plants from completely unrelated species, which can be transmitted to their descendants (Low et al. 2018, Nazir et al. 2019). In 1983, the first transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants containing a gene coding for resistance against the antibiotic kanamycin were generated (Fraley et al. 1983). Since then, several proteins have been expressed in transgenic tobacco and other plants (Jube and Borthakur 2007, Burnett and Burnett 2019, Moon et al. 2020). Tobacco is a highly productive, non-food crop that is cultivated in about 120 countries throughout the world. Furthermore, it is considered to be a model plant for scientific research because of its well-established regeneration and transformation methodologies, and the existence of a sequenced genome (Edwards et al. 2017).

The genetic transformation of model plants is key to validating gene function. Transgenic plants can be used to characterize single genes and reconstruct gene networks that control plant biochemistry, physiology, and morphology under different conditions (Kochetov and Shumny 2017). Molecular characterization is necessary after transformation because copy number and the insertion site can influence gene stability and the expression levels of the

**\*Corresponding author:**

E-mail: [sylvia.sousa@embrapa.br](mailto:sylvia.sousa@embrapa.br)  
ORCID: 0000-0002-8030-1385

**Received:** 17 September 2019

**Accepted:** 28 March 2020

**Published:** 05 June 2020

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João del-Rei, 36.301-160, São João Del-Rei, MG, Brazil

<sup>2</sup> Centro Universitário de Sete Lagoas, 35.701-242, Sete Lagoas, MG, Brazil

<sup>3</sup> Embrapa Milho e Sorgo, 35.701-970, Sete Lagoas, MG, Brazil

SS Lopes et al.

transgene (Gadaleta et al. 2011). Transgenic ( $T_0$ ) plants are hemizygous for the gene of interest and if they inherit a dominant trait and follow Mendelian inheritance, then they will produce homozygous and hemizygous plants after segregation. Out of all the generated plants, only one quarter of the  $T_1$  generation are homozygous plants that can be used to improve crops. Therefore, it is important to find simple, reliable, and high-throughput techniques that can detect the zygosity of transgenes (Passricha et al. 2016). Southern blotting was used for a long time to determine copy numbers, but it is a laborious and time-consuming method. It requires considerable amounts of DNA from samples and hazardous radioisotopes in some cases. Real-time PCR was identified as a fast, sensitive, and accurate technique that could be used to determine copy number insertion. However, in order to ensure that this method produces accurate results, it is essential to have a single copy gene as a reference, such as *Alcohol dehydrogenase 1* (*Adh1*) in maize (Ingham et al. 2001) and a gene encoding the I/Y protein of a mobile element (*hmg I/y*) in *Brassica napus* (Masek et al. 2000, Weng et al. 2005).

Not many single genes in tobacco have been characterized as being potential single-copy reference genes. The *Auxin independent1* (*Axi1*) gene was first used to determine the copy number in transgenic plants transformed with the *p3* gene (Potato Virus A - PVA), an aphid-transmitted potyvirus (Nováková et al. 2005) by Šubr et al. (2006). However, they were unable to prove that *Axi1* was a single copy-gene. The *Axi1* gene was isolated from a DNA tagged plant mutant collection that aimed to isolate genes involved in auxin action. When *Axi1* expression is interrupted, the protoplasts gain the ability to grow in culture in the absence or at high concentrations of auxin, which is uncommon in wild type protoplasts (Walden et al. 1994).

Tobacco is an allotetraploid and its large genome (4.5 Gb) contains a large number of replicates (> 70%). The species *N. tabacum* ( $2n = 4x = 48$ ) evolved from the interspecific hybridization of the ancestors *Nicotiana sylvestris* ( $2n = 24$ , maternal donor) and *Nicotiana tomentosiformis* ( $2n = 24$ , paternal donor) about 400,000-800,000 years ago (Clarkson et al. 2017). The results from this study showed that *Axi1* is a single copy gene and that it came from the maternal donor *N. sylvestris*. We also established a methodology to estimate transgene copy number in transgenic tobacco using real-time PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.

## MATERIAL AND METHODS

### Cloning the *Axi1* gene

Oligonucleotides were designed and used to clone a 727 bp fragment from the *Axi1* gene (GenBank: X80301) (*Axi1*CloneF: 5'-AGATGCAGTTGTTGAGCTC-3' and *Axi1*CloneR: 5'-TCAGATGCAAGGCAACAAAG-3'). The PCR reaction solution contained 40 ng tobacco genomic DNA ( $20 \text{ ng mL}^{-1}$ ), 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mM of each primer, and 1× Promega GoTaq® Colorless Master Mix in a final volume of 20 mL. The reaction solutions were heated to 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 20 s, 61 °C for 20 s, and 72 °C for 1 min. The final step was 72 °C for 5 min. The PCR product was applied to 1% agarose gel and visualized with GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA). The band from the fragment of interest was isolated from the gel and purified using a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and then cloned into the pGEM®-T Easy Vector System (Promega Corporation, Madison, WI, USA). *Escherichia coli* DH5-a cells were transformed using the freeze-thaw method and the plasmid DNA from the recombinant clones was extracted using a Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA). The plasmid DNA was quantified using a Nanodrop1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA). All procedures were performed according to manufacturer's instructions.

### Determination of the *Axi1* gene copy number in the tobacco genome

The copy number of the *Axi1* gene in the tobacco genome was determined using a standard four-point curve obtained from a 1:10 factor serial dilution of plasmid DNA containing 100 000, 10 000, 1000, and 100 copies of the *Axi1* gene. The copy number for the plasmid (starting amount) was calculated using the formula:

$$\text{Copy Number } \mu\text{L}^{-1} = \frac{\text{molecular mass}}{\text{mass (g)}} \times 6.022 \times 10^{23}$$

The CT values were plotted against the log of the copy number and the standard curve was generated from an adjusted



*Auxin independent1 (Axi1)* as an endogenous gene for copy number determination in transgenic tobacco

linear regression of the plotted points. The PCR amplification efficiency (E) was calculated from the slope coefficient of the adjusted line using the equation in Rasmussen (2001):

$$10^{-1/\text{slope} - 1}$$

The copy number of the gene *Axi1* in the tobacco genome was determined by taking 87 ng (10 000 copies of the genome – content 2C = 8.7 pg) from three independent genomic DNA samples. The results were then interpolated using the standard curve.

The PCR reaction sample contained plasmid DNA, and there were three biological replicates and three technical replicates with 1:10 factor serial dilution of plasmid DNA (100 000, 10 000, 1000, and 100 copies of the *Axi1* gene). The sample also contained 87 ng genomic DNA, 1× Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), 1 mM of each primer (*Axi1*Forward: 5'-GCCGTCCTTGAGTTCCAAA-3' and *Axi1*Reverse:5'-AGCGGTCGACATCAAAAATC-3') (Šubr et al. 2006) in a final volume of 10 mL. The *Axi1* primers were located on exons five (forward) and six (reverse), and they amplified an 85 bp section of DNA. A 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) was used for the PCR and the amplification conditions were 95 °C for 20 s, followed by 40 cycles of 95 °C for 3 s, and 60 °C for 30 s, which were the manufacturer's recommendations.

#### Confirmation of the *Axi1* parental donor

Genomic DNA from *N. tabacum* leaves and its parents, *N. sylvestris* and *N. tomentosiformis*, was extracted using the Saghai-Marouf et al. (1984) method. A 975 bp fragment was amplified from 40 ng DNA (20 ng mL<sup>-1</sup>) in a mixture that contained 0.6 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM *Axi1*F2 (5'-CCAAAATCATCATCAACCA-3') and *Axi1*R2 (5'-TCTGTTGATTCAAGCCTCCA-3'), 5% DMSO, 1.25× Promega GoTaq® Colorless Master Mix in a final volume of 20 mL. The cycle conditions were 94 °C for 2 min, followed by a 35 cycles of 94 °C for 20 s, 59 °C for 20 s, 72 °C for 1 min, and a final extension of 72 °C for 5 min.

#### Tobacco transformation with the pMCG1005 vector

*Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101 harboring a pMCG1005 binary vector (McGinnis et al. 2005) that expressed the *Bar* gene driven by the 4× 35S promoter and the nopaline synthase gene terminator was used to transform axenic *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana plants following the protocol developed by Horsch et al. (1985). Tobacco leaf disks were placed in a Petri dish that was lined with tissue. Then 20 mL *Agrobacterium tumefaciens* culture (grown at 28 °C, 250 rpm) was added and the samples were left to culture overnight. After culturing, the leaf disks were removed and any excess bacterial culture was blotted from the tissue using sterile filter paper. The leaf disks were placed onto infection medium (4.3 g L<sup>-1</sup> MS salts mixture, 3% sucrose, 0.8% agar, 0.4 mg L<sup>-1</sup> thiamine-HCl, 100 mg L<sup>-1</sup> myo-inositol, 5 mM kinetin, and 13.5 mM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and incubated for 48 hours at 26 °C in a lit growth chamber. Unless otherwise stated, all of the chemicals were obtained from the Sigma Corporation (Sigma, São Paulo, Brazil). The transformed tissues were selected on shoot induction medium (4.3 g L<sup>-1</sup> MS salts, 3% sucrose, 0.8% agar, 1 mL L<sup>-1</sup> 1000× MS vitamins stock (1000× MS stock solution: thiamine HCl 1 g L<sup>-1</sup>, nicotinic acid 0.5 g L<sup>-1</sup>, pyridoxine HCl 0.5 g L<sup>-1</sup>, glycine 2 g L<sup>-1</sup>, and myo-inositol 100 g L<sup>-1</sup>), 0.5 μM μ-naphthaleneacetic acid, 4 μM 6-benzylaminopurine, 100 mg L<sup>-1</sup> tioxin, and 3 mg L<sup>-1</sup> phosphinothricin (PPT). The explants were transferred to new selection medium on a weekly basis and the shoots regenerated within three to four weeks. The transformed shoots rooted in two to three weeks and were maintained on 50 mL of shoot induction medium without phytohormones, but supplemented with 100 mg L<sup>-1</sup> tioxin and 1 mg L<sup>-1</sup> PPT, in Majenta GA7 containers (Sigma) under continuous light at 26 ± 2 °C. Then the plants were transferred from the culture media to soil and grown in the greenhouse.

#### Copy number quantification of the transgenic tobacco events

The copy number was calculated for the five pMCG1005 events (T0) using the formula:  $2^{C_{\text{reference}} - C_{\text{transgene}}}$ , which does not require a single-copy reference event (Zhang et al. 2015). After this analysis, a single copy sample was selected as a reference to quantify the relative expression levels using the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method (Livak and Schmittgen 2001).

The PCR reaction solution contained 50 ng of genomic DNA (20 ng mL<sup>-1</sup>), 1× Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Thermo-Fisher), 0.6 μM each of the forward and reverse *Axi1* primers (Šubr et al. 2006), and 0.8 mM of the *Bar* primers (*Bar*F: 5'-ACAGCGACCAGCTCTGA-3 and *Bar*R: 5'-GCTCTACACCCACCTGCTGA-3') in a final volume of 10

SS Lopes et al.

mL. A 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) was used for the PCR analysis and the amplification conditions were 95 °C for 20 s, followed by 40 cycles of 95 °C for 3 s, and 60 °C for 30 s.

### Segregation test in transgenic tobacco plants

Twenty seeds from each of the five transgenic tobacco T1 pMCG1005 events were germinated in MS medium (Murashige and Skoog 1962) without the selection agent. The genomic DNA was extracted from the seedlings at two and a half months after germination, according to Saghai-Marooft et al. (1984). The DNA was quantified by a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) and an integrity check was carried out using electrophoresis with 1.0% agarose gel stained with GelRed (Biotium).

The presence of the *Bar* gene was confirmed by PCR using 60 ng of genomic DNA, 0.5 μM of each primer (*35SxΩmegaF*: 5'-ACTATCCTTCGCAAGACCTTC-3' and *BarR*: 5'-CTTCAGCAGGTGGGTAGAG-3'), 1× reaction buffer, 0.6 mM of dNTP, 1U Invitrogen Taq DNA polymerase platinum, and 5% DMSO in a final volume of 20 mL. The cycling conditions were 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles of: 94 °C for 20 s, 60 °C for 20 s, and 72 °C for 1 min, with a final extension of 72 °C for 5 min.

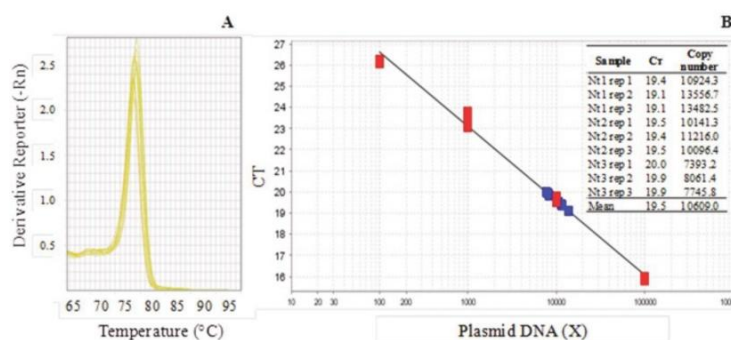
A  $\chi^2$  test was performed to compare the expected proportions of the transgene copy numbers.

## RESULTS AND DISCUSSION

Tobacco is a model plant that is often used in plant-microorganism interaction and gene function studies (Clarkson et al. 2017, Chen et al. 2018, Bai et al. 2019). Real-time PCR was used to estimate the copy number in transgenic tobacco plants using *Axi1* as the endogenous gene and *Bar* as the target gene. Quantitative PCR is based on a comparison between the target gene and the single copy gene in each sample. Therefore, having a characterized single-copy gene is essential to ensure experimental accuracy. In this study, the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method was used to select a reference sample that could be utilized in large-scale experiments because it does not require a reference sample. After the first round of analysis, a single copy event was selected as the reference sample for the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method, which was then used to estimate the copy number of the *Bar* gene in the transgenic tobacco genome. Finally, a Mendelian segregation analysis was carried out to check the real-time PCR results and to confirm that there was only one *Bar* gene insertion.

The  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method requires an amplification efficiency of between 90 and 100%, and an equivalent efficiency between the endogenous control and the target gene. Therefore, the amplification efficiency was tested and the results showed a 93% efficiency rate. This meant that the *Bar* oligonucleotides could be used in the real-time PCR. Furthermore, the dissociation or melting curve showed the presence of a single product (Figure 1).

The standard curve was created using plasmids with increasing concentrations of the *Axi1* gene fragment (727 bp) that ranged from 100 to 100 000 copies in the tobacco genomic DNA. The tobacco genomic DNA was quantified as

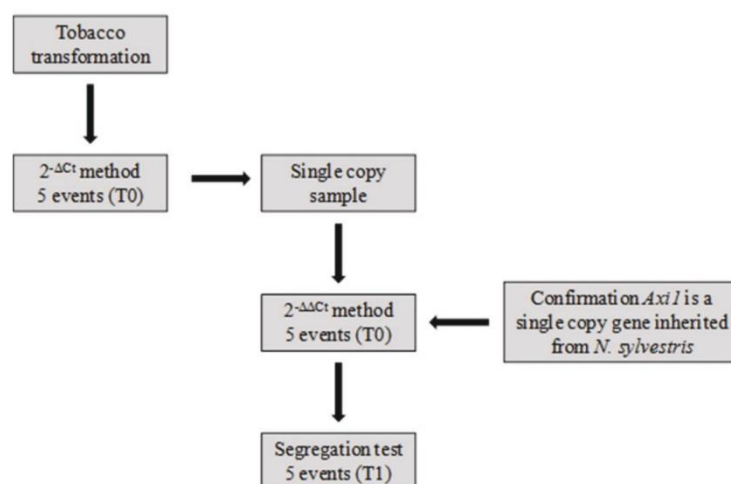


**Figure 1.** Dissociation curve when *Axi1* primers (A) were used. The standard curve for the *Axi1* gene cloned in a plasmid with 100 000, 10 000, 1000, and 100 copies is in red and the *Axi1* gene in the *N. tobacco* genome is in blue. There were three biological and three technical replicates (Nt 1–3, rep 1–3) (B).  $R^2$ : 0.992 and Efficiency (%): 93.055.

*Auxin independent1 (Axi1)* as an endogenous gene for copy number determination in transgenic tobacco

having 7000 and 12 650 copies after interpolating the results from the 10 000 copies point of the standard curve (Figure 1B). This result indicated that there was only one copy of the *Axi1* gene in the tobacco genome and that it was inherited from only one parent.

We generated seven transgenic events (T0), but only five events produced enough seeds to perform the experiments. Initially, the  $2^{-\Delta Ct}$  method was performed, using *Axi1* as endogenous the gene and *Bar* as the target gene in the T0 generation of five tobacco transgenic events, to identify a single copy sample because we did not have a characterized single copy sample for tobacco. After the first round of analysis, a reference sample (single copy) was selected and used to calculate the number of copies in the five events. The  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method was used to estimate the copy number of the *Bar* gene in the transgenic tobacco genome and then a segregation test was performed (Figure 2). The five analyzed events were considered to be a single copy (Table 1). The values 0.52 and 0.5 were estimated as copy numbers equal to 1 because the transgene was inserted into the T0 generation by hemizygosity (Tt). Although all DNA samples were diluted to  $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  and the concentration verified by the Nanodrop method and in agarose gel, which produced similar results to the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method, there was some variation in the pipetting and DNA quality that resulted in different  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  results and consequently a difference in the copy numbers, which ranged from 0.5 and 1.0. As expected, the wild type tobacco did not show amplification of the *Bar* gene (Table 1). Transgenic single copy events are desirable because they follow a Mendelian segregation pattern, which means that the possibility of gene silencing is lower (Collier et al. 2017, Tark-Dame et al. 2018). Our results corroborated those of Šubr et al. (2006) who also used the *Axi1* gene as an endogenous control to determine the copy number for the Potato virus A (PVA) P3 gene in transgenic tobacco.



