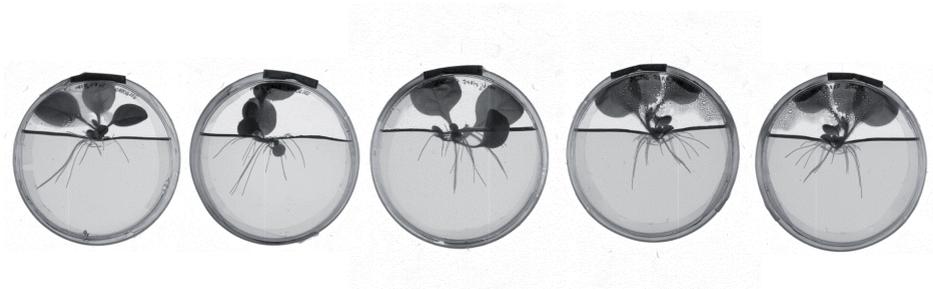


**Aumento da Superfície Radicular de Tabaco Mediada pelo Gene *Rootless Concerning Crown and Seminal Roots (RTCS)* de Milho**



ISSN 1679-0154  
Setembro 2017

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Milho e Sorgo  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

# **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 155**

## **Aumento da Superfície Radicular de Tabaco Mediada pelo Gene *Rootless* *Concerning Crown and Seminal Roots (RTCS)* de Milho**

Mariana Lourenço Campolino  
Ubiraci Gomes de Paula Lana  
Andrea Almeida Carneiro  
Sylvia Morais de Sousa Tinoco

Embrapa Milho e Sorgo  
Sete Lagoas, MG  
2017

**Esta publicação está disponível no endereço:**  
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

### **Embrapa Milho e Sorgo**

Rod. MG 424 Km 45  
Caixa Postal 151  
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
Fone: (31) 3027-1100  
Fax: (31) 3027-1188  
[www.embrapa.br/fale-conosco](http://www.embrapa.br/fale-conosco)

### **Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: Sidney Netto Parentoni  
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau  
Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Roberto dos Santos Trindade, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro, Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros  
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro  
Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa  
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa  
Foto(s) da capa: Sylvia Morais de Sousa Tinoco

**1ª edição**

**Formato digital (2017)**

### **Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Milho e Sorgo**

---

Aumento da superfície radicular de tabaco mediada pelo gene *Rootless Concerning Crown and Seminal Roots* (RTCS) de milho / Mariana Lourenço Campolino... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2017,  
38 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 155).

1. Genética. 2. Fumo. 3. Fósforo. 4. Sistema radicular. I. Campolino, Mariana Lourenço. II. Lana, Ubiraci Gomes de Paula. III. Carneiro, Andrea Almeida. IV. Tinoco, Sylvia Morais de Sousa. V. Série.

---

CDD 576.5 (21. ed.)

© Embrapa 2017

# Sumário

<b>Resumo</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	6
<b>Introdução</b> .....	7
<b>Material e Métodos</b> .....	10
<b>Resultados e Discussão</b> .....	15
<b>Conclusões</b> .....	27
<b>Referências</b> .....	27

# **Aumento da Superfície Radicular de Tabaco Mediada pelo Gene *Rootless Concerning Crown and Seminal Roots (RTCS)* de Milho**

---

*Mariana Lourenço Campolino*<sup>1</sup>

*Ubiraci Gomes de Paula Lana*<sup>2</sup>

*Andrea Almeida Carneiro*<sup>3</sup>

*Sylvia Moraes de Sousa Tinoco*<sup>\*4</sup>

## **Resumo**

A disponibilidade de fósforo (P) é um dos fatores mais limitantes para a produtividade agrícola em solos tropicais, uma vez que este nutriente apresenta menor eficiência de uso por plantas. Modificações na morfologia do sistema radicular são particularmente importantes para a eficiência na aquisição de P em plantas em razão da baixa mobilidade do fósforo no solo. O sistema radicular é complexo e formado por diferentes tipos de raízes. Durante a embriogênese, uma raiz primária é depositada no polo basal do embrião, enquanto um número variável de raízes seminais é formado no escutelo, que são relevantes somente nos estágios iniciais do desenvolvimento.

---

<sup>1</sup>Mestranda em Biotecnologia e Gestão da Inovação, Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM, Av. Marechal Castelo Branco, 2765 - Santo Antônio, Sete Lagoas - MG, 35701-242 Sete Lagoas, MG, mlcampolino@hotmail.com.

<sup>2</sup>Químico, D.Sc. em Genética, Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 65 Cx. Postal 151, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, ubiraci.lana@embrapa.br

<sup>3</sup>Ph.D em Biologia Molecular. Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 65 Cx. Postal 151, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, andrea.carneiro@embrapa.br

<sup>4</sup>Bióloga, Ph.D. em Biologia Molecular, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 45, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, sylvia.sousa@embrapa.br

\*autora correspondente

Em estágios mais avançados de desenvolvimento, um extenso sistema radicular pós-embriônico forma a maior parte do sistema radicular. O mutante de *rtcs* (*rootless concerning crown and seminal roots*) de milho foi identificado pela sua completa falta de raízes seminais embrionicamente formadas e raízes pós-embriônicas formadas. Posteriormente, foi demonstrado que *RTCS* codifica um fator de transcrição responsável pela regulação desses tipos radiculares no milho. Além disso, o *RTCS* foi mais expresso em genótipo de milho eficiente a P. O objetivo deste trabalho foi superexpressar o gene *RTCS* em plantas de tabaco visando o aumento da superfície radicular e aumento da aquisição de P. Para isso, o gene *RTCS* foi amplificado a partir da linhagem de milho e clonado no vetor binário pMCG1005. As plantas de tabaco foram transformadas via *Agrobacterium tumefaciens*, selecionadas e regeneradas e a inserção foi confirmada por PCR com oligonucleotídeos específicos para os genes *RTCS* e *BAR*. Foram obtidos três eventos transgênicos que apresentaram alto número de cópias e baixa expressão do transgene. Contudo, houve maior crescimento do sistema radicular e vegetativo sob baixo P. O gene *RTCS* codifica um fator de transcrição que se liga a fatores responsivos a auxina, que podem estar estimulando o crescimento radicular, mesmo com expressão gênica baixa. As informações geradas nesse trabalho contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos genéticos ligados ao sistema radicular.

