

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

**DEFICIÊNCIA DE FÓSFORO EM *Arabidopsis thaliana*: CARACTERIZAÇÃO
DE MUTANTES E INTERAÇÕES NUTRICIONAIS**

Mércio Luiz Strieder
Engenheiro Agrônomo, M.Sc. (UFRGS)

Tese apresentada como um dos
requisitos à obtenção do grau de
Doutor em Fitotecnia
Área de Concentração Plantas de Lavoura

Porto Alegre (RS), Brasil
Dezembro de 2009

MÉRCIO LUIZ STRIEDER
Engenheiro Agrônomo e Mestre – UFRGS

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOUTOR EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em:
Pela Banca Examinadora

Homologada em:
Por:

CARLA ANDRÉA DELATORRE
Orientadora - PPG-Fitotecnia

PAULO VITOR DUTRA DE SOUZA
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

MARISA AZZOLINI
PPG-Fitotecnia - UFRGS

ARTHUR GERMANO FETT-NETO
Departamento de Botânica - UFRGS

RENATA PEREIRA DA CRUZ
Divisão de Pesquisa - IRGA

PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de Agronomia

“O trabalho científico é lento, na maioria das vezes monótono e, quase sempre, sujeito às adversidades. Somente a disposição, a perseverança e o amor ao estudo e à pesquisa científica de interesse podem manter o pesquisador ligado ao seu trabalho. Não se devem esperar compensações financeiras ou gratidões humanas. O trabalho científico honesto é acompanhado sempre pela recompensa espiritual e, eventualmente, por alguma homenagem que florescerá de suas verdades.”

PETROIANUA

“A um homem exemplar, meu pai Hilário e ainda a três mulheres grandiosas: a mãe Maria Dolores, a esposa Denise e à filha Gabriela Mary. Vocês são muito especiais e não há palavras que meçam o valor de vosso estímulo e crença constantes, compreensão e, sobretudo, exemplos de garra e de luta. Obrigado por termos vivido juntos mais esta jornada. Sou-lhes eternamente grato por tudo.”

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força, por ser esse “ser superior” no qual busquei forças em momentos conturbados e por me acompanhar nesta caminhada.

À orientadora Carla Andrea Delatorre e ao amigo e conselheiro Paulo Regis Ferreira da Silva, pelas orientações constantes, apoio e incentivo durante toda esta “parceria” e, sobretudo, pela grande amizade e sinceridade.

Às minhas irmãs Marciane e Elenice, aos cunhados Evaldo e Airton e ao afilhado Vinicius e ao sobrinho Arthur, por tudo aquilo que foi partilhado, planejado e que tem propiciado momentos muito especiais em nossas vidas.

Ao Roque e à Anastácia Strieder e ao Gabriel e à Terêsia Rohden, “pais por opção”, e seus filhos, familiares e amigos, pelo apoio e incentivo constantes para continuar buscando conhecimentos e por contribuírem para a “evolução sócio-cultural do homem-cidadão do campo”.

A dois grandes amigos e colegas de pós-graduação Itamar C. Nava e Lisandro Rambo, este agora também meu gestor, pela motivação constante e discussões críticas sobre temas variados, em sua maioria para além do relatado em artigos ou capítulos.

Aos colegas de pós-graduação Cândida S. Monteiro, Naracelis Polleto, Dênis S. Guerra, Divanilde Guerra, Vanderlei D. Tonon, Paulo C. Endrigo, e ao bolsista Adriano B. Schneider, amigos e incentivadores, pelo companheirismo e estímulo à realização deste trabalho.

Aos professores da UFRGS, gratidão pelos ensinamentos e atenção dispensada e aos funcionários do Departamento de Plantas de Lavoura pela colaboração na execução deste trabalho.

Ao Steffen Abel, um amigo de outras fronteiras e supervisor durante o doutorado sanduíche na Universidade da Califórnia em Davis nos EUA, pelos recursos disponibilizados, discussões profícuas de resultados e pelo reconhecimento ao trabalho desenvolvido durante a breve passagem por seu laboratório. Aos colegas de laboratório nos EUA, Siritwat Sachkaronese, Aaron Adamsen, Carmen Lopes e Rocco Lucero, pela amizade e companheirismo.

Ainda um agradecimento especial à Marta Pinzón e ao Pablo Guzmán, pela acolhida nos EUA e por toda história vivida e presente durante nossa estada por aqueles ares. Uma ressalva especial à Marta, que mais do que amiga foi “nossa mãe americana” e, desta forma “também avó da Gabriela Mary”, sua ajuda foi grandiosa.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto de pesquisa (Proc. 473050/2006-4), pela bolsa de estudos durante o doutoramento no Brasil (Proc. 140725/2006-7) e ainda pela bolsa do doutorado sanduíche em Davis-CA, EUA (Proc. 201660/2007-5).

DEFICIÊNCIA DE FÓSFORO EM *Arabidopsis thaliana*: CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES E INTERAÇÕES NUTRICIONAIS ¹

Autor: Mércio Luiz Strieder

Orientadora: Prof. Carla Andrea Delatorre

RESUMO

Fósforo (P) é um dos principais nutrientes que limitam a produção vegetal. Em *Arabidopsis*, sua deficiência reduz o comprimento da raiz principal e aumenta o número e a densidade de raízes laterais. O isolamento e caracterização de mutantes têm ajudado a elucidar a função de genes envolvidos na superação da deficiência de P. Este estudo objetivou fazer a caracterização de respostas morfo-fisiológicas dos mutantes de *Arabidopsis thaliana* *p9*, *p23* e *p37* a suprimentos contrastantes de P, bem como avaliar interações nutricionais de P com outros nutrientes. Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com a *University of California at Davis*, Davis - Califórnia, EUA. Todos os estudos foram conduzidos em câmara de crescimento. Entre os estudos conduzidos citam-se: efeito de formulações de meios de cultura na arquitetura radical; caracterização morfo-fisiológica dos mutantes; transferência de plantas entre meios de cultura com contrastes de P e nitrogênio (N); respostas as interações nutricionais P x Fe e P x N. A maioria das avaliações centraram-se no desenvolvimento do sistema radical, porém em alguns estudos, analisou-se a expressão de genes de resposta à limitação por P. A presença de ácidos nucléicos no meio de cultura reduz o desenvolvimento radical dos três mutantes, sobretudo em *p9*. A ausência de Fe no meio permite resgate do fenótipo radical de COL em *p9*, enquanto a supressão de N possibilita resgate do fenótipo em *p23* e *p37*, independente da condição de P. A inibição radical em *Arabidopsis* causada pelo Fe é agravada sob deficiência de P. Parte do fenótipo radical dos mutantes pode ser causada por defeitos na síntese e/ou sinalização de auxinas ou citocininas. As mutações de *p9* e *p23* foram localizadas no braço superior do cromossomo 1, próximas ao marcador F23M19 onde se obteve as menores taxas de recombinação (0,0% - *p9Ler* e 7,8% - *p23Ler*).