**Figure 2.** Experimental workflow.

**Table 1.** Copy number, segregation, and  $\chi^2$  results (3481;  $p < 0.05$ ) for tobacco transgenic event T1

Samples	Copy number ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	Segregation	$\chi^2$
pMCG1005 Ev. 3	0.52	3:1	1.42
pMCG1005 Ev. 4	0.98	3:1	1.06
pMCG1005 Ev. 6	0.5	3:1	0.26
pMCG1005 Ev. 7	1.12	3:1	2.40
pMCG1005 Ev. 10	0.45	3:1	0.26
Wild type tobacco	0	-	-



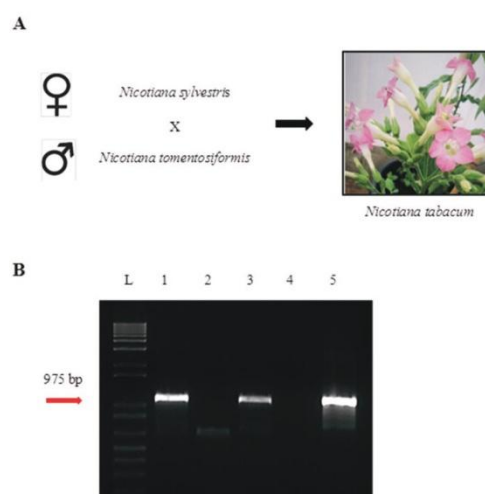
SS Lopes et al.

Once it had been confirmed that there was only one copy of the *Axi1* gene in the *N. tabacum* genome, a PCR was performed with *N. sylvestris* as the maternal parent (S-genome) and *N. tomentosiformis* as the paternal parent (T-genome). The PCR only amplified the *Axi1* gene fragment (975 bp) in the maternal parent (Figure 3).

*Nicotiana* (Solanaceae) contains approximately 75 species, 48% of which are allotetraploids (36 species) that are classified into 12 sections. These allotetraploids are mainly distributed in the Americas, except for one section that is found outside the Americas (Knnap et al. 2004). *Nicotiana tabacum* ( $2n=48$ , SSTT) was originally derived from interspecific hybridization between *N. sylvestris* ( $2n=24$ , SS) and *N. tomentosiformis* ( $2n=24$ , TT) followed by chromosome doubling. These events occurred less than 1 Ma ago at an early stage in the diploidization process (Clarkson et al. 2010). Concerted evolution of the rDNA has been documented in *N. tabacum*. The process led to rDNA loci being overwritten within a few generations by one dominant progenitor copy, which was usually maternal, and it is possible that the same could have happened to the *Axi1* loci.

*N. tabacum* genome is highly similar to its parent's genome. However, there has been a reduction in its genome, with greater losses of repetitive DNA sequences from the T-genome than from the S-genome, showing a preferential loss of repetitive sequences from the paternal parent at the genome level (Renny-Byfield et al. 2011). The loss of repetitive sequences from T-genome also happened with *Axi1* gene, which is only present in the S-genome. Studies to identify mutations in the N gene, responsible to resistance to mosaic virus and present in the N-chromosome, also showed that this chromosome is closer related to *N. sylvestris*, which is probably derived from the S-genome (Chen et al. 2018), as showed for *Axi1* gene. The genome downsizing is a widespread biological response to polyploidization that is also illustrated in the *Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase* (*XTH*) gene family, which has a higher number of *NtXTHs* genes in *N. tabacum* than in the ancestral donors, but less than the sum of these two donors (Wang et al. 2018).

Antibiotic or herbicide selection is a conventional method that is used to differentiate between hemizygous and homozygous lines if the transgene is a dominant trait and follows the Mendelian first law of segregation (Passricha et al. 2016, Tarafdar et al. 2019). To validate the data obtained for the copy number by real-time PCR, a segregation test was performed on the five independent pMCG1005 events. For event pMCG1005 Ev. 3, 12 seedlings out of 19 were positive for the *Bar* gene and 7 were negative, which was similar to event pMCG1005 Ev. 4, where 13 out of 20 seedlings were positive for the *Bar* gene and 7 were negative, and event pMCG1005 Ev. 6, where 14 out of 20 seedlings were positive for the *Bar* gene and 6 were negative. However, for event pMCG1005 Ev. 7, 18 out of 20 seedlings were positive for the *Bar* gene and 2 were negative and for event pMCG1005 Ev. 10, 16 out of 20 seedlings were positive for the *Bar* gene and 4 were negative (Table 1). The segregation pattern obtained in these events was the expected for monogenic characteristics (3:1) and this was confirmed by the  $\chi^2$  test at  $p < 0.05$  (Table 1). Events that had copy numbers between 0.5 and 1.0 may have had more than one copy integrated into the same locus. In this case, the copies would be inherited together and show a 3:1 distribution in the segregation test at T1. Tizaoui and Kchouk (2012) reported a tobacco transgenic event that showed two tightly linked inserts in the cis part at T1 with a low recombination frequency. By the T2 generation, the transgenic locus had evolved and the inserts were far enough apart to recombine with a high frequency. Transgenes are sexually inherited as a dominant trait with 3:1 Mendelian inheritance when present as single copy in the host genome



**Figure 3. A.** Representation of the interspecific hybridization that occurred 400 000–800 000 years ago between *N. sylvestris* and *N. tomentosiformis*, which generated *N. tabacum*. **B.** PCR analysis of the tobacco *Axi1* gene origin. L. 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), 1. *N. sylvestris*, 2. *N. tomentosiformis*, 3. *N. tabacum*, 4. Negative control (Water); 5. Positive control (pGEM®-T Easy Vector with the *Axi1* gene). Red arrow indicates the amplified *Axi1* fragment (975 pb).

*Auxin independent1 (Axi1)* as an endogenous gene for copy number determination in transgenic tobacco

(Low et al. 2018), which is usually functional (Parrott 2010).

A Southern blot analysis is traditionally used to determine transgene copy number and is still a very useful technique when working with a species that do not have an available, fully annotated genome sequence. While reliable, this classic molecular biology technique is laborious, time-consuming, and requires large amounts of starting plant material, which is difficult in the case of tobacco seedlings, for example, and may involve the use of hazardous radioisotopes (Giancaspro et al. 2017, Nazir et al. 2019). Furthermore, it may fail to detect the exact number of transgene copies when these have been rearranged during integration into the host genome, which may cause changes and/or the loss of relevant restriction sites (Gadaleta et al. 2011, Giancaspro et al. 2017). Real-time PCR analyses are being used on many crops and model species to detect and characterize transgene locus structures. The determination of the transgenic locus number through real-time PCR overcomes the problems linked to phenotypic segregation analysis (i.e., lack of detectable expression even when the transgenes are present) and it is possible to analyze hundreds of samples per day. These two advantages mean that real-time PCR is an efficient method for estimating gene copy numbers (Gadaleta et al. 2011, Thu et al. 2016, Giancaspro et al. 2017). Real-time PCR is a fast and sensitive method, but its precision depends on a reliable one-copy reference gene, which was confirmed by the results from this study.

To date, there have been no genes characterized and validated in tobacco that could be used as a single-copy reference. However, this study has shown that *Axi1* is definitely a single-copy gene in *N. tabacum*, and that it came from its maternal donor *N. sylvestris*. The results also showed that it can be used as a reference gene for copy number determination by real-time PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method, and consequently for transgenic characterization.

## ACKNOWLEDGEMENTS


This work was supported by Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (Grant No 12.14.10.003.00.00) and Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais – Fapemig (Grant No CBB - APQ-01515-14). SSL was a recipient of a research fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes. The authors would like to thank Souza Cruz for providing *N. sylvestris* and *N. tomentosiformis* seeds.

## REFERENCES

- Bai G, Yang DA, Cao P, Yao H, Zhang Y, Chen X, Xiao B, Li F, Wang ZY, Yang J and Xie H (2019) Genome-wide identification, gene structure and expression analysis of the MADS-Box gene family indicate their function in the development of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *International Journal of Molecular Sciences* **20**: 1-20.
- Burnett MJB and Burnett AC (2019) Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *Plants, People, Planet* **2**: 121-132.
- Chen S, Ren F, Zhang L, Liu Y, Chen X, Li Y, Zhang L, Zhu B, Zeng P, Li Z, Larkin RM and Kuang H (2018) Unstable allotetraploid tobacco genome due to frequent homologous recombination, segmental deletion, and chromosome loss. *Molecular Plant* **11**: 914-927.
- Clarkson JJ, Kelly LJ, Leitch AR, Knapp S and Chase MW (2010) Nuclear glutamine synthetase evolution in Nicotiana: Phylogenetics and the origins of allotetraploid and homoploid (diploid) hybrids. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **55**: 99-112.
- Clarkson JJ, Dodsworth S and Chase MW (2017) Time-calibrated phylogenetic trees establish a lag between polyploidisation and diversification in *Nicotiana* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* **303**: 1001-1012.
- Collier R, Dasgupta K, Xing Y-P, Hernandez BT, Shao M, Rohozinski D, Kovak E, Lin J, Oliveira MLP, Stover E, McCue KF, Harmon FG, Blechl A, Thomson JG and Thilmony R (2017) Accurate measurement of transgene copy number in crop plants using droplet digital PCR. *The Plant Journal* **90**: 1014-1025.
- Edwards KD, Fernandez-Pozo N, Drake-Stowe K, Humphry M, Evans AD, Bombarely A, Allen F, Hurst R, White B, Kernodle SP, Bromley JR, Sanchez-Tamburrino JP, Lewis RS and Mueller LA (2017) A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency. *BMC Genomics* **18**: 1-14.
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL and Woo SC (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**: 4803-4807.
- Gadaleta A, Giancaspro A, Cardone MF and Blanco A (2011) Real time PCR for detection of precise transgene copy number in durum wheat. *Cellular & Molecular Biology Letters* **16**: 652.
- Giancaspro A, Gadaleta A and Blanco A (2017) Real-Time PCR for the detection of precise transgene copy number in wheat. In Bhalla PL and Singh MB (eds) *Wheat biotechnology: methods and protocols, methods in molecular biology*. Human Press, New York, p. 251-257.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG and Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**: 1229-1231.



- Ingham DJ, Beer S, Money S and Hansen G (2001) Quantitative real time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. **Biotechniques** **31**: 132-141.
- Jube S and Borthakur D (2007) Expression of bacterial genes in transgenic tobacco: methods, applications and future prospects. **Electronic Journal of Biotechnology** **10**: 452-467.
- Knapp S, Chase MW and Clarkson JJ (2004) Nomenclatural changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (Solanaceae). **Taxon** **53**: 73-82.
- Kochetov AV and Shumny VK (2017) Transgenic plants as genetic models for studying functions of plant genes. **Russian Journal of Genetics: Applied Research** **4**: 421-427.
- Livak K and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative pCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . **Methods** **25**: 402-408.
- Low LY, Yang SK, Andrew Kok DX, Ong-Abdullah J, Tan NP and Lai KS (2018) Transgenic plants: Gene constructs, vector and transformation method. In Çelik Ö (ed) **New visions in plant science**. Intech Open, London, p. 41-61.
- McGinnis K, Chandler V, Cone K, Kaeppeler H, Kaeppeler S, Kerschen A, Pikaard C, Richards E, Sidorenko L, Smith T, Springer N and Wulan T (2005) Transgene-induced RNA interference as a tool for plant functional genomics. **Methods in Enzymology** **392**: 1-24.
- Masek T, Smykal P, Janotova II, Honys D, Capkova VV and Pechan PM (2000) Isolation of a *Brassica napus* L. cDNA encoding a putative high-mobility-group HMG I/Y protein. **Plant Science** **159**: 197-204.
- Moon KB, Park JS, Park YI, Song YJ, Lee HJ, Cho HS, Jeon JH and Kim HS (2020) Development of systems for the production of plant-derived biopharmaceuticals. **Plants** **9**: 1-21.
- Murashige T and Skoog FA (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum** **15**: 473-497.
- Nazir S, Zaffar Iqbal M and Sajid-ur-Rahman (2019) Molecular identification of genetically modified crops for biosafety and legitimacy of transgenes. In Chen YC (ed) **Gene editing - technologies and applications**. Intech Open, London, p. 1-18.
- Nováková S, Mazúrová I, Čeřovská N and Šubr ZW (2005) Transgenic tobacco plants carrying the non-structural P3 gene of potato virus A. **Biologia Plantarum** **49**: 593-598.
- Parrott W (2010) Genetically modified myths and realities. **New Biotechnology** **27**: 545-551.
- Passricha N, Saifi S, Khatodia S and Tuteja N (2016) Assessing zygosity in progeny of transgenic plants: current methods and perspectives. **Journal of Biological Methods** **3**: e46.
- Rasmussen R (2001) Quantification on the Light Cycler. In Dietmaier W, Wittwer C and Sivasubramanian N (eds) **Rapid cycle real-time PCR: methods and applications**. Springer, Berlin, p. 21-34.
- Renny-Byfield S, Chester M, Kovarik A, Le Comber SC, Grandbastien MA, Deloger M, Nichols RA, Macas J, Novak P and Chase MW (2011) Next generation sequencing reveals genome downsizing in allotetraploid *Nicotiana tabacum*, predominantly through the elimination of paternally derived repetitive DNAs. **Molecular Biology and Evolution** **28**: 2843-2854.
- Saghai-Marooof MA, Soliman KA, Jorgensen RA and Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **81**: 8014-8018.
- Šubr Z, Nováková S and Dražovská 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. **Acta virologica** **50**: 135-138.
- Tarafdar A, Vishwakarma H, Gothandapani S, Bhati M, Biswas K, Prakash A, Chaturvedi U, Solanke AU and Padaria JC (2019) A quick, easy and cost-effective *in planta* method to develop direct transformants in wheat. **Biotech** **9**: 1-11.
- Tark-Dame M, Weber B, de Sain M, Anggoro DT, Bader R, Walmsley A, Oka R and Stam M (2018) Generating transgenic plants with single-copy insertions using BIBAC-GW binary vector. **Journal of Visualized Experiments** **133**: 1-13.
- Tizaoui K and Kchouk ME (2012) Genetic approaches for studying transgene inheritance and genetic recombination in three successive generations of transformed tobacco. **Genetics and Molecular Biology** **35**: 640-649.
- Thu LTM, Thuy VTX, Duc LH, Son LV, Ha CH and Mau CH (2016) RNAi-mediated resistance to SMV and BYMV in transgenic tobacco. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** **16**: 213-218.
- Walden R, Hayashi H, Lubenow H, Czaja I and Schell J (1994) Auxin inducibility and developmental expression of *Axi1*: a gene directing auxin independent growth in tobacco protoplasts. **The EMBO Journal** **13**: 4729-4736.
- Wang M, Xu Z, Ding A and Kong Y (2018) Genome-wide identification and expression profiling analysis of the Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase gene family in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Genes** **9**: 1-22.
- Weng H, Yang L, Liu Z, Ding J, Pan A and Zhang D (2005) A novel reference gene, high-mobility-group protein I/Y, can be used in qualitative and real time quantitative PCR detection of transgenic rapeseed cultivars. **Journal of AOAC International** **88**: 577-584.
- Zhang Y, Liu Y, Zhang J, Wang G, Wang J and Liu J (2015) Assessment of transgene copy number and zygosity of transgenic maize overexpressing *Cry1le* gene with SYBR® Green qRT-PCR. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant** **51**: 125-134.

 This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## CAPÍTULO 2

### **Genes *Phosphorus-starvation tolerance 1* de arroz, milho e sorgo são capazes de aumentar a superfície radicular e biomassa de tabaco transgênico**

#### **INTRODUÇÃO**

O fósforo (P) é um macronutriente essencial para o crescimento das plantas, mas devido a sua baixa disponibilidade no solo, principalmente nos solos ácidos, onde formam complexos insolúveis com cátions de ferro e alumínio, ele se torna pouco disponível para absorção pelas plantas (Vance *et al.* 2003; Chapin *et al.* 2011; Hasan *et al.* 2016; Daneshgar *et al.* 2018). A adubação fosfatada aumenta a produtividade das culturas, porém os fertilizantes fosfatados são recursos não renováveis com pico de exploração estimado para 2070 (Cordell *et al.* 2011; Daneshgar *et al.* 2018). Portanto, a busca por estratégias sustentáveis, como genótipos mais eficientes para o uso de P, são cada vez mais necessárias.

Para absorver quantidade suficiente de P para suas atividades metabólicas, as plantas apresentam mudanças em sua morfologia radicular, se associam a fungos micorrízicos e exsudam mais compostos orgânicos. No entanto essas respostas variam entre espécies e genótipos (Wen *et al.* 2019). A identificação de genes relacionados a características do sistema radicular e a eficiência na aquisição de P são importantes, uma vez que podem ser usados como marcadores moleculares ou para gerarem plantas transgênicas que pode ser usados em programas de melhoramento para desenvolvimento de cultivares mais eficientes na aquisição de nutrientes. Em arroz foi descrito um QTL de efeito maior para absorção de P, chamado *Pup1* (*Phosphorus uptake 1*). Esse QTL está associado ao aumento da superfície radicular e da eficiência na aquisição de P em arroz (Ni *et al.* 1998; Wissuwa *et al.* 1998; Wissuwa & Ae 2001), respondendo por cerca de 80% da variabilidade fenotípica (Wissuwa *et al.* 2002). O gene responsável pelo loco *Pup1* é o *Phosphorus-starvation tolerance 1* (*Pstol1*) e está envolvido no desenvolvimento precoce do sistema radicular de arroz em condições de baixo P, presente na variedade tradicional Kasalath e ausente no genoma de referência do

arroz *Nipponbare* (Gamuyao *et al.* 2012). *OsPstol1* é uma proteína quinase serina/treonina, classificada como receptor tipo quinase citoplasmática (RLCKs) (Dardick *et al.* 2007; Vij *et al.* 2008).

Em sorgo e milho foram identificados homólogos da proteína *OsPstol1* com identidade superior a 55% (Hufnagel *et al.* 2014; Azevedo *et al.* 2015). Os genes *SbPstol1* (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*) foram associados com SNPs para produção de grãos, morfologia radicular, absorção de P e acúmulo de biomassa em hidroponia e solo em condições de baixo P. Além disso, foram co-localizados com QTLs para morfologia radicular e produtividade, e associados com características de arquitetura radicular (Hufnagel *et al.* 2014; Bernardino *et al.* 2019). Já os genes *ZmPstol1* (*ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02* e *ZmPstol8.05\_1*) co-localizaram com QTLs para características de raiz, acúmulo de biomassa e teor de P e foram mais expressos na raiz do que na parte aérea em condições de baixo P na linhagem parental doadora dos alelos favoráveis (Azevedo *et al.* 2015).