**Palavras-chave:** *Agrobacterium tumefaciens*, fósforo, raiz, sistema radicular, transgênico.

# Tobacco Root Surface Increase Mediated by Maize *Rootless Concerning Crown And Seminal Roots (RTCS)* Gene

---

*Mariana Lourenço Campolino*<sup>1</sup>

*Ubiraci Gomes de Paula Lana*<sup>2</sup>

*Andrea Almeida Carneiro*<sup>3</sup>

*Sylvia Moraes de Sousa Tinoco*<sup>\*4</sup>

## Abstract

The phosphorus (P) availability is one of the most limiting factors for agricultural productivity in tropical soils, since this nutrient has the lowest efficiency use by plants. Modification in root morphology is especially important for P acquisition efficiency in plants due to low P mobility in soil. The root system is complex and formed by different root types. During embryogenesis, a primary root is deposited in the basal nucleus of the embryo, while a variable number of seminal roots are formed in the scutellum, which are relevant only in the early stages of development. In more advanced stages of development, an extensive post-embryonic root system form most of the root system. The maize *rtcs* (*rootless concerning crown and seminal roots*) mutant was identified by its complete lack of embryonic and post-embryonic roots. Subsequently, it was demonstrated that *RTCS* encodes a transcription factor responsible for the regulation of these root types in maize. In addition, *RTCS* was more expressed in a P-efficient maize genotype. The aim of this work was to overexpress the *RTCS*

gene in tobacco plants in order to improve root surface area and P acquisition efficiency. For this purpose, the *RTCS* gene was amplified from a maize line and cloned in the binary vector pMCG1005. Tobacco plants were transformed via *Agrobacterium tumefaciens*, selected, regenerated and the insertion was confirmed by PCR with specific primers for *RTCS* and *BAR* genes. Three transgenic events were obtained and presented high copy number and low expression. However, they presented superior root and vegetative growth. The *RTCS* gene encodes a transcription factor, that binds to auxin responsive factors, that could be stimulating root growth, even with low expression. The information generated in this work contribute for a better understating of root system genetic mechanism.

**Key words:** *Agrobacterium tumefaciens*, phosphorus, root, root system, transgenic.

## Introdução

A disponibilidade de fósforo (P) no solo é um dos fatores mais limitantes à produtividade agrícola em solos tropicais, uma vez que esse nutriente apresenta menor eficiência de uso pelas plantas (BALIGAR; FAGERIA, 1997). A adubação fosfatada é realizada pela adição de altas doses de fosfatos solúveis ao solo, sendo que a maior parte do adubo adicionado se torna indisponível por causa do processo de fixação às partículas do solo (VANCE; CHIOU, 2011), aumentando significativamente os custos de produção. Adicionalmente, esse nutriente não é renovável, sendo derivado da exploração de reservas minerais sedimentares ou magmáticas. Comparado a outros nutrientes, o P é considerado o de menor mobilidade e o menos prontamente disponível na rizosfera (RAGHOTHAMA,

1999; SHEN et al., 2011). O P é absorvido do solo pelas plantas na forma de ortofosfato que ocorre em concentrações extremamente baixas na solução do solo, consideradas subótimas para a produção de grãos (VANCE et al., 2003). Além disso, o coeficiente de difusão do P no solo é muito baixo, fazendo com que a absorção pela planta crie uma zona de depleção desse nutriente ao redor da raiz (RAMAEKERS et al., 2010). Vários são os mecanismos desenvolvidos pelas plantas quando submetidas à limitação de P, dentre eles: modificações de atributos morfológicos da raiz, modificações de características químicas na rizosfera, alterações de características fisiológicas na 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).

O controle genético da morfologia radicular é complexo e apenas alguns genes foram descritos em cereais até o momento (ZHU et al., 2005; WOLL et al., 2005; TARAMINO et al., 2007; BRADY et al., 2007; GAMUYAO et al., 2012). Um dos genes relacionados à formação radicular em milho é o *Rootless Concerning Crown and Seminal Roots (RTCS)*. O *RTCS* desempenha um papel central na iniciação de raízes seminais embriônicas e pós-embriônicas, sendo que o mutante desse gene tem apenas a raiz primária e suas laterais (HERTZ et al., 1996). A clonagem baseada em mapeamento revelou que esse gene está localizado no braço curto do cromossomo 1 e codifica uma proteína de domínio LOB (*Lateral Organ Boundaries*) (TARAMINO et al., 2007). As proteínas de domínio LOB fazem parte da família de genes LBD (*Lateral Organ Boundaries Domain*), específica de plantas, e essencial na regulação do desenvolvimento de órgãos laterais de plantas.

Genes LBD estão envolvidos na regulação do metabolismo de antocianina e nitrogênio, bem como em respostas a fitormônios, como citocianinas, auxinas e giberelinas. As proteínas LBD contêm um domínio LOB característico composto por um motivo C necessário para a ligação do DNA, um resíduo de glicina conservado e uma sequência tipo fecho de leucina (*leucine-zipper*) necessária para interações proteína-proteína. Recentemente, vários genes da família LBD foram caracterizados funcionalmente, mostrando associações a fenótipos mutantes relacionados com quase todos os aspectos do desenvolvimento da planta, incluindo desenvolvimento de embriões, raízes, folhas e inflorescência (MAJER; HOCHHOLDINGER, 2011; THATCHER et al., 2012).

Em *Arabidopsis* e milho, a família de genes LBD é composta por 43 membros. A família de genes LBD pode ser dividida em duas classes de acordo com a estrutura do seu motivo fecho de leucina. As proteínas semelhantes a esse tipo de sequência pertencem a classe I, ao passo que as proteínas de domínio LOB de classe II são caracterizadas por um fecho de leucina incompleto indicando funções divergentes destas classes proteicas. As proteínas do domínio LOB de classe I são tipicamente expressas na base de órgãos laterais e estão envolvidas na formação desses órgãos. *RTCS* e seu paralog *RTCL* são da classe I e estão envolvidos em diferentes aspectos do desenvolvimento radicular, como a formação de raízes da parte aérea no milho e no arroz e no desenvolvimento das raízes laterais em *Arabidopsis* (SHUAI et al., 2002; MAJER; HOCHHOLDINGER, 2011; THATCHER et al., 2012).

O gene *RTCS* é expresso nos primórdios da raiz da coroa em milho e é induzido por auxina. Porém o *RTCS* não é expresso

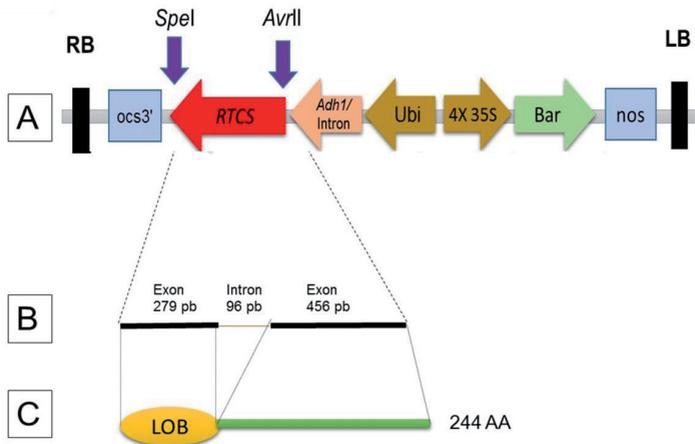
em raízes laterais e essas raízes não são afetadas nos mutantes (TARAMINO et al., 2007). Além disso, o *RTCS* é mais expresso na linhagem de milho eficiente para aquisição de fósforo de milho (L3) do que na linhagem ineficiente (L22) em condições de baixo P (SOUSA et al., 2012).

Nesse trabalho foi feita a transformação de tabaco, via *Agrobacterium tumefaciens*, com o gene *RTCS* de milho visando o aumento da superfície radicular e da eficiência da aquisição de P.