¹ Tese de doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (217 p.) Dezembro, 2009.

PHOSPHATE DEFICIENCY IN *Arabidopsis thaliana*: MUTANTS CHARACTERIZATION AND NUTRITIONAL INTERACTIONS ²

Author: Mércio Luiz Strieder
Adviser: Prof. Carla Andrea Delatorre

ABSTRACT

Phosphorus (P) is one of the main limiting nutrients to plant production. In *Arabidopsis*, P deficiency reduces the primary root length and increases the number and the density of lateral roots. Isolation and characterization of mutants have contributed to better understanding the function of several genes involved in overcoming P starvation. This study has had as objective figure out morpho-physiological response of the *p9*, *p23* and *p37* *Arabidopsis thaliana* mutants in different P supply conditions, as well as evaluates and identify nutritional interactions between P and other nutrients. This work was developed in a collaborative work with the University of California at Davis, Davis - California, U.S.A. All studies were carried out in growth chamber. Among the conducted studies there are: effect of media on the root architecture; morphological and physiological characterization of the mutants; studies with plant transference from media with different P and nitrogen (N) levels and check for nutritional interactions between P x Fe and P x N. Most of the evaluations were focused on root development. However, in some studies we also analyzed the expression of genes related to P limitation. The presence of nucleic acids in the growth media reduces root development of the three mutants, particularly in *p9*. The absence of Fe in the media rescues the COL root phenotype in *p9*, while N suppression rescues that phenotype in *p23* and *p37*, regardless of the P condition. The root inhibition in *Arabidopsis* caused by Fe is stronger under P deficiency. Part of the mutant root phenotype might be caused by defects in the synthesis and/or signaling of auxins or cytokinins. The *p9* and *p23* mutations were mapped to the upper arm of chromosome 1, next to marker F23M19 for which the lowest recombination ratios were obtained (0.0% - *p9Ler* and 7.8% - *p23Ler*).

² Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (217 p.). December, 2009.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Local dos estudos e material vegetal	20
3.2 Condições de crescimento	22
3.3 Preparo e composição de meios de cultura	24
3.3.1 Tratamento do agar	24
3.3.2 Purificação do ácido ribonucléico	25
3.3.3 Composição geral dos meios de cultura	27
3.4 Caracterização geral dos mutantes <i>p9</i> , <i>p23</i> e <i>p37</i>	31
3.4.1 Alterações na disponibilidade de fósforo, dose resposta à fósforo e formulações contrastantes de meios de cultura	31
3.4.1.1 Análise qualitativa de amido	33
3.4.2 Resposta à deficiência nutricional distinta de fósforo	33
3.5 Estudos de transferência de plantas entre meios de cultura e análise de divisão celular	34
3.6 Alterações na arquitetura radical pela presença de ferro sob contrastes no suprimento de fósforo	35
3.7 Alterações na arquitetura radical pela presença de níveis e fontes de nitrogênio sob contrastes no suprimento de fósforo	36
3.8 Alterações na arquitetura radical em função de interações nutricionais de níveis de ferro e fontes e níveis de nitrogênio	37
3.9 Desenvolvimento radical sob contrastes de fósforo e nitrogênio na presença de reguladores de crescimento vegetais	39
3.10 Desenvolvimento de linhagens recombinantes a partir do cruzamento dos mutantes com transgenes	40
3.11 Mapeamento da mutação a um dos cinco cromossomos de arabidopsis	43
3.11.1 Desenvolvimento de populações recombinantes e seleção entre gerações autofecundadas	43
3.11.2 Em busca do cromossomo e da região de localização da mutação em <i>p9</i> e <i>p23</i>	47
3.12 Análise estatística	50

4.	RESULTADOS	51
4.1	Comparação de formulações de meio de cultura, alterações na disponibilidade e dose resposta à fósforo	53
4.2	Resposta à deficiência nutricional distinta de fósforo	73
4.3	Estudos de transferência de plantas entre meios de cultura: análise de divisão celular e crescimento radical após a transferência	80
4.4	Alterações na arquitetura radical pela presença de ferro sob contrastes de fósforo	99
4.5	Alterações na arquitetura radical decorrentes de níveis e de fontes de nitrogênio	104
4.6	Alterações na arquitetura radical em função de interações nutricionais de fósforo, níveis de ferro e fontes de nitrogênio	111
4.7	Desenvolvimento radical sob contrastes de fósforo e nitrogênio na presença de reguladores de crescimento vegetais	132
4.8	Mapeamento da mutação de <i>p9</i> e <i>p23</i> a um dos cinco cromossomos de arabis	144
5.	DISCUSSÃO	151
6.	CONCLUSÕES	206
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	208
8.	VITA	216

