

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Genética

Matheus Carlos Valinhas

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE SORGO SUPEREXPRESSANDO O
GENE *SbPSTOL1***

Belo Horizonte

2024

Matheus Carlos Valinhas

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE SORGO SUPEREXPRESSANDO O
GENE *SbPSTOL1***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Genética da
Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Jurandir Vieira de
Magalhães

Coorientadora: Dra. Andrea Almeida
Carneiro

Belo Horizonte

2024

043

Valinhas, Matheus Carlos.

Caracterização morfológica de sorgo superexpressando o gene SbPSTOL1 [manuscrito] / Matheus Carlos Valinhas. – 2024.

74 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Jurandir Vieira de Magalhães. Coorientadora: Dra. Andrea Almeida Carneiro.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética vegetal. 2. Sorgo. 3. Sistema radicular. 4. Solo. 5. Fósforo. I. Magalhães, Jurandir Vieira de. II. Carneiro, Andrea Almeida. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA - SECRETARIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO ALUNO

MATHEUS CARLOS VALINHAS

Às oito horas do dia **30 de outubro de 2024**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Caracterização morfológica de sorgo superexpressando o gene SbPSTOL1**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Jurandir Vieira de Magalhães**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Jurandir Vieira de Magalhães	EMBRAPA	APROVADO
Dra. Andréa Almeida Carneiro	EMBRAPA	APROVADO
Dr. Frederico Marianetti Soriani	UFMG	APROVADO
Dra. Karine da Costa Bernardino	EMBRAPA	APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **APROVADO**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 30 de outubro de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Dr. Jurandir Vieira de Magalhães - Orientador

Dra. Andréa Almeida Carneiro - Coorientador

Dr. Frederico Marianetti Soriani

Dra. Karine da Costa Bernardino



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Marianetti Soriani, Professor do Magistério Superior**, em 01/11/2024, às 08:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jurandir Vieira de Magalhaes, Usuário Externo**, em 01/11/2024, às 08:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karine da Costa Bernardino, Usuário Externo**, em 01/11/2024, às 08:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andréa Almeida Carneiro, Usuário Externo**, em 19/11/2024, às 13:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3672521** e o código CRC **FAE7F908**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Caracterização morfológica de sorgo superexpressando o gene SbPSTOL1"

MATHEUS CARLOS VALINHAS

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Frederico Marianetti Soriani
UFMG

Profa Karine da Costa Bernardino
EMBRAPA

Prof. Andréa Almeida Carneiro - Coorientador
EMBRAPA

Prof. Jurandir Vieira de Magalhães - Orientador
EMBRAPA

Belo Horizonte, 30 de outubro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Marianetti Soriani, Professor do Magistério Superior**, em 01/11/2024, às 08:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jurandir Vieira de Magalhaes, Usuário Externo**, em 01/11/2024, às 08:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karine da Costa Bernardino, Usuário Externo**, em 01/11/2024, às 08:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andréa Almeida Carneiro, Usuário Externo**, em 06/11/2024, às 16:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3672526** e o código CRC **9535A1DD**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha família por todo o apoio, amor e confiança. À minha mãe, irmã e meu pai pela convivência e suporte nesse tempo. Aos meus queridos avós por serem incríveis. Aos meus tios e primos pela confiança.

Agradeço à Dra. Vanessa de Almeida Barros, Dra. Karine da Costa Bernardino, Dra. Beatriz de Almeida Barros, Dra. Sylvia de Sousa Tinoco e ao Dr. Mayron Martins pela grande ajuda nos experimentos e pela boa vontade.

Agradeço aos amigos do laboratório por toda disposição e apoio. Em especial Naty, Gabi, Lorena e Douglas.

Agradeço ao Dr. Jurandir Vieira de Magalhães pela orientação e pela oportunidade.

Agradeço à Dra. Andrea Almeida Carneiro pelo coorientação.

Agradeço ao Dr. Frederico Marianetti Soriani e Dr. Paulo César Magalhães por aceitarem participar da banca.

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-graduação em Genética pela oportunidade.

À EMBRAPA Milho e Sorgo e a todos os funcionários por contribuírem para o bom funcionamento da unidade, contribuindo para o desenvolvimento científico no Brasil.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por conceder a minha bolsa.

Quem passou pela vida em branca nuvem
E em plácido repouso adormeceu,
Quem não sentiu o frio da desgraça,
Quem passou pela vida e não sofreu,
Foi espectro de homem, e não homem,
Só passou pela vida, não viveu.

-Francisco Otaviano

RESUMO

A disponibilidade de nutrientes no solo é de grande importância para o estabelecimento das culturas e exerce influência no desenvolvimento e produção das plantas. Indispensável para diversos processos biológicos, o fósforo (P) é um nutriente que se encontra sob baixa disponibilidade em solos tropicais, tornando-se assim um dos principais fatores limitantes para o crescimento vegetal. Um dos mecanismos evolutivos desenvolvidos pelas plantas para otimizar a absorção desse nutriente é a alteração na arquitetura do sistema radicular, visando um aumento na área de superfície da raiz, permitindo a melhor exploração do solo e absorção de P. Descrito pela primeira vez em arroz, o gene *PSTOL1* (*PHOSPHORUS STARVATION TOLERANCE1*), que codifica uma quinase receptora do tipo serina/treonina, foi associado a alterações na morfologia radicular que levam à tolerância ao estresse de P. Ortólogos do gene *PSTOL1* foram associados com aumento na área de superfície da raiz, maior acúmulo de fósforo na parte aérea e aumento na produção de grãos em linhagens de milho e trigo tolerantes à indisponibilidade de P. Análises de associação identificaram diversos SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) na sequência do gene *PSTOL1* de sorgo (*SbPSTOL1*) associados à otimização do uso de P e a alterações na morfologia radicular. Em eventos de milho transgênico superexpressando o gene *SbPSTOL1*, foi observado aumento no comprimento e superfície do sistema radicular e redução do diâmetro médio das raízes. Nesse trabalho, linhagens transgênicas de sorgo produzidas no background genético P898012 foram utilizadas para avaliar os efeitos da superexpressão do gene *SbPSTOL1* na morfologia do sistema radicular em condições de estresse de fósforo, em solo e em hidroponia. Adicionalmente, foram avaliadas características fisiológicas da parte aérea e características da morfologia do sistema radicular dos eventos transgênicos de sorgo em condição de estresse hídrico. Os eventos superexpressando *SbPSTOL1* apresentaram uma tendência para o aumento da área de superfície e redução do diâmetro médio radicular em condição de baixo P, em solução hidropônica e em solo. No entanto essas alterações não foram consistentemente observadas em repetições dos experimentos. Em condição de estresse hídrico, os eventos apresentaram melhora na taxa fotossintética e redução na temperatura foliar, não apresentando alterações significativas na morfologia do sistema radicular. Os eventos superexpressando o gene *SbPSTOL1* apresentaram grande variação para as características avaliadas relacionadas à morfologia radicular em solo e em solução nutritiva. A variação foi observada entre diferentes eventos e em repetições de um mesmo evento. A linhagem de sorgo P898012 é naturalmente tolerante aos estresses hídrico e de P que, em adição à variação observada nas linhagens superexpressando o gene, dificultam

uma conclusão acerca do efeito da superexpressão do gene *SbPSTOL1* na morfologia do sistema radicular de sorgo. Uma característica consistentemente observada foi o acúmulo de antocianinas na panícula dos eventos de sorgo cultivados em solo com baixo P. Em sorgo, antocianinas são produtos do metabolismo secundário e o aumento de sua produção está relacionado a estresses abióticos. Esses resultados sugerem a relação de *SbPSTOL1* com vias de resposta e tolerância a estresses abióticos em sorgo.

Palavras-Chave: Estresse de fósforo, estresse hídrico, quinase receptora, sorgo, *SbPSTOL1*, superexpressão, morfologia radicular.

ABSTRACT

The availability of nutrients in the soil is of great importance for crop establishment and influences plant development and production. Phosphorus (P), indispensable for various biological processes, is a nutrient found in low availability in tropical soils, making it one of the main limiting factors for plant growth. One of the evolutionary mechanisms developed by plants to optimize the absorption of this nutrient is the alteration of root system architecture, aiming at increasing root surface area, which allows for better soil exploration and P absorption. First described in rice, the *PSTOL1* gene (*PHOSPHORUS STARVATION TOLERANCE1*), which encodes a serine/threonine receptor kinase, has been associated with root morphology changes that lead to P stress tolerance. Orthologs of the *PSTOL1* gene have been associated with increased root surface area, greater phosphorus accumulation in the shoots, and increased grain production in P-tolerant maize and wheat lines. Association analyses identified several SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) within sorghum *PSTOL1* genes (*SbPSTOL1*) associated with optimized P use associated with changes in root morphology. In transgenic maize events overexpressing *SbPSTOL1*, increased root system length and surface area, and reduced average root diameter were observed. In this study, transgenic sorghum lines transformed in the P898012 genetic background were used to evaluate the effects of *SbPSTOL1* overexpression on root system morphology under phosphorus stress conditions, in soil and in hydroponics. Additionally, physiological characteristics of the shoot and root morphology of the transgenic sorghum events under water stress were evaluated. The events overexpressing *SbPSTOL1* showed a trend toward increased surface area and reduced average root diameter under low P conditions, in hydroponic solution and in soil. However, these changes were not consistently observed in different experiments. Under water stress conditions, the events showed improved photosynthetic rates and reduced leaf temperature, with no significant changes in root morphology. The events overexpressing the *SbPSTOL1* gene showed great variation in the evaluated traits related to root morphology in both soil and in nutrient solution. The variation was observed between and within different events. The P898012 sorghum line is reasonably tolerant to water and P stresses which, along with the variation observed in the lines overexpressing the gene, complicates drawing a conclusion about the effect of *SbPSTOL1* overexpression on sorghum on tolerance to low P and drought conditions. One consistently observed characteristic was the accumulation of anthocyanins in the panicles of sorghum events grown in a low P soil. In sorghum, anthocyanins are secondary metabolites and increased production of anthocyanins has been associated with abiotic stress tolerance. These results

suggest a relationship between *SbPSTOL1* and tolerance pathways to abiotic stresses in sorghum.

Keywords: Phosphorus stress, drought stress, receptor kinase, sorghum, *SbPSTOL1*, overexpression, root morphology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do vetor binário p7o2x35s, utilizado na transformação genética dos eventos de sorgo. Nesse vetor, o gene *BAR* (*Bar'*, "*Bar'*") é controlado pelo promotor 35s (*P2x35s'*) e o gene *SbPSTOL1* (*Sb03g06765*) é controlado pelo promotor constitutivo da ubiquitina de milho (*UbiZm Promoter*). A sequência do gene *SbPSTOL1* controlado pelo promotor da ubiquitina de milho é ausente na construção inserida nas plantas vetor vazio (VTVZ).....20

Figura 2: Ilustração do sistema de plantio em tubos dos eventos transformados, em solo com baixa disponibilidade de fósforo (P). Os anéis foram preenchidos com solo da respectiva camada e unidos com fita adesiva, resultando em uma unidade experimental de 80 cm de altura. Ao final do experimento, a fita adesiva foi retirada para a separação dos anéis e um fio de metal foi utilizado para seccionar a terra e a raiz entre os anéis. Foram utilizadas 3 camadas de solo com alta fixação de P (latossolo vermelho distrófico, Santos et al., 2013). As camadas de solo em profundidade de 0 – 20 e 20 – 40 cm foram utilizadas para preencher os anéis 1 e 2, respectivamente. A camada em profundidade de 40-80 cm foi utilizada para preencher os anéis 3 e 4.....25

Figura 3: Expressão relativa dos genes *SbPSTOL1* e *BAR* em diferentes eventos transgênicos da linhagem P898012 transformadas com a construção *UbiZm::6765-Flag::NOS*, nas gerações T1 e T2. Como controle, foram utilizadas plantas de sorgo não transformadas (tipo selvagem, *wild type* - WT) e uma planta transformada com a construção *UbiZm::Flag::NOS* (vetor vazio, VTVZ). As plantas foram cultivadas em sistema de hidroponia em baixo fósforo. (A) Expressão relativa do gene *SbPSTOL1* (*Sb03g006765*). A expressão de *SbPSTOL1* nos controles (WT e VTVZ) é devida à expressão endógena do gene *Sb03g006765*. (B) Expressão relativa do gene *BAR*. Os valores de WT e VTVZ foram de 0,04 e 1,04, respectivamente. Valores de expressão relativa foram obtidos através do método $\Delta\Delta C_t$, utilizando o genótipo WT como normalizador para o gene *Sb03g06765* e o evento VTVZ como normalizador para o gene *BAR*. Os valores de expressão demonstrados equivalem à média de três réplicas biológicas.....29

Figura 4: Caracterização fenotípica do sistema radicular de plantas de sorgo da linhagem P898012 não transformada (tipo selvagem, *wild type* - WT) e transformadas com a construção *UbiZm::6765-Flag::NOS*, cultivadas em solução nutritiva com tratamento de alto (250 μ M) e

baixo fósforo (P, 2,5 μ M), por um período de 13 dias. Foram utilizadas três repetições biológicas para os eventos transformados e seis para a linhagem não transformada. O teste Dunnett foi utilizado para comparar as médias dos eventos transformados com a linhagem não transformada, dentro dos respectivos tratamentos (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). (A) Área de superfície total do sistema radicular dos eventos transformados e da linhagem P898012 não transformada cultivados em tratamento de alto e baixo P. (B) Média do diâmetro do sistema radicular dos eventos transformados e da linhagem não transformada cultivados em tratamento de alto e baixo P.....32

Figura 5: Caracterização da biomassa seca da parte aérea e do sistema radicular de plantas de sorgo da linhagem P898012 não transformada (tipo selvagem, *wild type* - WT) e transformada com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, cultivadas em solução nutritiva com tratamento de alto (250 μ M) e baixo fósforo (P, 2,5 μ M) , por um período de 13 dias. Foram utilizadas três repetições biológicas para os eventos transformados e seis para o linhagem não transformada. O teste Dunnett foi utilizado para comparar as médias dos eventos transformados com a linhagem não transformada, dentro dos respectivos tratamentos (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). (A) Média da massa seca da parte aérea dos eventos transformados e linhagem não transformada cultivados em tratamento de alto e baixo P. (B) Média da massa seca do sistema radicular dos eventos transformados e linhagem não transformada cultivados em tratamento de alto e baixo P.....34

Figura 6: Caracterização fenotípica do sistema radicular de plantas de sorgo da linhagem P898012 transformadas com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, das gerações T1 e T2. O evento VTVZ, transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS, e plantas não transformadas das linhagens P898012, BTx399 e BTx675 foram usados como controle. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva em tratamento de baixo fósforo (P, 2,5 μ M), por um período de 13 dias. Os valores apresentados correspondem à média de três repetições biológicas. O teste Dunnett foi utilizado para comparar as médias dos eventos transformados e das linhagens não transformadas com o evento VTVZ (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). (A) Área de superfície total do sistema radicular dos eventos transformados e linhagens não transformadas cultivados em tratamento de baixo P. (B) Diâmetro médio do sistema radicular dos eventos transformados e linhagens não transformadas cultivados em tratamento de baixo P.....36

Figura 7: Caracterização da biomassa da parte aérea e do sistema radicular de plantas de sorgo da linhagem P898012 transformadas com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, das gerações

T1 e T2. O evento VTVZ, transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS, e plantas não transformadas das linhagens P898012, BTx399 e BTx675 foram usados como controle. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva em tratamento de baixo fósforo (2,5 μ M), por um período de 13 dias. Os valores apresentados correspondem à média de três repetições biológicas. O teste Dunnett foi utilizado para comparar as médias dos eventos transformados e das linhagens não transformadas com o evento VTVZ (* p < 0,05 e ** p < 0,01). (A) Média da massa seca da parte aérea dos eventos transformados e linhagens não transformadas cultivados em tratamento de baixo P. (B) Média da massa seca do sistema radicular dos eventos transformados e linhagens não transformadas cultivados em tratamento de baixo P.....37

Figura 8: Caracterização da área de superfície, diâmetro médio e massa seca do sistema radicular das plantas transformadas com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS em sistema de tubos, em solo processado, com baixa disponibilidade de P. Os valores apresentados correspondem a média de cinco repetições biológicas e são referentes ao anel 1 (camada 0 – 20 cm do solo) da unidade experimental. Como controle, foi utilizado o evento VTVZ (vetor vazio), transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS. O teste Dunnett foi utilizado para comparar as médias dos eventos superexpressando *SbPSTOL1* com VTVZ (* p < 0,05 e ** p < 0,01). (A) Área de superfície total do sistema radicular correspondente ao anel 1 dos eventos transformados, em condição de baixo P. (B) Média do diâmetro do sistema radicular correspondente ao anel 1 dos eventos transformados, em condição de baixo P. (C) Valor médio da massa seca do sistema radicular dos eventos transformados, correspondente ao anel 1, em condição de baixo P.....40

Figura 9: Caracterização da massa seca da parte aérea, raiz, total e dos grãos das plantas transformadas com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS em sistema de tubos, em solo processado, com baixa disponibilidade de P. Os valores apresentados correspondem à média de cinco repetições biológicas. Como controle, foi utilizado o evento VTVZ (vetor vazio), transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS. O teste Dunnett foi utilizado para comparar as médias dos eventos superexpressando *SbPSTOL1* com VTVZ (* p < 0,05 e ** p < 0,01). (A) Massa seca da parte aérea. Corresponde à soma da massa seca de perfilho e massa seca da planta principal. (B) Massa seca do sistema radicular. Corresponde à soma da massa seca da raiz de todos os anéis. (C) Massa seca total. Corresponde à soma da massa seca da parte

aérea, da raiz e da panícula das plantas. (C) Massa seca dos grãos. Corresponde à massa de 100 grãos de sorgo.....41

Figura 10: Caracterização da área de superfície radicular nos anéis 1, 2 e 3, das plantas transformadas com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS em sistema de tubos, em solo processado, com baixa disponibilidade de P. Os valores apresentados correspondem à média de cinco repetições biológicas para todos os anéis da unidade experimental. Como controle, foi utilizado o evento VTVZ (vetor vazio), transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS. O teste Dunnett foi utilizado para comparar as médias dos eventos superexpressando *SbPSTOLI* com VTVZ (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). (A) Área de superfície total do sistema radicular correspondente ao anel 1 (camada 0 – 20 cm de solo) dos eventos transformados, em condição de baixo P. (B) Área de superfície total do sistema radicular correspondente ao anel 2 (camada 20 – 40 cm de solo) dos eventos transformados, em condição de baixo P. (C) Área de superfície total do sistema radicular correspondente ao anel 3 (camada 40 – 80 cm de solo) dos eventos transformados, em condição de baixo P.....42

Figura 11: Panículas de sorgo cultivado em solo com baixa disponibilidade de P em sistema de tubos com 10 dias de florescimento. (A) Panícula de sorgo do evento vetor vazio (VTVZ). (B) Panícula de sorgo do evento superexpressando *SbPSTOLI*, 3.4. A pigmentação no evento 3.4 foi observada em todos os eventos superexpressando *SbPSTOLI*, enquanto não observada nos eventos VTVZ.....43

Figura 12: Características fisiológicas dos eventos de sorgo transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, em condição de irrigação suficiente e estresse hídrico. Como controle, foi utilizado o evento VTVZ (vetor vazio), transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS. Foi medida a taxa fotossintética, eficiência do fotossistema II e temperatura foliar em 5 (Coleta 1) e 10 (Coleta 2) dias de estresse hídrico, utilizando três repetições biológicas, com três plantas para cada repetição, por evento. As médias dos eventos superexpressando *SbPSTOL* foram comparadas por teste Dunnett com a média do evento VTVZ, transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).46

Figura 13: Caracterização fenotípica do sistema radicular e biomassa da parte aérea e sistema radicular em condição de estresse hídrico. Foram selecionadas para o experimento eventos de sorgo transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, da geração T2 e o evento VTVZ (vetor vazio), transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS. Os eventos foram cultivados em três repetições, com três plantas por repetição para cada tratamento. O

experimento teve 48 dias de duração. O teste Dunnett foi utilizado para comparar as médias dos eventos superexpressando *SbPSTOL1* com VTVZ, dentro dos respectivos tratamentos ($*p < 0,05$ e $**p < 0,01$). **(A)** Área de superfície total do sistema radicular dos eventos transformados cultivados em condição de estresse hídrico e em condição de irrigação suficiente. **(B)** Média do diâmetro do sistema radicular dos eventos transformados cultivados em condição de estresse hídrico e em condição de irrigação suficiente. **(C)** Média da massa seca da parte aérea dos eventos transformados cultivados em condição de estresse hídrico e em condição de irrigação suficiente. **(D)** Média da massa seca do sistema radicular dos eventos transformados cultivados em condição de estresse hídrico e em condição de irrigação suficiente.....**48**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise de variância (ANOVA) para as características comprimento total (CT), área de superfície total (AS), diâmetro médio (DM), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST) dos eventos de sorgo transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS e a linhagem não transformada, em condição de alto (250 μ M) e baixo P (2,5 μ M) em solução nutritiva.....**31**

Tabela 2: Análise de variância (ANOVA) para as características comprimento total (CT), área de superfície total (AS), diâmetro médio (DM), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST), dos eventos de sorgo transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, linhagens de sorgo não transformadas BTx399, BTx635, P898012, e uma planta transformada com a construção UbiZm::Flag::NOS. O experimento foi conduzido em tratamento de baixo fósforo (P, 2,5 μ M).....**35**

Tabela 3: Análise de variância (ANOVA) para as características comprimento total (CT), área de superfície total (AS), diâmetro médio (DM), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (PST), dos eventos de sorgo transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS e uma planta transformada com a construção UbiZm::Flag::NOS em sistema de tubos em tratamento de baixo P. A fonte de variação “Anel” corresponde aos anéis 1 (camada 0 – 20 cm), 2 (camada 20 – 40) e 3 (camada 40 – 80).....**38**

Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) para massa seca dos eventos de sorgo transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS e uma planta transformada com a construção UbiZm::Flag::NOS em sistema de tubos, em tratamento de baixo P.....**39**