## Materiais e Métodos

### Construção dos Cassetes de Expressão

O gene *RTCS* foi amplificado a partir do RNA extraído de raiz da linhagem L3 de milho eficiente para aquisição de fósforo (SOUSA et al., 2012), proveniente do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo. O RNA foi extraído com o kit Plant RNeasy (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante. A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se 1 mg de RNA total, previamente tratado com DNase I, utilizando o kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (Life Technologies, CA). O gene *RTCS* foi amplificado, sequenciado e subclonado no vetor PGEMT-Easy (Promega) com oligonucleotídeos: *RTCS\_1\_F*: ATGACGGGGTTCGGGTCAC e *RTCS\_1\_R*: TTACGAGCGATGGTTCAGGT desenhados com base na linhagem B73 de milho (RefGen\_v3 - GCF\_000005005.1). Após a confirmação por sequenciamento o *RTCS* foi clonado no vetor binário pMCG1005 nos sítios *Spel* e *AvrII*, sob o promotor da ubiquitina e contendo o gene BAR para seleção (Figura 1).



**Figura 1.** Representação esquemática da construção e do gene *RTCS* de milho. (A) Esquema da região do T-DNA do vetor binário pMCG1005. LB, borda esquerda, RB, borda direita, com o promotor ubiquitina no sítio de clonagem do *RTCS*, marcador de seleção gene *BAR* sob promotor 4x35S e terminadores *nos* e *ocs3'*. (B) Gene *RTCS*. (C) Proteína codificada pelo gene *RTCS*, em destaque o domínio LOB.

## Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com o Gene *RTCS*

Inserção do cassete de expressão na *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 foi feita via eletroporação. Foi adicionado às células 1,0 ml de meio YEP sem antibiótico, seguido de incubação por 2 horas a 28 °C com agitação. Em seguida essa mistura foi centrifugada e ressuspensa em 200 µl de meio YEP. Foram plaqueados 50 µl dessa suspensão em meio YEP sólido com os antibióticos canamicina, espectinomicina e clorofenicol. As placas foram incubadas a 28 °C por três dias. Posteriormente, uma colônia de cada construção

gênica foi isolada e incubada a 28 °C durante 18 horas em meio YEP líquido contendo antibióticos (LIN et al., 1995). O DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina, de acordo com Sambrook e Russel (2001). Foi aplicado 1,0 µl do DNA plasmidial em gel de agarose 0,8% para confirmar a clonagem.

## **Transformação de Tabaco com os Genes Candidatos**

As plântulas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Petit Havana*) utilizadas para transformação foram mantidas *in vitro* até atingirem aproximadamente 5 cm de altura, quando foram utilizadas para a transformação via *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101. A cultura de *Agrobacterium* contendo a construção gênica foi colocada em contato com discos de folhas de tabaco (explantes) em uma placa de Petri, durante 1 minuto. Após serem agitados, os explantes foram transferidos para o meio PSM (*Shooting Medium*), cuja composição em um litro corresponde a: 0,43% sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 3% sacarose, 1 mL/L vitamina B5, 0,5 µM NAA e 4 µM BA, sem antibiótico ou agente de seleção por 48 horas a 24-26 °C em câmara de crescimento iluminada (LOPES, 2016). Após esse período os explantes foram transferidos para meio PSM suplementado com 100 mg/L tioxin. Após sete dias foram transferidos para um novo meio PSM + antibiótico + 1 mg/L PPT e esse subcultivo foi feito a cada sete dias até 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, composição para um litro corresponde a: 0,215% sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 1,5% sacarose, 1 mL/L vitamina B5, antibiótico e 1 mg/L de PPT (LOPES, 2016). As plântulas transformadas e

enraizadas foram transferidas para o solo e mantidas em casa de vegetação.

## Identificação da Inserção dos Transgenes

Com o intuito de verificar a inserção dos cassetes de expressão nas linhagens transgênicas de tabaco regeneradas foi realizado PCR utilizando 10 ng/ $\mu$ l de DNA genômico extraído de cada linhagem usando o método de Saghai-Marroof et al. (1984). Para a amplificação do DNA genômico foram utilizados, respectivamente, um oligonucleotídeo senso junto à região promotora Ubiquitina, e um oligonucleotídeo complementar a região codificadora do *RTCS*. Também foram utilizados oligonucleotídeos específicos para o gene *BAR* (Tabela 1).

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

Oligonucleotídeo	Sequências	Tamanho fragmento
UBI_F	GTGTTTAGCAAGGGCGAAAA	862 pb
RTCS_R	TTACGAGCGATGGTTCAGGT	
BAR_F	AGAAACCCACGTCATGCC	427 pb
BAR_R	TGCACCATCGTCAACCAC	

## Estimativa do Número de Cópias do Transgene por qPCR

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens, de acordo com Saghai-Marroof et al. (1984), e usado a uma concentração de 20 ng/ $\mu$ l. As reações de PCR quantitativo foram conduzidas no equipamento 7500 Fast RealTime PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando o kit Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) seguindo

as recomendações do fabricante. A estimativa do número de inserções do transgene no genoma de tabaco foi feita conforme Barros et al. (2011) e Zhang et al. (2014). Como referência de cópia única foi usado o gene *AX11* (SUBR et al, 2006) de tabaco, *AX11-F*: 5'-GAGGAAATTGGCCTTATGC-3' e *AX11-R*: 5'-CGTTCGAACTTGTGAAGCAA-3' e para o transgene oligonucleotídeos para o gene *BAR*, *BAR-F*: 5'-ACAGCGACCACGCTCTTGA-3' e *BAR-R*: 5'-GCTCTACACCCACCTGCTGA-3'). O evento cópia única de tabaco utilizado como referência para o gene *BAR* foi a amostra *ZmPSTOL1\_8.02Ev.6*, que apresentou segregação 3:1 em trabalhos anteriores (LOPES, 2016).

## **Deteção de Transcritos do Gene de Interesse por qPCR**

O RNA foi extraído de plântulas de tabaco crescidas sob baixo P (97  $\mu$ M) em três estágios do desenvolvimento, a 20, 40 e 60 dias após o plantio. Os tecidos foram coletados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até o momento da extração do RNA total. O RNA total foi extraído utilizando o kit Plant RNeasy (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante. A concentração do RNA foi determinada pela leitura de absorbância a 260, 280 e 320 nm e a qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose. A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se 1 mg de RNA total, previamente tratado com DNase I, utilizando o kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription" (Life Technologies, CA).

As análises de PCR quantitativo foram realizadas no equipamento ABI7500 utilizando a técnica de SYBR, segundo as recomendações do fabricante. Foi utilizado um par de

oligonucleotídeos para 18S ribossomal TaqMan® (Life Technologies™) como controle endógeno e oligonucleotídeos específicos *RTCS*-F: ATGACGGGGTTCGGGTACAC e *RTCS*-R: TTACGAGCGATGGTTCAGGT. A expressão gênica relativa foi calculada conforme o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

## **Caracterização Morfológica do Sistema Radicular**

As sementes de tabaco T1 foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 6% por 5 minutos, lavadas com água destilada e germinadas para posterior transferência para placas de Petri (90 x 15mm) em meio MS ½ (Anexo 3) sob baixo fósforo (97  $\mu$ M de P). Os experimentos foram realizados em câmara de crescimento com temperatura diurna média de  $27 \pm 3$  °C, noturna de  $20 \pm 3$  °C e fotoperíodo de 12 horas. Após 42 dias de tratamento, as imagens do sistema radicular das plântulas de tabaco foram obtidas 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 diversas características radiculares, incluindo comprimento total (cm) e área de superfície total (cm<sup>2</sup>) (SOUSA et al., 2012).