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Desenvolvimento radical oito dias após a germinação de quatro genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> em quatro meios de cultura da formulação MP, onde +P= 1,0 mM e +RNA= 0,6 mg ml ⁻¹	62
2. Ausência de acúmulo de amido na parte aérea em quatro genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> , 10 dias após emergência, em meio de cultura da formulação MP com suficiência de fósforo (+P= 1,05 mM) e com organofosfatos (0,6 mg de RNA ml ⁻¹)	66
3. Efeito da disponibilidade de fósforo na cinética da expressão de <i>CycB1::GUS</i> na raiz primária de dois genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> crescidos em meio de cultura MP com contrastes no suprimento de fósforo (+P, -P/+RNA e -P) durante oito dias. DAE= dias após emergência	67
4. Desenvolvimento radical oito dias após a germinação de quatro genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> em meio de cultura MP sem suprimento de nitrogênio (-N) ou ferro (-Fe), em meio com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM)	75
5. Desenvolvimento radical oito dias após a germinação de quatro genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> em meio de cultura MP sem suprimento de potássio (-K) ou enxofre (-S), em meio com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM)	76
6. Desenvolvimento do sistema radical oito dias após a germinação de quatro genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> em meio de cultura MP sem suprimento de nitrogênio (-N), ferro (-Fe) ou potássio (-K), sob ausência de fósforo (-P= 0,0 mM)	77
7. Desenvolvimento do sistema radical oito dias após a germinação de quatro genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> em meio de cultura MP sem suprimento de enxofre, sob ausência de fósforo (-P= 0,0 mM)	78
8. Efeito da disponibilidade de fósforo na cinética da expressão de <i>AtACP5::GUS</i> na raiz primária de três genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> crescidos por cinco dias em meio de cultura MP com	

	suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM) e após transferidos para meio sem suprimento de fósforo (-P= 0,0 mM) ou com limitação deste (-P/+RNA) durante oito dias. DAT= dias após transferência	83
9.	Efeito da disponibilidade de fósforo na cinética da expressão de <i>QC25::GUS</i> na raiz primária de dois genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> crescidos durante cinco dias em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM) e após transferidos para meio sem suprimento de fósforo (-P= 0,0 mM) ou com limitação deste (-P/+RNA) durante oito dias. DAT= dias após transferência	86
10.	Efeito da disponibilidade de fósforo na cinética da expressão de <i>CycB1::GUS</i> na raiz primária de dois genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> crescidos durante cinco dias em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM) e após transferidos para meio sem suprimento de fósforo (-P= 0,0 mM) ou com limitação deste (-P/+RNA) durante seis dias. DAT= dias após transferência	88
11.	Desenvolvimento radical no ecótipo COL e mutantes <i>p9</i> , <i>p23</i> e <i>p37</i> , inicialmente crescidos em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM) durante cinco dias (0 DAT) e após transferidos para meio com ausência de fósforo (-P= 0,0 mM) durante oito dias (8 DAT). Pontos pretos ou linha vermelha indicam o local a partir do qual ocorreu crescimento radical continuado após a transferência, entre 0 DAT e 8 DAT	95
12.	Desenvolvimento radical no ecótipo COL e mutantes <i>p9</i> , <i>p23</i> e <i>p37</i> , inicialmente crescidos por cinco dias em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM) e transferidos para meio com limitação de fósforo (-P/+RNA) por oito dias (8 DAT). Desenvolvimento radical logo após transferência (0 DAT) é o mesmo da Figura 11	97
13.	Desenvolvimento radical de quatro genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> oito dias após germinação em meio de cultura MP com fontes (sulfato de amônio ou nitrato de potássio) e níveis de nitrogênio (0 µM, 25 µM, 250 µM e 1000 µM), sob condição de suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM)	108
14.	Desenvolvimento radical no ecótipo COL e mutantes <i>p23</i> e <i>p37</i> , inicialmente crescidos por cinco dias em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM) e após transferidos para meio com suficiência de fósforo mas sem nitrogênio (+P-N) durante sete dias	123
15.	Desenvolvimento radical no ecótipo COL e mutantes <i>p23</i> e <i>p37</i> , inicialmente crescidos por cinco dias em meio de cultura MP com suficiência de fósforo e ausência de N(+P-N) e após transferidos para meio completo (+P+N) durante sete dias	130

16.	Desenvolvimento radical no ecótipo COL e mutantes <i>p23</i> e <i>p37</i> , inicialmente crescidos por cinco dias em meio de cultura MP com suficiência de fósforo e ausência de nitrogênio (+P-N) e após transferidos para meio de cultura com ausência de fósforo (-P+N) durante sete dias	131
17.	Desenvolvimento radical no ecótipo COL e mutantes <i>p23</i> e <i>p37</i> , inicialmente crescidos por cinco dias em meio de cultura MP com suficiência de fósforo e ausência de nitrogênio (+P-N) e após transferidos para meio com limitação de fósforo (-P/+RNA+N) durante sete dias	132
18.	Análise genética de produtos dos <i>primers</i> NGA168 e F17123 em 14 plantas F1 de duas populações recombinantes de <i>p9</i> e <i>p23</i> com <i>Landsberg erecta</i> (LER), para confirmar perfil genético de plantas anteriormente checadas quanto ao fenótipo radical	146
19.	Taxas médias de recombinação cromossômica no DNA de 32 indivíduos da geração F2 com genótipo confirmado, nos quais testaram-se 11 <i>primers</i> no mutante <i>p9Ler</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	147
20.	Taxas médias de recombinação cromossômica no DNA de 38 indivíduos da geração F3 com genótipo confirmado, nos quais testaram-se 11 <i>primers</i> no mutante <i>p23Ler</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	148
21.	Taxas médias de recombinação cromossômica no DNA de 32 indivíduos da geração F2 com genótipo confirmado, nos quais se testaram nove <i>primers</i> no mutante <i>p9Ler</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	149
22.	Taxas médias de recombinação cromossômica no DNA de 38 indivíduos da geração F2 com genótipo confirmado, nos quais se testaram nove <i>primers</i> no mutante <i>p23</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	150