A superexpressão em tabaco do *OsPstol1* (*Phosphorus-Starvation Tolerance 1*) de arroz (Gamuyao *et al.* 2012) e seus homólogos em milho (*ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02* e *ZmPstol8.05\_1*) (Azevedo *et al.* 2015) e sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*) (Hufnagel *et al.* 2014) foi realizada com objetivo de validar e caracterizar funcionalmente estes genes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Construção da árvore filogenética e análise dos domínios de proteínas quinases de tabaco e gramíneas

Utilizando a sequência de aminoácidos do *OsPstol1* (BAK26566) foram realizadas buscas no banco de dados do genoma de tabaco ([http://solgenomics.net/organism/Nicotiana\\_tabacum/genome](http://solgenomics.net/organism/Nicotiana_tabacum/genome)) usando BLASTp.

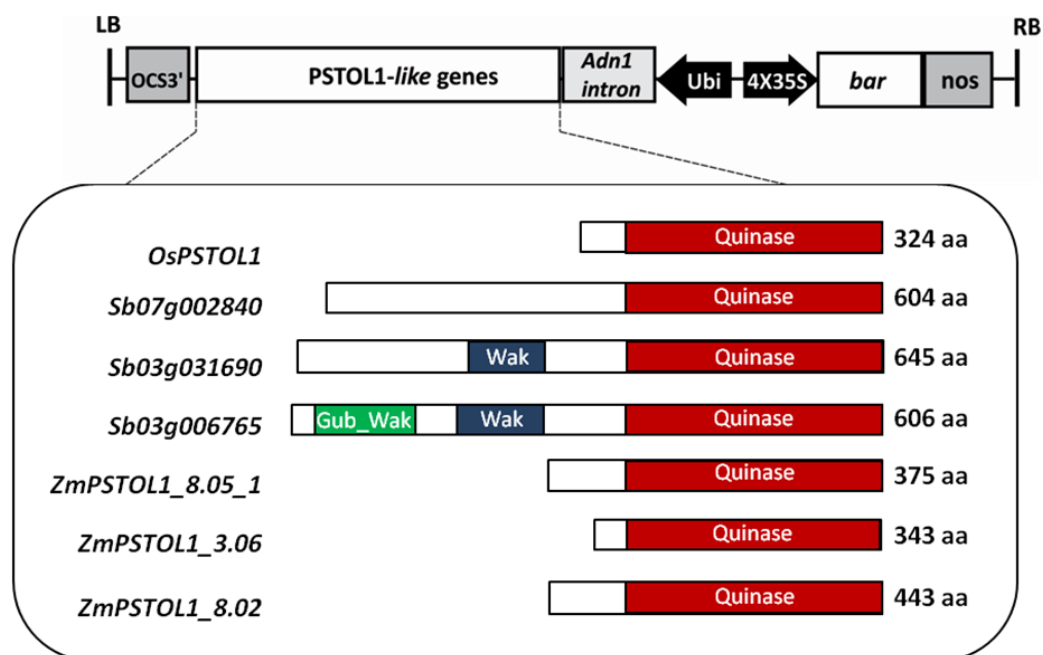
As dez proteínas preditas de tabaco com mais de 55% de identidade foram selecionadas e alinhadas utilizando o software Clustal X versão 2.1 (Larkin *et al.* 2007). O alinhamento incluiu as proteínas preditas do *Pstol1* de arroz (BAK26566, Gamuyao *et al.* 2012), de milho (*ZmPstol3.04*, *ZmPstol3.06*, *ZmPstol4.05*, *ZmPstol8.02*, *ZmPstol8.05\_1* e *ZmPstol8.05\_2*) (Negri 2015), de sorgo (*Sb03g006765*, *Sb03g031670*, *Sb03g031680*, *Sb03g031690*, *Sb03g031700* e

*Sb07g002840*) (Hufnagel *et al.* 2014) e de trigo (*TaPstol1*) (Milner *et al.* 2018). As sequências de proteínas foram analisadas pelo método da máxima verossimilhança baseado na matriz do modelo JTT desenvolvido por D. T. Jones, W. R. Taylor e J. M. Thornton (Jones *et al.* 1994; Rzhetsky & Nei 1992) utilizando o programa MEGA versão X (Kumar *et al.* 2018). Mil etapas de reamostragem por *bootstrap* foram aplicadas às sequências.

As sequências de proteínas foram analisadas com o software Expasy (Artimo *et al.* 2012) para a predição de domínios e sítios ativos por meio dos softwares TMHMM Server v. 2.0 (Krogh *et al.* 2001), InterProScan (Jones *et al.* 2014), Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) e Phobius (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/phobius/>). Para a elaboração da figura com os domínios e sítios ativos preditos da proteína foi utilizado o software Prosite My Domains (Sigrist *et al.* 2012).

### **Geração de plantas de tabaco com os genes *Pstol1* de arroz, milho e sorgo**

A região codificante dos genes de arroz *OsPstol1* (BAK26566, Gamuyao *et al.* 2012), de milho *ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02* e *ZmPstol8.05\_1* (Negri 2015) e de sorgo *Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765* (genoma referência de sorgo BTx623; Hufnagel *et al.* 2014) foram sintetizadas e clonadas no vetor binário pMCG1005 (Iowa State University Plant Transformation Facility) (Figura 1) pela empresa GenScript USA Inc. (<http://www.genscript.com>). O promotor utilizado foi ubiquitina e o marcador de seleção para planta o gene *Bar* sob promotor 4x35S (Figura 1).



**Figura 1** – Vetor binário pMCG1005 para transformação com os genes de interesse. Genes de arroz *OsPstol1* (BAK26566), milho (*ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02* e *ZmPstol8.05\_1*) e sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*) foram sintetizados e clonados nos sítios *AvrII* e *SpeI* sob o promotor da ubiquitina com o *Bar* como gene de seleção sobre o promotor 4x35S.

Plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. *Petit havana*) foram obtidas pela transformação via *Agrobacterium tumefaciens* por Lopes (2016). 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 agitação os explantes foram transferidos para o meio PSM (Shooting Medium – Anexo 1), sem antibiótico ou agente de seleção por 48 horas em uma câmara de crescimento com temperatura diurna média de  $27 \pm 3$  °C, noturna de  $20 \pm 3$  °C e fotoperíodo de 12 horas. 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 1) +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. Os eventos transgênicos gerados para cada construção foram confirmados por PCR para o gene *Bar* e genes *Pstol1* (Lopes 2016).

Estimativa do número de cópias do transgene foi feita em eventos confirmados para os transgenes *Pstol1* na geração T<sub>0</sub> usando o gene *Bar*. A confirmação do número de cópias por segregação Mendeliana, expressão relativa dos transgenes e caracterização morfológica do sistema radicular foram feitos na geração T<sub>1</sub> (Lopes 2016). A partir dessas análises foram selecionados dois eventos cópia única e com expressão de média a alta de cada um dos genes *Pstol1* para os experimentos realizados neste trabalho. As sementes desses eventos foram plantadas em casa de vegetação para obtenção de linhagens fixadas com os transgenes e avaliadas em câmara de crescimento e casa de vegetação em condições contrastantes de P.

### **Análise de zigosidade de eventos transgênicos de tabaco por PCR semiquantitativo**

Sementes de eventos transgênicos de tabaco dos genes *Pstol1* das gerações T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> foram plantadas diretamente e crescidas em vasos com solo em casa de vegetação. O DNA genômico de folhas jovens foi extraído pelo método de Saghai-Marroof *et al.* (1984) e usado para determinação da zigosidade por reação de PCR semiquantitativo. Foram usadas de 10 a 20 plantas para cada evento para seleção de plantas homozigotas comparadas com controles heterozigotos e homozigotos (*ZmPstol8.02* ev. 6 T<sub>0</sub>Tt; pMCG1005 ev. 7 T<sub>0</sub>Tt; *OsPstol1* ev. 6.1 T<sub>2</sub> TT).

A reação de PCR foi composta por DNA genômico de tabaco (100 ng), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo (BarF1: 5'- AGAAACCCACGTCATGC-3' e BarR1: 5'- GTGGTTGACGATGGTGCA-3'), tampão 1X, 1,25 µM MgCl<sub>2</sub>, 0,06 µM dNTPs, *Taq* DNA Polimerase Kapa 0,5 U, 5% DMSO e água ultra pura para um volume final de



20 µL de reação. As reações foram submetidas à 95 °C por 5 minutos, seguido por 27 ciclos de 94 °C por 30 segundos, e 60°C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos.

### **Análise de zigosidade de eventos transgênicos de tabaco por PCR em tempo real (qPCR)**

Após análise inicial quanto a zigosidade por PCR semiquantitativo foram escolhidas de 2 a 4 plantas homocigotas de cada evento para confirmação por qPCR usando controles heterocigotos e homocigotos (*ZmPstol8.02* ev. 6 T<sub>0</sub>Tt; pMCG1005 ev. 7 T<sub>0</sub>Tt ; *OsPstol1* ev. 6.1 T<sub>2</sub> TT).

A reação foi composta por 50 ng de DNA genômico, Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) 1X, 0,6 µM dos oligonucleotídeos *Axi1*Forward e *Axi1*Reverse (SUBR et al., 2006) e 0,8 µM dos oligonucleotídeos *Bar* (BarF: 5'-ACAGCGACCACGCTCTTGA-3 e BarR: 5'-GCTCTACACCCACCTGCTGA-3') em volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram: 95 °C por 20 segundos uma vez, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA), seguindo as recomendações do fabricante.

### **Análise de expressão dos transgenes por PCR em tempo real**

Sementes de eventos transgênicos de tabaco *Pstol1* e controles das gerações T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> homocigotas foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 6% por 5 minutos, lavadas com água destilada e germinadas em frascos com meio de cultura MS ½ (Murashig & Skoog 1962) polimerizado com ágar Sigma A1296 (Lote SLBN5825B), sob tratamentos de baixo P (97 µM de P) e alto P (1000 µM de P) por 60 dias.

O RNA total foi extraído de plântulas inteiras de tabaco utilizando o kit Plant RNeasy (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante. A concentração do RNA foi determinada pela leitura de absorvância 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 0,5 µg de RNA total, previamente tratados com DNase I, utilizando o kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems, EUA).

As análises de PCR quantitativo foram realizadas no equipamento ABI7500 utilizando a metodologia *Taqman* e SYBR Green, segundo as recomendações do fabricante. Foi utilizado um par de oligonucleotídeos 18S ribossomal TaqMan® (Life Technologies, Reino Unido) e 18S ribossomal SYBR Green como controle endógeno e oligonucleotídeos específicos para os genes *OsPstol1*, *ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02*, *ZmPstol8.05\_1*, *Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765* (Tabela 1). A reação para o ensaio *Taqman* foi conforme recomendações do fabricante. As condições do termociclador foram: 50 °C por 2 minutos, seguida por um aquecimento de 95 °C por 10 minutos e, depois, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. A reação para o ensaio com SYBR Green foi composta por 125 ng de cDNA, reagente Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, EUA) 1X, 1µM de cada oligonucleotídeo e água ultra pura para volume final de reação de 10 µL. 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 1**– Oligonucleotídeos e sondas utilizados nos ensaios de expressão gênica *Taqman* e *SYBR* das plantas transformadas com genes *Pstol1*.

Nome	Oligonucleotídeos 5' - 3'	Ensaio usado
OsPstol1-F	GTTTGTGGTGCATACAACACTCGT	<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	CGCCCTCTTGATCCTTG	
ZmPstol3.06 Sonda	CAAGCAGAACCCCGTCAGTGTCA	
ZmPstol8.02 F	CAGGAATTTCACTGCAACTAGACGACCA	<i>Taqman</i>
ZmPstol8.02 R	CCGTCACCTTTGGAGTCATG	
ZmPstol8.02 Sonda	TGGTTTTCAAGGGAAGGCTAG	

### Caracterização morfológica do sistema radicular

As sementes de tabaco dos eventos transgênicos *Pstol1* e controles das gerações T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> homocigotas foram germinadas em placas de Petri convencionais com meio de cultura MS ½ sob tratamentos de baixo P (97 µM de P) e alto P (1000 µM de P). Após a germinação foi selecionada uma plântula uniforme para cada placa (quatro repetições), que foi transferida para placa de Petri 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 a partir da quinta semana até a décima semana, 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 de superfície total (cm<sup>2</sup>) e área de superfície de raízes com diâmetro entre 0 e 0,5 mm e 0,5 e 4,5 mm (de Sousa *et al.* 2012).

## **Avaliação fenotípica de eventos transgênicos de tabaco *Pstol1* em casa de vegetação sob condições contrastantes de P**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação com delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições. Cada vaso com duas plantas foi considerado uma unidade experimental. O solo utilizado foi o Latossolo vermelho com textura argilosa (Oxisol) (Santos *et al.* 2013), pH 6,0 e baixo P (2,8 mg/dm<sup>3</sup>), corrigido com 2 g/kg de calcário dolomítico e 0,5 g /kg de gesso. Para o tratamento com alto teor de fósforo foi adicionado também 0,225 g de fosfato supertríplo por kg de solo (63,8 mg /dm<sup>3</sup>).

As sementes de tabaco das gerações T<sub>4</sub> e T<sub>5</sub> foram plantadas diretamente nos vasos contendo 22 kg de solo. A adubação de cobertura foi feita usando 5 g de sulfato de amônia em cada vaso e a irrigação foi realizada diariamente com base na capacidade do campo.

Após 85 dias para alto P e 146 dias para baixo P do plantio (início do surgimento de botões florais), o comprimento da planta foi determinado medindo-se a distância da base do caule até a última folha expandida. A parte aérea e a raiz foram secas a 65°C em estufa até peso constante para obtenção do peso seco.

A parte aérea foi submetida a um processo de digestão com ácido nítrico perclórico seguida de quantificação de P por espectrometria de emissão de plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP) (da Silva, 2009). O conteúdo de fósforo foi calculado multiplicando-se o peso seco e a concentração de P.

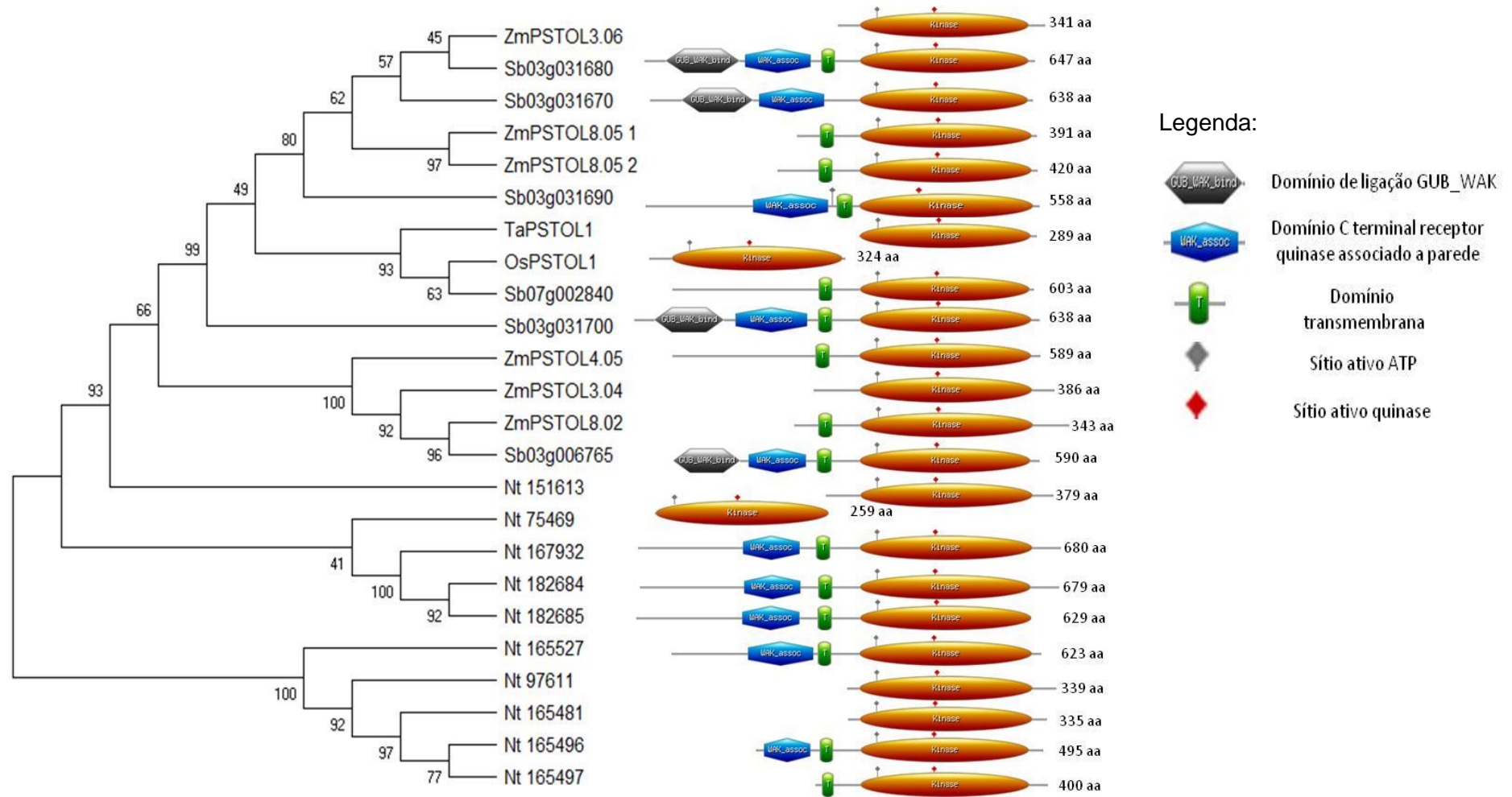
### **Análises de dados**

Análise de variância (ANOVA) foi feita no programa R versão 3.5.1 usando o pacote *Agricolae* (Mendiburu, 2019). Para a comparação das médias foi usado o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Coeficientes de correlação de Pearson foram estimados baseados nas médias dos genótipos para características de morfologia radicular, peso seco da parte aérea, peso seco de raiz, altura de plantas, conteúdo de P da parte aérea e expressão relativa (RQ) dos genes *Pstol1* usando o pacote *Performance Analytics* (Peterson *et al.* 2020).