Tabela 5: Análise de variância (ANOVA) para a primeira coleta de dados fisiológicos dos eventos de sorgo transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS e uma planta transformada com a construção UbiZm::Flag::NOS. O experimento foi conduzido em tratamentos de irrigação suficiente e estresse hídrico. Os quadrados médios apresentados se referem ao teor de clorofila (TC), eficiência do fotossistema II, taxa fotossintética (TF), condutância estomática (CE), transpiração (T), temperatura foliar (TEF) e eficiência do uso de água (EUA).....**44**

Tabela 6: Análise de variância (ANOVA) para a segunda coleta de dados fisiológicos dos eventos de sorgo transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS e uma planta transformada com a construção UbiZm::Flag::NOS. O experimento foi conduzido em tratamentos de irrigação suficiente e estresse hídrico. Os quadrados médios apresentados se referem ao teor de clorofila (TC), eficiência do fotossistema II, taxa fotossintética (TF), condutância estomática (CE), transpiração (T), temperatura foliar (TEF) e eficiência do uso de água (EUA).....**45**

Tabela 7: Análise de variância (ANOVA) para as características comprimento total (CT), área de superfície total (AS), diâmetro médio (DM), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (PST), dos eventos de sorgo transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS e uma planta transformada com a construção UbiZm::Flag::NOS. O experimento foi conduzido em tratamentos de irrigação suficiente e estresse hídrico.....**46**

SUMÁRIO

1. Introdução.....	9
2. Justificativa.....	11
3. Referencial teórico.....	11
3.1 Sorgo e a segurança alimentar mundial.....	11
3.2 Disponibilidade e importância de fósforo em plantas.....	12
3.3 Mecanismos de tolerância ao estresse de P em plantas.....	14
3.4 A relação do gene <i>PSTOL1</i> com características morfológicas de tolerância ao estresse de P.....	15
3.5 Genes <i>PSTOL1</i> em sorgo (<i>SbPSTOL1</i>).....	16
3.6 Proteínas quinase e a relação com tolerância a estresses.....	17
4. Objetivos.....	19
4.1 Objetivo Geral.....	19
4.2 Objetivos Específicos.....	19
5. Materiais e Métodos.....	19
5.1 Transformação Genética de Sorgo.....	19
5.2 Teste dos primers.....	21
5.3 Seleção dos eventos homozigotos.....	21
5.4 Análise da morfologia de raiz e acúmulo de biomassa em sistema de hidroponia em condições de baixo e alto fósforo.....	22
5.5 Análise de expressão das plantas transformadas e controles.....	23
5.6 Análise da morfologia de raiz e acúmulo de biomassa em solo com baixa disponibilidade de P em sistema de tubos.....	24
5.7 Análise de características fisiológicas e de morfologia radicular e acúmulo de biomassa em solo sob irrigação e estresse hídrico.....	26
5.8 Análises Estatísticas.....	27
6. Resultados.....	27
6.1 Análise de Expressão dos genes <i>Sb003g006765</i> e <i>BAR</i>	27
6.2 Análise da morfologia de raiz e acúmulo de biomassa em hidroponia em condições de baixo e alto fósforo.....	30
6.3 Análise da morfologia de raiz e acúmulo de biomassa em solo com baixa disponibilidade de P em sistema de tubos.....	38

6.4 Análise de indicadores fisiológicos e da morfologia de raiz e acúmulo de biomassa em solo em situação de estresse hídrico.....	44
7. Discussão.....	48
8. Conclusão.....	53
9. Referências.....	54

1. Introdução

A limitação de nutrientes essenciais no solo causa estresse em plantas, prejudicando seu desenvolvimento e produção (Uchida, 2000). A perspectiva da intensificação dos estresses abióticos devido às mudanças climáticas (Chaudhry et al, 2021) ressalta a importância do estudo de mecanismos de tolerância a estresses abióticos, a fim de determinar novos alvos para o melhoramento, contribuindo para a garantia da segurança alimentar global.

O fósforo (P) é um macronutriente essencial para o desenvolvimento das plantas. Sendo assim, é indispensável para a estrutura dos ácidos nucleicos, fosfolipídeos e ATP, o que o torna limitante para o desenvolvimento das plantas (Schachtman, D. P, 1998). Em solos tropicais, a alta concentração de óxidos de ferro e alumínio provocam a fixação do P, reduzindo sua disponibilidade para as plantas (Marschner, 1995). Em condições de baixa disponibilidade de P no solo, as plantas desencadeiam respostas adaptativas, que provocam alterações metabólicas e fisiológicas que podem mitigar os efeitos negativos da menor disponibilidade do nutriente, facilitando a sua absorção (Fitter et al., 2002). Dentre as respostas observadas, destacam-se alterações na arquitetura radicular da planta, como a redução do crescimento da raiz primária e a maior proliferação de raízes finas, permitindo a maior exploração do solo pela raiz e consequentemente, aumento da aquisição de P (Yan et al., 2004; Ho et al., 2005).

Estudos desenvolvidos em arroz (*Oryza sativa*), demonstraram que o gene que codifica a proteína quinase receptora citoplasmática *Phosphorus Starvation Tolerance 1* (OsPSTOL1), integrante da superfamília RLK/Pelle, está envolvido em respostas adaptativas relacionadas à morfologia radicular em solo com baixa disponibilidade de P (Gamuyao et al., 2012). A maior expressão desse gene está relacionada com alterações nas características morfológicas da raiz, principalmente no aumento da proliferação de raízes com o diâmetro reduzido, promovendo aumento da área de superfície radicular, possibilitando a melhor exploração do solo pela planta e influenciando positivamente a produtividade de grãos (Gamuyao et al., 2012). Estudos em linhagens tolerantes e sensíveis ao estresse de P em trigo (*Triticum aestivum*), confirmaram o efeito do gene *PSTOL1* na tolerância da planta ao estresse de P, através da modificação da arquitetura do sistema radicular (Milner et al., 2018; Abbas et al., 2022).

Em *Sorghum bicolor*, por meio de análise por similaridade de sequências, utilizando a sequência do gene *PSTOL1* de arroz, possíveis homólogos foram identificados e denominados *SbPSTOL1*. Por meio de análise de associação, foram descobertos diversos SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) associados com características de tolerância ao estresse de P, como

alterações na morfologia radicular (Hufnagel et al., 2014). Dentre os homólogos destacados, o gene *Sb003g006765*, localizado no cromossomo 3, apresentou múltiplos SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism* - Polimorfismo de nucleotídeo único) associados a características relacionadas à alteração da morfologia radicular, como o aumento da área de superfície e a redução do diâmetro do sistema radicular, bem como o aumento da produção de grãos destacando-se, assim, como um gene relacionado à tolerância ao estresse de P em sorgo (Hufnagel et al., 2014).

A presença do domínio quinase citoplasmático em *SbPSTOL1* é uma característica em comum com a proteína *OsPSTOL1* de arroz. Proteínas quinase são enzimas que catalisam o processo de adição um grupo fosfato (PO_4^{3-}), derivado de uma molécula de adenosina trifosfato (ATP), a resíduos de serina, treonina e tirosina em proteínas-alvo com as quais interagem. A adição do grupo fosfato modifica a atividade da proteína alvo. Esse mecanismo é definido como fosforilação (Lehti-Shiu et al., 2012), um processo reversível que está relacionado à sinalização celular e à resposta a estímulos extracelulares, como estresses bióticos e abióticos (Dievart et al., 2020). Devido a presença dos domínios quinase citoplasmático e extracelulares, *SbPSTOL1* é classificado como uma RLK (*Receptor-Like Kinase*; Maciel, 2019), o que sugere um papel regulatório dessa proteína, mediado por estímulos externos ao meio celular (Brutus et al., 2010; Shiu et al., 2001).

Embora o mecanismo de ação por meio do qual *PSTOL1* provoca alterações na morfologia do sistema radicular ainda não tenha sido elucidado, um aumento na produção de grãos e na massa seca da raiz foi verificado em linhagens transgênicas de arroz superexpressando o gene *OsPSTOL1* (Gamuyao et al., 2012), sugerindo uma relação positiva entre a expressão do gene e o fenótipo de tolerância. A superexpressão do gene *SbPSTOL1* e *OsPSTOL1* em milho provocou alteração na modulação do sistema radicular das plantas, apresentando uma maior proliferação de raízes finas e aumento no acúmulo de biomassa na parte aérea nas plantas cultivadas em solo com baixa disponibilidade de P (Maciel, 2019). Neste trabalho, buscamos explorar os efeitos da superexpressão do gene *SbPSTOL1 Sb003g006765* em plantas de sorgo, a fim de avaliar as possíveis alterações no sistema radicular e a performance em meio com baixa disponibilidade de P. Além disso, os eventos foram avaliados em condição de estresse hídrico.

2. Justificativa

Os mecanismos de tolerância ao estresse de fósforo (P) em plantas são de grande importância científica e comercial. Um melhor entendimento das vias de sinalização envolvidas na resistência ao estresse de P permite não apenas o melhor entendimento dos fenótipos e genes relacionadas à tolerância a estresse abióticos em culturas importantes para alimentação humana e animal, mas também a compreensão dos processos e vias de sinalização subjacentes aos mecanismos de tolerância. No presente trabalho, avaliamos os efeitos da superexpressão do gene *SbPSTOL1* em plantas de sorgo da linhagem P898012, avaliando as mudanças fenotípicas nas plantas transgênicas em cultivo hidropônico e em solo sob baixo fósforo. Esperamos avançar no entendimento do papel dos genes *SbPSTOL1* nos estresses causados pela deficiência de fósforo e déficit hídrico sem sorgo.

3. Referencial teórico

3.1 Sorgo e a segurança alimentar mundial

A mudança climática é um enorme desafio que a humanidade enfrenta, onde a variação inesperada da temperatura provoca uma mudança nas condições das culturas vegetais, reduzindo a produção em culturas de soja, milho e trigo (Hu et al., 2024). O crescimento populacional é outro fator relevante, com projeções sugerindo que a população mundial atingirá 8,5 bilhões de pessoas em 2030 e 9,7 bilhões de pessoas a partir de 2050 (UNDESA, 2022).

Para garantir a segurança alimentar, uma transição em direção a culturas mais resilientes às mudanças climáticas, como o sorgo (*Sorghum bicolor*), é de grande interesse. Nativo da África - é o sorgo é o segundo alimento mais consumido no continente atrás do milho. O sorgo pertence à família *Poaceae*, podendo chegar até 2,4 m de altura, produzindo panículas que contém sementes amiláceas, sendo cultivado para consumo humano e animal. O sorgo tem um desempenho melhor em condições de escassez de água e temperatura elevada em comparação com culturas de cereais, trigo, arroz e milho (Schittenhelm and Schroetter, 2014; Hadebe et al., 2017), o que reduz o custo da produção e demanda menos mão de obra.

O sorgo é um alimento base para mais de 500 milhões de pessoas em mais de 30 países, e é predominante em nações em desenvolvimento e em zonas propensas ao déficit hídrico, como África e Ásia, onde o cereal chega a compor 70% do consumo calórico diário (Mutissya, 2009) Na América Central, Ásia, África, China e Rússia, os grãos de sorgo são utilizados para a

alimentação humana, sendo empregados como alternativa ao milho, enquanto que na América do Norte e Sul, Europa e Austrália sua produção é voltada principalmente para a produção de rações (Rodrigues, 2010).

Na perspectiva nutricional, o grão de sorgo contém cerca de 72% de carboidratos, 7% de fibras totais e 11% de proteínas (USDA, ARS., 2019). Outra grande vantagem do sorgo é sua maior proporção de componentes de amidos resistentes de digestão lenta, em comparação com outras culturas de cereais básicos (Taylor & Duodu, 2023). Esses amidos resistentes presentes em sorgo reduzem a hiperglicemia pós-prandial em humanos e podem ser potencialmente manipulados para reduzir a ingestão geral de calorias de produtos feitos com sorgo (Taylor & Duodu, 2023). O sorgo é rico em diversos polifenóis bioativos e outros compostos benéficos que estão associados à redução do risco de doenças crônicas relacionadas à nutrição, incluindo diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (Xu et al., 2021).

3.2 Disponibilidade e importância de fósforo em plantas.

O fósforo (P), um macronutriente essencial para o desenvolvimento das plantas, é necessário para diversos processos fisiológicos e bioquímicos sendo primordial para o crescimento e sobrevivência da planta. Apesar da abundância de compostos fosfatados no solo, as plantas são capazes de utilizar apenas os ortofosfatos, H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} , como fonte de P. Em solos tropicais, que são tipicamente ácidos, a presença de óxidos de ferro e de alumínio na fração argila do solo causa a fixação do P disponível (Marschner, 1995). P fixado em óxidos de ferro e alumínio apresenta uma baixa reversão para a fração disponível. A imobilização de P em formas orgânicas é outro fenômeno que, apesar do menor efeito em relação à fixação em óxidos, também reduz a disponibilidade de P para as plantas (Schachtman et al., 1998). Cerca de metade das terras cultiváveis no planeta estão localizadas em áreas com baixa disponibilidade de P (Lynch, 2011).

A disponibilidade de fósforo no solo tem um impacto direto no rendimento da planta. Em culturas como o milho (*Zea mays*), a deficiência de fósforo durante o desenvolvimento inicial da planta leva a uma redução na área foliar e no acúmulo de biomassa. A redução na área foliar afeta a capacidade fotossintética da planta, reduzindo o potencial energético e consequentemente a produção de grãos (Yao et al., 2007). Da mesma forma, em trigo (*Triticum*

aestivum), a deficiência de fósforo afeta o número de perfilhos e reduz o período de enchimento de grãos, resultando em menor produção e redução da massa do grão (Grant et al., 2001).

O fósforo é um nutriente necessário para a síntese de ácidos nucleicos, cumprindo papel estrutural na composição do DNA. O fosfato se liga aos carbonos 3' e 5' na estrutura das desoxirriboses, formando uma cadeia de ligações covalentes que conferem estabilidade e continuidade para a dupla hélice de DNA (Alberts et al., 2002). O fósforo também apresenta função no metabolismo de fosfolipídios, que são lipídeos com cadeias polares que constituem a membrana celular. A fosfatidilserina e fosfatidilcolina são exemplos de fosfolipídeos essenciais para manter a integridade estrutural das membranas celulares (Vance et al., 2005), como a membrana externa dos cloroplastos (Botella et al., 2017). Além de compor a estrutura física das membranas, os fosfolipídios atuam na sinalização celular (Laxalt & Munnik., 2002; Xue et al., 2009) e na regulação da atividade das proteínas relacionadas à membrana celular (Suetsugu et al., 2014). A alteração da síntese de fosfolipídeos pode prejudicar a integridade das membranas celulares e organelas, levando à redução da absorção de nutrientes e à redução da tolerância a estresses bióticos e abióticos (Raghothama, 1999; Gigli-bisceglia et al., 2020).

Uma das funções de maior relevância do fósforo nas plantas é sua participação na transferência de energia, através da adenosina trifosfato (ATP). O ATP, a principal molécula transportadora de energia nas células vegetais, é indispensável para processos como o transporte ativo de nutrientes, reações enzimáticas e transdução de sinais (Xiao et al., 2024; Wang et al., 2022; Sondergaard et al., 2004). Na fotossíntese, o ATP é essencial para a regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP), uma molécula necessária para o ciclo de Calvin, que atua na fixação de dióxido de carbono pela planta. A insuficiência de fósforo pode reduzir severamente a taxa fotossintética da planta, prejudicando o metabolismo energético e reduzindo o acúmulo de biomassa e consequentemente a produção vegetal (Raghothama, 1999; Vance et al., 2005). Outra função do ATP é na fosforilação de proteínas através das quinases, que são enzimas que catalisam a adição de um grupo fosfato em resíduos de serina, treonina e tirosina em proteínas, causando alterações pós-traducionais reversíveis, de caráter regulatório na proteína alvo (Li & Liu, 2021). A fosforilação é um processo importante para a percepção e transdução de sinais no meio celular (Hardie, 1999) e controla vários aspectos do crescimento, incluindo desenvolvimento de raízes e respostas a estresses ambientais (Schachtman et al., 1998).

3.3 Mecanismos de tolerância ao estresse de P em plantas

Como parte do mecanismo de adaptação à insuficiência de fósforo, as plantas passam por diversas alterações morfológicas do sistema radicular para otimizar a absorção de P, como o aumento na proliferação de raízes finas (Yan et al., 2004), a redistribuição da biomassa do sistema radicular através da maior proliferação de raízes laterais em relação a raiz principal (Fitter et al., 2002), bem como o aumento da área de superfície total através da redução do diâmetro médio e maior alongamento das raízes (Fitter et al., 2002). Plantas cultivadas em solos com baixa disponibilidade de P apresentam menor acúmulo de P na parte aérea. A menor concentração de P na parte aérea é um sinal que indica a insuficiência do nutriente no solo, e leva à modificações metabólicas, que são transmitidas ao sistema radicular, induzindo as alterações morfológicas (Barros et al., 2020) a fim de se adaptar à condição.

Em *Arabidopsis thaliana*, linhagens mutantes com fenótipo de redução do desenvolvimento de raízes laterais finas apresentaram crescimento das raízes laterais finas quando cultivadas em tratamento de baixo fósforo (Bates & Lynch, 1996), ilustrando as mudanças radiculares em resposta ao estresse de P. O aumento da diferenciação de células meristemáticas no periciclo, de onde se originam as raízes laterais, é observado em *arabidopsis* cultivada em condição de baixo P (Sánchez-Calderón et al., 2005). Tais alterações na arquitetura radicular permitem uma melhor exploração do solo pela raiz e otimizam a absorção de P. Plantas que naturalmente apresentam maior volume radicular em relação à parte aérea, como o trigo e o centeio, naturalmente apresentam maior tolerância ao estresse causado pela menor disponibilidade de nutrientes (Raghothama, 1999).

Outro mecanismo para a tolerância à baixa disponibilidade de P é a exsudação de ácidos orgânicos, fosfatases e ribonucleases que, ao favorecer a solubilização de P, aumentam a absorção radicular de P (Hinsinger, 2001). Associações simbióticas com micorrizas na raiz também contribuem para a maior absorção de P pela planta (Smith & Smith, 2012).

O suprimento adequado de fósforo não apenas viabiliza o melhor desenvolvimento das raízes e a absorção de nutrientes, mas também garante o crescimento saudável e o sucesso reprodutivo, tornando-se um fator crucial para a produtividade agrícola (Marschner, 1995).

3.4 A relação do gene *PSTOL1* com características morfológicas de tolerância ao estresse de P

Um loco de característica quantitativa relacionado à tolerância ao estresse de P foi identificado através do cruzamento da linhagem sensível Nipponbare com a linhagem tolerante Kasalath (Wissuwa et al., 2002; Chin et al., 2010). A influência do loco *Pup1* (*Phosphorus uptake 1*) na tolerância ao estresse de P foi observada na linhagem quase isogênica NIL-C443, que possui cerca de 91% do genoma idêntico à linhagem sensível Nipponbare, porém, apresenta um fragmento de 50-cM no cromossomo 12, correspondente ao loco *Pup1*, herdado da linhagem tolerante Kasalath (Wissuwa et al., 2002). Apesar da alta similaridade genética com a linhagem sensível, NIL-C443 apresentou 3 vezes mais absorção de fósforo quando comparada com a linhagem sensível, evidenciando o papel do loco *Pup1* na tolerância ao estresse de P.

Em arroz, a comparação entre características do loco *Pup1* das linhagens Kasalath e Nipponbare, trouxe novas informações acerca dos mecanismos envolvidos na tolerância do estresse de P conferida pelo loco *Pup1*, presente na variedade tolerante (Gamuyao et al., 2012). O sequenciamento do loco *Pup1* da linhagem Kasalath revelou a presença uma inserção contendo elementos transponíveis, de 90kb. Essa inserção não foi encontrada na linhagem Nipponbare, nem em outras linhagens sensíveis ao estresse de P. Nessa inserção foi observada a presença do gene *OsPupK46-2*, altamente conservado em linhagens de arroz tolerantes ao estresse de fósforo (Chin et al., 2010).

A regulação positiva de *OsPupK46-2* em condição de baixo P foi demonstrada, e o gene *OsPupK46-2* foi nomeado *Phosphorus Starvation Tolerance1* (*PSTOL1*, Gamuyao et al., 2012). Foi verificado que *OsPSTOL1* codifica uma proteína quinase funcional do tipo serina/treonina. Para avaliar o efeito do gene, *OsPSTOL1* foi clonado e inserido em arroz da linhagem sensível Nipponbare, controlado pelo promotor constitutivo 35s, em transformação mediada por *A. tumefaciens*. Foi verificado que a superexpressão do gene *OsPSTOL1* provocou alterações no sistema radicular, como aumento no comprimento total, área de superfície total, e na produção de grãos, sendo a magnitude das alterações diretamente proporcional à expressão do transgene (Gamuyao et al., 2012). Os resultados apontam *PSTOL1* como um gene relevante para melhor entender os processos moleculares ligados às alterações morfológicas que conferem tolerância ao estresse de P.

Em trigo, ortólogos do gene *OsPSTOL1* demonstraram um papel crítico na aquisição de fósforo e no desenvolvimento da raiz em condições de baixo P, como um maior alongamento

das raízes, aumento da biomassa da parte aérea, aumento na produção de grãos e floração adiantada em plantas transgênicas (Abbas et al., 2022; Kettenburg et al., 2023; Milner et al., 2018). Apesar da similaridade com as observações feitas em arroz, dentre os 22 genes homólogos do gene *OsPSTOL1* em trigo, alguns apresentaram expressão regulada negativamente pela concentração de fósforo, enquanto outros apresentaram expressão dependente do *background* genético da planta (Abbas et al., 2022). Além disso, a expressão dos genes *TaPSTOL1* variou de acordo com o tecido observado. A variação dos níveis de expressão e diferença na regulação da expressão sugerem um papel multifuncional para os genes *PSTOL1*.