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Composição nutricional de dois meios de cultura adotados nos estudos com <i>arabidopsis</i>	29
2. Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> usados nas ampliações durante mapeamento das mutações nos mutantes <i>p9</i> e <i>p23</i>	45
3. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de formulações de meios de cultura (MP e ½ MS) em meio com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM), na média de quatro genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	55
4. Comprimento da raiz primária de quatro genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> oito dias após germinação em meio com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM), na média de duas formulações de meios de cultura (MP e ½ MS)	56
5. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de interação dupla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> e formulações de meios de cultura (MP e ½ MS), sob ausência de fósforo (-P= 0,0 mM)	57
6. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de interação tripla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> , níveis de fósforo (P) e formulação do meio de cultura	58
7. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de interação tripla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> , níveis de fósforo (P) e formulação do meio de cultura (½ MS= meio comercial e MP= meio a partir de sais)	60
8. Comprimento da raiz primária em quatro genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> aos oito dias após germinação em quatro meios de cultura da formulação MP (+P= 1,0 mM, +RNA= 0,6 mg ml ⁻¹)	61
9. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de interação dupla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> e níveis de fósforo (P) em meio de cultura MP	69

10.	Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de interação dupla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> e níveis de fósforo (P) em meio de cultura ½ MS	71
11.	Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de deficiências nutricionais distintas de fósforo, em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM)	74
12.	Comprimento da raiz primária em quatro genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> oito dias após germinação em função de deficiências nutricionais distintas de fósforo, em meio de cultura MP sem suprimento de fósforo (-P= 0,0 mM)	79
13.	Comprimento da raiz primária sete dias após germinação (0 dias após transferência - 0 DAT) e crescimento continuado da raiz primária aos quatro e sete dias após transferência (4 e 7 DAT) para meio de cultura MP com limitação de fósforo (-P ou -P/+RNA), em função da interação dupla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> e tratamentos de fósforo	91
14.	Número de raízes laterais sete dias após germinação (0 dias após transferência - 0 DAT) e aos quatro e sete dias após transferência (4 DAT e 7 DAT) para meio de cultura MP com limitação de fósforo (-P ou -P/+RNA) em função da interação dupla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> e tratamentos de fósforo	93
15.	Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação dupla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> e níveis de ferro (Fe) em meio de cultura MP, com e sem suprimento de fósforo	101
16.	Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de interação dupla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> e níveis de ferro (Fe) em meio de cultura MP com limitação de fósforo (-P/+RNA)	104
17.	Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de interação tripla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> , fontes e níveis de nitrogênio (N) em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM)	106
18.	Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de interação tripla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> , fontes e níveis de nitrogênio (N) em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM)	110

19.	Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação tripla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> , fontes de nitrogênio (N) ¹ e níveis de ferro (Fe) em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM)	113
20.	Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação tripla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> , níveis de ferro (Fe) e fontes de nitrogênio (N) em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM)	115
21.	Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação tripla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> , fontes de nitrogênio (N) e níveis de ferro (Fe) em meio de cultura MP sem suprimento de fósforo (-P)	116
22.	Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação tripla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> , níveis de ferro (Fe) e fontes de nitrogênio (N) em meio de cultura MP sem suprimento de fósforo (-P)	117
23.	Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação dupla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> e níveis de ferro (Fe), em meio de cultura MP com ou sem suprimento de fósforo, na ausência de nitrogênio (+P-N e -P-N)	119
24.	Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em quatro genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> em meio de cultura MP com limitação de fósforo (-P/+RNA) e ausência de nitrogênio (-N)	121
25.	Comprimento da raiz primária cinco dias após germinação (no dia da transferência para os demais meios de cultura) em função de interação dupla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> e combinações de suprimento de fósforo (P) e de nitrogênio (N) em meio de cultura MP	122
26.	Desenvolvimento radical sete dias após transferência para meio de cultura MP com os tratamentos listados em função de interação dupla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> e suprimentos de fósforo (+P e -P) na ausência de nitrogênio (-N), em plantas oriundas de meio de cultura MP com suficiência de fósforo e de nitrogênio (+P+N)	125
27.	Crescimento continuado da raiz primária em quatro genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> aos sete dias após transferência entre meios de cultura MP, em plantas oriundas de meio de cultura com suficiência de fósforo e ausência de nitrogênio (+P-N), na média de três tratamentos de P (+P+N, -P/+RNA+N e -P+N)	126

28.	Crescimento continuado da raiz primária sete dias após transferência entre meios de cultura MP com três tratamentos de fósforo (P), em plantas oriundas de meio com suficiência de P e deficiência de nitrogênio (+P-N), na média de quatro genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	127
29.	Desenvolvimento radical sete dias após transferência para tratamentos listados em função de interação dupla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> e combinações de suprimento de fósforo (P), em plantas oriundas de meio de cultura MP com suficiência de P e deficiente em nitrogênio (+P-N)	129
30.	Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação dupla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> e níveis do hormônio auxina, em meio de cultura MP sob dois suprimentos de fósforo (+P e -P)	134
31.	Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação dupla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> e níveis do hormônio citocinina, em meio de cultura MP sob dois suprimentos de fósforo (+P e -P)	137
32.	Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação dupla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> e níveis do hormônio citocinina, em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM), sob dois suprimentos de nitrogênio (+N e -N)	139
33.	Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação dupla de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> e níveis do hormônio citocinina, em meio de cultura MP com limitação de fósforo (-P/+RNA), sob dois suprimentos de nitrogênio (+N e -N)	142

1 INTRODUÇÃO

A nutrição mineral e a deficiência hídrica constituem os fatores mais limitantes à produção vegetal no mundo. No Brasil, a maioria dos solos agricultáveis possui limitações à produção agrícola, como a acidez, baixos teores de matéria orgânica, ocorrência de níveis tóxicos de alumínio, ferro ou manganês e reduzida disponibilidade de fósforo (P).

Conforme a adubação se torna onerosa e limitada, cresce a importância de obter conhecimento para obtenção de plantas que se desenvolvam eficientemente nestes ambientes. Para obter estes avanços, uma das estratégias é identificar e elucidar mecanismos fisio-genéticos e moleculares envolvidos na absorção e uso de nutrientes, buscando assim, entender as adaptações desenvolvidas pelas plantas para conseguirem absorver mais e/ou usar melhor os nutrientes disponíveis no solo, mesmo que este ambiente seja de baixa disponibilidade nutricional.

Após o nitrogênio (N), o P é o nutriente mais limitante à produção vegetal, sendo um dos 17 elementos essenciais ao desenvolvimento das plantas. Entre suas principais funções, destacam-se a participação em processos fisio-genéticos, incluindo geração de energia, síntese de ácidos nucléicos, fotossíntese, glicólise, respiração, síntese e estabilidade de

membranas, (in)ativação de enzimas, reações redox, sinalização e fixação de N.