## RESULTADOS

### **Proteínas quinases de tabaco agrupam separadamente das proteínas PSTOL1 das gramíneas**

As proteínas de tabaco com identidade maior do que 55% com OsPSTOL1 foram agrupadas separadamente das proteínas PSTOL1 das gramíneas (arroz, milho, sorgo e trigo) (Figura 2). Todas as proteínas apresentaram o domínio serina-treonina quinase, porém as proteínas de milho ZmPSTOL3.04, ZmPSTOL8.02, ZmPSTOL8.05\_1 e ZmPSTOL8.05\_2 possuem um domínio transmembrana, enquanto as proteínas ZmPSTOL3.06 e ZmPSTOL4.05 não possuem este domínio, similar a proteína de arroz OsPSTOL1. As proteínas de sorgo Sb03g031680, Sb03g031700 e Sb03g006765 possuem um domínio transmembrana, um domínio de ligação GUB\_WAK e um domínio C terminal de receptor quinase associado à parede, e a proteína Sb03g031670 possui os domínios de ligação GUB\_WAK e o domínio C terminal de receptor quinase associado à parede, mas não possui o domínio transmembrana. As proteínas Sb07g002840 e Sb03g031690 possuem o domínio transmembrana e a proteína Sb03g031690 também possui o domínio C terminal de receptor quinase associado à parede. As proteínas quinases de tabaco Nt182684, Nt182685, Nt165496, Nt165497, Nt165527, Nt167932 possuem o domínio transmembrana e as proteínas Nt182684, Nt182685, Nt165496, Nt165527, Nt167932 também possuem o domínio C terminal de receptor quinase associado à parede.



**Figura 2** - Análise filogenética e domínios das proteínas de arroz (OsPSTOL1), de trigo (TaPSTOL1), de milho (ZmPSTOL3.04, ZmPSTOL3.06, ZmPSTOL4.05, ZmPSTOL8.02, ZmPSTOL8.05\_1 e ZmPSTOL8.05\_2), de sorgo (Sb03g006765, Sb03g031670, Sb03g031680, Sb03g031690, Sb03g031700 e Sb07g002840) e de tabaco (Nt151613, Nt182684, Nt182685, Nt97611, Nt165496, Nt165497, Nt165481, Nt165527, Nt167932, Nt75469). A análise filogenética das proteínas foi feita pelo método da máxima verossimilhança baseado na matriz do modelo JTT com 1000 bootstraps.

## Caracterização molecular dos eventos transgênicos de tabaco

Foram obtidos eventos transgênicos de tabaco para todas as oito construções e estes confirmados para o gene *Bar* e genes *Pstol1* por PCR (Tabela 2).

**Tabela 2** - Eventos transgênicos de tabaco ( $T_0$ ) confirmados por PCR para os genes *Bar* e *Pstol1*.

Construção gênica	Total eventos
pMCG1005 (4x35S:: <i>Bar</i> ::NOS)	7
UBI:: <i>OsPstol1</i> ::NOS	5
UBI:: <i>ZmPstol3.06</i> ::NOS	6
UBI:: <i>ZmPstol8.02</i> ::NOS	7
UBI:: <i>ZmPstol8.05_1</i> ::NOS	8
UBI:: <i>Sb07g002840</i> ::NOS	1
UBI:: <i>Sb03g031690</i> ::NOS	8
UBI:: <i>Sb03g006765</i> ::NOS	10

A estimativa do número de cópias de 52 eventos ( $T_0$ ) mostrou que 48 eventos foram considerados cópia única e os eventos *OsPstol1* Ev. 11 e *ZmPstol8.02* Ev.7 tiveram duas cópias, o evento pMCG1005 Ev. 5 três cópias e o evento *Sb07g002840* Ev.11 cinco cópias (Tabela 3). Como esperado, o tabaco não transformado não apresentou amplificação para o gene *Bar* (Tabela 3).

Para validar os dados obtidos do número de cópias por PCR em tempo real foi feito um teste de segregação com os eventos pMCG1005 Ev. 7, *OsPstol1* Ev. 6 e *ZmPstol8.02* Ev. 6. Para o evento pMCG1005 Ev. 7 do total de dezesseis plântulas quatorze foram positivas para o gene *Bar* e duas negativas, no evento *OsPstol1* Ev. 6 de dezenove plântulas dezesseis foram positivas e três negativas para o gene *Bar*, e no evento *ZmPstol8.02* Ev. 6 de dezenove plântulas quatorze foram positivas e cinco negativas para o gene *Bar*. Portanto, o padrão de segregação foi confirmado por meio de teste de  $\chi^2$  com  $p < 0,05$ , sendo o esperado para características monogênicas (3:1) (Tabela 4).

**Tabela 3** - Estimativas do número de cópias do transgene *Bar* em linhagens T<sub>0</sub> de tabaco por qPCR calculado pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando o gene *Ax1* como controle endógeno.

Amostras	Nº de cópias ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	Amostras	Nº de cópias ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )
Tabaco não transgênico	0	Tabaco não transgênico	0
pMCG1005 Ev. 3	0,52	<i>ZmPstol8.02</i> Ev.2	0,24
pMCG1005 Ev. 4	0,98	<i>ZmPstol8.02</i> Ev.3	0,84
pMCG1005 Ev. 5	2,7	<i>ZmPstol8.02</i> Ev. 5	0,39
pMCG1005 Ev. 6	0,5	<i>ZmPstol8.02</i> Ev. 6	1
pMCG1005 Ev. 7	1,12	<i>ZmPstol8.02</i> Ev.7	1,54
pMCG1005 Ev. 9	0,39	<i>ZmPstol8.02</i> Ev.9	1,37
pMCG1005 Ev. 10	0,45	<i>ZmPstol8.02</i> Ev.10	0,7
<i>OsPstol1</i> Ev. 5	0,79	<i>Sb07g002840</i> Ev.11	4,78
<i>OsPstol1</i> Ev. 6	1,17	<i>Sb03g031690</i> Ev.1	0,52
<i>OsPstol1</i> Ev. 11	1,72	<i>Sb03g031690</i> Ev.2	0,37
<i>OsPstol1</i> Ev. 21	0,8	<i>Sb03g031690</i> Ev.3	0,58
<i>OsPstol1</i> Ev. 22	0,8	<i>Sb03g031690</i> Ev.5	0,41
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.4	0,44	<i>Sb03g031690</i> Ev.6	0,4
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.8	0,62	<i>Sb03g031690</i> Ev.7	0,83
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.10	0,39	<i>Sb03g031690</i> Ev.8	0,32
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.11	0,32	<i>Sb03g031690</i> Ev.10	0,42
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.13	0,57	<i>Sb03g006765</i> Ev.5	0,72
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.14	0,39	<i>Sb03g006765</i> Ev.6	0,74
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.15	0,39	<i>Sb03g006765</i> Ev.7	0,96
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.16	0,34	<i>Sb03g006765</i> Ev.12	1
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.1	1,33	<i>Sb03g006765</i> Ev.13	0,59
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.3	0,4	<i>Sb03g006765</i> Ev.19	0,69
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.5	1,35	<i>Sb03g006765</i> Ev.20	0,83
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.6	0,71	<i>Sb03g006765</i> Ev.21	0,94
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.7	0,55	<i>Sb03g006765</i> Ev.29	0,8
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.8	0,7	<i>Sb03g006765</i> Ev.30	0,66



**Tabela 4** - Segregação mendeliana e valores  $\chi^2$  para eventos transgênicos de tabaco T<sub>1</sub> obtendo valores menores que o tabelado (3,481) ( $p < 0,05$ ).

Amostras	Nº de cópias ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	Segregação	Valor $\chi^2$
pMCG1005 Ev. 7	1,12	3:1	1,33
<i>OsPstol1</i> Ev. 6	1,17	3:1	0,85
<i>ZmPstol8.02</i> Ev. 6	1	3:1	0,01

Plantas homozigotas (T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>) selecionadas por PCR semiquantitativo foram analisadas por qPCR para confirmação da zigosidade, sendo confirmadas plantas homozigotas para todos os eventos *Pstol1* e controles, exceto para pMCG1005 ev. 7.2 Planta 10 (Tabela 5).

O nível de expressão relativa foi analisado nos eventos transgênicos homozigotos de tabaco *Pstol1* nas gerações T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> sob baixo e alto P, mostrando que com exceção dos eventos do *ZmPstol3.06* em baixo e alto P e *ZmPstol8.02* em alto P houve superexpressão quanto comparado ao controle negativo. A expressão relativa do Ev. 5.1 Planta 20 do gene *OsPstol1* foi significativamente superior a dos eventos do controle em condições de baixo e alto P. Além disso, este evento mostrou maiores níveis de expressão sob alto P. O Ev.4.1 Planta 19 do gene *ZmPstol8.05\_1* apresentou expressão relativa diferente entre tratamentos, sendo a expressão maior em alto P. Eventos do gene *ZmPstol3.06* mostraram níveis de expressão baixos, semelhantes aos níveis do controle, em ambas condições, e sendo que Ev. 5.2 Planta 15 teve maior expressão sob alto P. Eventos *ZmPstol8.02* mostraram níveis de expressão relativa maiores que o do controle em condições de baixo P (Tabela 6). Os eventos dos genes *Sb07g002840*, Ev. 3 Planta 3 e Ev. 5 Planta 20 do gene *Sb03g031690* e Ev. 6.1 Planta 18 e Ev. 7 Planta 15 do gene *Sb03g006765* mostraram expressão relativa diferente do controle em condições de baixo e alto P com expressão relativa maior em baixo P (Tabela 6).

**Tabela 5** - Zigosidade de eventos transgênicos de tabaco *Pstol1* e controle (pMCG1005) nas gerações T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>.

<b>Amostras</b>	<b>Zigosidade (RQ)*</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Total plantas homocigotas</b>
pMCG1005 Ev. 4.1 Planta 1	1,70	TT	4
pMCG1005 Ev. 4.1 Planta 2	1,44	TT	
pMCG1005 Ev. 7.2 Planta 10	-	Tt	-
<i>OsPstol1</i> Ev. 5.1 Planta 20	2,66	TT	6
<i>OsPstol1</i> Ev. 6.1 Planta 1	1,66	TT	2
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.4.1 Planta 19	1,67	TT	1
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.8.2 Planta 1	1,38	TT	2
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.5.2 Planta 15	2,44	TT	5
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.7.1 Planta 11	3,13	TT	6
<i>ZmPstol8.02</i> Ev.6.1 Planta 14	1,40	TT	1
<i>ZmPstol8.02</i> Ev. 9.2 Planta 10	1,97	TT	1
<i>Sb07g002840</i> Ev.11.1 Planta 14	2,05	TT	6
<i>Sb07g002840</i> Ev.11.1 Planta 15	2,09	TT	
<i>Sb03g031690</i> Ev. 3 Planta 3	3,47	TT	1
<i>Sb03g031690</i> Ev. 5 Planta 20	1,58	TT	2
<i>Sb03g031690</i> Ev.7.2 Planta 13	1,63	TT	3
<i>Sb03g006765</i> Ev.5.2 Planta 6	2,06	TT	2
<i>Sb03g006765</i> Ev.6.1 Planta 18	2,05	TT	3
<i>Sb03g006765</i> Ev. 7 Planta 15	3,51	TT	4

\*Valores de expressão relativa calculados pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

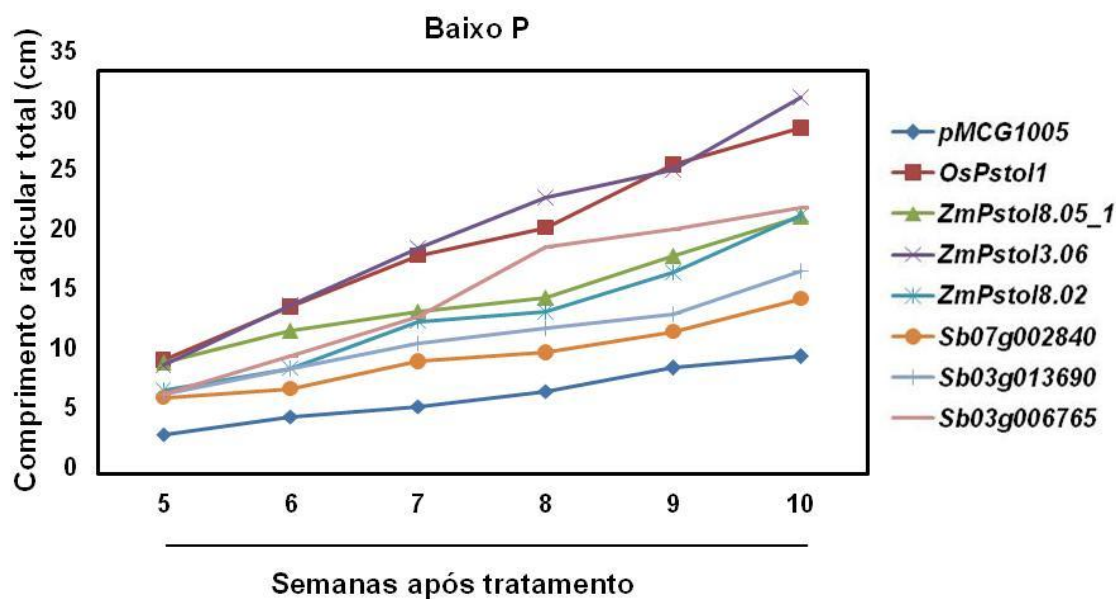
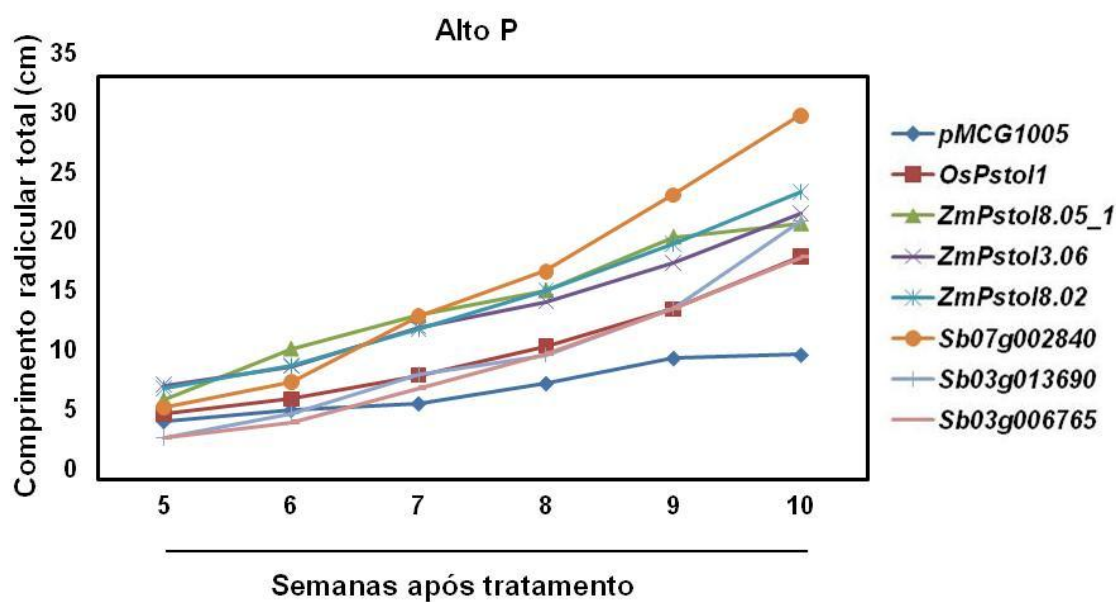
**Tabela 6** – Expressão relativa de eventos transgênicos homocigotos (T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>) de tabaco *Pstol1* e controle em condições de baixo e alto P.

Amostras	Nº de cópias (2 <sup>-ΔΔCt</sup> )	Expressão relativa (RQ) Baixo P*	Expressão relativa (RQ) Alto P*
pMCG1005 Ev. 4.1 (Controle)	0,98	1 <sup>Ba</sup>	1 <sup>Ba</sup>
<i>OsPstol1</i> Ev. 5.1 Planta 20	0,79	4950,14 <sup>Ab</sup>	7687,14 <sup>Aa</sup>
<i>OsPstol1</i> Ev. 6.1 Planta 1	1,17	747,26 <sup>Ba</sup>	439,70 <sup>Ba</sup>
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.4.1 Planta 19	0,44	165,88 <sup>Bb</sup>	1762,23 <sup>Aa</sup>
<i>ZmPstol8.05_1</i> Ev.8.2 Planta 1	0,62	233,37 <sup>Ba</sup>	20,88 <sup>Bb</sup>
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.5.2 Planta 15	1,35	0,52 <sup>Bb</sup>	3,88 <sup>Ba</sup>
<i>ZmPstol3.06</i> Ev.7.1 Planta 11	0,55	0,30 <sup>Ba</sup>	0,61 <sup>Ba</sup>
<i>ZmPstol8.02</i> Ev.6.1 Planta 14	1	322,62 <sup>Aa</sup>	0,99 <sup>Bb</sup>
<i>ZmPstol8.02</i> Ev. 9.2 Planta 10	1,37	1616,35 <sup>Aa</sup>	6,33 <sup>Bb</sup>
<i>Sb07g002840</i> Ev.11.1 Planta 14	4,7	137,76 <sup>Aa</sup>	78,80 <sup>Ab</sup>
<i>Sb07g002840</i> Ev.11.1 Planta 15	4,7	179,33 <sup>Aa</sup>	54,07 <sup>Ab</sup>
<i>Sb03g031690</i> Ev. 3 Planta 3	0,58	54,00 <sup>Aa</sup>	34,54 <sup>Ab</sup>
<i>Sb03g031690</i> Ev. 5 Planta 20	0,41	99,62 <sup>Aa</sup>	52,38 <sup>Ab</sup>
<i>Sb03g031690</i> Ev.7.2 Planta 13	0,83	44,26 <sup>Aa</sup>	38,30 <sup>Aa</sup>
<i>Sb03g006765</i> Ev.5.2 Planta 6	0,72	66,59 <sup>Aa</sup>	77,87 <sup>Aa</sup>
<i>Sb03g006765</i> Ev.6.1 Planta 18	0,74	72,58 <sup>Aa</sup>	61,72 <sup>Ab</sup>
<i>Sb03g006765</i> Ev. 7 Planta 15	0,96	166,28 <sup>Aa</sup>	85,19 <sup>Ab</sup>

\*Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem entre os eventos pelo teste de Dunnett a 5% e letras minúsculas iguais não diferem entre os tratamentos de baixo e alto P pelo teste de Tukey a 5%.