3.5 Genes *PSTOL1* em sorgo (*SbPSTOL1*)

Em sorgo, foi feita uma busca com base em similaridade de sequência, utilizando a sequência do gene *PSTOL1* de arroz. O resultado apontou uma família gênica composta por aproximadamente 100 genes (Hufnagel et al., 2014). Os dados gerados foram curados com base na similaridade de nucleotídeos e aminoácidos, e foram selecionados seis genes, *Sb07g02840*, *Sb03g031670*, *Sb03g031680*, *Sb03g031690*, *Sb03g0031700* e *Sb03g006765*. Análises de associação identificaram SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) nos genes *SbPSTOL1* significativamente associados a diferentes características de morfologia radicular. Nos genes *Sb03g0031690* e *Sb03g006765*, foram identificados SNPs associados ao diâmetro radicular e à área de superfície. Em *Sb03g006765* foram observados efeitos alélicos consistentes em relação a características de área de superfície e produção de grãos avaliada em solo sob baixa disponibilidade de P. Por meio de mapeamento de QTLs (Quantitative Trait Loci) para características múltiplas relacionadas à eficiência da aquisição de fósforo em sorgo, os genes *Sb03g031700*, *Sb03g031690*, *Sb03g031680*, *Sb03g031670* e *Sb03g006765* foram co-localizados com QTLs relacionados ao aumento da área de superfície do sistema radicular e produtividade de grãos. Já o gene *Sb07g002840* foi co-localizado com QTLs para diâmetro da raiz e produtividade de grãos (Bernardino et al., 2019). Esses resultados suportam o papel dos genes *SbPSTOL1* na tolerância ao estresse de P em sorgo.

Em milho, a superexpressão do gene *Sb03g006765* foi correlacionada positivamente com o aumento no comprimento e superfície do sistema radicular e redução do diâmetro médio das raízes em comparação com o controle, sugerindo uma correlação positiva entre a expressão do transgene e alterações na morfologia radicular relacionadas ao estresse de P. As plantas de

milho superexpressando *SbPSTOL1* apresentaram um maior acúmulo de biomassa da parte aérea em solo com baixo P, em comparação com o controle (Maciel, 2019).

Estudos *in silico* mostraram que a similaridade entre as sequências da proteína PSTOL1 de sorgo e arroz deve-se, principalmente, a presença de domínio citoplasmático serina/treonina quinase conservado nas duas proteínas. Apesar da conservação dos domínios quinase, a predição estrutural *in silico* mostrou a presença de domínios distintos nas proteínas SbPSTOL1 em comparação com a proteína descrita em arroz (Hufnagel et al., 2014). Além do domínio quinase conservado, as proteínas SbPSTOL1 são polimórficas para a presença de peptídeo sinal, domínio transmembrana e os domínios extracelulares, *Wall-associated receptor kinase domain* (WAK_association) e *Galacturan binding domain* (GUB-WAK-bind). O domínio WAK_association é encontrado em todas as proteínas SbPSTOL1, com exceção de *Sb07g02840*, enquanto o domínio (GUB-WAK-bind) se mostrou exclusivo em *Sb03g006765* e *Sb03g031700*. Os domínios extracelulares WAK_association e GUB-WAK-bind, ausentes em arroz, estão presentes nas proteínas PSTOL1 em trigo, sugerindo uma maior proximidade evolutiva entre as proteínas de sorgo e trigo, e uma divergência com as proteínas de arroz e milho (Abbas et al., 2022). Uma análise filogenética alocou as proteínas SbPSTOL1 na família de quinases receptoras, RLK (Maciel, 2019).

3.6 Proteínas quinase e a relação com tolerância a estresses

As proteínas quinases são enzimas essenciais em plantas e regulam diversos processos celulares por meio da fosforilação de proteínas-alvo, alterando de forma reversível sua função, localização, estabilidade ou interações com outras moléculas (Lehti-Shiu et al., 2012). A fosforilação está relacionada a diversas vias de sinalização celular envolvidas no desenvolvimento, crescimento, metabolismo e respostas a estímulos ambientais (Afzal et al., 2008; Hardie, 1999).

Em plantas, as quinases são essenciais para a percepção de estresses abióticos, como aqueles causados por seca, salinidade e temperatura. Essas enzimas fazem parte de complexos de sinalização, transferindo sinais de receptores na superfície celular para o núcleo, o que ativa vias de resposta ao estresse e altera a expressão gênica (Afzal et al., 2008; Sinha et al., 2011). Essas cascatas de sinalização permitem que as plantas modifiquem processos fisiológicos, como regulação estomática, defesa contra estresse oxidativo e equilíbrio hormonal (Xu &

Zhang., 2015; Meng & Zhang., 2013). As proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPKs) são módulos de sinalização altamente conservados em eucariotos. MAPKs estão envolvidas em todos os estágios da vida da planta, como a gametogênese, a embriogênese a senescência. As cascatas MAPK envolvem três proteínas quinase em atividade sequencial, onde uma quinase fosforila a próxima, amplificando o sinal (Xu & Zhang, 2015). As MAPKs estão associadas à tolerância de estresses desencadeados por patógenos em tabaco (*Nicotiana benthamiana*) e arroz (Nakagami et al., 2005).

A superfamília de quinases receptoras RLK/pelle é a maior família de genes em *Arabidopsis* e arroz, compreendendo mais de 600 e 1100 genes, respectivamente (Lehti-shiu et al., 2005). Essa família pode ser dividida nas subfamílias RLK (*Receptor like Kinase*) e RLCK (*Receptor Like Cytoplasmic Kinase*). As RLKs são proteínas que apresentam domínio quinase citoplasmático, domínio transmembrana e domínio extracelular. As RLCKs são proteínas que apresentam o domínio quinase citoplasmático, porém não apresentam domínios extracelulares (Shiu & Bleeker, 2001). Os domínios extracelulares possivelmente permitem a interação das proteínas RLK com estímulos extracelulares. Esses estímulos podem partir da própria planta, como é o caso da interação entre a proteína CLAVATA3 e a proteína RLK CLAVATA1, que causa a restrição da proliferação do meristema (Ogawa et al., 2008). As RLKs estão envolvidas na percepção de sinais associados a patógenos, como a flagelina, quitina e peptidoglicanos (Zipfel et al., 2006; Madsen et al., 2003).

Os genes *SbPSTOLI* fazem parte da subfamília RLK, de acordo com análises filogenéticas, e apresentam similaridades com outro grupo de proteínas RLK, as WAKs. As quinases associadas à parede celular (WAKs) são uma classe de quinases especializada que possuem domínios de associação à parede celular (Kanneganti & Gupta, 2008). As proteínas WAK possuem domínios extracelulares que se ligam às pectinas que compõem a parede celular, um domínio transmembrana e um domínio quinase intracelular. A despolimerização enzimática das pectinas, bem como alterações no ambiente iônico, muitas vezes relacionado à infecção por patógenos, podem modular a sinalização a partir das WAKs (Decreux & Messiaen, 2005; Lally et al., 2001). Ao detectar mudanças na parede celular, os WAKs iniciam a fosforilação de proteínas-alvo, ativando vias de sinalização que mediam respostas ao estresse, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a expressão de genes relacionados à defesa (Decreux & Messiaen, 2005; Brutus et al., 2010).

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da superexpressão do gene *SbPSTOL1* no fenótipo do sistema radicular e na tolerância a estresses abióticos em plantas de sorgo.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar efeitos gerais da superexpressão do gene *SbPSTOL1* na morfologia radicular.

Avaliar a eficiência dos eventos na utilização de P.

Avaliar o desempenho dos eventos em situação de estresse hídrico.

5. Materiais e Métodos

5.1 Transformação Genética de Sorgo

As transformações de sorgo foram feitas utilizando as construções UbiZm::6765-Flag::NOS e UbiZm::Flag::NOS. A construção UbiZm::6765-Flag::NOS é composta pelo promotor constitutivo da ubiquitina de milho (UbiZm) dirigindo a expressão do gene *Sb003g006765* (6765 – região codante) fusionada (::) traducionalmente à tag Flag e, por fim, contendo o terminador NOS. A construção UbiZm::Flag::NOS não possui a sequência do gene *Sb003g006765*, e as plantas transformadas com essa construção possuem função de controle negativo (vetor vazio, VTVZ). As construções foram inseridas no vetor binário p7o2x35s (Figura 1), que contém em sua estrutura o gene *BAR*, que confere resistência ao herbicida amônio-glufosinato (PPT) e possui função na seleção dos eventos transformados (Dröge et al., 1992)

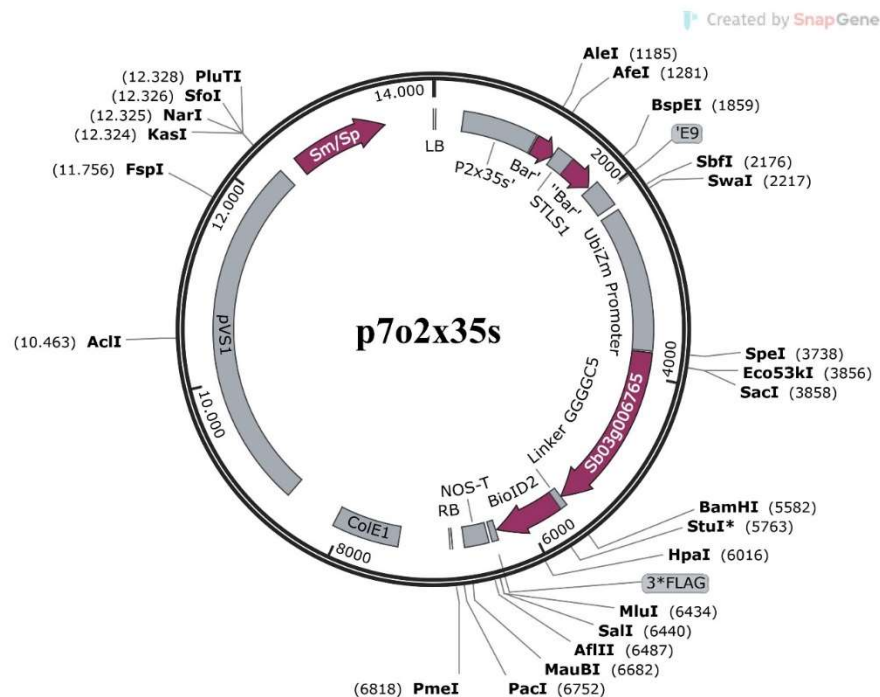


Figura 1: Representação esquemática do vetor binário p7o2x35s, utilizado na transformação genética dos eventos de sorgo. Nesse vetor, o gene *BAR* (*Bar'*, ''*Bar'*'') é controlado pelo promotor 35s (*P2x35s'*) e o gene *SbPSTOLI* (*Sb03g06765*) é controlado pelo promotor constitutivo da ubiquitina de milho (*UbiZm Promoter*). A sequência do gene *SbPSTOLI* controlado pelo promotor da ubiquitina de milho é ausente na construção inserida nas plantas vetor vazio (VTVZ).

O processo de transformação genética foi feito em embriões imaturos da linhagem de sorgo P898012, por meio de *Agrobacterium tumefaciens* (EHA101) conforme descrito por Do et al. (2016). Sementes imaturas obtidas da linhagem P898012 foram esterilizadas por 15 minutos em solução de hipoclorito 50% sob leve agitação. Os embriões imaturos foram excisados da semente e colocados em microtubos de 1,5 ml. Os microtubos foram preenchidos com solução contendo *A. tumefaciens* transformada com o gene de interesse. Os microtubos contendo os embriões imaturos e *A. tumefaciens* foram colocados em local escuro por 15 minutos - período em que os embriões imaturos são transformados pela bactéria. Os embriões foram removidos dos microtubos e colocados em placas de petri com meio sólido para a seleção dos transformantes. O gene *Bar*, presente na construção inserida no embrião imaturo, é utilizado como agente de seleção, possibilitando a eliminação dos embriões não transformados pelo herbicida e selecionando os transformados. Os embriões resistentes foram então regenerados, desenvolvendo parte aérea e raiz, e posteriormente transplantados em solo em casa de vegetação para que o ciclo da planta se complete. As sementes geradas pelas plantas transformadas são

hemizigotas para as respectivas construções e a prole da planta transformada foi denominada como geração T0. Neste trabalho, as plantas transformadas são referidas como eventos.

5.2 Teste dos primers

Para os ensaios de PCR para confirmação dos eventos transgênicos, foram desenhados dois *primers forward* anelando na sequência codante do gene *Sb003g006765* e dois *primers reverse*, anelando na sequência Flag. O teste foi feito utilizando diferentes temperaturas de anelamento e diferentes combinações de *primers forward* e *reverse*, em DNA plasmidial UbiZm::6765-Flag::NOS. Ao final, as combinações de primers e temperaturas de anelamento que resultaram em um produto de amplificação do peso molecular esperado foram escolhidas.

5.3 Seleção dos eventos homozigotos

Para a seleção dos eventos homozigotos, foi conduzido um teste de progênie em 16 sementes de cada um dos eventos da geração T0. As sementes foram plantadas em bandejas de germinação e, após o desenvolvimento inicial da parte aérea, foi feita aplicação do herbicida amônio-glufosinato (200 mg/l). Após a eliminação das plantas sensíveis ao herbicida que, portanto, não possuíam o transgene, as plantas transgênicas foram transplantadas em vasos maiores.

Após o crescimento da parte aérea por um período de 4 semanas, foram extraídos discos foliares de todas as plantas extraído o DNA genômico. A seleção das plantas contendo o transgene em homozigose foi realizada utilizando-se uma curva padrão de quatro pontos, obtida a partir de uma diluição seriada (1:10, 1:100 e 1:1000), contendo 100.000, 10.000, 1.000 e 100 cópias de DNA genômico de sorgo de P898012 transformado com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS. As reações foram conduzidas no equipamento QuantStudio™ 6 Flex System Real-Time PCR (Applied Biosystems), com três repetições técnicas por evento. As reações foram feitas com 10 ng de DNA genômico, Fast SYBR™ Green Master Mix 2X (Applied Biosystems), 2,5 pmol de cada primer, com um volume final de 10 µl. Considerando que o conteúdo 2C de DNA de sorgo = 1,67 pg de DNA, 10ng de DNA genômico corresponderá a, aproximadamente, 100.000 cópias genômicas. Nesse caso, quando plotadas na curva, amostras que tiverem o transgene em homozigose apresentaram valores próximos a 25.000 cópias enquanto as hemizigotas tiveram valores próximos a 12.500 cópias. Das plantas selecionadas

como homozigotas, foram retiradas novamente 16 sementes e submetidas a um novo teste de progênie, com o uso do herbicida para confirmação de que os eventos selecionados não eram segregantes para o transgene.

Foram gerados 45 eventos homozigotos para a construção UbiZm::6765-Flag::NOS e 13 eventos homozigotos para a construção UbiZm::Flag::NOS na linhagem de sorgo P898012. Os eventos com o transgene em homozigose foram classificados como geração T1. Os eventos T1 foram multiplicados por autofecundação, que produziu a geração T2.

5.4 Análise da morfologia de raiz e acúmulo de biomassa em sistema de hidroponia em condições de baixo e alto fósforo

As sementes transgênicas e homozigotas para a construção UbiZm::6765-Flag::NOS foram caracterizadas com base na morfologia radicular e no acúmulo de biomassa. A avaliação das características morfológicas da raiz foi feita de acordo com Sousa et al (2012), com o cultivo das plantas em solução nutritiva em dois tratamentos: Alto (250 μ M) e baixo (2,5 μ M) fósforo (P).

Foi feito um delineamento inteiramente casualizado, onde cada evento possuía três repetições biológicas. Para a avaliação, foram selecionados os eventos: 3.4, 6.10, 7.1, 8.7, 9.5, 10.3, 12.8, 14.8, 15.1, 16.10, 17.4, 18.1, 24.9, 25.10, 26.10, 27.4, 28.7 e 32.6. Totalizando 18 eventos, com três repetições por evento. Para o controle foi utilizado o tipo selvagem (*wild type*, WT), que corresponde à linhagem P898012 não transformada e o evento VTVZ (vetor vazio), transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS, que é o vetor de transformação sem o gene *Sb003g006765*. Foram separadas 90 sementes de cada um desses eventos e dos controles. As sementes foram colocadas em béqueres contendo solução de hipoclorito de sódio 0,5% (w/v), e mantidas sob agitação em um *shaker* por 5 minutos, para a desinfecção e, em seguida, lavadas por 10 vezes com água destilada. Após a desinfecção, as sementes foram transferidas para papel de germinação umedecido, que foi posteriormente enrolado e colocado em béqueres com água para germinação, por quatro dias em câmara de germinação em uma temperatura de 30° C e 12 horas de fotoperíodo.

Após a germinação, foram selecionadas 9 plantas morfológicamente similares, totalizando três repetições com três plântulas por repetição, para cada evento, por tratamento. As plântulas foram cultivadas em sistema de hidroponia, como descrito por de Sousa e

colaboradores (2012), com a utilização de pastas de papel colocadas em um recipiente de 15 l preenchido com 5 l de solução nutritiva Magnavaca modificada (Magnavaca et al., 1987) com duas concentrações de P: baixo P (2,5 μM) e alto P (250 μM). A solução nutritiva foi trocada a cada três dias, com o pH da solução mantido a 5.6. As condições da câmara de crescimento foram ajustadas para 12 horas de fotoperíodo, 330 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa, sob contínua aeração, com temperatura diurna de $27 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e temperatura noturna de $20 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

O sistema radicular das plântulas foi avaliado 13 dias após a montagem do experimento. Após a remoção da parte aérea, as plantas de cada repetição foram colocadas em uma bandeja transparente de acrílico com 500 ml de água, posicionada no *scanner* EPSON E100 EXPRESSION (Epson America, Inc.) e as imagens das raízes foram adquiridas através do *software* WinRhizo (<http://www.regent.qc.ca/>). As imagens foram processadas utilizando o mesmo *software*. As características de morfologia da raiz avaliadas foram comprimento total (cm), diâmetro médio (mm) e área de superfície (cm^2). Após o escaneamento, a parte aérea e raízes de cada repetição foram colocadas separadamente em sacos de papel para secagem à $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por três dias em estufa com circulação de ar. O material seco foi pesado e os dados tabulados.

Em um segundo experimento em delineamento inteiramente casualizado, foram utilizadas as gerações T1 e T2 dos eventos 3.5, 7.1 e 7.5, com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS. Para o controle foram utilizadas as linhagens de sorgo Btx399, Btx635 e P898012 não transformadas. As linhagens Btx399 e Btx635 são tolerantes e sensível ao estresse de P, respectivamente, e foram utilizadas como controle experimental e para avaliar comparativamente o desempenho da linhagem P898012. Foi utilizado também como controle o evento VTVZ, transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS. Os eventos foram cultivados apenas em tratamento de baixo P no segundo experimento.

5.5 Análise de expressão das plantas transformadas e controles

Seguindo a mesma metodologia do experimento para a avaliação da morfologia radicular em sistema de hidroponia, foi montado um outro experimento, utilizando plantas das gerações T1 e T2 dos eventos 3.4, 7.1 e 28.7 transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS. Para controle foi utilizada uma planta não transformada da linhagem P898012 e o evento VTVZ (vetor vazio), transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS. As plantas foram cultivadas apenas em tratamento de baixo P (2,5 μM). Após 13 dias de crescimento, as

raízes das plantas foram coletadas, colocadas em papéis alumínio e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido.

A extração de RNA foi feita utilizando o kit de extração *SV Total RNA Isolation System*TM (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Após a obtenção do RNA, o processo de transcrição reversa foi feito utilizando o kit *High-Capacity RNA-to-cDNA*TM (Thermo Fisher), de acordo com as instruções do fabricante.

A análise de expressão foi feita com três repetições técnicas para todos os eventos e o controle, com a utilização de dois pares de *primers* diferentes. Foram utilizados primers para o gene de tolerância ao herbicida amônio glufosinato (BAR) e para o gene *Sb003g006765*. A reação foi preparada utilizando o kit Fast SYBRTM (Bio-Rad) no equipamento QuantStudioTM 6 Flex System Real-Time PCR (Applied Biosystems).

A expressão do gene foi calculada com a fórmula $\Delta Ct = Ct(\text{alvo}) - Ct(\text{referência})$. Para o valor de $\Delta\Delta Ct$ foi estabelecido um valor de expressão basal, utilizando os valores do controle endógeno. A expressão relativa foi obtida pela equação de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen., 2001).

5.6 Análise da morfologia de raiz e acúmulo de biomassa em solo com baixa disponibilidade de P em sistema de tubos

Os eventos 3.4, 7.1 e 28.7, transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS e o evento controle, transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS (vetor vazio, VTVZ), foram selecionados para o experimento. Os eventos foram cultivados individualmente em unidades de tubos PVC (Figura 2), compostas de quatro anéis de 25 cm de diâmetro e 20 cm de altura. O experimento foi feito em casa de vegetação, com temperaturas variando entre 23°C (dia) e 28°C (noite) e os tubos foram irrigados três vezes por semana. O experimento foi montado em blocos casualizados.