## **Resultados e Discussão**

### **Construção do Cassete de Expressão e Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com o Gene *RTCS***

O gene *RTCS* foi amplificado a partir do cDNA de raiz de milho com tamanho de fragmento de 735 pb com tamanho similar ao *RTCS* da linhagem B73 descrita por Taramino et al. (2007).

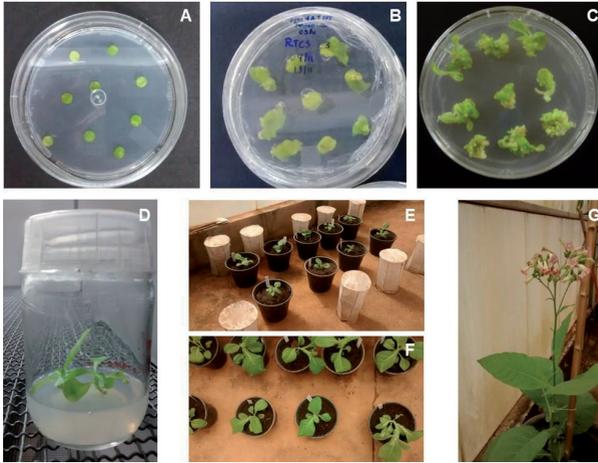
Os insertos positivos foram sequenciados e comparados com a sequência do gene *RTCS-B73* (Gene Bank: EF051735). No alinhamento das sequências *RTCS-B73*, *RTCS-L3* (colônia L3V2) foram observados alguns SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), incluindo uma deleção de três bases, que resultou na deleção de um aminoácido. O gene *RTCS* foi clonado no vetor pMCG1005 nos sítios *AvrII* e *SpeI*, que foi inserido na *Agrobacterium tumefaciens* EHA101.

## **Transformação de Tabaco com o Gene *RTCS***

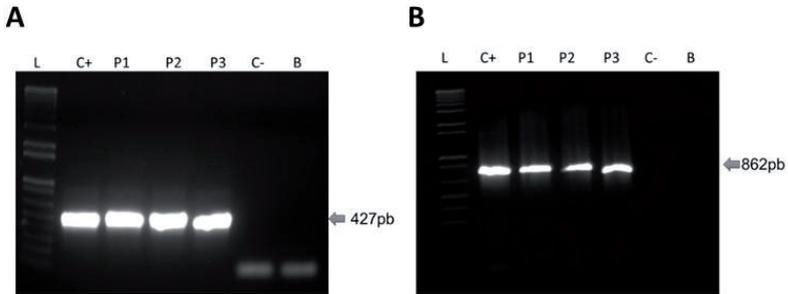
Foi feita a transformação dos discos foliares a partir de plântulas de tabaco cultivadas *in vitro* (Figura 2) com as construções gênicas de interesse e o material foi cultivado na presença do herbicida fosfinotricina (PPT) (Figura 2AB) a fim de selecionar os calos resistentes. Conforme pode ser observado na Figura 2C, os calos resistentes exibem coloração esverdeada, enquanto os susceptíveis apresentam coloração marrom. O subcultivo foi feito até o aparecimento dos calos e diferenciação das folhas (Figura 2D). As plântulas isoladas foram transferidas para o solo (Figura 2EF) até seu estágio de florescimento para coleta das sementes (Figura 2G).

## **Identificação da Inserção dos Transgenes**

Após o processo de seleção das plantas transformadas pelo herbicida fosfinotricina (PPT), três plantas foram resistentes ao PPT e a inserção dos transgenes *BAR* (Figura 3A) e *RTCS* (Figura 3B) foi confirmada por PCR.



**Figura 2.** Processo de transformação de tabaco. A- Discos de folha de tabaco no meio PSM sólido com *Agrobacterium tumefaciens* com a construção pMCG1005- *Rtcs* L3. B- Estágios iniciais da formação de calos no meio de seleção. C- Desenvolvimento da parte aérea sob seleção. D- Plântula de tabaco enraizando *in vitro*. E e F- Planta de tabaco em pote com solo na casa de vegetação. G-Tabaco florescendo.



**Figura 3.** Visualização do PCR feito com plantas transformadas com o gene *RTCS* com oligonucleotídeos para o *BAR* (A) e *RTCS* (B). L - 1 kb Plus Ladder (Invitrogen). P1, P2 e P3- Plantas regeneradas da transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com UBI::*RTCSL3*::NOS. C + Controle positivo (plasmídeo). C - Controle negativo (planta de tabaco selvagem) e B - branco. As setas indicam o tamanho do fragmento.

A técnica de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* tem sido muito utilizada em dicotiledôneas, pois ela naturalmente infecta essas plantas. Um fator importante envolvido na capacidade de infecção é a quantidade de compostos fenólicos liberados pela planta hospedeira para interação com a bactéria. Células de tabaco quando rompidas, liberam compostos fenólicos como acetosiringona e alfa-hidroxiacetoseringona que ativam os genes de virulência (*vir*), responsáveis pela transferência do T-DNA da *A. tumefaciens* para as células feridas do hospedeiro. No processo de infecção, vários outros parâmetros devem ser considerados, entre eles, pH, temperatura, açúcares, período de cocultivo, tecido alvo, cepas da *Agrobacterium* e pequenas quantidades de antibióticos para controle do crescimento da bactéria. Em razão dessas variações, os números de plantas transformadas e resistentes

são relativamente baixos, entre 10 a 20% do número de calos totais (ZAMBRYSKI, 2013; NESTER, 2015).

## **Estimativa do Número de Cópias do Transgene por qPCR**

A estimativa do número de inserções do transgene no genoma de tabaco foi feita pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As amostras utilizadas nesse ensaio foram pMCG1005 (Evento 3), pMCG1005 (Evento 4), pMCG1005 (Evento 6), *RTCS* L3 (Evento 1), *RTCS* L3 (Evento 2), pois até o momento do experimento a planta *RTCS* L3 (Evento 3) não havia florescido. Foram encontradas mais de uma cópia do gene *BAR* nos eventos transgênicos (Tabela 2) quando comparados com o evento cópia única ZMPSTOL8.02 (Evento 6), utilizado como referência (LOPES, 2016). A inserção de uma cópia do transgene é desejável, pois eventos com cópia única são geneticamente estáveis (GADELETA et al., 2011).