A concentração de fosfato inorgânico no interior da célula pode exceder 2000 vezes seu teor médio na solução do solo, o qual varia de 0,1 a 10,0 μM em solos naturais. Essa concentração está muito abaixo do K_m de absorção da planta e do total de P presente no solo, pois apenas parte deste P está disponível para absorção pelas plantas. Isto se deve à imobilização e/ou fixação do P junto a complexos insolúveis com cátions, principalmente alumínio e ferro em solos ácidos e cálcio em solos alcalinos, além da adsorção à matéria orgânica recalcitrante e às argilas do solo. Desta forma, a planta gasta ainda mais energia para absorvê-lo e este se torna um dos nutrientes mais limitantes ao crescimento e desenvolvimento das plantas.

Uma das formas usadas para contornar parte dos impactos negativos oriundos da limitação nutricional e estimular o desenvolvimento da planta é a aplicação de corretivos e fertilizantes. Entretanto, essa prática encarece a produção agrícola, tem baixa eficiência e, ainda assim, não permite exploração do potencial genético produtivo de cultivares. Por outro lado, o uso excessivo de fertilizantes fosfatados, somado a restrições nas práticas de conservação do solo, causa perdas expressivas de P de lavouras para rios e outros recursos hídricos. Isso ocorre devido à perda de solo pela erosão, já que o P fica imobilizado nesse e, assim, pode causar eutrofização e hipoxia em lagos e estuários marinhos. Deve-se considerar ainda, que as fontes de rochas de P de qualidade são limitadas e não renováveis, com predições de que sejam consumidas ainda neste século.

Neste contexto, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias e adoção de medidas que otimizam a eficiência de absorção e de uso de P pelas plantas nos sistemas agrícolas de produção de grãos, tornando-os menos dependentes de insumos externos e, portanto, mais sustentáveis. Entre as estratégias que podem ser usadas, está a obtenção de cultivares de espécies agrícolas mais eficientes na absorção e no uso de P do solo. Para tanto, é importante identificar e elucidar mecanismos fisio-genéticos e moleculares envolvidos na absorção de P e buscar entender como as adaptações desenvolvidas pelas plantas podem contribuir para maior absorção desse nutriente, mesmo sob níveis limitantes no ambiente. Entre as limitações dessa estratégia está o fato da seleção de cultivares de espécies agrícolas de alta produtividade ser realizada, especialmente, em ambientes bem fertilizados. Apesar de favorecer a identificação de genótipos com maior potencial produtivo, esta prática reduz a estabilidade e adaptabilidade de genótipos mais produtivos a ambientes produtivos distintos, além de gerar perda de caracteres ligados a estresses abióticos, como os nutricionais.

Por outro lado, o seqüenciamento genético da espécie silvestre *Arabidopsis thaliana* em 2000, uma espécie modelo, trouxe novas ferramentas e perspectivas para contornar o problema. *A. thaliana* é, atualmente, a espécie de planta vascular mais bem estudada e, assim como outros organismos modelos de estudo, pode auxiliar a elucidar fenômenos na planta, contribuir ao desenvolvimento de técnicas e facilitar identificação de genes estruturais e de regulação importantes em mecanismos chaves do desenvolvimento. Os diversos estudos desenvolvidos com essa espécie são atribuídos ao seu pequeno tamanho, ao curto tempo de geração e reprodução

autógama, à acessibilidade e à facilidade de manipulação genética, à grande produção de sementes, ao pequeno tamanho do genoma e à ampla conservação de mecanismos fisio-genéticos, bioquímicos e moleculares entre as espécies vegetais. Além disso, essa espécie não interage com micorrizas e apresenta a maioria das respostas clássicas de plantas à deficiência nutricional.

Em estudos anteriores conduzidos por outros integrantes deste grupo de estudo, utilizando seleção genética previamente desenvolvida por CHEN *et al.* (2000), em parceria com o grupo do Dr. Steffen Abel junto à UC Davis, foram identificados três mutantes insensíveis a fosfatos orgânicos. Em estudos prévios, foi verificado que além da resposta à limitação de P os mutantes também evidenciam apresentar efeito de interação com outros nutrientes, o que acabou direcionando boa parte dos estudos.

O presente trabalho pretende auxiliar na elucidação do processo de sinalização à limitação de P em plantas e verificar a ocorrência de eventuais interações com outros nutrientes. Para tal, foi adotada a espécie modelo *A. thaliana*, através de estudos em mutantes, para entender como as plantas reconhecem e respondem ao sinal da deficiência de P. Além disso, foram conduzidos estudos para entender a relação de P com outros nutrientes em níveis contrastantes, uma vez que há relatos de interações com efeitos negativos no desenvolvimento do sistema radical de *A. thaliana*. Os conhecimentos obtidos nessa espécie modelo provavelmente também serão válidos para outras espécies vegetais, pois rotas metabólicas, fatores regulatórios e genes que as codificam são conservados durante a evolução das espécies.

A identificação de mecanismos regulatórios, de sinalização e a clonagem de genes envolvidos na resposta à deficiência de P em arábido podem possibilitar transferência desse conhecimento a culturas de interesse agrícola e/ou contribuir para identificação de genes ortólogos nas espécies de interesse comercial. Desta forma, poder-se-á alterar a expressão destes genes, buscando produzir cultivares comerciais mais eficientes no uso de P, reduzir dispêndios com fertilização fosfatada e tornar a produção de alimentos mais próxima da sustentabilidade.