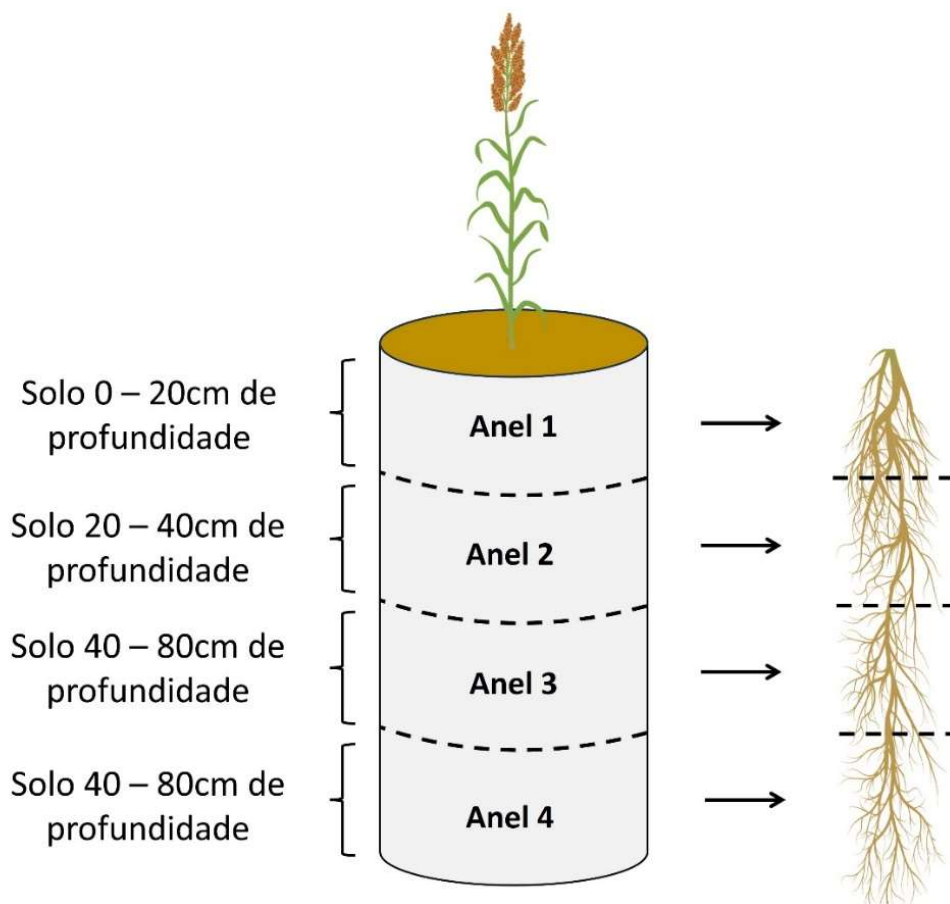


Figura 2: Ilustração do sistema de plantio em tubos dos eventos transformados, em solo com baixa disponibilidade de fósforo (P). Os anéis foram preenchidos com solo da respectiva camada e unidos com fita adesiva, resultando em uma unidade experimental de 80 cm de altura. Ao final do experimento, a fita adesiva foi retirada para a separação dos anéis e um fio de metal foi utilizado para seccionar a terra e a raiz entre os anéis. Foram utilizadas 3 camadas de solo com alta fixação de P (latossolo vermelho distrófico, Santos et al., 2013). As camadas de solo em profundidade de 0 – 20 e 20 – 40 cm foram utilizadas para preencher os anéis 1 e 2, respectivamente. A camada em profundidade de 40-80 cm foi utilizada para preencher os anéis 3 e 4.

Antes da montagem das unidades experimentais, as camadas de solo coletadas foram tratadas para neutralizar o Al^{3+} , a fim de isolar o efeito do estresse de P na arquitetura e morfologia radicular. No solo da camada 0-20 cm foi feita calagem com $6,0 \text{ mg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de calcário dolomítico (CaO 42%, MgO 8%, ECCE - silicato de cálcio e magnésio- 80%), recomendado com base em análises de solo e de acordo com o método para a neutralização de Al^{3+} e aumento no conteúdo de Mg e Ca (Alvarez et al., 1999). Adicionalmente, $3,50 \text{ mg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de gesso agrícola (Ca 17%, S 14%) foi utilizado como suplemento de cálcio e enxofre. Cinco e dez $\text{Mg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de gesso (sulfato de cálcio) foi adicionado ao solo proveniente das camadas 20-40 cm e 40-80 cm, respectivamente. Os anéis foram unidos utilizando fita adesiva, possibilitando a separação dos mesmos, com um fio de metal.

A adubação de cobertura foi feita na semeadura, utilizando N-P-K + FTEBR12 (N - $50 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de ureia, P_2O_5 - $200 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de superfosfato triplo [STP], K_2O - $240 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de KCl e

FTEBR12 - 100 kg.ha⁻¹). A aplicação de N (200 mg.dm⁻³) na forma de ureia foi feita 15 e 30 dias após a germinação. O anel 1, no topo da unidade, foi preenchido com a camada de 0-20 cm de profundidade de solo argiloso (64% de argila), com alta fixação de P (Latossolo Vermelho Distrófico, Santos et al., 2013), que é naturalmente encontrado no Cerrado. O anel 2 foi preenchido com solo da camada 20-40 cm. Os anéis 3 e 4 foram preenchidos com solo da camada 40-80 cm. Os anéis foram unidos com fita adesiva. As concentrações de P no solo foi entre 3,04 e 5,36 mg.dm³ no anel 1, entre 0,74 e 1,14 mg.dm³ no anel 2 e entre 0,36 e 1,68 mg.dm³ no anel 3 (Hufnagel et al., 2024).

Para a coleta, os anéis foram separados com um fio de metal e as raízes lavadas separadamente com água, para remover o solo aderido. O escaneamento e a análise de morfologia radicular dos anéis 1, 2, 3 e 4 foi feita através do *software* WinRHIZO, de acordo com a forma descrita no tópico “Análise da morfologia de raiz e acúmulo de biomassa em sistema de hidroponia em condições de baixo e alto fósforo” com as plantas cultivadas em solo, nesse caso. As características radiculares avaliadas foram: comprimento total, área de superfície e diâmetro médio. Os dados do anel 4 foram descartados devido a um acúmulo das raízes no fundo das bandejas nas quais o os anéis 4 foram alocados. Dados de produção de grãos em condição de baixo P foram obtidos após a secagem das panículas em estufa a 65° com circulação de ar por cinco dias.

5.7 Análise de características fisiológicas e de morfologia radicular e acúmulo de biomassa em solo sob irrigação e estresse hídrico

Foram selecionados os eventos 3.4, 7.1, 27.4 e 28.7, transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS e o evento VTVZ (vetor vazio), transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS, para controle. O experimento foi montado em blocos casualizados, com três repetições por evento e três plantas por repetição, para o tratamento irrigado e estressado. Dez sementes foram semeadas por vaso, as plantas excedentes foram desbastadas após duas semanas, restando três plantas por vaso.

A medição do nível de umidade do solo, utilizando o medidor de umidade *Water Mark soil moisture meter* (Irrometer Company, INC.), teve início após a irrigação dos vasos até a capacidade de campo (saturação hídrica), um mês após a semeadura, e ocorreu diariamente até o fim do experimento. O estresse hídrico teve início três dias após o início da medição da

umidade. O volume de água utilizado para os grupos irrigado e estressado foram 600 ml e 300 ml, respectivamente, com a irrigação ocorrendo duas vezes na semana.

Foram feitas duas medições separadas das características fisiológicas da parte aérea num período de cinco e dez dias após o início do estresse hídrico. Para medir o teor de clorofila foi utilizado o equipamento *Chlorophyll meter* SPAD 502 (Konica Minolta). A eficiência do fotossistema II foi medida utilizando o *Fluor pen* FP100 (*Phonton Systems Insruments*). A taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração, temperatura foliar e eficiência do uso de água foram medidas utilizando o (IRGA) LI-6400 (LI-COR) *Infra Red Gas Analyser*. As medições feitas com o IRGA tiveram duração dois dias em função do grande número de plantas.

O experimento foi colhido 48 dias após a semeadura. Nesse período, foram feitas medições do diâmetro do colmo, área foliar e peso verde. Em paralelo, foi feito o processamento das raízes para análise. As raízes foram separadas do solo manualmente e posteriormente lavadas para remover o solo aderido. O escaneamento das raízes e a medição das características radiculares foram feitos como *software* WinRHIZO, de acordo com a descrição no tópico “Análise da morfologia de raiz e acúmulo de biomassa em sistema de hidroponia em condições de baixo e alto fósforo”. Foram avaliadas as características morfológicas radiculares, comprimento total, área de superfície, diâmetro médio e acúmulo de biomassa seca.

5.8 Análises Estatísticas

As análises de variância (ANOVA) para as características relacionadas à morfologia radicular das plantas transformadas com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS em delineamento de blocos casualizados foram realizadas com o auxílio do pacote ExpDes (Ferreira., 2014) do *software* R (R Core Team, 2023). Para a comparação dos valores entre evento e controle, foi utilizado o teste Dunnett. $\alpha = 0,05$ e $0,01$.

6. Resultados

6.1 Análise de Expressão dos genes *Sb003g006765* e *BAR*

Para melhor compreender os efeitos do gene *PSTOL1* na morfologia radicular de sorgo, plantas de sorgo do genótipo P898012 foram transformadas com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, composta pelo promotor da ubiquitina, a sequência codante do gene *Sb003g006765*

fusionada à *tag BIOD-Flag* e por fim o terminador NOS. Presente nessa construção está também o gene *BAR*, controlado pelo promotor 35s. Com a fusão do promotor da ubiquitina com o gene *Sb003g006765*, espera-se a expressão constitutiva de *PSTOL1* (Tsuda et al., 2022), possibilitando a avaliação do fenótipo mutante. O mesmo pode ser observado para o *BAR*. Após a seleção dos eventos homozigotos para o transgene, foi feita uma análise de expressão utilizando primers para a sequência de cDNA do gene *SbPSTOL1* e do gene de seleção *BAR* (Figura 3).

Foram escolhidas as gerações T1 e T2 dos eventos 3.4, 7.1 e 28.7, transformados com a construção *UbiZm::6765-Flag::NOS*. Como controle, foram selecionados um evento transformado com a construção *UbiZm::Flag::NOS* (VTVZ) e uma planta da linhagem P898012 não transformada (WT). Os resultados de expressão apresentados para o gene *SbPSTOL1* (Figura 3A), apontam uma grande diferença na expressão dos eventos transformados com a construção *UbiZm::6765-Flag::NOS* em relação aos controles, com valores de expressão 12 vezes maiores que os controles WT e VTVZ. A diferença entre os níveis de expressão confirma a superexpressão do gene *SbPSTOL1* dos eventos transformados. Os valores basais de expressão do gene *SbPSTOL1* nos controles é esperado, e deve-se à expressão endógena do gene *Sb03g006765* em sorgo. Não foi identificado um padrão que reforce a influência geracional nos valores de expressão das plantas T1 e T2, logo, não podemos afirmar neste experimento que a expressão do gene *SbPSTOL1* transformado é influenciado pela geração da planta.

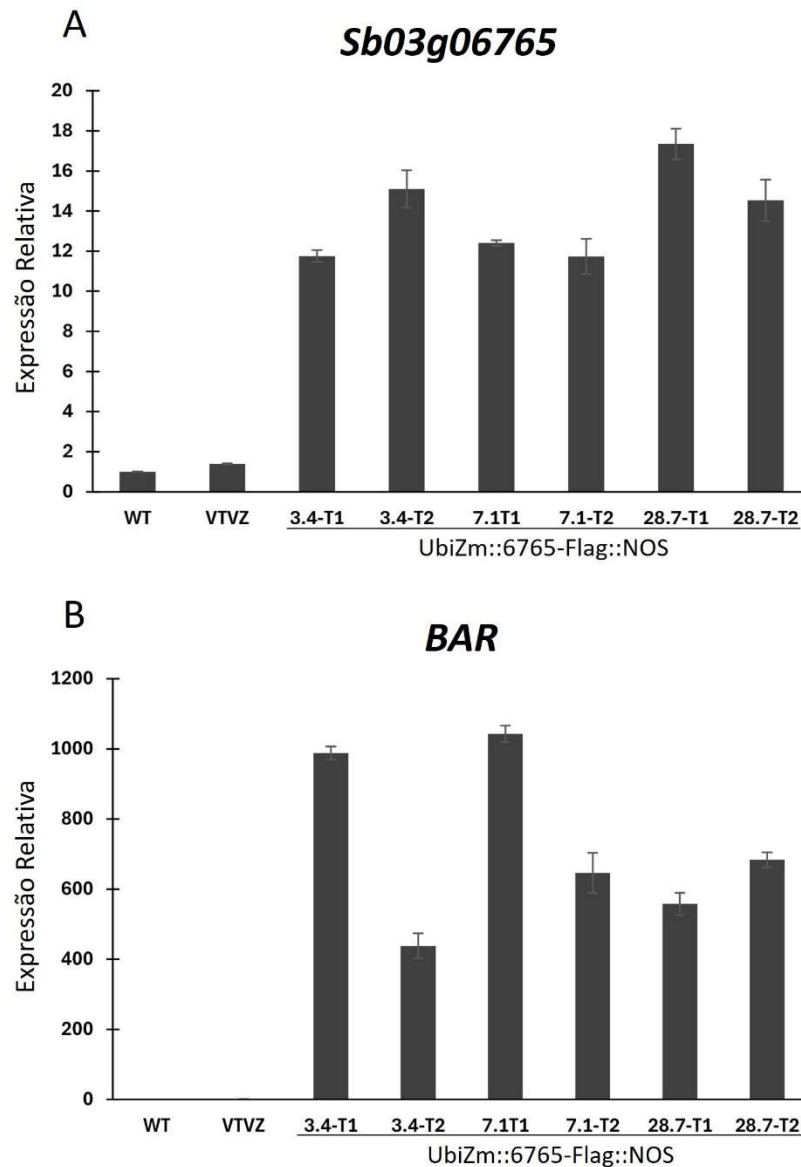


Figura 3: Expressão relativa dos genes *SbPSTOL1* e *BAR* em diferentes eventos transgênicos da linhagem P898012 transformadas com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, nas gerações T1 e T2. Como controle, foram utilizadas plantas de sorgo não transformadas (tipo selvagem, *wild type* - WT) e uma planta transformada com a construção UbiZm::Flag::NOS (vetor vazio, VTVZ). As plantas foram cultivadas em sistema de hidroponia em baixo fósforo. **(A)** Expressão relativa do gene *SbPSTOL1* (*Sb03g006765*). A expressão de *SbPSTOL1* nos controles (WT e VTVZ) é devida à expressão endógena do gene *Sb03g006765*. **(B)** Expressão relativa do gene *BAR*. Os valores de WT e VTVZ foram de 0,04 e 1,04, respectivamente. Valores de expressão relativa foram obtidos através do método $\Delta\Delta Ct$, utilizando o genótipo WT como normalizador para o gene *Sb03g006765* e o evento VTVZ como normalizador para o gene *BAR*. Os valores de expressão demonstrados equivalem à média de três réplicas biológicas.

Na Figura 3B, pode-se observar os valores de expressão do gene *BAR*, que confere resistência ao herbicida amônio glufosinato (PPT). O gene *BAR* tem como principal função a seleção de eventos transformados durante o processo de transformação com *A. tumefaciens* e a seleção de eventos homozigotos para o transgene, por meio de tratamento com herbicida. A expressão do gene *BAR* pode ser verificada em níveis maiores nos eventos transformados. O

evento VTVZ (vetor vazio), apesar de apresentar valores de expressão menores quando comparado com os eventos transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, também está expressando o gene *BAR*. Os eventos transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS apresentaram valor médio de expressão para o gene *BAR* 700 vezes maior que o evento VTVZ, que por sua vez apresentou um valor de expressão 20 vezes maior que a linhagem não transformada.

As plantas selecionadas para as análises de expressão foram testadas previamente em casa de vegetação, onde foram expostas ao herbicida glufosinato de amônio. Os eventos transformados com as construções UbiZm::6765-Flag::NOS e UbiZm::Flag::NOS (VTVZ) apresentaram resistência ao herbicida, enquanto a planta não transformada (WT) não sobreviveu à exposição.

Os resultados da análise de expressão permitiram confirmar a superexpressão dos genes *SbPSTOL1* e *BAR* nas plantas transformadas, demonstrando o sucesso da transformação genética dos eventos de sorgo e demonstrando a adequação do material para o estudo dos efeitos fenotípicos advindos da superexpressão do gene *SbPSTOL1* em sorgo.

6.2 Análise da morfologia de raiz e acúmulo de biomassa em hidroponia em condições de baixo e alto fósforo

Para avaliar o efeito da superexpressão do gene *SbPSTOL1* em sorgo, foram realizados dois experimentos para avaliar a morfologia radicular dos eventos transformados em sistema de hidroponia. No primeiro experimento, foram utilizados 18 eventos de sorgo transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS e uma planta não transformada como controle. Esses genótipos foram cultivados em solução nutritiva em tratamentos de alto e baixo fósforo, a fim de verificar o efeito da superexpressão de *SbPSTOL1* em relação à morfologia radicular das plantas nos diferentes tratamentos (Figura 4 e 5). A partir dos valores obtidos para comprimento total da raiz (CT), área de superfície (AS), diâmetro médio (DM), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST) foram realizadas análises de variância. No experimento 1 (Tabela 1) o efeito de bloco foi significativo apenas para DM. O efeito de tratamento, o qual contrasta a média geral de cada característica em alto e baixo P, foi significativo para CT, AS, MSR e MST. O efeito de evento, que descreve as diferenças entre os genótipos transgênicos avaliados, foi significativo para as características CT, AS, MSR e MST, enquanto o efeito da interação tratamento x evento foi significativo para

CT e AS. As características CT, MSPA e MST apresentaram coeficiente de variação (CV) considerado elevado para essas características.

Tabela 1: Análise de variância (ANOVA) para as características comprimento total (CT), área de superfície total (AS), diâmetro médio (DM), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST) dos eventos de sorgo transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS e a linhagem não transformada, em condição de alto (250 μ M) e baixo P (2,5 μ M) em solução nutritiva.

Fonte de Variação	Quadrado Médio					
	CT (cm)	AS (cm ²)	DM (mm)	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)
Bloco	2354	10	0,00054**	0,0033	0,00004	0,0026
Tratamento	47177**	588**	0,00023	0,0006	0,00131*	0,0037
Evento	9789*	223**	0,00013	0,0014	0,00091**	0,0026
Tratamento x Evento	10159**	342**	0,00012	0,0013	0,00049	0,0020
Resíduo	5040	32	0,00008	0,0018	0,00032	0,0027
CV	20,41%	11,65%	6,16%	38,27%	14,91%	22,37%

CV: Coeficiente de variação. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

O primeiro experimento foi feito com 18 eventos de sorgo da linhagem P898012, transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, e uma planta não transformada como controle (tipo selvagem, *wild type* - WT). O sistema radicular das plantas foi avaliado em relação à área de superfície (Figura 4A) e diâmetro médio (Figura 4B). Em condição de baixo P, os eventos 12.8 e 27.4 apresentaram aumento da área de superfície da raiz, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação à linhagem não transformada (Figura 4A), enquanto os eventos 26.10 e 28.7 apresentaram redução da área de superfície da raiz na mesma condição (Figura 4A). Em condição de alto P, os eventos 15.1 e 26.10, apresentaram aumento na área de superfície da raiz em comparação à linhagem não transformada (Figura 4A), enquanto os eventos 12.8 e 24.9 apresentaram redução da área de superfície da raiz na mesma condição (Figura 4A). Os eventos transformados não apresentaram diferenças estatisticamente significativo quanto ao diâmetro médio quando comparados com a planta não transformada, nas condições de alto e baixo P (Figura 4B).

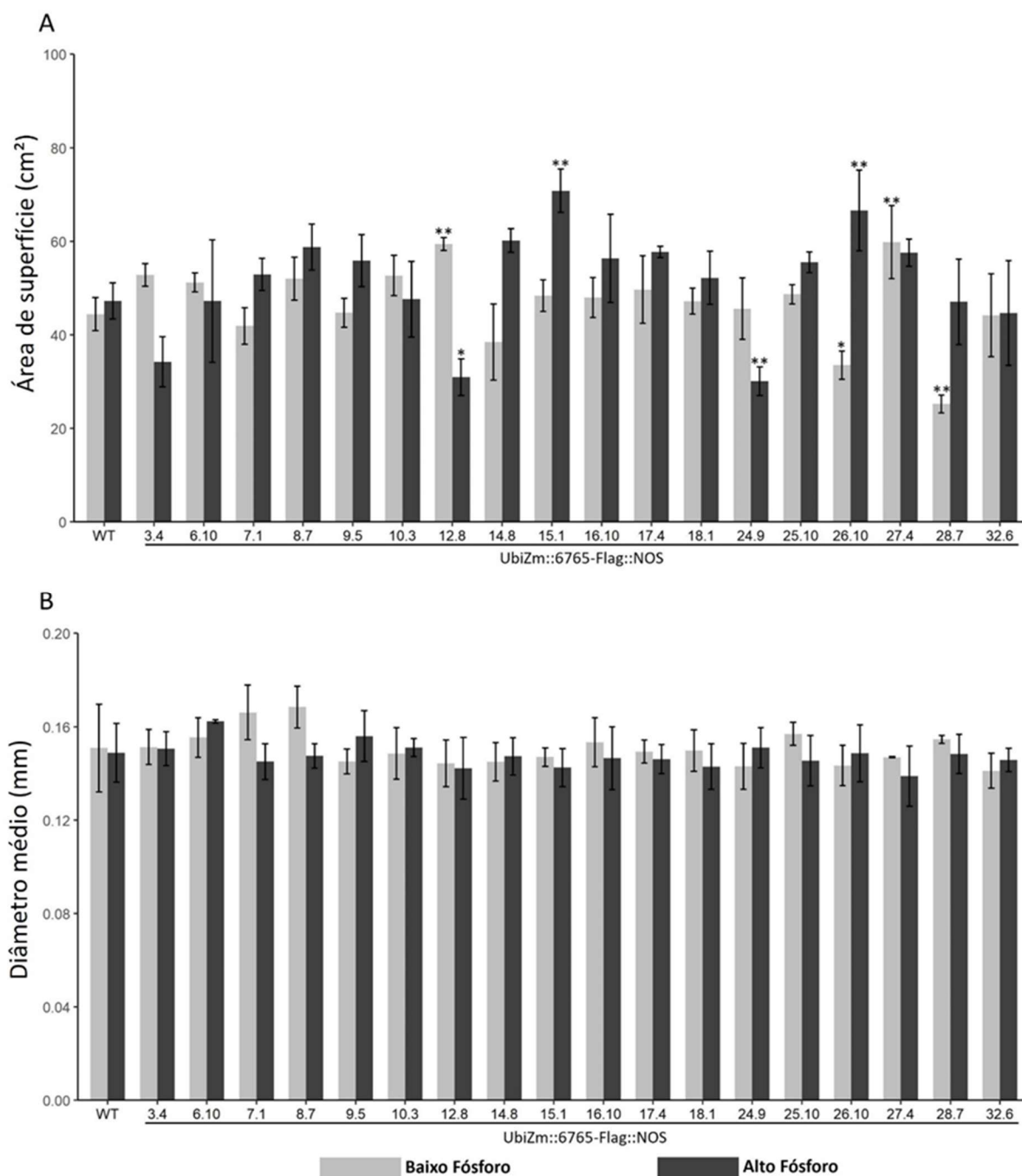


Figura 4: Caracterização fenotípica do sistema radicular de plantas de sorgo da linhagem P898012 não transformada (tipo selvagem, *wild type* - WT) e transformadas com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, cultivadas em solução nutritiva com tratamento de alto (250 μ M) e baixo fósforo (P, 2,5 μ M), por um período de 13 dias. Foram utilizadas três repetições biológicas para os eventos transformados e seis para a linhagem não transformada. O teste Dunnett foi utilizado para comparar as médias dos eventos transformados com a linhagem não transformada, dentro dos respectivos tratamentos (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). **(A)** Área de superfície total do sistema radicular dos eventos transformados e da linhagem P898012 não transformada cultivados em tratamento de alto e baixo P. **(B)** Média do diâmetro do sistema radicular dos eventos transformados e da linhagem não transformada cultivados em tratamento de alto e baixo P.