Os sítios de integração do DNA exógeno e o número de cópias integradas no genoma da planta são, ainda, imprevisíveis, mesmo utilizando métodos indiretos como a transformação por *Agrobacterium*, considerada um processo mais preciso, com integração de uma ou poucas cópias no genoma da planta. As moléculas de T-DNA integram-se aleatoriamente por recombinação no genoma, embora haja indicações de que se integrem mais frequentemente em regiões com alta atividade transcricional, de modo que o número de cópias inseridas varia entre um transformante e outro (BRASILEIRO; DUSI, 1999; VAUCHERET et al., 2001; GADELETA et al., 2011). Em *Arabidopsis*, a distribuição da integração do T-DNA foi observada em regiões codificantes, regiões não codificantes,

regiões intergênicas, sequência repetitivas, incluindo regiões de centrômero e telômero, grande rDNA e 5S rDNA repetidos (GELVIN; KIM, 2007).

**Tabela 2.** Estimativa do número de cópias do transgene por qPCR calculado pelo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  em linhagens  $T_0$  de tabaco.

Amostras	Número de cópias ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )
RTCS L3 (Evento 1)	2,34
RTCS L3 (Evento 2)	5,91
pMCG1005 (Evento 3)	3,51
pMCG1005 (Evento 4)	1,65
ZMPSTOL8.02 (Evento 6)*Referência	1,02

### Expressão do Gene *RTCS* por qPCR

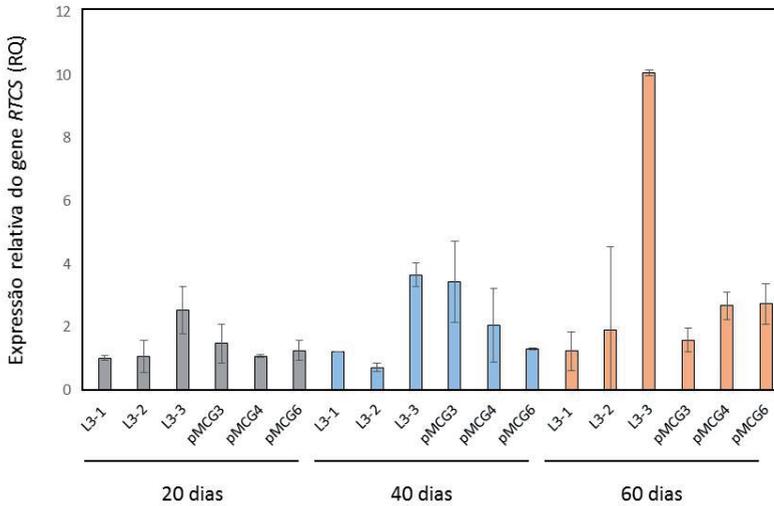
Foi realizado um ensaio de expressão temporal com o gene *RTCS* utilizando o gene *18S ribossomal* como controle endógeno em plântulas de tabaco em três estágios do desenvolvimento (20, 40 e 60 dias). A expressão do gene *RTCS* foi variável entre os eventos nos diferentes tempos (Figura 4). A planta L3 (Evento 3) obteve a maior expressão relativa com 60 dias em relação aos demais eventos (Figura 10). Vale ressaltar que o número de cópias nas plantas transgênicas L3 (Eventos 1 e 2) foi superior a um. Um pré-requisito para a planta expressar o transgene é a estabilidade e segregação. Diversos trabalhos têm relatado um desvio na segregação mendeliana em plantas transgênicas (SHRAWAT et al., 2007; WEINHOLD et al., 2013), revelando a existência de mecanismos celulares que regularam a expressão dos transgenes até então desconhecidos. A causa da instabilidade vem sendo estudada nas últimas três décadas e as explicações para a inativação/silenciamento da atividade do transgene incluem falta de transcrição por metilação do promotor juntamente com a condensação da cromatina, ou

degradação do transcrito por outros mecanismos (FAGARD; VAUCHERET, 2000; RAJEEVKUMAR et al., 2015).

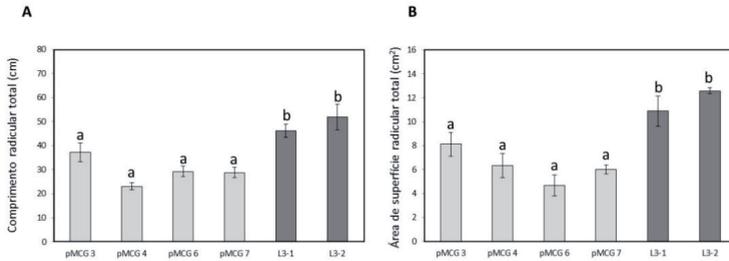
Além dos fatores epigenéticos que podem influenciar os níveis de expressão, o local de inserção do transgene também pode estar associado ao silenciamento gênico (VAUCHERET et al., 1998). O silenciamento de genes induzido por transgene em plantas pode ocorrer ao nível transcricional ou pós-transcricional. O silenciamento gênico transcricional ocorre principalmente quando repetições múltiplas de um transgene são inseridas no genoma de plantas transgênicas. Ele se correlaciona com a condensação da cromatina e com a metilação. Alternativamente, pode envolver a produção de RNA por um loco, levando à inativação de alvos homólogos através de uma interação RNA-DNA (PARK et al., 1996).

## **Caracterização Morfológica do Sistema Radicular**

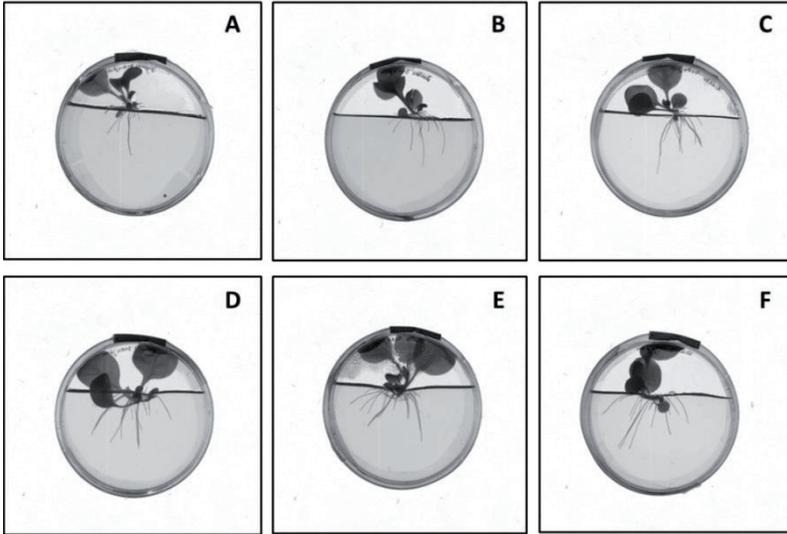
Plântulas de tabaco dos eventos transgênicos foram crescidas em placas de Petri com meio de cultura sob baixo P durante 42 dias. Foram medidos diversos parâmetros radiculares, incluindo comprimento radicular total e a área de superfície total (Figura 5A e B). Os eventos transgênicos contendo o gene *RTCS* apresentaram diferença significativa no comprimento radicular total (cm) e área de superfície total (cm<sup>2</sup>) (Figura 6) e visual considerando o crescimento vegetativo (Figura 7) em relação aos eventos controle.