### Caracterização fenotípica de eventos transgênicos de tabaco *Pstol1* mostra aumento do sistema radicular e biomassa

As plântulas de tabaco das gerações T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> homocigotas dos eventos superexpressando os genes *OsPstol1*, *ZmPstol8.05\_1*, *ZmPstol3.06*, *ZmPstol8.02*, *Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765* foram crescidas por dez semanas em placas de petri com baixo e alto P, mostrando diferença no comprimento radicular total a partir da quinta semana de crescimento. O comprimento radicular total foi superior ao controle negativo (pMCG1005) (Figura 3A e 3B) tanto em baixo quanto em alto P para todos os eventos *Pstol1* quando observada a curva de crescimento da quinta semana até a décima semana.

**A****B**

**Figura 3** - Comprimento radicular total (cm) de plantas de tabaco gerações T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> de cinco a dez semanas sob tratamento de baixo (A) e alto P (B) de eventos do controle (pMCG1005) e eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz, milho e sorgo.

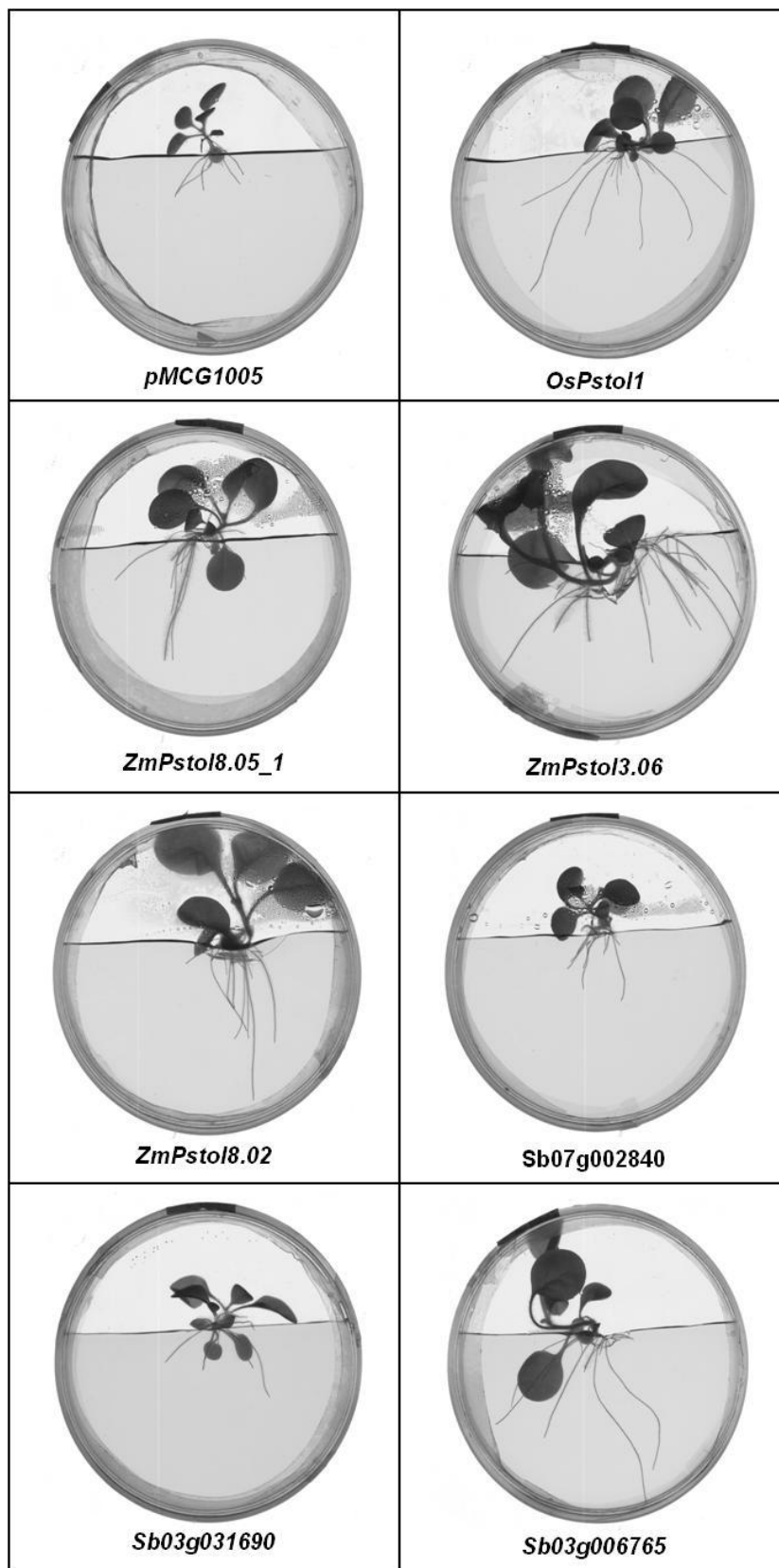
Após 10 semanas, o comprimento radicular total sob baixo P (Tabela 7, Figura 4) foi significativamente maior nos eventos superexpressando os genes *OsPstol1* e *ZmPstol3.06* em relação aos outros eventos. Já em alto P (Tabela 6, Figura 5) os eventos superexpressando os genes *ZmPstol8.02* e *Sb07g002840* tiveram maior comprimento radicular total. Houve diferença significativa entre tratamentos com comprimento radicular total superior nos eventos superexpressando os genes *OsPstol1* e *ZmPstol3.06* em baixo P e em alto P no evento superexpressando o gene *Sb07g002840* (Tabela 7). Para área de superfície total e área de superfície de raízes finas (diâmetro > 0,5 mm) não houve diferença significativa entre eventos gerados (Tabela 7).

A área de superfície de raízes superfinas (diâmetro entre 0 e 0,5 mm) foi significativamente maior nos eventos superexpressando os genes *OsPstol1*, *ZmPstol3.06* e *Sb03g006765* em condições de baixo P. Já em alto P, os eventos superexpressando os genes *ZmPstol8.02* e *Sb07g002840* mostraram área de superfície de raízes superfinas significativamente maior. Houve diferença significativa entre tratamentos com área de superfície de raízes superfinas superior no evento superexpressando o gene *ZmPstol3.06* em baixo P e em alto P no evento superexpressando o gene *Sb07g002840* (Tabela 7).

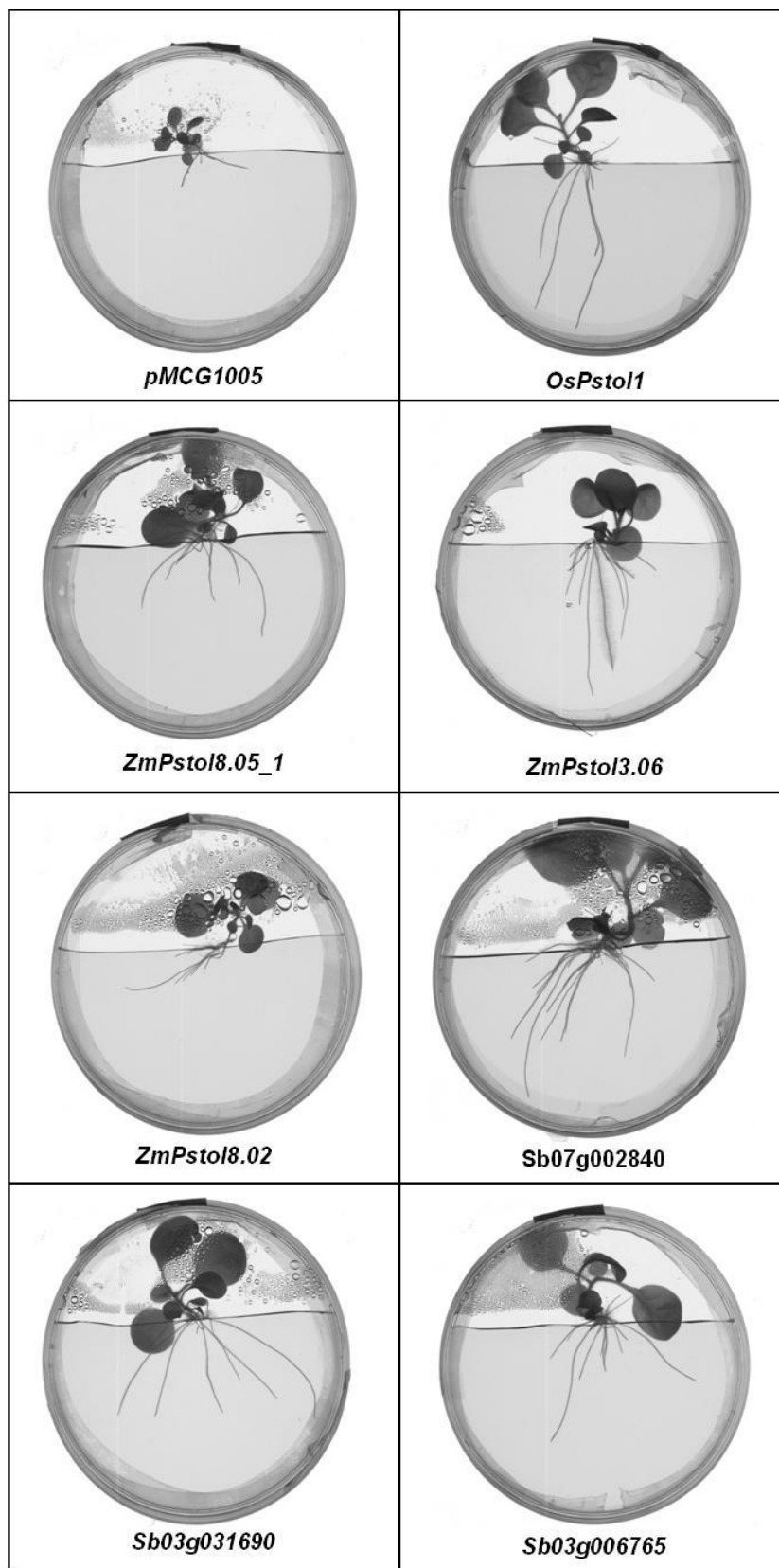
**Tabela 7** - Comprimento radicular total (cm), área de superfície total (cm<sup>2</sup>), área de superfície de raízes superfina (diâmetro 0 – 0,5 mm) (cm<sup>2</sup>) e área de superfície de raízes finas (diâmetro >0,5 mm) (cm<sup>2</sup>) de plantas de tabaco gerações T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> do controle (pMCG1005) e de eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz, milho e sorgo após dez semanas sob tratamento de baixo e alto P em meio de cultura.

Genes superexpressos	Comprimento radicular total (cm)	Comprimento radicular total (cm)	Área de superfície total (cm <sup>2</sup> )	Área de superfície total (cm <sup>2</sup> )	Área de superfície 0-0,5 mm (cm <sup>2</sup> )	Área de superfície 0-0,5 mm (cm <sup>2</sup> )	Área de superfície 0,5-4,5 mm (cm <sup>2</sup> )	Área de superfície 0,5-4,5 mm (cm <sup>2</sup> )
	Baixo P*	Alto P*	Baixo P*	Alto P*	Baixo P*	Alto P*	Baixo P*	Alto P*
<b>pMCG1005 (Controle)</b>	9,28 <sup>Cb</sup>	9,60 <sup>Bb</sup>	1,42 <sup>Bb</sup>	1,85 <sup>Bb</sup>	0,45 <sup>Db</sup>	0,48 <sup>Bb</sup>	0,72 <sup>Bb</sup>	1,07 <sup>Bb</sup>
<b><i>OsPstol1</i></b>	28,49 <sup>ABa</sup>	17,88 <sup>ABb</sup>	4,46 <sup>Bb</sup>	3,16 <sup>Bb</sup>	1,46 <sup>ABb</sup>	1,01 <sup>ABb</sup>	2,16 <sup>Bb</sup>	1,47 <sup>Bb</sup>
<b><i>ZmPstol8.05_1</i></b>	21,07 <sup>ABCb</sup>	20,63 <sup>ABb</sup>	4,19 <sup>Bb</sup>	3,50 <sup>Bb</sup>	0,93 <sup>ABCDb</sup>	0,98 <sup>ABb</sup>	2,78 <sup>Bb</sup>	2,00 <sup>Bb</sup>
<b><i>ZmPstol3.06</i></b>	31,09 <sup>Aa</sup>	21,54 <sup>ABb</sup>	5,20 <sup>Bb</sup>	3,42 <sup>Bb</sup>	1,61 <sup>Aa</sup>	1,15 <sup>ABb</sup>	2,99 <sup>Bb</sup>	1,56 <sup>Bb</sup>
<b><i>ZmPstol8.02</i></b>	21,18 <sup>ABCb</sup>	23,33 <sup>Ab</sup>	3,72 <sup>Bb</sup>	3,19 <sup>Bb</sup>	1,06 <sup>ABCDb</sup>	1,21 <sup>Ab</sup>	1,99 <sup>Bb</sup>	1,25 <sup>Bb</sup>
<b><i>Sb07g002840</i></b>	14,17 <sup>Cb</sup>	29,77 <sup>Aa</sup>	1,83 <sup>Bb</sup>	4,28 <sup>Bb</sup>	0,73 <sup>CDb</sup>	1,50 <sup>Aa</sup>	0,87 <sup>Bb</sup>	2,08 <sup>Bb</sup>
<b><i>Sb03g031690</i></b>	16,48 <sup>BCb</sup>	20,89 <sup>ABb</sup>	3,17 <sup>Bb</sup>	4,05 <sup>Bb</sup>	0,84 <sup>BCDb</sup>	0,96 <sup>ABb</sup>	1,69 <sup>Bb</sup>	2,22 <sup>Bb</sup>
<b><i>Sb03g006765</i></b>	21,79 <sup>ABCb</sup>	17,80 <sup>ABb</sup>	2,85 <sup>Bb</sup>	3,32 <sup>Bb</sup>	1,19 <sup>ABCb</sup>	0,93 <sup>ABb</sup>	1,38 <sup>Bb</sup>	1,85 <sup>Bb</sup>

\*Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem entre os eventos e letras minúsculas iguais não diferem entre os tratamentos de baixo e alto P pelo teste de Tukey a 5%.



**Figura 4** - Sistema radicular de plantas de tabaco homocigotas após dez semanas sob tratamento de baixo P de eventos do controle (*pMCG1005*) e eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz (*OsPstol1*), milho (*ZmPstol8.05\_1*, *ZmPstol3.06* e *ZmPstol8.02*) e sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*).



**Figura 5** - Sistema radicular de plantas de tabaco homocigotas após dez semanas sob tratamento de alto P de eventos do controle (*pMCG1005*) e eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz (*OsPstol1*), milho (*ZmPstol8.05\_1*, *ZmPstol3.06* e *ZmPstol8.02*) e sorgo (*Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765*).



As plantas de tabaco foram crescidas até o aparecimento do primeiro botão floral em casa de vegetação, sendo que houve um intervalo de 60 dias entre a coleta em alto P e baixo P, devido à diferença de desenvolvimento das plantas. O peso seco da parte aérea dos eventos superexpressando os genes *OsPstol1*, *ZmPstol3.06*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765* foi significativamente maior em baixo P. Para peso seco de raiz não houve diferença estatística entre os eventos *Pstol1* e o controle quando as plantas foram crescidas na mesma condição (Tabela 8). Em condições de baixo P a parte aérea de plantas dos eventos superexpressando os genes *OsPstol1* e *Sb03g031690* apresentou crescimento superior aos outros eventos *Pstol1* e ao controle (Figura 6).

Os eventos superexpressando os genes *OsPstol1*, *ZmPstol3.06* e *Sb03g031690* apresentaram conteúdo de P da parte aérea significativamente maior em relação aos outros eventos *Pstol1* e ao controle em baixo P. A altura de plantas dos eventos superexpressando os genes *OsPstol1*, *ZmPstol3.06*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765* foi significativamente maior para os eventos *Pstol1* do que para o controle em baixo P (Tabela 8).

Já em alto P foram as plantas do evento superexpressando o gene *OsPstol1* que apresentaram crescimento superior aos outros eventos *Pstol1* e ao controle (Figura 7), com o peso seco da parte aérea, o peso seco de raiz, o conteúdo de P da parte aérea e a altura de plantas do evento superexpressando o gene *OsPstol1* significativamente maior do que todos os outros eventos (Tabela 9).

**Tabela 8** - Peso seco de parte aérea (g), peso seco de raiz (g), conteúdo de P da parte aérea (g) e altura de plantas (cm) de plantas de tabaco gerações homozigotas do controle (pMCG1005) e de eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz, milho e sorgo após 146 dias sob tratamento de baixo P em casa de vegetação.