O acúmulo de massa seca da parte aérea e da raiz dos eventos transformados cultivados em solução hidropônica em condição de alto e baixo P foi avaliado (Figura 5). A massa seca da

parte aérea (Figura 5A) do evento 27.4 apresentou aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em comparação com a linhagem não transformada em tratamento de baixo P, enquanto no evento 26.10 verificou-se aumento na massa seca da parte aérea estatisticamente significativo em comparação com a linhagem não transformada em tratamento de alto P (Figura 5A). A massa seca da raiz (Figura 5B) do evento 27.4 apresentou aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em comparação à linhagem não transformada em tratamento de baixo P. O evento 28.7 apresentou redução da massa seca da raiz sob as mesmas condições (Figura 5B). Os eventos cultivados em condição de alto P não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na massa seca da raiz em relação à linhagem não transformada.

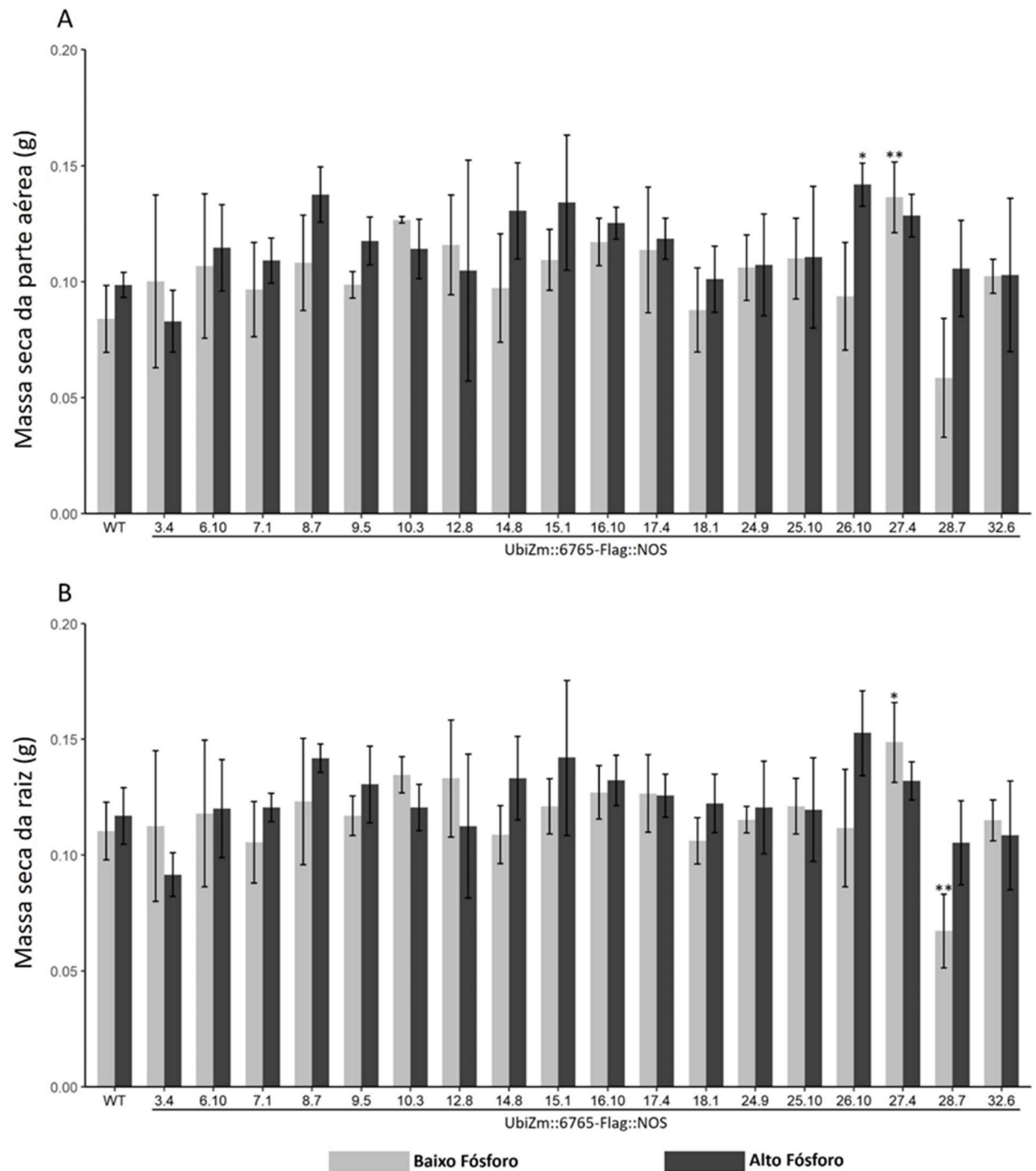


Figura 5: Caracterização da biomassa seca da parte aérea e do sistema radicular de plantas de sorgo da linhagem P898012 não transformada (tipo selvagem, *wild type* - WT) e transformada com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, cultivadas em solução nutritiva com tratamento de alto (250 μ M) e baixo fósforo (P, 2,5 μ M), por um período de 13 dias. Foram utilizadas três repetições biológicas para os eventos transformados e seis para o linhagem não transformada. O teste Dunnnett foi utilizado para comparar as médias dos eventos transformados com a linhagem não transformada, dentro dos respectivos tratamentos (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). **(A)** Média da massa seca da parte aérea dos eventos transformados e linhagem não transformada cultivados em tratamento de alto e baixo P. **(B)** Média da massa seca do sistema radicular dos eventos transformados e linhagem não transformada cultivados em tratamento de alto e baixo P.

No segundo experimento, a primeira (T1) e a segunda (T2) geração de 3 eventos transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, em conjunto com plantas não transformadas das linhagens P898012, BTx399 e BTx635 foram cultivadas somente em tratamento de baixo P, a fim de avaliar e comparar características da morfologia radicular nas diferentes gerações de eventos transgênicos em relação às linhagens não transformadas. A linhagem BTx399 é tolerante ao estresse de P, enquanto BTx635 é sensível. As linhagens sensíveis e tolerantes foram inseridas no experimento para avaliar o desempenho da linhagem P898012 não transformada em relação à tolerância ao estresse de P. A ANOVA para o segundo experimento (Tabela 2) seguiu o mesmo critério descrito no primeiro, exceto pela ausência do tratamento como fonte de variação, visto que as plantas foram cultivadas apenas em baixo P. O efeito de evento foi significativo para CT, AS, DM, MSPA, MSR e MST. O efeito de bloco não foi significativo.

Tabela 2: Análise de variância (ANOVA) para as características comprimento total (CT), área de superfície total (AS), diâmetro médio (DM), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST), dos eventos de sorgo transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, linhagens de sorgo não transformadas BTx399, BTx635, P898012, e uma planta transformada com a construção UbiZm::Flag::NOS. O experimento foi conduzido em tratamento de baixo fósforo (P, 2,5 μ M).

Fonte de Variação	Quadrado médio					
	CT (cm)	AS (cm ²)	DM (mm)	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)
Evento	29580**	456**	0,0007**	0,0014**	0,0041**	0,0100**
Bloco	7517	57	0,0005	0,0002	0,0002	0,0007
Resíduo	3917	47	0,0002	0,0001	0,0002	0,0008
CV	12,09%	10,38%	3,28%	11,73%	9,89%	10,09%

CV: Coeficiente de variação. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

No segundo experimento, as gerações T1 e T2 dos eventos 3.5, 7.1 e 7.5, transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, as linhagens P898012, BTx399 e BTx635 não transformadas e um evento da linhagem P898012 transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS (VTVZ) tiveram as características radiculares avaliadas em condição de baixo P.

O sistema radicular das plantas foi avaliado em relação à área de superfície (Figura 6A) e diâmetro médio (Figura 6B). A linhagem não transformada BTx399 apresentou maior área de superfície da raiz em comparação ao evento vetor vazio ($p < 0,05$). Nas linhagens não transformadas P898012 e BTx635 foi verificada a redução da área de superfície da raiz em comparação ao evento VTVZ. Os eventos transformados com a construção UbiZm::6765-

Flag::NOS não apresentaram diferença estatística do evento VTVZ. O diâmetro médio não apresentou variação significativa para nenhuma das observações.

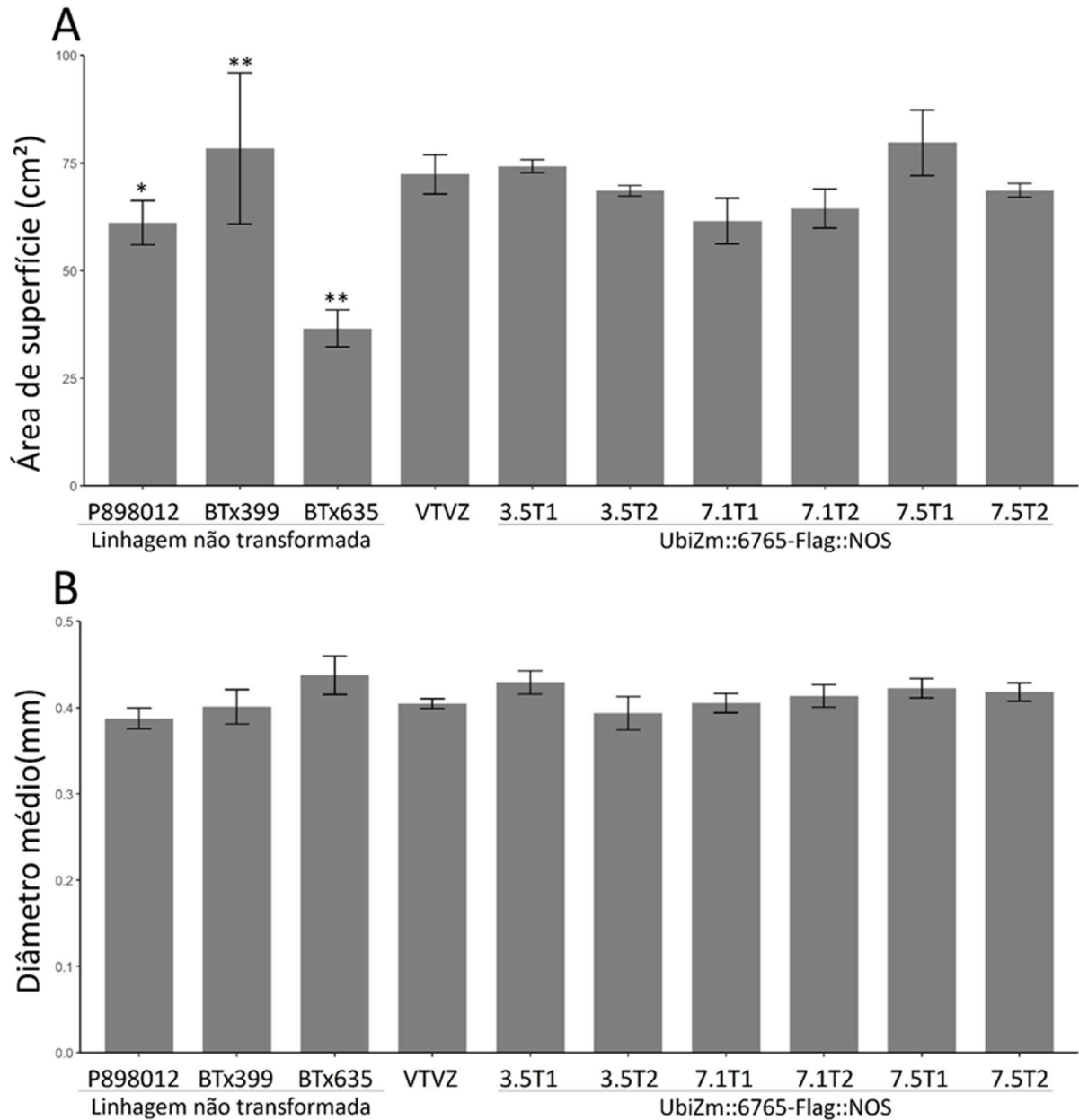


Figura 6: Caracterização fenotípica do sistema radicular de plantas de sorgo da linhagem P898012 transformadas com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, das gerações T1 e T2. O evento VTVZ, transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS, e plantas não transformadas das linhagens P898012, BTx399 e BTx675 foram usados como controle. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva em tratamento de baixo fósforo (P, 2,5 μ M), por um período de 13 dias. Os valores apresentados correspondem à média de três repetições biológicas. O teste Dunnett foi utilizado para comparar as médias dos eventos transformados e das linhagens não transformadas com o evento VTVZ (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). **(A)** Área de superfície total do sistema radicular dos eventos transformados e linhagens não transformadas cultivados em tratamento de baixo P. **(B)** Diâmetro médio do sistema radicular dos eventos transformados e linhagens não transformadas cultivados em tratamento de baixo P.

O acúmulo de massa seca da parte aérea e da raiz dos eventos transformados cultivados em solução hidropônica em condição de baixo P foi avaliado (Figura 7). Os eventos 7.1 T1 e 7.1 T2, transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS e as linhagens não transformadas P898012 e BTx635 apresentaram redução ($p < 0,05$) na massa seca da parte aérea em comparação ao evento VTVZ. A linhagem não transformada BTx635 apresentou redução na massa seca da raiz em relação ao evento VTVZ. Os demais eventos e linhagens não transformadas não apresentaram variação significativa da característica em relação ao evento VTVZ.

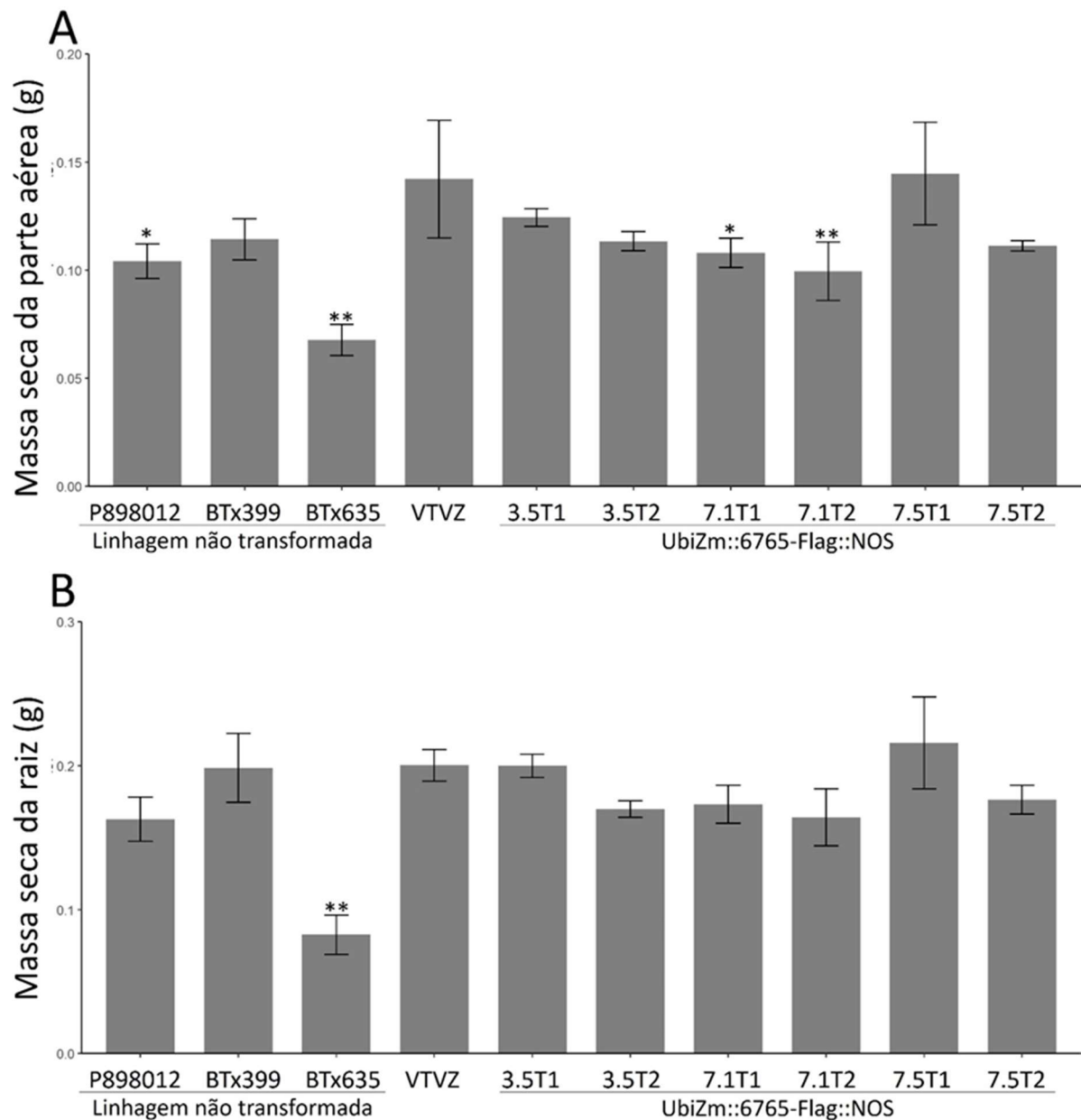


Figura 7: Caracterização da biomassa da parte aérea e do sistema radicular de plantas de sorgo da linhagem P898012 transformadas com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, das gerações T1 e T2. O evento VTVZ, transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS, e plantas não transformadas das linhagens P898012, BTx399

e BTx675 foram usados como controle. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva em tratamento de baixo fósforo (2,5 μM), por um período de 13 dias. Os valores apresentados correspondem à média de três repetições biológicas. O teste Dunnett foi utilizado para comparar as médias dos eventos transformados e das linhagens não transformadas com o evento VTVZ (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). **(A)** Média da massa seca da parte aérea dos eventos transformados e linhagens não transformadas cultivados em tratamento de baixo P. **(B)** Média da massa seca do sistema radicular dos eventos transformados e linhagens não transformadas cultivados em tratamento de baixo P.

6.3 Análise da morfologia de raiz e acúmulo de biomassa em solo com baixa disponibilidade de P em sistema de tubos

Os eventos 3.4, 7.1 e 28.7, transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS e o evento controle VTVZ, transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS foram cultivados em solo com baixa disponibilidade de P, em sistema de tubos de PVC. As características avaliadas foram: área de superfície, diâmetro médio e massa seca das raízes (Figura 8); massa seca da parte aérea, da raiz, massa seca total e de grãos (Figura 9) e área de superfície do sistema radicular para os anéis 1, 2 e 3 (Figura 8). Com os dados obtidos para morfologia radicular, foi feita uma ANOVA para o experimento dos tubos (Tabela 3). O efeito de bloco foi significativo apenas para MSR. O efeito de anel indica a variação entre as medidas observadas para cada anel (i.e. profundidade do solo), significativo para CT, AS e MSR. O efeito de evento e evento x anel não foi significativo para nenhuma das características. As características CT, AS e MSR apresentaram coeficiente de variação (CV) considerado elevado para essas características.

Tabela 3: Análise de variância (ANOVA) para as características comprimento total (CT), área de superfície total (AS), diâmetro médio (DM) e massa seca da raiz (MSR), dos eventos de sorgo transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS e uma planta transformada com a construção UbiZm::Flag::NOS em sistema de tubos em tratamento de baixo P. A fonte de variação “Anel” corresponde aos anéis 1 (camada 0 – 20 cm), 2 (camada 20 – 40) e 3 (camada 40 – 80).

Fonte de Variação	Quadrado Médio			
	CT (cm)	AS (cm ²)	DM (mm)	MSR (g)
Bloco	7891142	220755	0,011	2,3*
Anel	174341568**	5458863**	0,295	128,1**
Evento	3408175	29958	0,001	0,4
Anel x Evento	5163913	25003	0,009	0,2
Resíduo	5276308	96979	0,003	0,8
CV	27,36%	25,53%	11,59%	26,58

CV: Coeficiente de variação. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$)

Uma segunda ANOVA foi feita para as características da parte aérea dos eventos cultivados em tubos (Tabela 4). As características avaliadas foram a massa seca (g) da parte aérea, dos perfilhos, da raiz, da panícula e dos grãos. Somente o efeito de bloco foi significativo

para PA. O CV foi elevado para a massa da raiz e panícula e muito elevado para a massa de perfilho.

Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) para massa seca dos eventos de sorgo transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS e uma planta transformada com a construção UbiZm::Flag::NOS em sistema de tubos, em tratamento de baixo P. A medição da massa foi feita após a secagem à 65°C em estufa com circulação de ar por 5 dias.