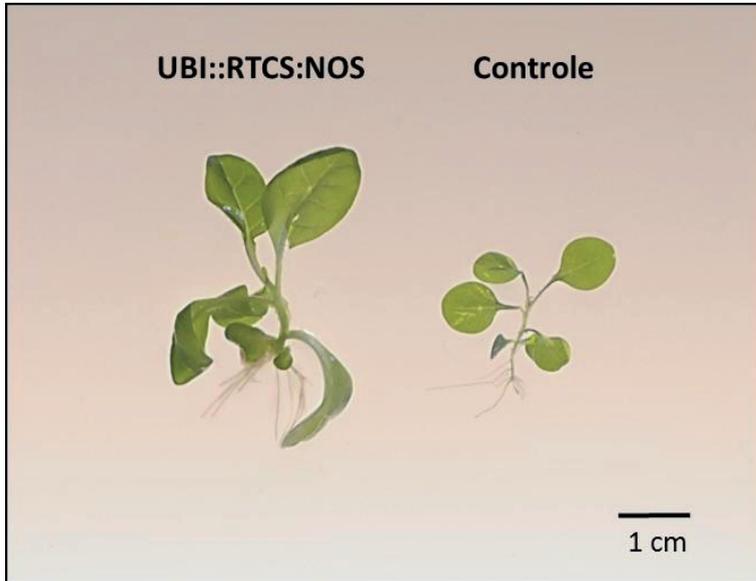
**Figura 4.** Expressão temporal do gene *RTCS* em plântulas de tabaco transgênicas T1 em três estágios de desenvolvimento (20, 40 e 60 dias). A expressão gênica relativa foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Plântulas transgênicas RTCS-L3 (Eventos 1, 2 e 3) e controles negativos (pMCG1005 Eventos 3, 4 e 6). As barras de erro correspondem a SEM (Erro padrão da média) de 3 repetições técnicas com 20 plântulas cada.



**Figura 5.** Comprimento radicular total (cm) e área de superfície radicular total (cm<sup>2</sup>) de plântulas de tabaco transgênico crescidas em meio de cultura sob baixo P por 42 dias. As barras de erro correspondem a 6 repetições. Em cinza claro os controles negativos (pMCG1005 Eventos 3, 4, 6 e 7) e cinza escuro as plântulas transgênicas RTCS-L3 (Eventos 1 e 2). As barras de erro correspondem a SEM (Erro padrão da média) de seis repetições técnicas. As barras com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste t de Student (LSD) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 6.** Plântulas de tabaco T1 crescidas em meio com baixo fosforo por 42 dias. (A, B, C): Plantas controle, transformadas com o vetor pMCG1005 vazio e (D, E, F): Plantas transgênicas com *RTCS-L3*.



**Figura 7.** Plântulas de tabaco T1 com 60 dias de desenvolvimento. Planta transgênica (UBI: :*Rtcs* L3-3: :NOS) à esquerda e controle à direita.

Os três eventos obtidos apresentaram um alto número de cópias. O *RTCS* codifica um fator de transcrição, que pode desencadear múltiplas respostas celulares (YANAGISAWA et al., 2004). A expressão do gene *RTCS* em milho é muito baixa, de 3 a 13 p.p.m. (partes por milhão) em bibliotecas geradas para análise por MPSS (*Massive Parallel Signature Sequencing*) de raiz, sendo sua expressão detectada nas raízes primárias 55 horas após a germinação, raízes nodais no estágio V5, ponta de raízes nodais no estágio V6 e raízes inteiras nos estágios V6 e V12 (TARAMINO et al., 2007). Apesar de o mutante *rtcs* afetar a iniciação de raízes seminais embrionárias, não foi detectada expressão desse gene nas bibliotecas de embrião, implicando que o *RTCS* pode ser expresso em níveis mínimos, inferiores a

1 p.p.m., ou então expresso que fases curtas e específicas do desenvolvimento (TARAMINO et al., 2007).

O *RTCS* em milho está localizado no núcleo (MAJER et al., 2012) e é expresso com 10 dias de crescimento nos nós coleoptilares (TARAMINO et al., 2007). O sistema radicular do tabaco é diferente do milho e essa informação é desconhecida até o momento. Foi observada uma variação temporal da expressão do *RTCS* em tabaco, que também pode ter sido influenciada pelo baixo P, uma vez sua expressão foi modulada em milho (SOUSA et al., 2012). O impacto no fenótipo observado, como o aumento da arquitetura radicular e crescimento vegetativo, pode ser consequência da ativação transcricional, mesmo com a baixa expressão do transgene. O *RTCS* tem elementos de resposta a auxina na sua região promotora, o que indica que ele tem função na iniciação mediada por auxina dos primórdios das raízes seminais embriônicas e pós-embriônicas (TARAMINO et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que o *RTCS* se liga no motivo de DNA LBD no promotor do fator de resposta a auxina (*ARF*) *ZmARF34* e este se liga no promotor do *RTCS*, de forma recíproca (MAJER et al., 2012). Os genes *ARF* são induzidos por auxina e se ligam nos fatores responsivos a auxina (*AuxREs*). Em *Arabidopsis*, que tem o sistema radicular similar ao tabaco, o *AtARF7* interage com *AtMYB77* e *AtARF19*, que regulam *AtLBD16* e *AtLBD29*, controlando a formação das raízes laterais (OKUSHIMA et al., 2007). Além disso, *LBD16* e *LBD18* estão envolvidos na iniciação e emergência de raízes laterais e também funcionam abaixo de *AtARF7* e *AtARF19* (LEE et al., 2009).

O *RTCS* é um regulador maior da formação de raízes coronais em milho e está envolvido com a regulação de fatores de

auxina, que é o principal hormônio ligado à formação de diferentes tipos radiculares. Mesmo com a expressão do transgene baixa e o alto número de cópias, que pode estar ocasionando esta baixa expressão, é possível que o *RTCS* esteja ativando os fatores de resposta a auxina em cascata, o que explica o aumento da superfície radicular e conseqüente maior crescimento vegetativo. Apesar das evidências apresentadas nesse trabalho, um maior número de eventos cópia única e experimentos detalhados serão necessários para comprovar a função do *RTCS* em tabaco.

## Conclusão

Linhagens de plantas transgênicas de tabaco superexpressando o gene *RTCS* apresentaram alto número de cópias, baixa expressão gênica relativa, porém tiveram aumento significativo do comprimento e área de superfície radicular, assim como da parte vegetativa, indicando que o gene *RTCS* provavelmente se liga a fatores responsivos a auxina, que por sua vez estimulam o crescimento radicular, mesmo com baixa expressão gênica do gene *RTCS*.

## Referências

BALIGAR, V. C.; FAGERIA, N. K. Nutrient use efficiency in acid soils: nutrient management and plant use efficiency. In: MONIZ, A. C.; FURLANI, A. M. C.; SCHAFFERT, R. E.; FAGERIA, N. K.; ROSOLEM, C. A.; CANTARELLA, H. (Ed.). **Plant-soil interactions at low pH: sustainable agriculture and forestry production**. Campinas: Brazilian Soil Science Society, 1997. p. 75-95.