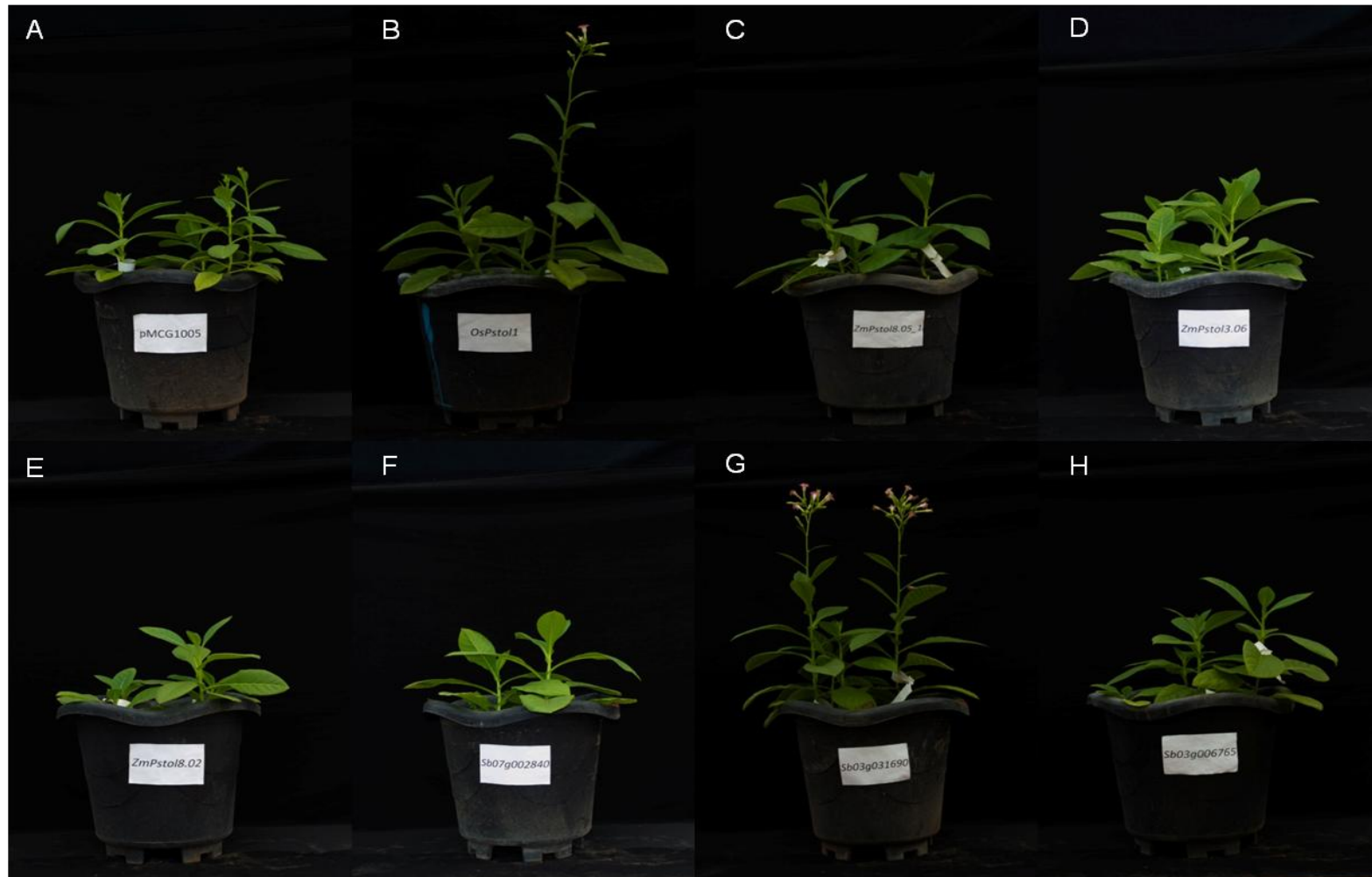
<b>Genes superexpressos</b>	<b>Peso seco da parte aérea (g)</b>	<b>Peso seco de raiz (g)</b>	<b>Conteúdo de P da parte aérea (g)</b>	<b>Altura de plantas (cm)</b>
<b>pMCG1005 (Controle)</b>	4,27 <sup>c</sup>	1,80 <sup>b</sup>	2,37 <sup>b</sup>	16,54 <sup>c</sup>
<b><i>OsPstol1</i></b>	14,02 <sup>ab</sup>	2,10 <sup>b</sup>	8,09 <sup>a</sup>	40,42 <sup>a</sup>
<b><i>ZmPstol8.05_1</i></b>	8,85 <sup>bc</sup>	1,742 <sup>b</sup>	6,44 <sup>ab</sup>	26,13 <sup>bc</sup>
<b><i>ZmPstol3.06</i></b>	12,23 <sup>ab</sup>	2,08 <sup>b</sup>	6,68 <sup>a</sup>	32,94 <sup>ab</sup>
<b><i>ZmPstol8.02</i></b>	9,03 <sup>bc</sup>	1,81 <sup>b</sup>	5,29 <sup>ab</sup>	24,88 <sup>bc</sup>
<b><i>Sb07g002840</i></b>	8,19 <sup>bc</sup>	2,07 <sup>b</sup>	5,57 <sup>ab</sup>	23,25 <sup>bc</sup>
<b><i>Sb03g031690</i></b>	15,84 <sup>a</sup>	1,63 <sup>b</sup>	7,30 <sup>a</sup>	44,85 <sup>a</sup>
<b><i>Sb03g006765</i></b>	11,34 <sup>ab</sup>	2,95 <sup>b</sup>	5,99 <sup>ab</sup>	32,94 <sup>ab</sup>

\*Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem entre os eventos para teste de Tukey a 5% de probabilidade.

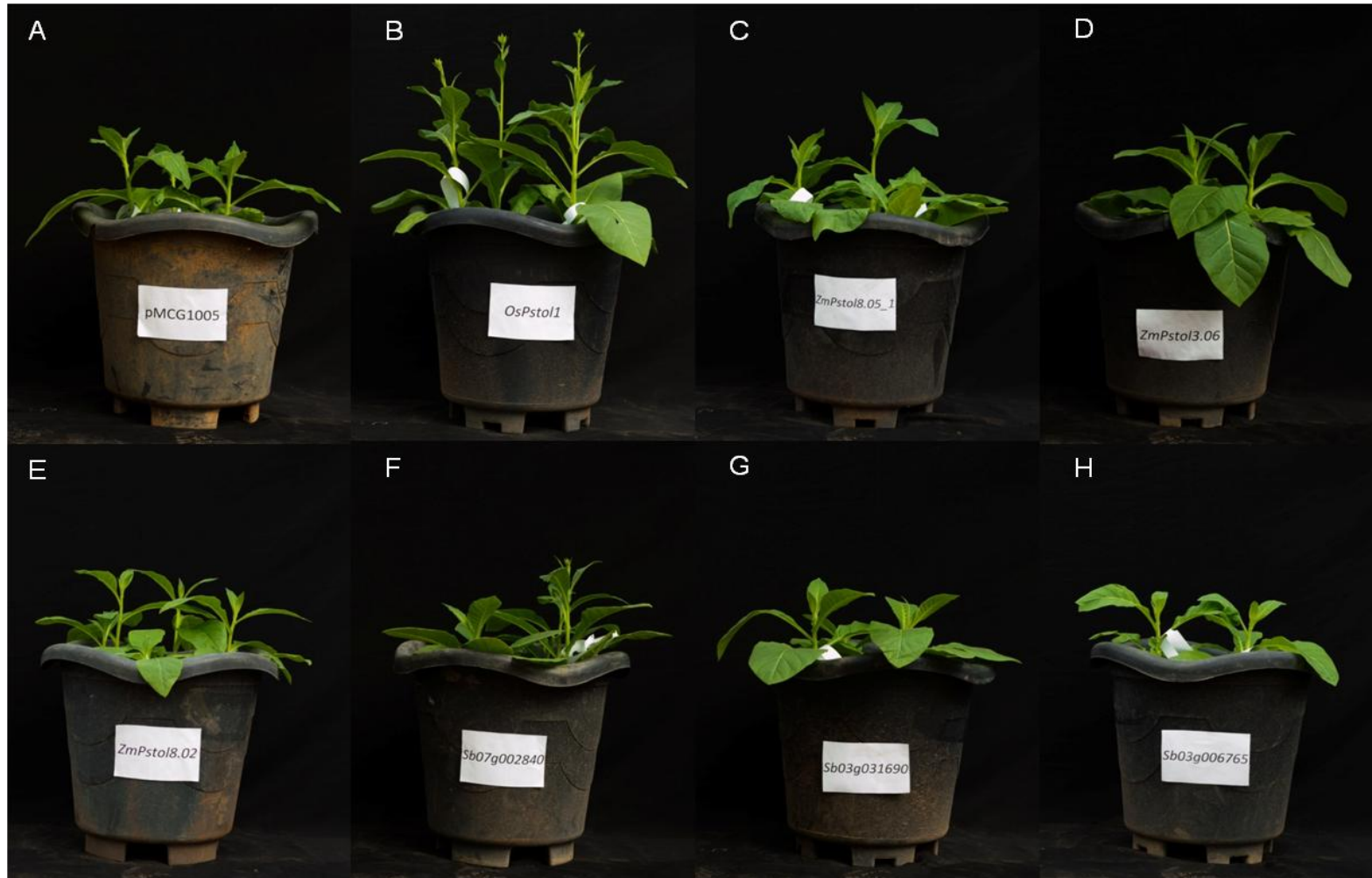
**Tabela 9** - Peso seco de parte aérea (g), peso seco de raiz (g), conteúdo de P da parte aérea (g) e altura de plantas (cm) de plantas de tabaco gerações homozigotas do controle (pMCG1005) e de eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz, milho e sorgo após 85 dias sob tratamento de alto P em casa de vegetação.

<b>Genes superexpressos</b>	<b>Peso seco da parte aérea (g)</b>	<b>Peso seco de raiz (g)</b>	<b>Conteúdo de P da parte aérea (g)</b>	<b>Altura de plantas (cm)</b>
<b>pMCG1005 (Controle)</b>	4,06 <sup>b</sup>	0,29 <sup>b</sup>	4,16 <sup>b</sup>	14,38 <sup>b</sup>
<b><i>OsPstol1</i></b>	12,42 <sup>a</sup>	1,55 <sup>a</sup>	14,28 <sup>a</sup>	29,42 <sup>a</sup>
<b><i>ZmPstol8.05_1</i></b>	5,01 <sup>bc</sup>	0,41 <sup>b</sup>	4,76 <sup>b</sup>	12,16 <sup>b</sup>
<b><i>ZmPstol3.06</i></b>	4,29 <sup>bc</sup>	0,38 <sup>b</sup>	5,53 <sup>b</sup>	12,31 <sup>b</sup>
<b><i>ZmPstol8.02</i></b>	3,76 <sup>bc</sup>	0,29 <sup>b</sup>	4,12 <sup>b</sup>	11,69 <sup>b</sup>
<b><i>Sb07g002840</i></b>	7,47 <sup>b<sup>ab</sup></sup>	0,92 <sup>ab</sup>	8,48 <sup>ab</sup>	21,00 <sup>ab</sup>
<b><i>Sb03g031690</i></b>	7,04 <sup>bc</sup>	0,83 <sup>ab</sup>	8,78 <sup>ab</sup>	14,00 <sup>b</sup>
<b><i>Sb03g006765</i></b>	2,76 <sup>c</sup>	0,41 <sup>b</sup>	3,33 <sup>b</sup>	11,61 <sup>b</sup>

\*Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem entre os eventos para teste de Tukey a 5% de probabilidade.



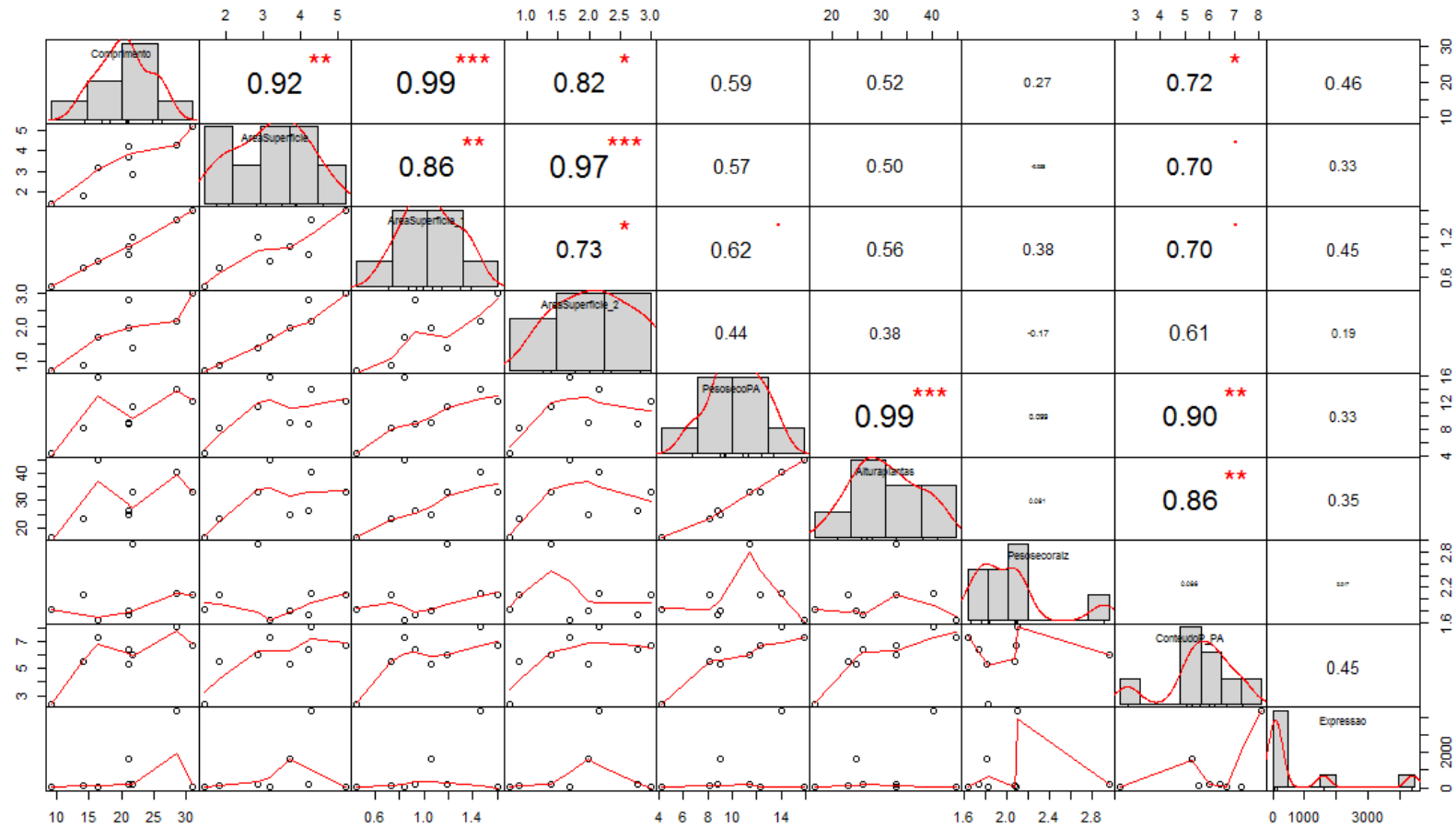
**Figura 6** - Plantas de tabaco homozigotas do controle (pMCG1005) e de eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz, milho e sorgo após 146 dias sob tratamento de baixo P em casa de vegetação. A: pMCG1005 (controle), B: *OsPstol1*, C: *ZmPstol8.05\_1*, D: *ZmPstol3.06*, E: *ZmPstol8.02*, F: *Sb07g002840*, G: *Sb03g031690* e H :*Sb03g006765*.



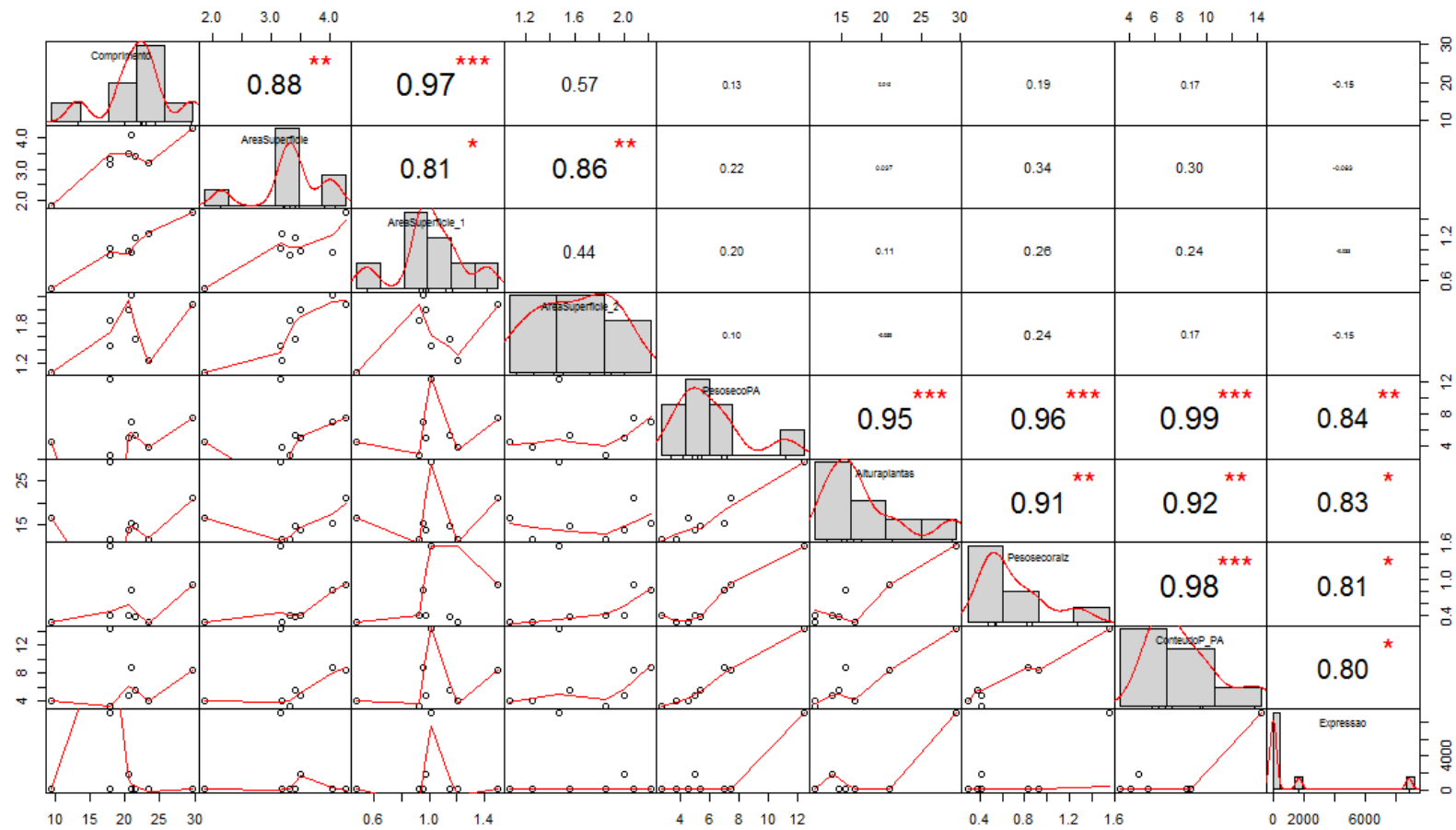
**Figura 7** - Plantas de tabaco gerações homozigotas do controle (pMCG1005) e de eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz, milho e sorgo após 85 dias sob tratamento de alto P em casa de vegetação. A: pMCG1005 (controle), B: *OsPstol1*, C: *ZmPstol8.05\_1*, D: *ZmPstol3.06*, E: *ZmPstol8.02*, F: *Sb07g002840*, G: *Sb03g031690* e H: *Sb03g006765*.