Fonte de Variação	Quadrado Médio				
	Parte Aérea (g)	Perfilho (g)	Raiz (g)	Panícula (g)	Grão (g)
Evento	1,1	41	1,4	20,6	0,45
Bloco	9,9*	124	9,5	35	0,18
Resíduo	3,0	207	9,9	22	0,27
CV	18,39%	73,92%	23,79%	36,09%	17,12%

CV: Coeficiente de variação. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$)

Na Figura 8, estão representados os valores da área de superfície, diâmetro médio e massa seca da raiz referentes ao anel 1. Observou-se uma tendência de maiores valores fenotípicos para os eventos *SbPSTOLI* em relação à VTVZ. Os eventos 3.4, 7.1 e 28.7 apresentaram um ligeiro aumento na área de superfície (Figura 8A), redução do diâmetro (Figura 8B) e aumento no acúmulo de massa seca da raiz (Figura 8C). Essas alterações estão de acordo com o efeito esperado de *SbPSTOLI*, porém, as diferenças não foram estatisticamente significativas para nenhuma das características. Os eventos transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS apresentam maior variação (maiores desvios) do que observado no controle.

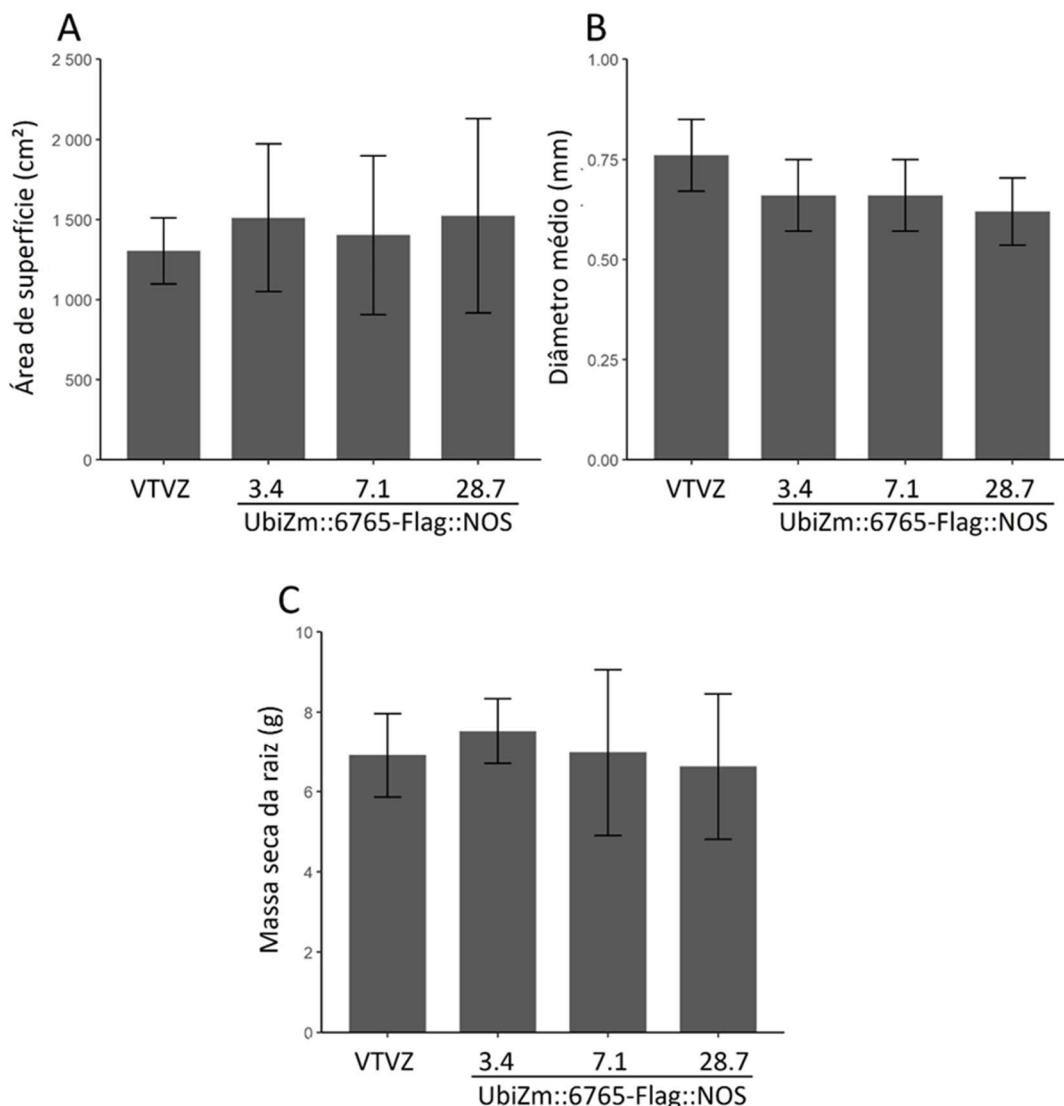


Figura 8: Caracterização da área de superfície, diâmetro médio e massa seca do sistema radicular das plantas transformadas com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS em sistema de tubos, em solo processado, com baixa disponibilidade de P. Os valores apresentados correspondem a média de cinco repetições biológicas e são referentes ao anel 1 (camada 0 – 20 cm do solo) da unidade experimental. Como controle, foi utilizado o evento VTVZ (vetor vazio), transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS. O teste Dunnett foi utilizado para comparar as médias dos eventos superexpressando *SbPSTOL1* com VTVZ (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). **(A)** Área de superfície total do sistema radicular correspondente ao anel 1 dos eventos transformados, em condição de baixo P. **(B)** Média do diâmetro do sistema radicular correspondente ao anel 1 dos eventos transformados, em condição de baixo P. **(C)** Valor médio da massa seca do sistema radicular dos eventos transformados, correspondente ao anel 1, em condição de baixo P.

A Figura 9 representa a massa seca da parte aérea (A), da raiz (B), total (C), soma da massa seca da parte aérea, da raiz, de perfilho e de panícula) e a massa seca de grãos (D). Não houve diferenças estatísticas significativas entre os eventos superexpressando *SbPSTOL1* e VTVZ. Uma maior variação dos eventos 3.4, 7.1 e 28.7 pode ser observada dentre as características avaliadas.

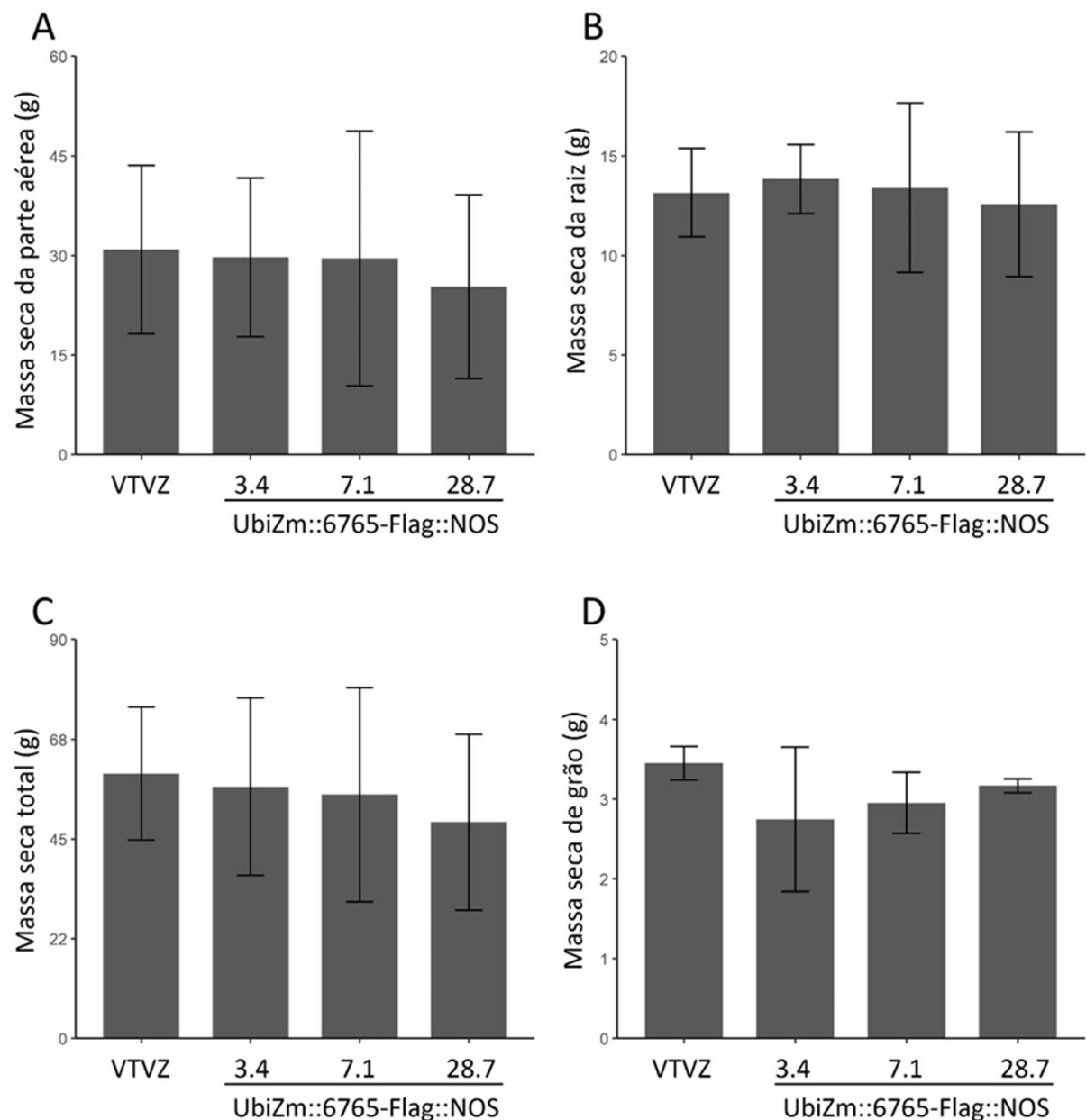


Figura 9: Caracterização da massa seca da parte aérea, raiz, total e dos grãos das plantas transformadas com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS em sistema de tubos, em solo processado, com baixa disponibilidade de P. Os valores apresentados correspondem à média de cinco repetições biológicas. Como controle, foi utilizado o evento VTVZ (vetor vazio), transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS. O teste Dunnett foi utilizado para comparar as médias dos eventos superexpressando *SbPSTOL1* com VTVZ (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). **(A)** Massa seca da parte aérea. Corresponde à soma da massa seca de perfilho e massa seca da planta principal. **(B)** Massa seca do sistema radicular. Corresponde à soma da massa seca da raiz de todos os anéis. **(C)** Massa seca total. Corresponde à soma da massa seca da parte aérea, da raiz e da panícula das plantas. **(D)** Massa seca dos grãos. Corresponde à massa de 100 grãos de sorgo.

A Figura 10 mostra os resultados de área de superfície do sistema radicular de acordo com a profundidade do solo. O anel 1 é equivalente à camada 0 - 20 cm do solo (Figura 10A). O anel 2 é equivalente à camada 20 - 40 cm do solo (Figura 10B). O anel 3 é equivalente à camada 40 - 60 cm do solo (Figura 10C). Observa-se um maior desenvolvimento das raízes nos

anéis 1, enquanto os anéis 2 e 3 apresentaram um desenvolvimento menor. Apesar da diferença entre anéis, não houve diferenças estatísticas significativas entre os eventos em um mesmo anel.

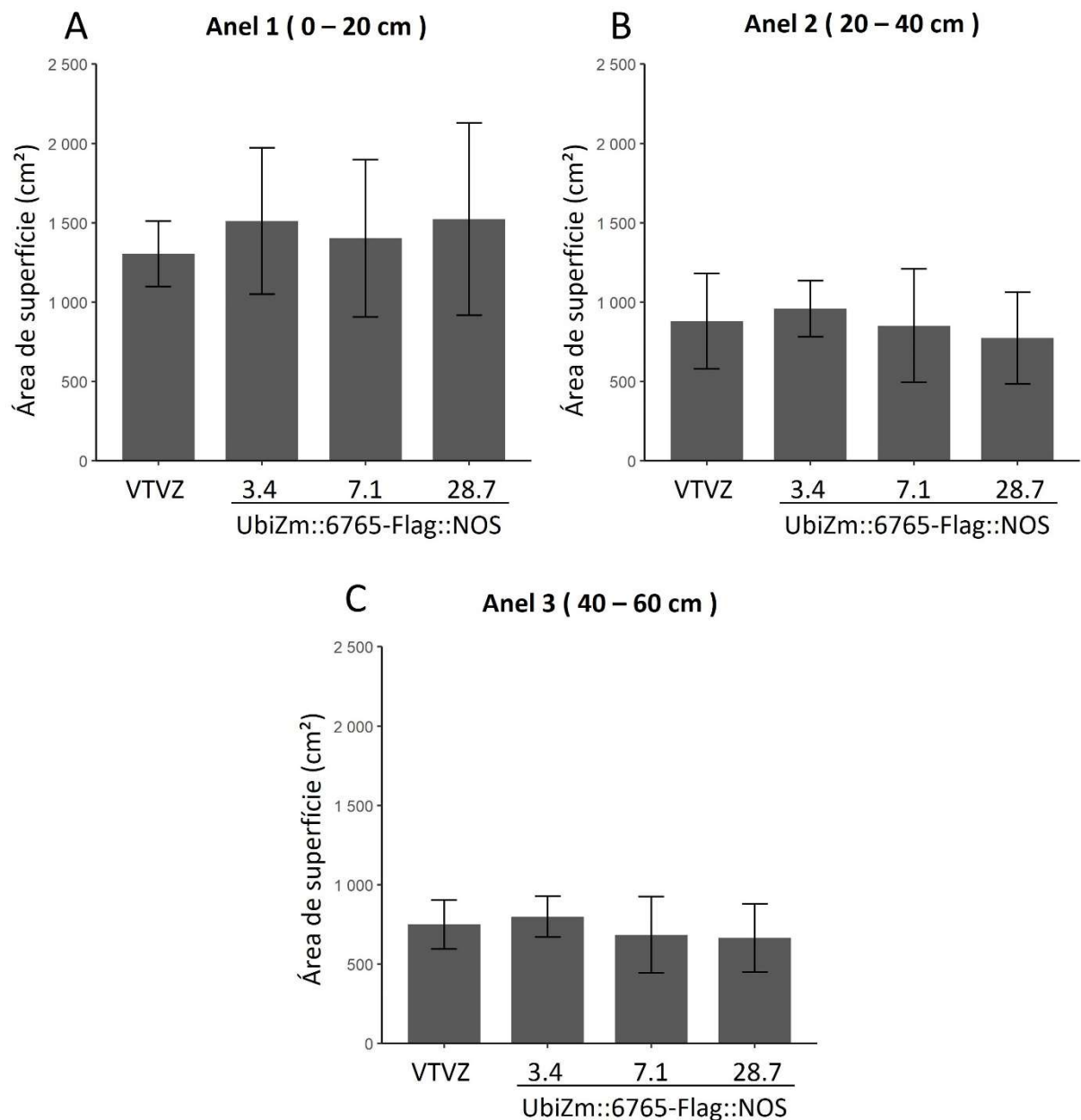


Figura 10: Caracterização da área de superfície radicular nos anéis 1, 2 e 3, das plantas transformadas com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS em sistema de tubos, em solo processado, com baixa disponibilidade de P. Os valores apresentados correspondem à média de cinco repetições biológicas para todos os anéis da unidade experimental. Como controle, foi utilizado o evento VTVZ (vetor vazio), transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS. O teste Dunnett foi utilizado para comparar as médias dos eventos superexpressando *SbpSTOL1* com VTVZ (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). **(A)** Área de superfície total do sistema radicular correspondente ao anel 1 (camada 0 – 20 cm de solo) dos eventos transformados, em condição de baixo P. **(B)** Área de superfície total do sistema radicular correspondente ao anel 2 (camada 20 – 40 cm de solo) dos eventos transformados, em condição de baixo P. **(C)** Área de superfície total do sistema radicular correspondente ao anel 3 (camada 40 – 80 cm de solo) dos eventos transformados, em condição de baixo P.

Um efeito observado consistentemente foi o acúmulo de pigmentos vermelhos, possivelmente antocianinas, nas glumas das panículas dos eventos superexpressando *SbPSTOL1* em relação aos eventos VTVZ (Figura 11). Os eventos VTVZ apresentaram coloração esverdeada nas glumas (Figura 11A), enquanto todos os eventos superexpressando *SbPSTOL1* apresentaram pigmentação avermelhada nas glumas (Figura 11B).

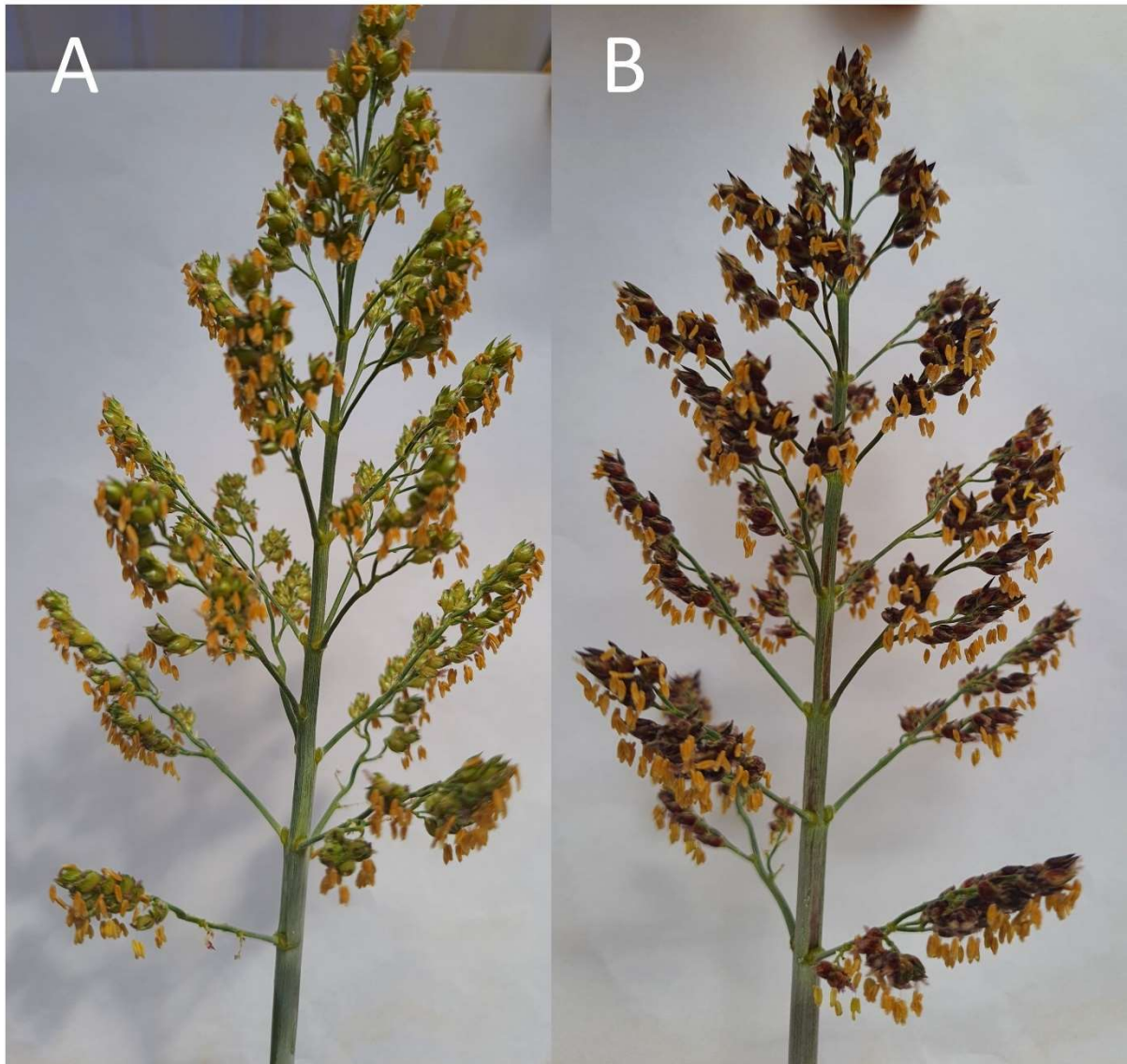


Figura 11: Panículas de sorgo cultivado em solo com baixa disponibilidade de P em sistema de tubos com 10 dias de florescimento. **(A)** Panícula de sorgo do evento vetor vazio (VTVZ). **(B)** Panícula de sorgo do evento superexpressando *SbPSTOL1*, 3.4. A pigmentação no evento 3.4 foi observada em todos os eventos superexpressando *SbPSTOL1*, enquanto não observada nos eventos VTVZ.

6.4 Análise de indicadores fisiológicos e da morfologia de raiz e acúmulo de biomassa em solo em situação de estresse hídrico

Para avaliar o desempenho das linhagens de sorgo transformadas sob estresse hídrico, foram utilizados os eventos 3.4, 7.1, 27.4 e 28.7, transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, e o evento controle (VTVZ), transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS. Neste experimento características fisiológicas de plantas de sorgo foram avaliadas em períodos de 5 e 10 dias com e sem estresse hídrico, além do sistema radicular. As características fisiológicas avaliadas foram: teor de clorofila (TC), eficiência do fotossistema II (EF II), taxa fotossintética (TF), condutância estomática (CE), transpiração (T), temperatura foliar (TEF) e eficiência do uso de água (EUA).

A análise de variância (ANOVA) foi feita para as características fisiológicas avaliadas para cada período de estresse hídrico, de forma separada. Na primeira coleta (Tabela 5), foram observados efeitos estatisticamente significativos do tratamento de estresse hídrico nas características de TC, CE, T, TEF e EUA. O efeito da interação tratamento x evento foi significativo para a característica TF. Os efeitos de bloco e evento não apresentaram significância para nenhuma característica. TF e EUA apresentaram coeficiente de variação (CV) considerado elevado para essas características.

Tabela 5: Análise de variância (ANOVA) para a primeira coleta de dados fisiológicos dos eventos de sorgo transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS e uma planta transformada com a construção UbiZm::Flag::NOS. O experimento foi conduzido em tratamentos de irrigação suficiente e estresse hídrico. Os quadrados médios apresentados se referem ao teor de clorofila (TC), eficiência do fotossistema II, taxa fotossintética (TF), condutância estomática (CE), transpiração (T), temperatura foliar (TEF) e eficiência do uso de água (EUA).