Baseado na complexidade em torno da deficiência de P à planta e dos resultados previamente obtidos com os mutantes, com os quais serão conduzidos estudos mais aprofundados, os objetivos deste trabalho foram:

(i) caracterizar respostas morfo-fisiológicas e bioquímicas dos mutantes *p9*, *p23* e *p37* crescidos em suprimentos contrastantes de P;

(ii) comparar o desenvolvimento radical dos três mutantes e identificar qual o meio de cultura mais adequado para avançar os estudos em busca da identificação da função do gene mutado;

(iii) avaliar o desenvolvimento radical nos mutantes em condição com suprimento de fósforo através de ácidos nucléicos, identificando respostas distintas entre os mutantes;

(iv) avaliar se a redução no desenvolvimento radical é devida apenas à deficiência de P ou se há interação com outros nutrientes e caso ocorram, identificar quais são estas e de que forma afetam o desenvolvimento radical dos três mutantes;

(v) visualizar na planta expressão de genes conhecidos e envolvidos no processo de aclimação à limitação de fósforo (*AtACP5*, *QC25*, e *Cyc::B1*)

através do uso de genes repórteres associados a estes genes e comparar essa expressão entre mutantes;

(vi) identificar se alguma das mutações dos mutantes é causada por defeitos na síntese e/ou percepção de hormônios vegetais sob contrastes de suprimento de fósforo e nitrogênio;

(vii) proceder mapeamento genético dos genes mutados de interesse a um dos cinco cromossomos de arabidopsis.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As deficiências nutricionais por N e P, juntamente com o estresse hídrico, são os principais fatores limitantes ao desenvolvimento de espécies vegetais. A limitação por P ocorre em solos alcalinos e ácidos (LÓPEZ-BÚCIO *et al.*, 2000). Embora a quantidade de P no solo seja alta, a forma preferida para absorção, o ortofosfato (P), encontra-se na forma não-lábil ou fora do alcance da rizosfera, portanto não disponível à maioria das plantas e microorganismos (HOLFORD, 1997). Isso ocorre devido à sua adsorção junto às partículas da matéria orgânica, argilas e superfícies de carbonatos de cálcio e magnésio, além do efeito do alumínio e ferro (Fe) tóxicos, com os quais forma quelatos e precipita, reduzindo a disponibilidade.

Uma das formas mais fáceis de mitigar a deficiência de P às plantas na agricultura é a aplicação de fertilizantes fosfatados, embora menos de 20 % desse P seja recuperado durante o primeiro cultivo após sua aplicação (RUSSELL, 1973 apud VANCE *et al.*, 2003). Isso ocorre devido à alta taxa de retenção de P junto à argilo minerais e, desta forma, um problema potencial, pois as reservas de fosfato não são renováveis e o uso de fertilizantes pode causar eutrofização e hipoxia de cursos hídricos (BUMB & BAANANTE, 1996 apud VANCE *et al.*, 2003). Na Europa, países como Suécia (ULÉN *et al.*, 2005), Holanda (SCHOUUMANS, 2006) e Reino Unido (RAHIMI *et al.*, 2006)

possuem restrições de doses de P a serem aplicadas no solo, dependendo das características de uso e manejo e do histórico das áreas.

Ao contrário de outros nutrientes, a absorção de P depende de difusão, a qual é muito baixa e depende do teor de água e da interação com colóides do solo, podendo ocorrer zona de depleção de P em torno da raiz sob altas taxas de absorção (MARSCHNER, 1995; JUNGK, 2001). A absorção de P ocorre, preferencialmente em pH 4,5 a 6,0, onde há predominância do ortofosfato primário (H_2PO_4^-) e ortofosfato secundário (HPO_4^{2-}) (ULLRICH-EBERIUS *et al.*, 1981; RAGHOTHAMA, 1999). Diferente de N e Ca, toda extensão radical pode absorver P (DREW & SAKER, 1984), especialmente sob baixa disponibilidade (FERGUSON & CLARKSON, 1975).

O transporte de P do solo à planta ocorre via membrana plasmática, sendo a energia requerida para absorção de P dependente de co-transporte de P com prótons (H^+), portanto da atividade de exclusão de H^+ via bomba de prótons (ULLRICH-EBERIUS *et al.*, 1981; 1984; SAKANO, 1990). A absorção inicia pela despolarização da membrana e acidificação do citosol, efeitos oriundos da reposição de P à planta (ULLRICH-EBERIUS *et al.*, 1981). Após, ocorre repolarização da membrana pela atividade da H^+ -ATPase, que bombeia o excesso de prótons ao meio externo, permitindo manutenção do pH interno da célula e gerando força motriz necessária para absorção do P (SCHACHTMAN *et al.*, 1998). Com isso, estima-se que para cada íon H_2PO_4^- absorvido sejam co-transportados de dois a quatro prótons (ULLRICH-EBERIUS *et al.*, 1984; SAKANO, 1990).

Parte considerável do conhecimento relativo à absorção de P é oriunda de estudos de cinética de absorção desenvolvidos por EPSTEIN & HAGEN

(1952), em cujos estudos verificaram que a absorção dos íons K^+ e Rb^+ em raízes de cevada segue a cinética clássica de enzimas, a de Michaelis-Menten. EPSTEIN *et al.* (1963) ainda demonstraram que absorção de íons simples ocorre em dupla fase, sob alta e/ou baixa afinidade, respectivamente, quando as concentrações externas são baixas e altas. Atualmente, considera-se que em concentrações de P de ordem μM , o mecanismo de alta afinidade é induzido, enquanto o de baixa afinidade apresentaria expressão constitutiva (FURIHATA *et al.*, 1992). Além disso, dos 18 transportadores identificados, 17 são considerados de alta afinidade, todos agrupados na família *Ph1*, enquanto o remanescente mostra cinética de baixa afinidade, o primeiro da família *Ph2* (DARAM *et al.*, 1999). Segundo os autores, todos os membros de *Ph1* são expressos em raízes, ao passo que o de baixa afinidade é expresso principalmente em folhas e parece ser pouco afetado pela disponibilidade de P (DARAM *et al.*, 1999). Estes dados sugerem que não há transportador de baixa afinidade expresso nas raízes, possivelmente devido à predominância de baixos teores de P disponíveis no solo, ou ainda, caso exista esse transportador, que este possui características bem distintas das dos demais identificados até o momento.