### **Correlação entre as características de morfologia radicular, produtividade e expressão gênica**

Em condições de baixo P houve alta correlação entre todas as características de morfologia radicular, entre comprimento radicular total e conteúdo de P da parte aérea e peso seco da parte aérea com altura de plantas e conteúdo de P da parte aérea (Figura 8). Já em condições de alto P o comprimento radicular total foi correlacionado com área de superfície total e área de superfície com diâmetro de 0-0,5 mm, e área de superfície total com área de superfície com diâmetro de 0-0,5 mm e área de superfície com diâmetro de 0,5-4,5 mm. Todas as características de produtividade foram altamente correlacionadas entre si e com a expressão relativa (Figura 9).



**Figura 8** - Correlação de Person com médias dos eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz, milho e sorgo para características de morfologia radicular, peso seco da parte aérea, peso seco de raiz, altura de plantas, conteúdo de P da parte aérea e expressão gênica relativa (RQ) em baixo P.



**Figura 9** - Correlação de Person com médias dos eventos superexpressando os genes *Pstol1* de arroz, milho e sorgo para características de morfologia radicular, peso seco da parte aérea, peso seco de raiz, altura de plantas, conteúdo de P da parte aérea e expressão gênica relativa (RQ) em alto P.

## DISCUSSÃO

Os membros da família dos receptores quinases (*Receptores-like kinases*, RLKs/*Pelle*) podem ser divididos em proteínas quinases citoplasmáticas (RLCKs), que não apresentam domínio extracelular, e em proteínas receptoras quinases (RLKs), que são caracterizadas pela presença de domínio extracelular, domínio transmembrana e domínio quinase citoplasmático (Shiu & Bleecker 2001). A superfamília das RLKs/*Pelle* é uma das maiores famílias de proteínas em plantas e seus membros apresentam uma ampla diversidade de domínios, o que confere multifuncionalidade a esta família (De Smet *et al.* 2009; Lehti-Shin & Shiu 2012). Neste trabalho as dez proteínas preditas de tabaco com identidade entre 55% e 58% a OsPSTOL1 ficaram em um ramo separado das proteínas das gramíneas. Algumas proteínas de tabaco apresentaram além do domínio serina/treonina quinase e o sítio de ligação de ATP, diferentes combinações de domínios, como apenas o domínio transmembrana ou a presença deste domínio junto com o domínio C terminal de receptor quinase associado à parede (Figura 2), com características de RLCKs e RLKs, assim como as proteínas PSTOL1 de gramíneas.

A proteína OsPSTOL1 é uma RLCK e as proteínas SbPSTOL1 são RLKs, que parecem ter um ancestral comum, sendo classificadas na subfamília das LRK10L-2 (Gamuyao *et al.* 2012; Maciel, 2018). A identidade da sequência dos aminoácidos das proteínas ZmPSTOL1 com OsPSTOL1 é de 55% a 70% (Azevedo *et al.* 2015). As proteínas ZmPSTOL8.02 e ZmPSTOL8.05\_1, localizadas no cromossomo 8, são classificadas como RLKs e apresentam um domínio transmembrana para a percepção de sinais e um domínio quinase intracelular (Shiu & Bleecker 2001; Vij *et al.* 2008). Já a proteína ZmPSTOL3.06, localizada no cromossomo 3, possui o domínio intracelular quinase, mas não tem o domínio transmembrana, assim como OsPSTOL1 (Gamuyao *et al.* 2012), sendo classificada como RLCKs (Vij *et al.* 2008). As funções moleculares e fisiológicas das quinases LRK10L-2 (*Leaf rust 10 disease-resistance locus receptor-like kinase*) ainda são pouco conhecidas. O gene *TaLRK10* descrito como um marcador da resistência a ferrugem do trigo *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* é uma LRK10L-2 (Feuillet *et al.* 1997) e seus



ortólogos em *Arabidopsis* são reguladores positivos da tolerância à seca mediada por ácido abscísico (Lim *et al.* 2014).

A identidade da sequência dos aminoácidos das proteínas *SbPSTOL1* com *OsPSTOL1* é de 55% a 73% e a predição dos domínios demonstra que todas as proteínas compartilham o domínio serina/treonina quinase (Hufnagel *et al.* 2014). O homólogo de sorgo com maior similaridade ao *OsPstol1* é o *Sb07g002840*, que está localizado no cromossomo 7, enquanto os outros cinco estão localizados no cromossomo 3 (Hufnagel *et al.* 2014). Uma peculiaridade das proteínas PSTOL1 de sorgo é a presença de um peptídeo sinal que sugere uma via secretória, um domínio transmembrana e de interação com parede celular. O domínio de associação com parede celular do tipo WAK na região C-terminal não são encontrados no *OsPSTOL1* e nem no *Sb07g002840*, mas estão presentes nas demais proteínas *PSTOL1* de sorgo. Já o domínio do tipo GUB\_WAK é encontrado especificamente no *Sb03g006765* e *Sb03g031700* (Hufnagel *et al.* 2014). O domínio extracelular das proteínas LRK10L-2 é caracterizado pela presença de domínios de associação à parede celular, denominados de *cysteine-rich galacturonan\_binding domain* (Gub\_Wak) e *wall-associated receptor kinase domain* (Wak\_assos). O domínio Gub\_Wak foi caracterizado em proteínas da subfamília das WAKs pela ligação com pectinas nativas da matriz extracelular e pela ligação com oligogalacturonídeos liberados a partir da ação dos DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*) (Kohorn 2016).

A menor identidade e a separação em diferentes ramos das proteínas *Pstol1* de gramíneas e das *Pstol1-like* de tabaco reduz a possibilidade de ocorrer silenciamento gênico. Genes inseridos no genoma vegetal com alta homologia com gene endógeno levam ao aumento dos níveis de transcritos acima do limite crítico e induzem a degradação específica de transcritos homólogos (Vendruscolo 2003; Rajeevkumar *et al.* 2015). 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 (Vendruscolo 2003; Rajeevkumar *et al.* 2015). Além do

silenciamento do transgene podem ocorrer rearranjos ou deleções no T-DNA inserido, fazendo com que o transgene possa estar apenas parcialmente presente, ou presente, mas diferencialmente ou não expresso (Gelvin 2017; Jupe *et al.* 2018).

Eventos transgênicos foram obtidos para todas as construções gênicas contendo genes *Pstol1* de arroz, milho e sorgo, sendo que apenas para a construção com o gene *Sb07g002840* foi obtido um único evento. Apesar disso, as plantas superexpressando o gene *Sb07g002840* mostraram comprimento radicular total e área de superfície de raízes superfinais significativamente maiores que os outros eventos *Pstol1* e controle sob alto P. Uma menor taxa de regeneração também foi observada em plantas de milho superexpressando o gene *Sb07g002840* (Negri 2019). Este fenômeno não parece estar ligado à estrutura da proteína, uma vez que *Sb07g002840* tem maior identidade com *OsPstol1*. No entanto, o efeito negativo parece estar ligado ao local de inserção ou ao nível de expressão. Neste estudo utilizamos o promotor constitutivo e de alta expressão ubiquitina. Apesar deste promotor ser preferencialmente usado em monocotiledôneas, há relatos de seu uso com sucesso em tabaco (Liu *et al.* 2004; Kanneganti & Gupta 2008; Hasthanasombut *et al.* 2009). Plantas superexpressando o fator de transcrição *MORE ROOT (TaMOR)* de trigo apresentaram maior sistema radicular e produção de grãos em arroz, no entanto o efeito de letalidade foi observado em alguns transformantes (Li *et al.* 2016). O promotor constitutivo e de alta expressão CaMV 35S foi usado na superexpressão do gene *TaMOR-D* em arroz. Uma possível explicação para a letalidade seja a alta expressão do transgene, portanto um promotor de baixa expressão pode ser uma alternativa viável para evitar este efeito negativo. Esse fenômeno também foi observado em outros genes responsivos à auxina em petunia (*Petunia hybrida*) e arroz (Tobena-Santamaria *et al.* 2002; Yamamoto *et al.* 2007).

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 cinco cópias do transgene. O número de cópias influencia os níveis de expressão e estabilidade dos genes exógenos e endógenos. Dessa maneira a inserção de uma cópia do transgene é desejável, pois eventos com cópia única são geneticamente estáveis, uma vez que normalmente seguem padrões de

segregação Mendeliana e, nestes, a possibilidade de silenciamento gênico é menor (Gadeleta *et al.* 2011; Collier *et al.* 2017). O teste de segregação mostrou que os eventos transgênicos *Pstol1* apresentaram segregação Mendeliana 3:1, confirmando inserção de uma única cópia do transgene nestes eventos. Os transgenes são herdados sexualmente como uma característica dominante (Christou *et al.* 1989; Low *et al.* 2018) e com herança Mendeliana 3:1 quando estão presentes em cópia única funcional no genoma hospedeiro (Parrott 2010; Tizaoui & Kchouk 2012). Linhagens transgênicas homozigotas foram obtidas para todos os eventos do controle e eventos dos genes *Pstol1*. Plantas homozigotas são importantes, uma vez que elas mantêm um alto grau de consistência para características determinadas por um gene em todas as gerações subsequentes, possuindo estabilidade de integração e de herança do transgene (Passricha *et al.* 2016).

Houve superexpressão dos transgenes tanto em baixo quanto em alto P, com exceção dos eventos *ZmPstol3.06*, porém essa expressão foi variável, apesar do promotor da Ubiquitina que foi utilizado ser constitutivo. Expressão diferencial de um mesmo transgene em diferentes linhagens foi observada em trigo ao se superexpressar o gene *POWDERY MILDEW RESISTANCE GENE (Pm3b)* associado à resistência fungo *Blumeria graminis f.sp. tritici* sob o promotor ubiquitina (Zeller *et al.* 2010). Essa variação na expressão pode estar relacionada ao efeito de posição da inserção do transgene e também com a interação com outros genes, como uma possível interrupção de genes nativos. O evento 5.1 superexpressando o gene *OsPstol1* e o evento 4.1 superexpressando o gene *ZmPstol8.05\_1* apresentaram, por exemplo, maior expressão sob alto P. Já os eventos superexpressando o gene *ZmPstol8.02* mostraram expressão relativa maior em baixo P, e os eventos dos genes *Sb07g002840*, Ev. 3 Planta 3 e Ev. 5 Planta 20 do gene *Sb03g031690* e Ev. 6.1 Planta 18 e Ev. 7 Planta 15 do gene *Sb03g006765* mostraram expressão relativa diferente do controle em condições de baixo e alto P com expressão relativa maior em baixo P (Tabela 6).

A expressão dos transgenes está mais relacionada com o local de integração do transgene no genoma vegetal do que ao número de cópias (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, sequências repetitivas, incluindo regiões de centrômero e telômero, grande rDNA e 5S rDNA repetidos (Gelvin & Kim 2007; Jupe *et al.* 2018).

Interessantemente, sob alto P foi observada uma correlação positiva significativa entre a expressão relativa e peso seco da parte aérea e raiz, conteúdo de P da parte aérea e altura de plantas, indicando que a expressão do transgene pode estar afetando diretamente características fenotípicas ligadas ao uso de P pelas plantas de tabaco. Cabe ressaltar que as plantas crescidas sob baixo P tiveram uma diferença de cerca de 60 dias no desenvolvimento, o que pode ter alterado as condições de expressão dos transgenes em casa de vegetação e influenciado as correlações.

Eventos superexpressando os genes *OsPstol1* e *ZmPstol3.06* sob baixo P apresentaram maior comprimento radicular total, área de superfície de raízes superfínas, peso seco da parte aérea, conteúdo de P da parte aérea e altura de plantas, se mostrando eficientes sob condições de restrição de P. Além disso, sob alto P os eventos *OsPstol1* tiveram maior peso seco da parte aérea e raiz, conteúdo de P da parte aérea e altura de plantas. Quando o *OsPstol1* foi superexpresso nas variedades IR64 e Nipponbare, representando duas variedades distintas de arroz irrigado moderno (*indica* e *japonica*, respectivamente), que naturalmente não possuem o gene, houve aumento da área de superfície radicular e da aquisição de P, o que levou a um aumento de rendimento de grãos de aproximadamente 30% em condição de baixa disponibilidade de P (Gamuyao *et al.* 2012). Os nossos resultados indicaram que o gene *OsPstol1* tem potencial uso tanto em gramíneas quanto em dicotiledôneas e em diferentes condições de P, tendo um papel no desenvolvimento precoce do sistema radicular. Já o gene *ZmPstol3.06* apresenta maior expressão na raiz do que na parte aérea e sob baixo P, além da contribuição dos alelos favoráveis ser do genótipo eficiente no uso de P (L3) (Azevedo *et al.* 2015). É interessante notar que o evento superexpressando o gene *ZmPstol8.05\_1* não mostrou diferenças fenotípicas, já o evento superexpressando o gene *ZmPstol8.02* teve maior comprimento radicular total e área de superfície de raízes superfínas sob alto P. Apesar de terem maior

expressão na raiz, estes genes apresentam expressão tanto sob baixo quanto sob alto P e os alelos que contribuem para as características ligadas a eficiência no uso de P destes genes vem da linhagem ineficiente no uso de P (L22) (Azevedo *et al.* 2015). Apesar da expressão do gene *ZmPstol3.06* não ter sido elevada, este gene de milho apresentou variações fenotípicas significativas. Cabe ressaltar ainda, que o gene *ZmPstol3.06* não possui o domínio transmembrana, assim como *OsPstol1* e ao contrário de *ZmPstol8.05\_1* e *ZmPstol8.02* (Figura 2).

O evento superexpressando o gene *Sb03g031690* apresentou maior peso seco da parte aérea, conteúdo de P da parte aérea e altura de plantas sob baixo P. O gene *Sb03g031690* está associado a SNPs para conteúdo de P e características de acúmulo de biomassa (Hufnagel *et al.* 2014). Já o evento superexpressando o gene *Sb03g006765* teve valores superiores de área de superfície de raízes superfinais, peso seco de parte aérea e altura de plantas sob baixo P (Tabelas 7, 8 e 9). O gene *Sb03g006765* co-localiza com QTLs relacionados com área de superfície de raízes finas (diâmetro entre 1 e 2 mm) e produção de grãos em sorgo (Hufnagel *et al.* 2014; Bernardino *et al.* 2019). Além disso, há forte associação dos genes *Sb03g006765* e *Sb03g031690* com características de arquitetura radicular como *bushiness* (razão do número máximo de raízes dividido pelo número médio de raízes), centróide (posição vertical do centro de massa do sistema radicular inteiro), número médio de raízes e comprimento específico da raiz (Hufnagel *et al.* 2014). Sob alto P, o evento superexpressando o gene *Sb07g002840* teve maior comprimento radicular total e área de superfície de raízes superfinais. O gene *Sb07g002840* está próximo de QTLs para produtividade de grãos e diâmetro radicular (Bernardino *et al.* 2019). As proteínas *Sb07g002840*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765* possuem um conjunto de domínios diferentes, o que pode estar influenciando os diferentes fenótipos dos transgenes. *Sb07g002840* é a proteína com maior identidade ao *OsPstol1*, enquanto que *Sb03g031690* e *Sb03g006765* apresentam um domínio transmembrana, um domínio C terminal de receptor quinase associado à parede nas proteínas e além disso, *Sb03g006765* apresenta domínio de ligação GUB\_WAK. O domínio WAK\_ASSOC na região C-terminal 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 afetam o crescimento radicular (Kanneganti & Gupta 2008, 2011; Kaur *et al.* 2013). Além disso, o domínio GUB-Wak, que também é um domínio de associação à parede celular (Kohorn, 2016), está presente em proteínas que participam da resposta imune a patógenos em milho e laranja doce (Hurni *et al.* 2015, Li *et al.* 2020).