Fonte de Variação	Quadrado Médio						
	TC	EF II	TF	CE	T	TEF	EUA
Bloco	5	0,00021	23	0,00018	0,00094	0,01464	5918
Tratamento	58**	0,00043	78	0,14062**	0,63049**	0,74492**	774201**
Evento	2	0,00037	42	0,00043	0,00222	0,02101	3435
Tratamento x Evento	5	0,00006	71*	0,00069	0,00372	0,05214	3187
Resíduo	5	0,00010	24	0,00025	0,00154	0,01329	4862
CV	7,22%	1,23%	23,83%	13,35%	11,58%	0,39%	25,67%

CV: Coeficiente de variação. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

Os eventos 3.4 e 28.7 apresentaram valores de taxa fotossintética maiores que o controle na primeira coleta em condição de estresse hídrico ($p < 0,05$), (Figura 9), enquanto o evento 27.4 teve apresentou menor temperatura foliar, em relação ao controle (Figura 9). Os eventos não apresentaram diferença estatística do controle nas demais características. As plantas

cultivadas em condição suficiente de irrigação não apresentaram variação significativa para nenhuma das características.

Na ANOVA da segunda coleta (Tabela 6), verifica-se o efeito estatisticamente significativo do fator tratamento para as características de TC, EF II, CE, T e EUA. No fator evento, foi verificado o efeito com significância estatística para as características de TC, EF II e TF. Os fatores “Bloco” e “Tratamento x Evento” não apresentaram significância estatística para nenhuma das características observadas. Assim como observado na primeira coleta, o CV das características TF e EUA foram maiores na segunda coleta.

Tabela 6: Análise de variância (ANOVA) para a segunda coleta de dados fisiológicos dos eventos de sorgo transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS e uma planta transformada com a construção UbiZm::Flag::NOS. O experimento foi conduzido em tratamentos de irrigação suficiente e estresse hídrico. Os quadrados médios apresentados se referem ao teor de clorofila (TC), eficiência do fotossistema II, taxa fotossintética (TF), condutância estomática (CE), transpiração (T), temperatura foliar (TEF) e eficiência do uso de água (EUA).

Fonte de Variação	Quadrado Médio						
	TC	EF II	TF	CE	T	TEF	EUA
Bloco	17	0,00017	96	0,00011	0,00621	0,025	11543
Tratamento	520**	0,00313**	52	0,002938**	0,00005	0,416**	39082**
Evento	27**	0,00045**	39**	0,00038	0,00173	0,032	3980
Tratamento x Evento	2	0,00003	7	0,00006	0,00064	0,012	1406
Resíduo	6	0,00005	12	0,00041	0,00219	0,036	3906
CV	6,81%	0,90%	14,59%	22,55%	16,67%	0,65%	22,40%

CV: Coeficiente de variação. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

Na Figura 12, verifica-se que o evento 28.7 apresentou uma redução na eficiência do fotossistema II ($p < 0,01$) em comparação ao controle na segunda coleta, em condição de irrigação suficiente. Para as demais características observadas e para a condição de estresse hídrico, os eventos não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controle. A Figura 12 mostra os resultados fisiológicos das linhagens transgênicas sob os tratamentos de estresse hídrico e irrigação suficiente. A taxa fotossintética e eficiência do fotossistema II é reduzida nos eventos sob estresse hídrico em comparação aos eventos irrigados, enquanto a temperatura foliar é maior nos eventos sob estresse hídrico, demonstrando o efeito esperado do tratamento.

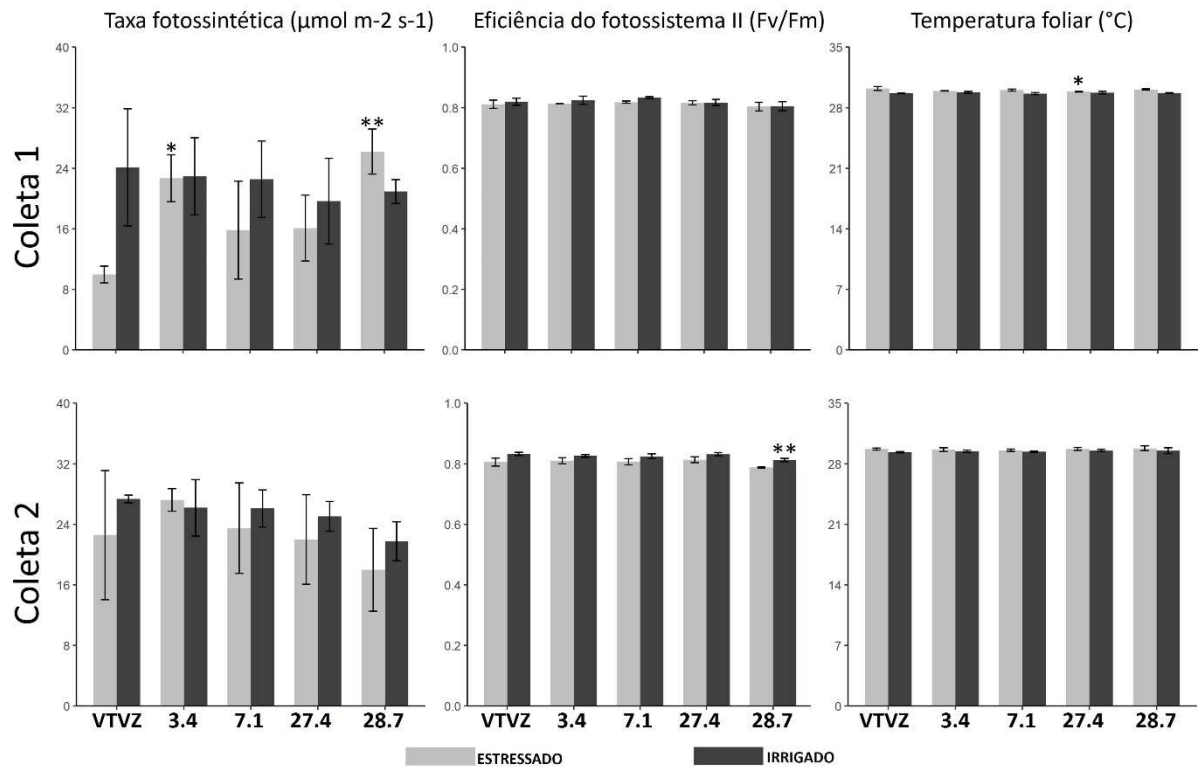


Figura 12: Características fisiológicas dos eventos de sorgo transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, em condição de irrigação suficiente e estresse hídrico. Como controle, foi utilizado o evento VTVZ (vetor vazio), transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS. Foi medida a taxa fotossintética, eficiência do fotossistema II e temperatura foliar em 5 (Coleta 1) e 10 (Coleta 2) dias de estresse hídrico, utilizando três repetições biológicas, com três plantas para cada repetição, por evento. As médias dos eventos superexpressando *SbPSTOL* foram comparadas por teste Dunnett com a média do evento VTVZ, transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

O sistema radicular das plantas foi coletado e processado ao final do experimento. Foram avaliadas as características área de superfície, diâmetro médio, massa seca da parte aérea e da raiz. Uma ANOVA foi feita com as medidas do sistema radicular dos eventos avaliados (Tabela 7). Verifica-se o efeito estatisticamente significativo de tratamento nas características de comprimento total (CT), área de superfície (AS), diâmetro médio (DM) e na massa seca da raiz (MSR). O fator “Evento” apresentou efeito estatisticamente significativo nas características CT, AS, DM, massa seca da parte aérea (MSPA) e MSR. O fator “Tratamento x Evento” apresentou efeito estatisticamente significativo para a característica DM, evidenciando a alteração do diâmetro médio do sistema radicular dos eventos de acordo com o tratamento observado. CT, AS e MSR apresentaram CV elevado.

Tabela 7: Análise de variância (ANOVA) para as características comprimento total (CT), área de superfície total (AS), diâmetro médio (DM), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (PST), dos eventos de sorgo transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS e uma planta transformada com a construção UbiZm::Flag::NOS. O experimento foi conduzido em tratamentos de irrigação suficiente e estresse hídrico.

Fonte de Variação	Quadrado Médio					
	CT (cm)	AS (cm ²)	DM (mm)	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)
Bloco	264976	3196	0,0002	2292	0,0090	2,5
Tratamento	9428060**	392919**	0,0132**	5158	0,3100**	2,9
Evento	3764162**	65887**	0,0032**	12838**	0,2497**	15,7**
Tratamento x Evento	413839	7737	0,0027**	2858	0,0477	2,4
Residuo	647819	12491	0,0006	2763	0,0461	2,5
CV	19,54%	18,72%	5,38%	11,44%	16,53%	10,01%

CV: Coeficiente de variação. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

Na Figura 13, pode-se observar o melhor desenvolvimento do sistema radicular dos eventos cultivados em situação de irrigação suficiente em comparação com os eventos sob estresse hídrico. Entretanto, não foram observadas diferenças consideráveis que destaquem um melhor desenvolvimento dos eventos superexpressando *SbPSTOL1* em relação à planta controle (VTVZ). O evento 28.7 apresentou uma redução estatisticamente significativa na área de superfície radicular (Figura 13A) em ambos os tratamentos. Apesar dos eventos não apresentarem diferença para diâmetro médio, os eventos 3.4 e 7.1 demonstram uma tendência de redução do diâmetro médio sob estresse hídrico, enquanto o evento 27.4 apresenta uma ligeira redução do diâmetro médio da raiz nos dois tratamentos (Figura 13B). O evento 27.4 apresentou redução da massa seca da parte aérea sob estresse hídrico (Figura 13C). O evento 28.7 apresentou redução da massa seca da raiz sob estresse hídrico (Figura 13D). Os eventos transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS apresentam uma tendência de redução da massa seca da raiz e da parte aérea em ambos os tratamentos.

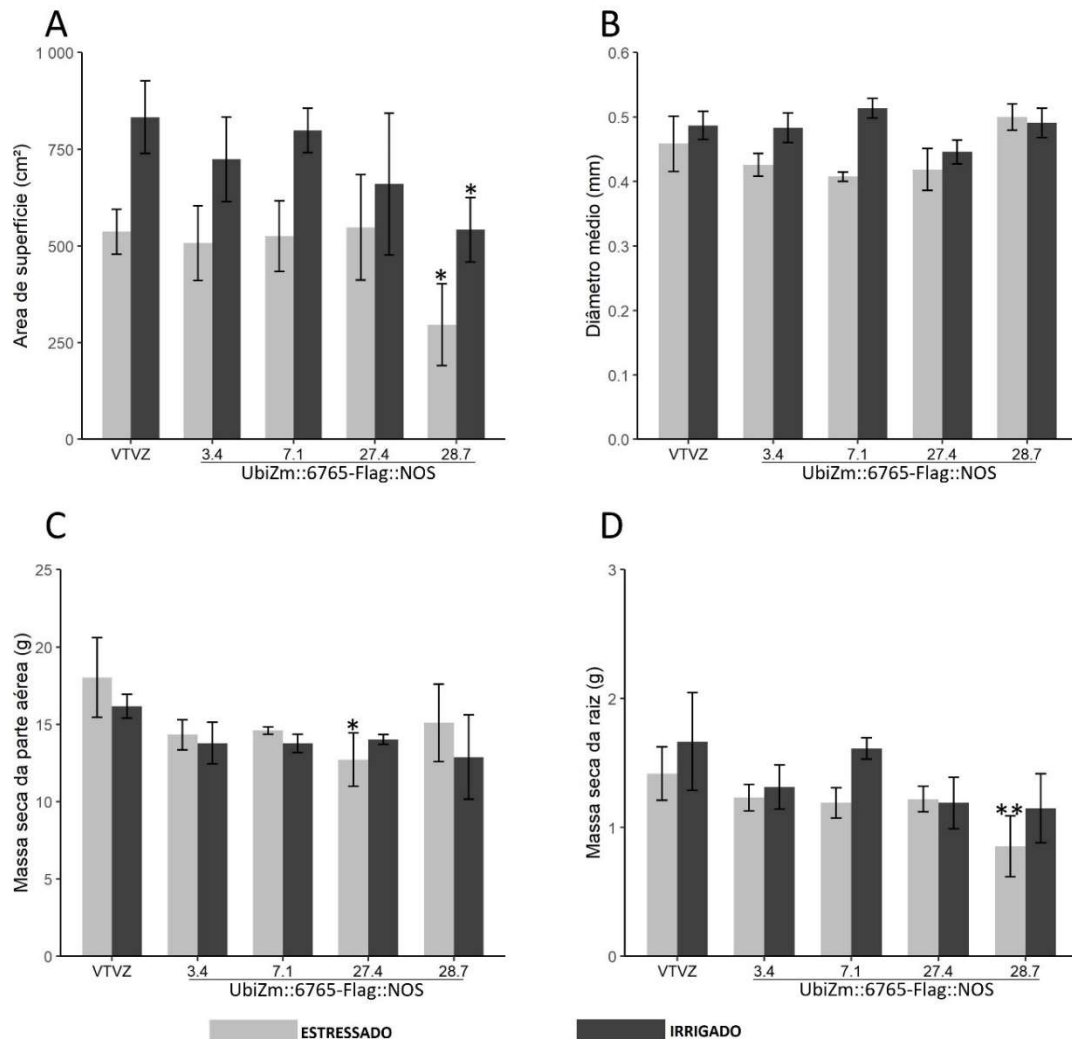


Figura 13: Caracterização fenotípica do sistema radicular e biomassa da parte aérea e sistema radicular em condição de estresse hídrico. Foram selecionadas para o experimento eventos de sorgo transformados com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, da geração T2 e o evento VTVZ (vetor vazio), transformado com a construção UbiZm::Flag::NOS. Os eventos foram cultivados em três repetições, com três plantas por repetição para cada tratamento. O experimento teve 48 dias de duração. O teste Dunnett foi utilizado para comparar as médias dos eventos superexpressando *SbPSTOL1* com VTVZ, dentro dos respectivos tratamentos (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). **(A)** Área de superfície total do sistema radicular dos eventos transformados cultivados em condição de estresse hídrico e em condição de irrigação suficiente. **(B)** Média do diâmetro do sistema radicular dos eventos transformados cultivados em condição de estresse hídrico e em condição de irrigação suficiente. **(C)** Média da massa seca da parte aérea dos eventos transformados cultivados em condição de estresse hídrico e em condição de irrigação suficiente. **(D)** Média da massa seca do sistema radicular dos eventos transformados cultivados em condição de estresse hídrico e em condição de irrigação suficiente.

7. Discussão

O efeito do gene *PSTOL1* em relação à morfologia do sistema radicular é observado em culturas como arroz (*Oryza sativa*) e trigo (*Triticum aestivum*, Gamuyao et al., 2012; Abbas et al., 2022). O gene *PSTOL1* de arroz (*OsPSTOL1*) está presente em linhagens de arroz tolerantes ao estresse de fósforo e está ausente em linhagens sensíveis. A superexpressão do gene

OsPSTOL1 em linhagens sensíveis de arroz resultou no aumento do peso de grãos, maior acúmulo de P na parte aérea da planta, aumento da massa seca da raiz em condição de baixo P e alterações na morfologia radicular, como o aumento no comprimento total e da área de superfície (Gamuyao et al., 2012). Em trigo, a superexpressão do gene *OsPSTOL1* em linhagens de trigo foi correlacionada com o aumento da biomassa da raiz em condição de baixo P, aumento do conteúdo de P na parte aérea e aumento no número de raízes da coroa em baixo P (Kettenburg et al., 2023). Os ortólogos do gene *OsPSTOL1* foram descritos em trigo (*TaPSTOL1*, Abbas et al., 2022), onde foi observado maior expressão de *TaPSTOL1* na linhagem tolerante *Pakistan-13*, que teve um maior crescimento radicular, e maior conteúdo de P na parte aérea, em relação à linhagem com menor expressão de *TaPSTOL1*, *Shafaq-06*, que é considerada uma linhagem sensível (Abbas et al., 2022). Essas observações em trigo e arroz indicam a função do gene *PSTOL1* na modulação do sistema radicular e em mecanismos de tolerância a estresses abióticos, principalmente o estresse de P em plantas.

A sequência do gene e da proteína *OsPSTOL1* em arroz permitiu a busca por homólogos no genoma de sorgo. Foram identificados 3 principais homólogos em sorgo: *Sb03g06765*, *Sb03g031690* e *Sb03g02840* (Hufnagel et al., 2014). Análises de associação identificaram diversos SNPs na sequência desses genes, associados à produção de grãos e características do sistema radicular, como o comprimento total, área de superfície e diâmetro médio do sistema radicular (Hufnagel et al., 2014; Bernardino et al., 2019). Os SNPs utilizados para o mapeamento associativo na sequência do gene *Sb03g06765* encontram-se em desequilíbrio de ligação, e estão relacionados à produção de grãos, ao acúmulo de biomassa e de P na planta. A superexpressão de *Sb03g06765* na linhagem de milho, B104, provocou aumento na proliferação de raízes finas e no acúmulo de biomassa e aumento no conteúdo de P na parte aérea (Maciel, 2019). Os efeitos associados ao gene *Sb03g06765* estão de acordo com o que foi observado em arroz e trigo, visto que apresentaram efeito em relação à otimização do uso de P. Com os resultados demonstrados em milho e nas análises de associação, o gene *Sb03g06765* foi o homólogo de sorgo escolhido para superexpressão em linhagens de sorgo, a fim de avaliar seu efeito na morfologia radicular e na adaptabilidade da planta às condições de baixo P.

O sorgo é considerado como uma das espécies vegetais mais difíceis para a cultura de tecidos (Maheswari et al., 2006), devido ao baixo potencial regenerativo do embrião, a produção de compostos fenólicos durante a regeneração e as diferentes respostas ao processo de cultura de tecidos por diferentes linhagens de sorgo (Maheswari et al., 2006). Para a

superexpressão do gene *SbPSTOLI*, foi escolhida a linhagem de sorgo P898012, devido a melhor regeneração e produção reduzida de compostos fenólicos durante a cultura de tecidos (Carvalho et al., 2004), favorecendo uma transformação bem sucedida.

Os eventos transformados demonstraram grande variação quando cultivados em solução nutritiva com alto e baixo conteúdo de P. A variação foi observada principalmente com relação à área de superfície radicular, onde repetições de um mesmo evento apresentaram valores consideravelmente diferentes no mesmo experimento. O desempenho dos eventos também variou quando comparados com resultados obtidos em diferentes experimentos em cultivo hidropônico sob as mesmas condições. Diversos fatores podem explicar a variação observada nos eventos e a ausência do fenótipo atribuído à maior expressão de *SbPSTOLI*. A inserção do transgene no genoma da planta ocorre de forma aleatória, com cópias em locais diferentes do genoma entre os diferentes eventos (Zhao et al., 2000), podendo exercer influência no silenciamento ou alteração da expressão do transgene, o que pode explicar parte da variação observada entre os eventos. No presente estudo, a superexpressão de *SbPSTOLI* foi confirmada através de *qPCR* em três eventos, mostrando que não houve silenciamento transcricional nesses eventos. No entanto, os resultados de *qPCR* não permitem descartar um possível silenciamento pós-traducional, visto que o mRNA pode ter a tradução inibida pela ação de micro RNAs (miRNA, He et al., 2004). Adicionalmente, maiores níveis de mRNA não significam maior síntese de proteínas, visto que a degradação de proteínas (i.e., silenciamento pós-traducional) em organismos transformados é bem documentada na literatura (Jang et al., 2012). A homologia entre *SbPSTOL* endógeno e a sequência do transgene inserido nas plantas pode causar o silenciamento gênico (Kooter et al., 1999). A sensibilidade à quantidade dos produtos gênicos, a possibilidade de síntese de moléculas sem sentido que podem afetar a expressão do gene e restrição dos produtos gênicos a certos domínios por atividade do núcleo são fatores que podem explicar o silenciamento na superexpressão de genes endógenos (Jorgensen, R., 1992).

Outro fator relevante é a escolha da linhagem utilizada para a transformação, P898012. Essa linhagem é frequentemente utilizada para a transformação de sorgo, por se adaptar bem ao processo de cultura de tecidos. No entanto, o crescimento do sistema radicular da linhagem P898012 em soluções com alta e baixa disponibilidade de fósforo indica características que sugerem a tolerância dessa linhagem ao estresse de P, apresentando um sistema radicular mais desenvolvido independente da presença ou ausência de níveis suficientes de fósforo. Esse resultado é diferente daquele apresentado por linhagens sensíveis à baixa disponibilidade de

fósforo. É possível perceber a diferença na área de superfície radicular entre a linhagem P898012 em relação à linhagem BTx635, que é classificada como uma linhagem sensível ao estresse de P (Liu et al., 2023; Hufnagel et al., 2014). Em oposição, a linhagem BTx399, considerada tolerante ao estresse de P (Silva., 2012), apresentou valores de área de superfície radicular próximos aos observados em P898012 em condições de baixa disponibilidade de P, indicando tolerância da linhagem P898012 ao estresse de P, visto que uma maior área de superfície radicular, como observado em BTx399 e P898012 em relação a BTx635, está associada a otimização da absorção de P (Lambers et al., 2006). Um painel de associação com 243 linhagens de sorgo cultivado sob baixa disponibilidade de P no solo apresentou uma média geral de produção de grãos de 2196 kg.ha⁻¹ (Hufnagel et al., 2014). Uma reanálise dos dados do painel mostrou que as linhagens BTx399 e P89812 apresentaram produção de grãos (2411 e 1798 kg.ha⁻¹, respectivamente) em relação à linhagem sensível BTx635 (706 kg.ha⁻¹), o que indica que a linhagem P898012 é medianamente tolerante e não altamente sensível ao estresse de P. Outros genes associados à tolerância ao estresse de P podem levar a necessidade de um efeito substancial do transgene para que o fenótipo seja detectado, o que não seria esperado caso a linhagem P898012 fosse altamente ineficiente.