Nos meristemas de plantas jovens são encontrados teores de P de 2 a 3 % da massa seca, enquanto em plantas adultas a concentração varia de 0,05 a 0,5 % da massa da planta (VANCE *et al.*, 2003). Apesar desses teores baixos relativamente aos níveis de N e K, o P participa de diversas funções biológicas básicas: atua como elemento estrutural de macromoléculas como os ácidos nucléicos e fosfolipídios, no metabolismo energético atuando na glicólise e respiração, além de compor e ativar intermediários da fotossíntese,

auxilia na síntese e estabilidade de membranas, na (in)ativação de enzimas e em reações redox. Além disso, atua em cascatas de transdução de sinal, no metabolismo de carboidratos e fixação de N.

Em termos de localização subcelular, a maior parte do P está no citoplasma e em organelas como vacúolo, plastídios e mitocôndria (RAUSCH & BUCHER, 2002). Sob suprimento adequado de P, o vacúolo pode incrementar em até 80 % seu conteúdo de P, sem afetar os níveis no citosol (TU *et al.*, 1990). Contudo, sob limitação de P, quase todo P está no citoplasma e no cloroplasto, sendo o vacúolo um tampão das flutuações do nível de P no citoplasma, evitando gasto energético com adaptações durante alterações de curta duração nos níveis de P (ANGHINONI & BARBER, 1980; MARSCHNER, 1995).

Entre as respostas clássicas de plantas à limitação prolongada por P estão o acúmulo de amido e de antocianinas na parte aérea e, especialmente a remodelagem e reestruturação da arquitetura radical (MARSCHNER, 1995; WILLIAMSON *et al.*, 2001; LÓPEZ-BUCIO *et al.*, 2002; DELATORRE, 2009; SÁNCHEZ-CALDERÓN *et al.*, 2006). Para otimizar a exploração do solo e absorção de P, há incremento na relação raízes/parte aérea, especialmente pelo maior volume de raízes laterais, em detrimento do desenvolvimento da raiz principal, (BATES & LYNCH, 1996; JUNGK, 2001; WILLIAMSON *et al.*, 2001; LÓPEZ-BUCIO *et al.*, 2002; DELATORRE, 2009), além de incrementos em pêlos radiculares, responsáveis por 60 % do P absorvido sob condições limitantes (GAHOONIA & NIELSEN, 1998; 2004).

Sob condições de deficiência de P na planta, seus níveis podem cair de cerca de 5,0 mM para menos de 0,2 mM nos tecidos foliares. Além disso,

níveis baixos de P no citoplasma e no cloroplasto afetam drasticamente a partição de carbono e a incorporação do carbono fixado em amido transitório (WALKER & SIVAK, 1986; MARSCHNER, 1995). Em estudos com cloroplastos isolados, FLÜGGE (1999) demonstrou que níveis de P superiores a 1,0 mM no meio externo estimulam a fotossíntese líquida mas reduzem a síntese de amido no cloroplasto. Segundo o autor, sob limitação de P no citoplasma, a síntese e o acúmulo de amido são estimulados nos cloroplastos e, ao mesmo tempo, ocorre diminuição da taxa fotossintética líquida. Essa mudança para maior síntese de amido reduz a atividade do ciclo de Calvin e a fixação de carbono, limitando a regeneração de ribulose bi-fosfato. A acumulação de amido transitório pode ocorrer devido à baixa exportação de trioses do cloroplasto, pelo aumento da atividade de ADPG-pirofosforilase e pela limitação de ATP (BUCHANAN *et al.*, 2000). Isso se justifica porque para cada molécula de P transportada numa direção, uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato (3-PGA) ou uma de dihidroxicetona-fosfato (DHAP) é transportada na direção oposta.

Por outro lado, a emissão de raízes laterais melhora a exploração da camada superficial de solo, que devido à aplicação sucessiva de fertilizantes e a baixa mobilidade do P no solo, concentra as maiores quantidades. Também pode ocorrer indução de transportadores de P de alta afinidade e secreção de ácidos orgânicos (WATT & EVANS, 1999; VANCE *et al.*, 2003), que alteram o pH da rizosfera, aumentam mobilização do fosfato ligado a cálcio, ferro ou alumínio em solos alcalinos e ácidos (JONES, 1998). Por fim, ainda há secreção de enzimas como fosfatases ácidas e diesterases, que atuam na liberação de P de compostos orgânicos do solo. Estes eventos combinados ou

mesmo isolados, podem alterar consideravelmente a morfologia radical da planta. Por outro lado, sob deficiência de P passageira a aclimatação passa pela manutenção dos níveis de P no citoplasma (SCHACHTMAN *et al.*, 1998), via remobilização do P do vacúolo e do cloroplasto.

A inibição da raiz primária em condição de P limitante é característica marcante de *arabidopsis*, especialmente do ecótipo Columbia (COL). Em outros acessos de *arabidopsis* e na maioria das plantas, há maior alocação de recursos às raízes durante limitação por P, resultando em raízes mais longas e, portanto com comportamento menos severo daquele observado em COL. MOLLIER & PELLERIN (1999) verificaram redução ou alongação celular radical pouco expressiva em milho sob limitação de P, resposta similar à obtida por SHIMIZU *et al.* (2004) em arroz, onde também não ocorreu alteração na alongação nas células da raiz primária. Contudo, estes autores observaram maior emissão de raízes laterais, possibilitando explorar maior volume de solo e, potencialmente, aumento na absorção de P.

Contrariando o comportamento verificado no ecótipo COL sob limitação de P, SÁNCHEZ-CALDERÓN *et al.* (2006) identificaram 11 mutantes *lpi* (*low phosphate insensitive*) com raízes primárias de comprimento igual ou superior às de COL em condição de suficiência de P (1,0 mM). Nesta mesma linha, SHIN *et al.* (2006) caracterizaram *at4*, que possui comportamento radical similar aos *lpi*. Ambos os grupos de pesquisa verificaram que com suprimento de P, estes mutantes possuem sistema radical similar ao de COL, raízes primárias longas e pequena emissão de laterais. Estas respostas radicais nos mutantes devem-se à maior alocação de P na parte aérea além de prováveis

alterações na regulação de translocação de P à parte aérea, que é influenciada pelo nível de P interno, mas não dependente do P externo.