Proteínas RLKs percebem sinais externos e podem interagir com RLCKs, que por sua vez podem ativar, por exemplo, a cascata de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e essa cascata de sinalização ativar genes envolvidos no crescimento nas plantas (Liang & Zhou 2018). Proteínas quinases RLKs e RLCKs também fazem parte da cascata de sinalização de resposta a estresses abióticos. A proteína de arroz STRK1, uma RLCK, é fosforilada por uma RLK ainda não caracterizada que recebe um sinal extracelular referente aos estresses salino e oxidativo e fosforila a enzima catalase CatC responsável por catalisar a decomposição de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigênio. Os estresses salino e oxidativo induzem o acúmulo de  $H_2O_2$  e uma vez que sua decomposição é catalisada por CatC ocorre tolerância a esses estresses mediada por STRK1 (Zhou *et al.* 2018). Já a proteína quinase MAPK6 está envolvida na reprogramação celular da raiz primária em resposta aos níveis contrastantes de P/Fe. Os mutantes *mapk6* apresentam uma exaustão exacerbada do meristema e conseqüentemente hipersensibilidade ao baixo P, sugerindo que o MAPK6 mantém a homeostase da auxina durante o crescimento determinado da raiz induzido pelo Fe -P / + Fe (López-Bucio *et al.* 2019). A quinase semelhante ao receptor ARABIDOPSIS CRINKLY4 (ACR4) foi identificada em uma análise de transcriptoma de células do periciclo durante o início da raiz lateral (De Smet *et al.* 2008). As linhagens superexpressando ACR4 apresentam maior densidade de raízes laterais emergentes, sendo fundamental para mediar a divisão celular no tecido radicular pluripotente durante a organogênese (De Smet *et al.* 2008). A função do ACR4 sugere que existe um mecanismo comum que regula o desenvolvimento do meristema apical radicular e lateral, fundamental para a captação de fósforo. Além disso, as quinases associadas à parede (WAKs)

estão envolvidas na conversa cruzada mediada por invertase entre o citoplasma e o exterior da raiz, levando a um aumento no tamanho das células das raízes e, portanto, alterações na morfologia das raízes (Wagner & Kohorn 2001). As WAKs mediam várias etapas intermediárias no processo de alongamento celular, incluindo aquelas controladas por expansinas (Wagner & Kohorn 2001). As WAKs têm sido implicadas em várias respostas das plantas a fatores bióticos e abióticos, possivelmente incluindo estresse por P, como mostrado em sorgo (Hufnagel *et al.* 2014), milho (Negri 2019) e tabaco, como mostrado neste trabalho.

Os resultados obtidos sugerem que os genes *Pstol1* possuem um papel mais geral no sistema radicular, alterando a morfologia radicular, com ganho na biomassa em condições de baixo e alto P. Além disso, os genes *Pstol1* têm potencial uso não apenas em monocotiledôneas (Gamuyao *et al.*, 2012; Hufnagel *et al.*, 2014; Azevedo *et al.*, 2015; Bernardino *et al.*, 2019), mas também em dicotiledôneas, podendo contribuir para o melhoramento por meio da alteração da arquitetura radicular, maior aquisição de P e conseqüentemente maior produção de grãos.

## REFERÊNCIAS

- ARTIMO, P.; JONNALAGEDDA, M.; ARNOLD, K.; BARATIN, D.; CSADI, G.; DE CASTRO, E.; DUVAUD, S.; FLEGEL, V.; FORTIER, A.; GASTEIGER, E.; GROSDIDIER, E.; HERNANDEZ, C.; LOANNIDIS, V.; KUZNETSOV, D.; LIECHTI, R.; MORETTI, S.; MOSTAGUIR, K.; REDASCHI, N.; ROSSIER, G.; XENARIOS, I.; STOCKINGER, H. (2012). ExPasy: SIB bioinformatics resource portal. *Acids Res.* 40: 597-603.
- AZEVEDO, G.C.; CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; NEGRI, B.F.; HUFNAGEL, B.; SILVA, L DA C.; MAGALHAES, J.V.; GARCIA, A.; LANA, U.G.P.; DE SOUSA, S.M.; GUIMARÃES, 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 Biol.* 15: 172.
- BERNARDINO, K.C.; PASTINA, M.M.; MENEZES, C.B.; DE SOUSA, S.M.; MACIEL, L.S.; CARVALHO JR, G.; GUIMARÃES, C.T.; BARROS, B.A.;

- COSTA e SILVA, L.; CARNEIRO, P.C.S.; SCHAFFERT, R.E.; KOCHIAN, L.V.; MAGALHÃES, J.V. (2019). The genetic architecture of phosphorus efficiency in sorghum involves pleiotropic QTL for root morphology and grain yield under low phosphorus availability in the soil. *BMC plant biology* 19: 87.
- CHAPIN, F.S.III.; MATSON, P.A.; VITOUSEK, P. (2011). *Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology*. New York, NY: Springer Science & Business Media.
- 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.
- CORDELL, D.; WHITE, S.; LINDSTRÖM, T. (2011). Peak phosphorus: The crunch time for humanity? *The Sustainability Review*.
- DA SILVA F.C. (2009). Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília.
- DANESHGAR, S.; CALLEGARI, A.; CAPODAGLIO, A.G.; VACCARI, D. (2018). The potential phosphorus crisis: resource conservation and possible escape technologies: a review. *Resources* 7: 37.
- DARDICK, C.; CHEN, J.; RICHTER, T.; OUYANG, S.; RONALD, P. (2007). The rice kinase database. A phylogenomic database for the rice kinome. *Plant Physiol.* 143: 579–586.
- 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.
- DE SMET, I.; VASSILEVA, V.; DE RYBEL, B.; LEVESQUE, M.P.; GRUNEWALD, W.; VAN DAMME, D.; VAN NOORDEN, G.; NAUDTS, M.; VAN ISTERDAEL, G.; DE CLERCQ, R.; WANG, J.Y.; MEULI, N.; VANNESTE, S.; FRIML, J.; HILSON, P.; JÜRGENS, G.; INGRAM, G.C.; INZÉ, D.; BENFEY, P.N.; BEECKMAN, T. (2008). Receptor-Like Kinase ACR4 Restricts Formative Cell Divisions in the Arabidopsis Root. *Science* 322: 594-597.



- DE SMET, I.; VOSS, U.; JÜRGENS, G.; BEECKMAN, T. (2009). Receptor-like kinases shape the plant. *Nature cell biology* 11: 1166–73.
- FEUILLET, C.; SCHACHERMAYR, G.; KELLER, B. (1997). Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded at the Lr10 disease resistance locus of wheat. *The Plant Journal* 11: 45–52.
- GADALETA, 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.
- 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.
- GELVIN, S.B. (2017). Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the plant genome. *Annu Rev Genet.* 51:195–217.
- HASAN, M.M.; HASAN, M.M.; DA SILVA, J.A.T.; LI, X. (2016). Regulation of phosphorus uptake and utilization: transitioning from current knowledge to practical strategies. *Cell Mol Biol Lett* 21:1–19
- HASTHANASOMBUT, S.; NTUI, V.; SUPAIBULWATANA, K.; MII, M.; NAKAMURA, I. (2009). Expression of *Indica* rice *OsBADH1* gene under salinity stress in transgenic tobacco. *Plant Biotechnology Reports* 4: 75–83.
- HUFNAGEL, B.; De SOUSA, S.M.; ASSIS, L.; GUIMARÃES, C.T.; LEISER, W.; AZEVEDO, G.C.; NEGRI, B.F.; 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.
- HURNI, S.; SCHEUERMANN, D.; KRATTINGER, S.G.; KESSEL, B.; WICKER, T.; HERREN, G.; FITZE, M.N.; BREEN, J.; PRESTERL, T.; OUZUNOVA, M.; KELLER, B. (2015). The maize disease resistance

- gene *Htn1* against northern corn leaf blight encodes a wall-associated receptor-like kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 8780–8785.
- JONES, D.T.; TAYLOR, W.R.; THORNTON, J.M. (1994). A mutation data matrix for transmembrane proteins. *FEBS Lett* 339: 269–275
- JONES, P.; BINNS, D.; CHANG, H.Y.; FRASER, M.; LI, W.; MCANULLA, C.; MCWILLIAM, H.; MASLEN, J.; MITCHELL, A.; NUKA, G.; PESSEAT, S.; QUINN, A. F.; SANGRADOR-VEGAS, A.; SCHEREMETJEW, M.; YONG, S.Y.; LOPEZ, R.; HUNDER, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30: 1236-1240.
- 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.
- JUPE, F.; RIVKIN, A.C.; MICHAEL, T.P.; ZANDER, M.; MOTLEY, T.S.; SANDOVAL, J.P.; SLOTKIN, K.R.; CHEN, H.; CASTAGNON, R.; NERY, J.R.; ECKER J.R. (2018). The complex architecture of plant transgene insertions. *bioRxiv*.
- KANNEGANTI, V.; GUPTA, A. K. (2008). Overexpression of *OsiSAP8*, a member of stress associated protein (SAP) gene family of rice confers tolerance to salt, drought and cold stress in transgenic tobacco and rice. *Plant Molecular Biology* 66: 445–462.
- 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. *FunctIntegr Genomics* 13: 167–177
- KOHORN, B.D. (2016). Cell wall-associated kinases and pectin perception. *J. Exp. Bot.* 67: 489–494.
- LOW, L.Y.; YANG, S.K.; ANDREW, K.D.X.; ONG-ABDULLAH, J.; TAN, N.P.; LAI, K.S. (2018). Transgenic plants: Gene constructs, vector and transformation method. In Çelik Ö (ed) *New visions in plant science*. Intech Open, London, p. 41-61.
- KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model:

- Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* 305: 567-580.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. (2018). MEGA x: Molecular evolutionary Genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 35: 1547–1549.
- LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.
- LEHTI-SHIU, M.D.; SHIU, S.H. (2012). Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 367: 2619-2639.
- LI, B.; LIU, D.; WANG, J.; LI, Q.; CHANG, X.; MAO, X.; JING, R. (2016). Overexpression of wheat gene *TaMOR* improves root system architecture and grain yield in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany* 67: 4155–4167.
- LI, Q.; HU, A.; QI, J.; DOU, W.; QIN, Z.; ZOU, X.; XU, L.; CHEN, S.; HE, Y. (2020). CsWAKL08, a pathogen-induced wall-associated receptor-like kinase in sweet orange, confers resistance to citrus bacterial canker via ROS control and JA signaling. *Hortic Res* 7: 42.
- LIANG, X.; ZHOU, J.M. (2018). Receptor-Like Cytoplasmic Kinases: Central Players in Plant Receptor Kinase-Mediated Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69: 267–299.
- LIM, C.W.; YANG, S.H.; SHIN, K.H.; LEE, S.C.; KIM S.H. (2014). The AtLRK10L1.2, Arabidopsis ortholog of wheat LRK10, is involved in ABA-mediated signaling and drought resistance. *Plant Cell Reports* 34: 447–455.
- LIU, Y.J.; SONG, F.P.; HE, K.L.; YUAN, Y.; ZHANG, X.X.; GAO, P.; WANG, J.H.; WANG, G.Y. (2004). Expression of a modified *Cry1le* gene in *E. coli* and in transgenic tobacco confers resistance to corn borer. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 36: 309–313.
- 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.

- LOPES, S.S. (2016). Análise funcional do gene PSTOL1 de arroz e de seus homólogos em milho e sorgo em plantas transgênicas de tabaco. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei.
- LÓPEZ-BUCIO, J.S.; SALMERÓN-BARRERA, G.J., RAVELO-ORTEGA G.; RAYA-GONZÁLEZ, J.; LEÓN, P.; DE LA CRUZ, H.R.; CAMPOS-GARCÍA J.; LÓPEZ-BUCIO, J.; GUEVARA-GARCÍA Á.A. (2019). Mitogen-activated protein kinase 6 integrates phosphate and iron responses for indeterminate root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 250: 1177-1189.
- MACIEL, L.S. (2019). Caracterização funcional de genes *PSTOL1* na modulação do sistema radicular em milho e sorgo. 104 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MENDIBURU, F.D. (2019). *Agricolae: statistical procedures for agricultural research*. R Package Version 1.2-3.
- MILNER, M.J.; HOWELLS, R.M.; CRAZE, M.; BOWDEN, S.; GRAHAM, N.; WALLINGTON, E.J. (2018). A PSTOL-like gene, TaPSTOL, controls a number of agronomically important traits in wheat. *BMC plant biology* 18: 115-129.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. (1962). Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays With Tobacco Tissue Culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- 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.
- NEGRI, B.F. (2019). Caracterização funcional dos genes de milho homólogos ao *Phosphorus Starvation Tolerance 1*, responsável por aumentar a superfície radicular, a aquisição de fósforo e a produção de grãos em arroz. Tese (Doutorado 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: 1361-136.
- PARROTT, W. (2010). Genetically modified myths and realities. *New Biotechnology* 27: 545-551.

- PASSRICHA, N.; SAIFI, S., KHATODIA, S.; TUTEJA, N. (2016). Assessing zygosity in progeny of transgenic plants: current methods and perspectives. *Journal of Biological Methods* 3: 1-13.
- PETERSON, B.G. et al. (2020). Package Performance Analytics. Version 2.0.4. Available at: <https://cran.r-project.org/web/packages/PerformanceAnalytics/PerformanceAnalytics.pdf>
- RAJEEVKUMAR, S.; ANUNANTHINI, P.; SATHISHKUMAR, R. (2015). Epigenetic silencing in transgenic plants. *Front. Plant Sci.* 6: 693.
- RZHETSKY, A.; NEI, M. (1992). A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Mol Biol Evol* 9: 945–967.
- 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.
- SANTOS, H.G. dos; JACOMINE, P.K.T.; ANJOS, L.H. C. dos; OLIVEIRA, V.A. de; LUMBRERAS, J.F.; COELHO, M.R.; ALMEIDA, J.A. de; CUNHA, T.J.F.; OLIVEIRA, J.B. de. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 3. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 353 p.
- SIGRIST, C.J.; DE CASTRO, E.; CERUTTI, L.; CUCHE, B.A.; HULO, N.; BRIDGE, A.; BOUGUELERET, L.; XENARIOS, I. (2012). New and continuing developments at Prosite. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res.* 41: 344-347.
- SHIU, S.H.; BLEECKER, A.B. (2001). Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10763–8.
- 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.
- 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: 640-649.
- TOBENA-SANTAMARIA, R.; BLIEK, M.; LJUNG, K.; SANDBERG, G.; MOL, J.N.; SOUER, E.; KOES, R. (2002). FLOOZY of petunia is a flavin mono-

- oxygenase-like protein required for the specification of leaf and flower architecture. *Genes & Development* 16: 753–763.
- 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.
- VENDRUSCOLO, E.C.G. (2003). Silenciamento gênico e transgênicos. *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 31: 8-13.
- 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. *Mol Plant*. 1: 732–50.
- WAGNER, T.A.; KOHORN, B.D. (2001). Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. *Plant Cell* 13: 303-18.
- WEN, Z.; LI, H.; SHEN, Q.; TANG, X.; XIONG, C.; LI, H.; PANG, J.; RYAN, M.H.; LAMBERS, H.; SHEN, J. (2019). Tradeoffs among root morphology, exudation and mycorrhizal symbioses for phosphorus-acquisition strategies of 16 crop species. *New Phytologist* 223: 882– 895.
- 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. *TheorAppl Genet* 105: 890-897.
- YAMAMOTO, Y.; KAMIYA, N.; MORINAKA, Y.; MATSUOKA, M.; SAZUKA, T. (2007). Auxin biosynthesis by the YUCCA genes in rice. *The Plant Physiology* 143: 1362–1371.
- ZELLER, S.L.; KALININA, O.; BRUNNER, S.; KELLER, B.; SCHMID, B. (2010). Transgene x environment interactions in genetically modified wheat. *PLoS ONE* 5: 11405.

ZHOU, Y.; LIU, C.; TANG, D.; YAN, L.; WANG, D.; YANG, Y.; GUI, J.; ZHAO, X.Y.; LI, L.; TANG, X.D.; YU, F.; LI, J.L.; LIU, L.L.; ZHU, Y.; LIN, J.; LIU X.M. (2018). The receptor-like cytoplasmic kinase STRK1 phosphorylates and activates CatC, thereby regulating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> homeostasis and improving salt tolerance in Rice. *Plant Cell* 30: 1100– 1118.

#### 4 CONCLUSÃO GERAL

Foi estabelecida uma metodologia para a determinação do número de cópias por PCR em tempo real e pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para caracterização de plantas transgênicas de tabaco, sendo que o gene *Axi1* apresentou cópia única no genoma do tabaco, sendo proveniente do doador materno *N. sylvestris*.

Plantas transgênicas de tabaco superexpressando os genes *OsPstol1*, *ZmPstol3.06* e *Sb03g006765* apresentaram maior superfície radicular sob baixo P e *ZmPstol8.02* e *Sb07g002840* sob alto P. O conteúdo de P foi maior nos eventos superexpressando os genes *OsPstol1*, *ZmPstol3.06* e *Sb03g031690* sob baixo P e *OsPstol1* sob alto P. Já a biomassa e altura de plantas foi superior nos eventos superexpressando os genes *OsPstol1*, *ZmPstol3.06*, *Sb03g031690* e *Sb03g006765* sob baixo P e *OsPstol1* sob alto P. A inserção em tabaco dos genes *Pstol1* de arroz e seus homólogos de milho e sorgo levaram ao aumento da superfície radicular e aquisição de P, tanto em baixo quanto em alto P, elevando a biomassa das plantas.



**ANEXO 1 - 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)

Ajustar o pH para 5.7

8 g	ágar
-----	------

Autoclavar e esfriar a 55°C, posteriormente adicionar os antibióticos e agentes de seleção desejados e distribuir 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. Usar 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

Ajustar o pH para 5.6

9g ágar

Autoclavar e esfriar a 55 °C, posteriormente adicionar os antibióticos e agentes de seleção desejados e distribuir 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

Ajustar o pH para 5.8

9 g ágar

Autoclavar e esfriar a 55 °C, posteriormente adicionar MS, vitaminas, antibióticos e agentes de seleção e distribuir 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*15: 473-497.

Química	Concentração (g/litro de estoque)
<b>Estoque de nitrato:</b>	
Nitrato de amônio, $\text{NH}_4\text{NH}_3$	165,0
Nitrato de potássio, $\text{KNO}_3$	190,0
<b>Estoque de sulfato:</b>	
Sulfato de magnésio, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37,0
Sulfato de manganês, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,69
Sulfato de zinco, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,86
Sulfato cúprico, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0025
<b>Estoque halogeneto:</b>	
Cloreto de cálcio, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44,0
Iodeto de potássio, KI	0,083
Cloreto de cobalto, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0025
<b>Estoque de PBMo:</b>	
Fosfato de potássio, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	17,0
Ácido bórico, $\text{H}_3\text{BO}_4$	0,620
Molibidato de sódio, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025
<b>Estoque de NaFeEDTA:</b>	
Sulfato de ferro, $\text{FeSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,784
Ácido etilenodiamino tetra-acético	
Sal dissódio, $\text{Na}_2\text{EDTA}$	3,724