Um terceiro fator que pode influenciar o desempenho das plantas é o vigor das sementes, como pôde ser observado no segundo experimento de cultivo hidropônico, onde a linhagem P898012 não transformada apresentou valores menores para área de superfície e massa seca radicular em relação ao evento transformado com o vetor vazio (VTVZ). O evento VTVZ possui o gene de seleção *BAR*, ausente no evento não transformado. Na literatura, não são descritos casos onde a presença do gene *BAR* promova um aumento no crescimento radicular, pelo contrário, a alta expressão desse gene foi associada a perda de vitalidade em cevada (*Hordeum vulgare*, Brown et al., 2023). Nesse caso, o fato das sementes VTVZ serem mais novas que as sementes WT pode ser mais relevante para a diferença no vigor das plantas. Os fatores mencionados podem ter prejudicado a observação do fenótipo atribuído à superexpressão de genes *PSTOL1* nos trabalhos com arroz e trigo (Gamuyao et al., 2012; Kettenburg et al., 2023), devido à grande variação observada nos eventos em diferentes experimentos. Apesar da variação dos resultados entre experimentos conduzidos da mesma forma, alguns eventos se destacaram em relação às características radiculares em tratamento hidropônico de baixo P, enquanto alguns apresentaram tendência de redução do diâmetro médio. Um comportamento observado de forma consistente nas linhagens superexpressando *SbPSTOL1*, quando cultivadas em tratamento de baixo P em solo, foi o maior acúmulo de

pigmentos, possivelmente antocianinas, nas glumas das panículas das linhagens transformadas com a construção UbiZm::6765-Flag::NOS, não observado na planta VTVZ. O acúmulo de antocianinas é observado em diversas plantas durante a resposta a estresses bióticos e abióticos (Xu et al., 2017; Chalker-Scott, L., 1999), e foi verificado que o acúmulo desse composto em folhas de sorgo sob estresse possui relação com proteínas quinases associadas a parede celular (Lv et al., 2022; Chalker-Scott., 1999). Essas observações sugerem a relação de *SbPSTOLI* com vias envolvidas na tolerância a estresses em sorgo. A identificação desse fenótipo indica também a funcionalidade do gene nos eventos transformados, reduzindo a plausibilidade de um efeito de silenciamento do transgene.

Em situação de estresse hídrico, eventos superexpressando *SbPSTOLI* apresentaram melhora de algumas características fisiológicas em relação ao controle (VTVZ). Os valores superiores para taxa fotossintética e a redução da temperatura foliar observados nos eventos 3.4 e 28.7 em relação ao controle sugerem uma melhor adaptação ao estresse hídrico advinda da superexpressão do gene Sb03g006765. Os valores de temperatura foliar e taxa fotossintética são correlacionados, visto que, para uma taxa fotossintética elevada, é necessária a abertura estomática para a assimilação de CO₂, que por consequência permite o escape do vapor de água, aumentando a transpiração (Lawson et al., 2010). Taxas maiores de transpiração promovem a redução na temperatura foliar (Downes, 1969). No entanto, os eventos com maiores taxas fotossintéticas (3.4 e 28.7) não apresentaram redução na temperatura foliar, da mesma forma que o evento com menor temperatura foliar (27.4) não apresentou aumento na taxa fotossintética. Dessa forma, os resultados da primeira coleta não são conclusivos para o efeito de *SbPSTOLI* em relação ao estresse hídrico.

As diferenças nas características de taxa fotossintética e temperatura foliar entre os eventos não foram observadas na segunda coleta de dados, cinco dias após a primeira, onde o controle apresentou aumento significativo na taxa fotossintética em relação ao observado com menos dias de estresse, o que sugere uma adaptação tardia do controle em relação aos eventos superexpressando *SbPSTOLI*. A adaptação precoce dos eventos superexpressando *SbPSTOLI* em relação à taxa fotossintética pode ser benéfica para a planta durante a fase reprodutiva, visto que a taxa fotossintética está correlacionada positivamente com a produção de grãos (Peng et al., 1991). A redução na eficiência do fotossistema II em um dos eventos após 10 dias de estresse não é informativa, visto que os valores observados para essa característica em todos os eventos, em ambos tratamentos, se encontra dentro do esperado para o funcionamento normal do

fotossistema II ($> 0,75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Wu et al., 2023; Kalagi et al., 2017). O sorgo é uma planta naturalmente tolerante ao estresse hídrico (Hadebe et al., 2016), porém, dentre as diversas linhagens de sorgo, com diferentes níveis de tolerância, a linhagem P898012 é considerada tolerante ao estresse hídrico (Ongom et al., 2016), o que pode dificultar a observação de um possível fenótipo atribuído ao gene.

8. Conclusão

Nesse trabalho, a grande variação das características radiculares observada nos eventos superexpressando *SbPSTOL1* não permitiu uma conclusão final acerca do efeito desse gene em sorgo. Futuramente, o planejamento de experimentos com um maior número de repetições pode ser uma boa alternativa para controlar, em parte, a variação experimental - refletida nos coeficientes de variação e nos desvios padrão. A linhagem P898012, escolhida pelo bom desempenho na transformação genética, foi verificada como mediantemente tolerante ao estresse de P. Em novos estudos, a transformação genética de uma linhagem sensível ao estresse de P pode ser benéfica para a observação de possíveis alterações na arquitetura radicular associadas à superexpressão do gene.

Nos experimentos em solo, o processamento das raízes mediante o escaneamento envolve a remoção das raízes do solo, peneiração e lavagem. A natureza mecânica desse processo pode provocar perda de material. Caso a superexpressão de *SbPSTOL1* tenha o efeito esperado no sistema radicular, as plantas transformadas seriam particularmente afetadas, devido ao afinamento das raízes, as tornando mais frágeis. Dessa forma, um protocolo para o manuseio das raízes em solo visando à preservação estrutural deve ser utilizado a fim de minimizar a perda de raízes.

Para a avaliação do estresse hídrico, a extensão da duração do experimento até a produção de grãos pode ser informativa para avaliar o efeito de *SbPSTOL1* em relação a eficiência do uso de água, visto que o efeito do estresse hídrico é refletido na produção da planta. As alterações descritas podem ser de grande valor para o estudo da superexpressão de *SbPSTOL1* em sorgo e a compreensão do efeito do gene em relação ao estresse de P.

9. Referências

- Abbas, H., Naeem, M. K., Rubab, M., Widemann, E., Uzair, M., Zahra, N., ... & Imran, M.** (2022). Role of Wheat Phosphorus Starvation Tolerance 1 Genes in Phosphorus Acquisition and Root Architecture. *Genes* 2022, 13, 487.
- Afzal, A. J., Wood, A. J., & Lightfoot, D. A.** (2008). Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(5), 507-517.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al.** *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. The Structure and Function of DNA. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/book>.
- Alvarez VVH, Ribeiro AC.** (1999) Calagem. In: Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. Viçosa: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais;. p. 43–60.
- Barros, V. A., Chandnani, R., De Sousa, S. M., Maciel, L. S., Tokizawa, M., Guimaraes, C. T., ... & Kochian, L. V.** (2020). Root adaptation via common genetic factors conditioning tolerance to multiple stresses for crops cultivated on acidic tropical soils. *Frontiers in Plant Science*, 11, 565339.
- Bates, T. R., & Lynch, J. P.** (1996). Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant, cell & environment*, 19(5), 529-538.
- Bernardino, K. C., Pastina, M. M., Menezes, C. B., De Sousa, S. M., Maciel, L. S., Jr, G. C., ... & Magalhaes, 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, 1-15.
- Botella, C., Jouhet, J., & Block, M. A.** (2017). Importance of phosphatidylcholine on the chloroplast surface. *Progress in lipid research*, 65, 12-23.
- Brown, R. H., Raboy, V., & Bregitzer, P.** (2013). Unintended consequences: high phosphinothricin acetyltransferase activity related to reduced fitness in barley. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49, 240-247.
- Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., & De Lorenzo, G.** (2010). A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), 9452-9457.
- Carvalho, C. H. S., Zehr, U. B., Gunaratna, N., Anderson, J., Kononowicz, H. H., Hodges, T. K., & Axtell, J. D.** (2004). Agrobacterium-mediated transformation of sorghum: factors that affect transformation efficiency. *Genetics and Molecular Biology*, 27, 259-269.
- Chalker-Scott, L.** (1999). Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and photobiology*, 70(1), 1-9.
- Chaudhry, S., & Sidhu, G. P. S.** (2021). Climate change regulated abiotic stress mechanisms in plants: a comprehensive review. *Plant Cell Reports*. doi:10.1007/s00299-021-02759-5

- Chin, J. H., Lu, X., Haefele, S. M., Gamuyao, R., Ismail, A., Wissuwa, M., & Heuer, S.** (2010). Development and application of gene-based markers for the major rice QTL Phosphorus uptake 1. *Theoretical and Applied Genetics*, 120, 1073-1086.
- de Sousa, S. M., Clark, R. T., Mendes, F. F., de Oliveira, A. C., de Vasconcelos, M. J. V., Parentoni, S. N., ... & Magalhães, J. V.** (2012). A role for root morphology and related candidate genes in P acquisition efficiency in maize. *Functional Plant Biology*, 39(11), 925-935.
- Decreux, A., & Messiaen, J.** (2005). Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation. *Plant and Cell Physiology*, 46(2), 268-278.
- Dievart, A., Gottin, C., Périn, C., Ranwez, V., & Chantret, N.** (2020). Origin and diversity of plant receptor-like kinases. *Annual Review of Plant Biology*, 71(1), 131-156.
- Do, P. T., Lee, H., Mookkan, M., Folk, W. R., & Zhang, Z. J.** (2016). Rapid and efficient Agrobacterium-mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor*) employing standard binary vectors and bar gene as a selectable marker. *Plant Cell Reports*, 35, 2065-2076.
- dos Santos HG, Jacomine PKT, dos Anjos LHC, de Oliveira VÁ, Lumbreras JF, Coelho MR, et al.** (2013) Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília: Embrapa.
- Downes, R. W.** (1969). Differences in transpiration rates between tropical and temperate grasses under controlled conditions. *Planta*, 88(3), 261-273.
- Dröge, W., Broer, I., & Pühler, A.** (1992). Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta*, 187, 142-151.
- Ferreira, E. B., Cavalcanti, P. P., & Nogueira, D. A.** (2014). ExpDes: an R package for ANOVA and experimental designs. *Applied Mathematics*, 5(19), 2952.
- Fitter, A., Williamson, L., Linkohr, B., & Leyser, O.** (2002). Root system architecture determines fitness in an Arabidopsis mutant in competition for immobile phosphate ions but not for nitrate ions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1504), 2017-2022.
- Gamuyao, R., Chin, J. H., Pariasca-Tanaka, J., Pesaresi, P., Catausan, S., Dalid, C., ... & Heuer, S.** (2012). The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. *Nature*, 488(7412), 535-539.
- Gigli-Bisceglia, N., Engelsdorf, T., & Hamann, T.** (2020). Plant cell wall integrity maintenance in model plants and crop species-relevant cell wall components and underlying guiding principles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(11), 2049-2077.
- Grant, C. A., Flaten, D. N., Tomasiewicz, D. J., & Sheppard, S. C.** (2001). The importance of early season phosphorus nutrition. *Canadian journal of plant science*, 81(2), 211-224.
- Hadebe, S. T., Modi, A. T., & Mabhaudhi, T.** (2017). Drought tolerance and water use of cereal crops: A focus on sorghum as a food security crop in sub-Saharan Africa. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 203(3), 177-191.

- Hardie, D. G.** (1999). Plant protein serine/threonine kinases: classification and functions. *Annual review of plant biology*, 50(1), 97-131.
- He, L., & Hannon, G. J.** (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews genetics*, 5(7), 522-531.
- Hinsinger, P.** (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and soil*, 237(2), 173-195.
- Ho, M. D., Rosas, J. C., Brown, K. M., & Lynch, J. P.** (2005). Root architectural tradeoffs for water and phosphorus acquisition. *Functional plant biology*, 32(8), 737-748.
- Hu, T., Zhang, X., Khanal, S., Wilson, R., Leng, G., Toman, E. M., ... & Zhao, K.** (2024). Climate change impacts on crop yields: A review of empirical findings, statistical crop models, and machine learning methods. *Environmental Modelling & Software*, 106119.
- Hufnagel, B., Bernardino, K. C., Malosetti, M., Sousa, S. M., Silva, L. A., Guimaraes, C. T., ... & Magalhaes, J. V.** (2024). Multi-trait association mapping for phosphorous efficiency reveals flexible root architectures in sorghum. *BMC Plant Biology*, 24(1), 562.
- Hufnagel, B., de Sousa, S. M., Assis, L., Guimaraes, C. T., Leiser, W., Azevedo, G. C., ... & Magalhaes, 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(2), 659-677.
- Jang, I. C., Niu, Q. W., Deng, S., Zhao, P., & Chua, N. H.** (2012). Enhancing protein stability with retained biological function in transgenic plants. *The Plant Journal*, 72(2), 345-354.
- Jorgensen, R.** (1992). Silencing of plant genes by homologous transgenes.
- Kalaji, H. M., Schansker, G., Brestic, M., Bussotti, F., Calatayud, A., Ferroni, L., ... & Bába, W.** (2017). Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel. *Photosynthesis research*, 132, 13-66.
- Kanneganti, V., & Gupta, A. K.** (2008). Wall associated kinases from plants—an overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 14, 109-118.
- Kettenburg, A. T., Lopez, M. A., Yogendra, K., Prior, M. J., Rose, T., Bimson, S., ... & Bailey-Serres, J.** (2023). PHOSPHORUS-STARVATION TOLERANCE 1 (OsPSTOL1) is prevalent in upland rice and enhances root growth and hastens low phosphate signaling in wheat. *Plant, Cell & Environment*, 46(7), 2187-2205.
- Kooter, J. M., Matzke, M. A., & Meyer, P.** (1999). Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends in plant science*, 4(9), 340-347.

- Lally, D., Ingmire, P., Tong, H. Y., & He, Z. H.** (2001). Antisense expression of a cell wall-associated protein kinase, WAK4, inhibits cell elongation and alters morphology. *The Plant Cell*, 13(6), 1317-1332.
- Lambers, H., Shane, M. W., Cramer, M. D., Pearse, S. J., & Veneklaas, E. J.** (2006). Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Annals of botany*, 98(4), 693-713.
- Lawson, T., von Caemmerer, S., Baroli, I.** (2010). Photosynthesis and Stomatal Behaviour. In: Lüttge, U., Beyschlag, W., Büdel, B., Francis, D. (eds) *Progress in Botany 72. Progress in Botany*, vol 72. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-13145-5_11
- Laxalt, A. M., & Munnik, T.** (2002). Phospholipid signalling in plant defence. *Current opinion in plant biology*, 5(4), 332-338.
- Lehti-Shiu, M. D., & Shiu, S.-H.** (2012). Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1602), 2619–2639.
- Li, P., & Liu, J.** (2021). Protein phosphorylation in plant cell signaling. *Plant Phosphoproteomics: Methods and Protocols*, 45-71.
- Liu, Z., Qin, T., Atienza, M., Zhao, Y., Nguyen, H., Sheng, H., ... & Kochian, L. V.** (2023). Constitutive basis of root system architecture: uncovering a promising trait for breeding nutrient-and drought-resilient crops. *Abiotech*, 4(4), 315-331.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Ly, Y., Chen, J., Zhu, M., Liu, Y., Wu, X., Xiao, X., ... & Cai, H.** (2022). Wall-associated kinase-like gene RL1 contributes to red leaves in sorghum. *The Plant Journal*, 112(1), 135-150.
- Lynch, J. P.** (2011). Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops. *Plant physiology*, 156(3), 1041-1049.
- Maciel LS.** 2019. Caracterização funcional de genes *PSTOL1* na modulação do sistema radicular em milho e sorgo. Tese de Doutorado.
- Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., ... & Stougaard, J.** (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legumeperception of rhizobial signals. *Nature*, 425(6958), 637-640.
- Magnavaca, R., Gardner, C. O., & Clark, R. B.** (1987). Evaluation of inbred maize lines for aluminum tolerance in nutrient solution. In *Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition: Proceedings of the Second International Symposium on Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition, organized by the University of Wisconsin, Madison, June 16–20, 1985* (pp. 255-265). Springer Netherlands.
- Maheswari, M., Jyothi Lakshmi, N., Yadav, S. K., Varalaxmi, Y., Vijaya Lakshmi, A., Vanaja, M., & Venkateswarlu, B.** (2006). Efficient plant regeneration from shoot apices of sorghum. *Biologia Plantarum*, 50, 741-744.

- Marschner H** (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants, Ed 2. Academic Press, London.
- Meng, X., & Zhang, S.** (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual review of phytopathology*, 51(1), 245-266.
- 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, 1-14.
- Mutisya, J., Sun, C., Rosenquist, S., Baguma, Y., & Jansson, C.** (2009). Diurnal oscillation of SBE expression in sorghum endosperm. *Journal of Plant Physiology*, 166(4), 428-434.
- Nakagami, H., Pitzschke, A., & Hirt, H.** (2005). Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in plant science*, 10(7), 339-346.
- Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami, Y., & Matsubayashi, Y.** (2008). Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science*, 319(5861), 294-294.
- Ongom, P. O., Volenec, J. J., & Ejeta, G.** (2016). Selection for drought tolerance in sorghum using desiccants to simulate post-anthesis drought stress. *Field Crops Research*, 198, 312-321.
- Peng, S., Krieg, D. R., & Girma, F. S.** (1991). Leaf photosynthetic rate is correlated with biomass and grain production in grain sorghum lines. *Photosynthesis Research*, 28, 1-7.
- Raghothama, K. G.** (1999). Phosphate acquisition. *Annual review of plant biology*, 50(1), 665-693.
- R Core Team** (2023). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.
- Sánchez-Calderón, L., López-Bucio, J., Chacón-López, A., Cruz-Ramírez, A., Nieto-Jacobo, F., Dubrovsky, J. G., & Herrera-Estrella, L.** (2005). Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, 46(1), 174-184.
- Schachtman, D. P., Reid, R. J., & Ayling, S. M.** (1998). Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant physiology*, 116(2), 447-453.
- Schittenhelm, S., & Schroetter, S.** (2014). Comparison of drought tolerance of maize, sweet sorghum and sorghum-sudangrass hybrids. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200(1), 46-53.
- Shiu, S. H., & Blecker, A. B.** (2001). Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(19), 10763-10768.
- Silva LA.** 2012. Fenotipagem para a eficiência de fósforo em linhagens de sorgo. Tese de Doutorado.
- Sinha, A. K., Jaggi, M., Raghuram, B., & Tuteja, N.** (2011). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant signaling & behavior*, 6(2), 196-203.
- Smith, S. E., & Smith, F. A.** (2012). Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia*, 104(1), 1-13.

- Sondergaard, T. E., Schulz, A., & Palmgren, M. G.** (2004). Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology*, 136(1), 2475-2482.
- Suetsugu, S., Kurisu, S., & Takenawa, T.** (2014). Dynamic shaping of cellular membranes by phospholipids and membrane-deforming proteins. *Physiological reviews*, 94(4), 1219-1248.
- Tardin, F. D., Rodrigues, J. A. S., & Coelho, R. R.** (2010). Cultivo do sorgo. *Cultivares. Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de Produção*, 2, 1-3.
- Taylor, J. R., & Duodu, K. G.** (2023). Resistant-type starch in sorghum foods—Factors involved and health implications. *Starch-Stärke*, 75(9-10), 2100296.
- Tsuda, K., Suzuki, T., Mimura, M., & Nonomura, K. I.** (2022). Comparison of constitutive promoter activities and development of maize ubiquitin promoter-and Gateway-based binary vectors for rice. *Plant Biotechnology*, 39(2), 139-146.
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service.** FoodData Central, 2019. fdc.nal.usda.gov.
- Uchida, R.** (2000). Essential nutrients for plant growth: nutrient functions and deficiency symptoms. *Plant nutrient management in Hawaii's soils*, 4, 31-55.
- United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division.** World Population Prospects 2022: Ten Key Messages. 2022. Available online: https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/un_desa_pd_2022_wpp_key-messages.pdf
- Vance, J. E., & Steenbergen, R.** (2005). Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Progress in lipid research*, 44(4), 207-234.
- Wang, J., Xu, G., Ning, Y., Wang, X., & Wang, G. L.** (2022). Mitochondrial functions in plant immunity. *Trends in Plant Science*, 27(10), 1063-1076.
- 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 105, 890-897.
- Wu, Q., Zhang, Y., Xie, M., Zhao, Z., Yang, L., Liu, J., & Hou, D.** (2023). Estimation of Fv/Fm in spring wheat using UAV-Based multispectral and RGB imagery with multiple machine learning methods. *Agronomy*, 13(4), 1003.
- Xiao, J., Zhou, Y., Xie, Y., Li, T., Su, X., He, J., ... & Qu, H.** (2024). ATP homeostasis and signalling in plants. *Plant Communications*.
- Xu, J., & Zhang, S.** (2015). Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in plant science*, 20(1), 56-64.
- Xu, J., Wang, W., & Zhao, Y.** (2021). Phenolic compounds in whole grain sorghum and their health benefits. *Foods*, 10(8), 1921.

- Xu, Z., Mahmood, K., & Rothstein, S. J. (2017).** ROS induces anthocyanin production via late biosynthetic genes and anthocyanin deficiency confers the hypersensitivity to ROS-generating stresses in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 58(8), 1364-1377.
- Xue, H. W., Chen, X., & Mei, Y. (2009).** Function and regulation of phospholipid signalling in plants. *Biochemical Journal*, 421(2), 145-156.
- Yan, X., Liao, H., Beebe, S. E., Blair, M. W., & Lynch, J. P. (2004).** QTL mapping of root hair and acid exudation traits and their relationship to phosphorus uptake in common bean. *Plant and soil*, 265, 17-29.
- YAO, Q. L., YANG, K. C., PAN, G. T., & RONG, T. Z. (2007).** The effects of low phosphorus stress on morphological and physiological characteristics of maize (*Zea mays* L.) landraces. *Agricultural Sciences in China*, 6(5), 559-566.
- Zhao, Z. Y., Cai, T., Tagliani, L., Miller, M., Wang, N., Pang, H., ... & Pierce, D. (2000).** Agrobacterium-mediated sorghum transformation. *Plant Molecular Biology*, 44, 789-798.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D., Boller, T., & Felix, G. (2006).** Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell*, 125(4), 749-760.