BARROS, B. de A.; GUIMARAES, C. T.; LANA, U. G. de P.; PÔSSA, K. F.; ANDRADE, L. C. S. S.; SILVA, V. L. da; LOPES, F. A.; CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; MAGALHAES, J. V. de. **Estimativa do número de inserções de transgenes em milho por PCR quantitativo (qPCR)**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 164).

BRADY, S. M.; SONG, S.; DHUGGA, K. S.; RAFALSKI, A.; BENFEY, P. N. Combining expression and comparative evolutionary analysis: the COBRA gene family. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 143, p. 172-187, 2007.

BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPH, 1999. p. 679-735.

FAGARD, M.; VAUCHERET, H. (Trans)gene silencing in plants: how many mechanisms? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 167-174, 2000.

GADELETA, A.; GIANCASPRO, A.; CARDONE, M. F.; BLANCO, A. Real-time PCR for detection of precise transgene copy number in durum wheat. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.16, p. 652-688, 2011.

GAMUYAO, R.; CHIN, J. H.; TANAKA, J. P.; PESARESI, P.; CATAUSAN, S.; DALID, C.; ISLAMET-LOEDIN, I.; TECSON-MENDOZA, E.M.; WISSUWA, M.; HEUER, S. The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. **Nature**, London, v. 488, p. 535-541, 2012.

GELVIN, S. B.; KIM, S. I. Effect of chromatin upon Agrobacterium T-DNA integration and transgene expression. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, n. 1769, p. 410-421, 2007.

HERTZ, W.; HOCHHOLDINGER, F.; SCHWALL, M.; FEIX, G. Isolation and characterization of *rtcs* a mutant deficient in the formation of nodal roots. **Plant Journal**, Oxford, v. 10, p. 845-857, 1996.

LEE, H. W.; KIM, N. Y.; LEE, D. J.; KIM, J. LBD18/ASL20 regulates lateral root formation in combination with LBD16/ASL18 downstream of ARF7 and ARF19 in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 151, p. 1377-1389, 2009.

LIN, W. H.; HUANG, L. H.; YEH, J. Y.; HOHEISEL, J.; LEHRACH, H.; SUN, Y. H.; TSAI, S. F. Expression of a Drosophila GATA transcription factor in multiple tissues in the developing embryos: identification of homozygous lethal mutants with P-element insertion at the promoter region. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, n. 42, p. 25150-25158, 1995.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ . **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOPES, S. **Análise funcional do gene Pstol1 de arroz e de seus homólogos em milho e sorgo em plantas transgênicas de tabaco**. 2016. 58 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São João del Rei, Sete Lagoas, 2016.

LYNCH, J. P. Root architecture and plant productivity. **Plan Physiology**, Bethesda, v. 109, p. 7-13, 1995.

LYNCH, J. P.; BROWN, K. M. New roots for agriculture: exploiting the root phenome. **Philosophical Transaction**, v. 367, p. 1598-1604, 2012.

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

MAJER, C.; HOCHHOLDINGER, F. Defining the boundaries: structure and function of LOB domain proteins. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 16, p. 47-52, 2011.

MAJER, C.; XU, C.; BERENDZEN, K. W.; HOCHHOLDINGER, F. Molecular interactions of ROOTLESS CONCERNING CROWN AND SEMINAL ROOTS, a LOB domain protein regulating shoot-borne root initiation in maize (*Zea mays* L.). **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B**, London, v. 367, p. 1542-1551, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NESTER, E. W. Agrobacterium: nature's genetic engineer. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-16, 2015.

OKUSHIMA, Y.; FUKAKI, H.; ONODA, M.; THEOLOGIS, A.; TASAKA, M. ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 118-130, 2007.

PARK, Y. D.; PAPP, I.; MOSCONE, E. A.; IGLESIAS, V. A.; VAUCHERET, H.; MATZKE, A. J. M.; MATZKE, M. A. Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. **Plant Journal**, Oxford, v. 9, p. 183-194, 1996.

RAGHOTHAMA, G. K. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 50, p. 665-693, 1999.

RAJEEVKUMAR, S.; ANUNANTHINI, P.; SATHISHKUMAR, R. Epigenetic silencing in transgenic plants. **Frontiers in Plant Science**, New Haven, v. 6, p. 693, 2015.

RAMAEKERS, L.; REMANS, R.; RAO, I. M.; BLAIR, M. W.; VANDERLEYDEN, J. Strategies for improving phosphorus acquisition efficiency of crop plants. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 117, p. 169-176, 2010.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. A.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, p. 8014-8018, 1984.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SHEN, J.; YUAN, L.; ZHANG, J.; LI, H.; BAI, Z.; CHEN, X.; ZHANG, W.; ZHANG, F. Phosphorus dynamics: from soil to plant 1. **Plant Physiology**, Bethesda, v.156, p. 997-1005, 2011.

SHRAWAT, A. K.; BECKER, D.; LORZ, H. Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Science**, Limerick, v. 172, p. 281-290, 2007.

SHUAI, B.; REYNAGA-PEÑA, C. G.; SPRINGER, P. S. The lateral organ boundaries gene defines a novel, plant-specific gene family. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 129, p. 747-761, 2002.

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

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

THATCHER, F.; KEMAL, K.; JOHN, M. Lateral organ boundaries domain transcription factors: new roles in plant defense. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, p. 1702-1704, 2012.

VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a

nonrenewable resource. **New Phytologist**, Cambridge, v. 157, p. 423-447, 2003.

VANCE, C. P.; CHIOU, T. J. Phosphorus focus editorial. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 15, p. 987-988, 2011.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; ELMAYAN, T.; FEUERBACH, F.; GODON, C.; MOREL, J. B.; MOURRAIN, P.; PALAUQUI, J. C.; VERNHETTES, S. Transgene-induced gene silencing in plants. **Plant Journal**, Oxford, v. 16, p. 651-659, 1998.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; FAGARD, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. **Journal of Cell Science**, London, v. 114, p. 3083-3091, 2001.

YANAGISAWA, S.; AKIYAMA, A.; KISAKA, H.; UCHIMIYA, H.; MIWA, T. Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 20, p. 7833-7838, 2004.

ZHANG, Y.; LIU, Y.; ZHANG, J.; WANG, G.; WANG, J.; LIU, Y. Assessment of transgene copy number and zygosity of transgenic maize overexpressing Cry IIe gene with Syber Green qRT-PCR. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 51, p. 125-134, 2014.

ZHU, J. M.; KAEPLER, S.; LYNCH, J. Mapping of QTLs for lateral root branching and length in maize (*Zea mays* L.) under differential phosphorus supply. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 111, n. 4, p. 688-695, 2005.

ZAMBRYSKI, P. Fundamental discoveries and simple recombination between circular plasmid DNAs led to widespread use of *Agrobacterium tumefaciens* as a generalized vector for plant genetic engineering. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 57, p. 449-452, 2013.

WEINHOLD, A.; KALLENBACH, M.; IANTHOMAS BALDWIN, T. I. Progressive 35S promoter methylation increases rapidly during vegetative development in transgenic *Nicotiana attenuate* plants. **BMC Plant Biology**, v. 13, p. 99, 2013.

WOLL, K.; BORSUK, L. A.; STRANSKY, H.; NETTLETON, D.; SCHNABLE, P. S.; HOCHHOLDINGER, F. Isolation, characterization, and pericycle-specific transcriptome analyses of the novel maize lateral and seminal root initiation mutant rum1. **Plant Physiology**, Washington, v. 139, n. 3, p. 1255-1267, 2005.

## Literatura recomendada

ABRASEM. 3º Acompanhamento da adoção de biotecnologia agrícola no Brasil, safra 1997/2013. **Agroanalysis**, 2014.

BARBOSA, E. G. G.; LEITE, J. P.; MARIN, S. R. R.; MARINHO, J. P.; CARVALHO, J. de F. C.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; OLIVEIRA, M. C. N. de; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NAKASHIMA, K.; MARUYAMA, K.; KANAMORI, N.; FUJITA, Y.; YOSHIDA, T.; NEPOMUCENO, A. L. Overexpression of the ABA-dependent AREB1 transcription Factor from *Arabidopsis thaliana* improves soybean tolerance to water deficit. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 31, p. 719-730, 2012.

BERGAMASCHI, H.; WHEELER, T. R.; CHALLINOR, A. J.; COMIRAN, F.; HECKLER, B. M. M. Maize yield and rainfall on different spatial and temporal scales in Southern Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, n. 5, p. 603-613, 2007.

BOLGER, M. E.; WEISSHAAR, B.; SCHOLZ, U.; STEIN, N.; USADEL, B.; MAYER, K. F. Plant genome sequencing: applications for crop improvement. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 26, p. 31-37, Apr. 2014.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 93-109.

CHASSY, B. M. The history and future of GMOs in food and agriculture. **Cereal Foods World**, Minneapolis, v. 52, n. 4, p. 169-172, 2007.

HANDEL, C. L.; WAGNER, C.; MILACH, S.; FEDERIZZI, L. Transformação genética de cereais via *Agrobacterium tumefaciens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 2, p. 359-365, 1997.

HOCHHOLDINGER, F.; WOLL, K.; SAUER, M.; DEMBINSKY, D. Genetic dissection of root formation in maize (*Zea mays*) reveals root type specific developmental programmes. **Annals of Botany**, London, v. 93, p. 359-368, 2004.

LEITE, A.; KEMPER, E. L.; SILVA, M. J. da; LUCHESSI, A. D.; SILOTO, R. M. P.; BONACORSSI, E. D.; EL-DORRY, H. F.; ARRUDA, P. Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 6, p. 47-53, 2000.

LOBELL, D. B.; SCHLENKER, W.; COSTA-ROBERTS, J. Climate trends and global crop production since 1980. **Science**, Washington, v. 333, n. 6042, p. 616-620, 2011.

MUNIZ, C. R.; SILVA, G. F. da; SOUZA, M. T.; FREIRE, F. C. O. Agrobacterium tumefaciens: mediated transformation of Lasiodiplodia theobromae, the causal agent of gummosis in cashew nut plants. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 2906-2913, 2014.

NELSON, D. E.; REPETTI, P. P.; ADAMS, T. R.; CREELMAN, R. A.; WU, J.; WARNER, D. C.; ANSTROM, D. C.; BENSEN, R. J.; CASTIGLIONI, P. P.; DONNARUMMO, M. G.; HINCHEY, B. S.; KUMIMOTO, R. W.; MASZLE, D. R.; CANALES, R. D.; KROLIKOWSKI, K. A.; DOTSON, S. B.; GUTTERSON, N.; RATCLIFFE, O. J.; HEARD, J. E. Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 104, n. 42, p. 16450-16455, 2007.

NI, J. J.; WU, P.; SENADHIRA, D.; HUANG, N. Mapping QTLs for phosphorus deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p. 1361-1369, 1998.

NOGUEIRA, A. R. de A.; SOUZA, G. B. de. (Ed.). **Manual de laboratórios**: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 334 p.

PREUSS, S. B.; MEISTER, R.; XU, Q.; URWIN, C. P.; TRIPODI, F. A.; SCREEN, S. E.; ANIL, V. S.; ZHU, S.; MORRELL, J. A.; LIU, G.; RATCLIFFE, O. J.; REUBER, T. L.; KHANNA, R.; GOLDMAN, B. S.; BELL, E.; ZIEGLER, T. E.; McCLERREN, A. L.; RUFF, T. G.; PETRACEK, M. E. Expression of the Arabidopsis thaliana BBX32 gene in soybean increases grain yield. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. e30717, 2012.

RICE, E. A.; KHANDELWAL, A.; CREELMAN, R. A.; GRIFFITH, C.; AHRENS, J. E.; TAYLOR, J. P.; MURPHY, L. R.; MANJUNATH, S.; THOMPSON, R. L.; LINGARD, M. J.; BACK, S. L.; LARUE, H.; BRAYTON, B. R.; BUREK, A. J.; TIWARI, S.; ADAM, L.; MORRELL, J. A.; CALDO, R. A.; HUAI, Q.; KOUADIO, J. L.; KUEHN, R.; SANT, A. M.; WINGBERMUEHLE, W. J.; SALA, R.; FOSTER, M.; KINSER, J. D.; MOHANTY, R.; JIANG, D.; ZIEGLER, T. E.; HUANG, M. G.; KURIAKOSE, S. V.; SKOTTKE, K.; REPETTI, P. P.; REUBER, T. L.; RUFF, T. G.; PETRACEK, M. E.; LOIDA, P. J. Expression of a truncated ATHB17 protein in maize increases ear weight at silking. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. e94238, 2014.

SAKURAI, G.; IIZUMI, T.; YOKOZAWA, M. Varying temporal and spatial effects of climate on maize and soybean affect yield prediction. **Climate Research**, Oldendorf, v. 49, p. 143-154, 2011.

SANTARÉM, E. R. **Laboratório de cultura de tecidos vegetais**. Cruz Alta: Universidade de Cruz Alta, 2000.

TORRES, A. C.; NASCIMENTO, W. M.; PAIVA, S. A. V.; ARAGÃO, F. A. S. de. Bioassay for detection of transgenic soybean seeds tolerant to glyphosate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n. 9, p. 1053-1057, set. 2003.

TUBEROSA, R.; SALVI, S. QTL for agronomic traits in maize production. In: BENNETZEN, J. L.; HAKE, S. C. (Ed.). **Handbook of maize: its biology**. London: Springer, 2009. p. 501-541.

ZHANG, E.; YANG, Z.; WANG, Y.; HU, Y.; SONG, X.; XU, C. Nucleotide polymorphisms and haplotype diversity of RTCS gene in China elite maize inbred lines. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. 1-6, 2013.

ZHU, J.; MICKELSON, S. M.; KAEPLER, S. M.; LYNCH, J. P. Detection of quantitative trait loci for seminal root traits in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown under differential phosphorus levels. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.113, p.1-10, 2006.

**Embrapa**

---

**Milho e Sorgo**

CGPE - 13951



MINISTÉRIO DA  
**AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO**