Considerando estes estudos, a resposta do ecótipo COL à limitação por P, redução no comprimento radical e emissão de raízes laterais, evidencia influência de outros fatores além de P, a menos que a resposta deste ecótipo seja exceção. Entre estes fatores, está a ocorrência de interações nutricionais, as quais podem resultar em complexos tóxicos às plantas ou redução na disponibilidade de nutrientes importantes, assim causando efeito negativo no desenvolvimento da planta.

Com isso, diversas interações nutricionais têm sido reportadas como importantes na manifestação de sintomas de deficiência e toxidez em plantas (MARSCHNER, 1995). Em arroz, LI *et al.* (2001) verificaram que em alguns casos os sintomas de deficiência e toxidez podem ser diminuídos pelo incremento ou redução nos níveis de outros nutrientes, como é o caso da adição de extra de K para reduzir a toxidez por Fe em arroz. Em arábida, há evidências de que interações nutricionais afetam crescimento radical sob limitação de P, especialmente a com Fe, pois ambos interagem no solo, na superfície radical e dentro da planta (WARD *et al.*, 2008). Além dos efeitos de interações nutricionais na arquitetura radical, MISSON *et al.* (2005) também verificaram alteração na expressão de genes relacionados ao acúmulo de Fe na planta. Segundo os autores, *AtFER1*, gene de ferritina relacionado ao acúmulo de Fe na planta, tem expressão aumentada, enquanto *AtIRT1*, transportador de Fe de alta afinidade, tem expressão reduzida, cujos resultados se correlacionam com incremento nos níveis de Fe em plantas sob deficiência de P.

Por outro lado, também há evidências de que a fonte de N pode afetar a resposta de *Arabidopsis* à limitação de P e a níveis tóxicos de Fe. Neste sentido, CHEVALIER *et al.* (2003) verificaram que o ecótipo Llagostera-0 (LI-0) de *A. thaliana* não apresenta a mesma resposta de redução no desenvolvimento radical típica de COL quando ambos estão sob limitação de P. Segundo WARD *et al.* (2008) essa resposta relaciona-se a maior tolerância de LI-0 a altos níveis de Fe. Contudo, estes autores demonstraram que este comportamento de LI-0 só ocorre quando há remoção de amônio do meio de cultura, enquanto na presença desta fonte de N o desenvolvimento radical de LI-0 é similar ao de COL sob limitação de P, ou seja, há limitação no desenvolvimento radical.

Outro aspecto relevante e ainda não completamente elucidado é o mecanismo sensor da disponibilidade de P na rizosfera e a necessidade da planta. Neste sentido, foram obtidos importantes avanços em relação à atividade meristemática. A raiz apresenta três camadas de células concêntricas distintas, epiderme, periciclo e a endoderme, as quais circundam os feixes vasculares e são consideradas o centro de origem de diversas das respostas à alteração na arquitetura radical em condições nutricionais limitantes. Destas camadas, o periciclo é região de especial importância no presente trabalho, uma vez que é a partir desta que ocorre a emissão de raízes laterais, resposta típica de ajuste da arquitetura radical em condições limitantes de P.

A organização dessa estrutura celular no meristema é responsável pela alteração na arquitetura radical durante a deficiência por P e é fortemente influenciada pelo centro quiescente (CQ), região que mantém algumas células

em estado de “células-tronco vegetais”. Ou seja, é reduto de células meristemáticas indiferenciadas, mas que se diferenciam a partir da captação de um sinal oriundo de outras células, culminando na origem de células de tecidos distintos, conforme necessidade da planta. Esse especializado mecanismo de resposta é dependente da ação de importantes fatores de transcrição como SHR (*Short Root*) (WHELCH *et al.*, 2007; CUI *et al.*, 2007), SCR (*Scarecrow*) (DI LAURENCIO *et al.*, 1996; SABATINI *et al.*, 2003), PLT1/2 (*Plethora*) (AIDA *et al.*, 2004) e, mais recentemente, *PDR2* (*Phosphate Deficient Response*) (TICCONI *et al.*, 2009), os quais em conjunto modulam toda organização da arquitetura radical.

Além de estratégias de aclimação através de alterações morfo-fisiológicas, diversas mudanças moleculares e na expressão gênica têm sido reportadas em resposta à limitação de P. Usando perfis transcricionais, após 100 h de limitação por P, HAMMOND *et al.* (2003) observaram alterações em 61 de 8100 genes analisados. WU *et al.* (2003), após 72 h de deficiência de P, encontraram alterações na expressão em mais de 1800 de 6172 genes analisados. Por outro lado, num microarranjo de oligonucleotídeos com 22810 genes, MISSON *et al.* (2005) observaram indução em 72 e repressão em quatro genes da raiz após 12 h de limitação de P, enquanto entre 24 e 48 h de limitação de P na parte aérea houve indução de 291 e repressão em 34 genes. Sob limitação superior a 48 h, houve indução em 228 e repressão em 74 genes de raízes e alterações ainda maiores em genes da parte aérea. Por sua vez, DELATORRE (2009) observou indução gênica em 705 e repressão em 874 genes em raízes após 24 horas de limitação de P. Em *pdr1*, a autora

verificou que mais de 20 genes induzidos sob deficiência de P em COL têm expressão reduzida quando *pdr1* é submetido a baixo nível de P.

Além dessa forma clássica de avaliação da expressão gênica, outra possibilidade é fazer uso de linhagens que tenham promotores de genes relacionados à limitação de P fusionados com genes marcadores. Essa ferramenta permite que o local de expressão destes genes seja observado em regiões tecido específicas, sendo desnecessária extração do mRNA ou realização de outras análises, o que reduz dispêndio de tempo e recursos financeiros.

Por outro lado, um aspecto ainda não completamente elucidado é o tipo de sinal usado pela planta para induzir genes envolvidos na resposta à limitação de P (BUN-YA *et al.*, 1991). Poucos componentes regulatórios e de sinalização à limitação de P foram identificados até o momento, embora várias proteínas transportadoras envolvidas na aquisição e na distribuição de P sejam conhecidas. Em princípio, parece ser mais apropriado a adoção dos níveis internos de P como sinal regulatório, pois sob níveis adequados de P dentro da célula, o sistema de resgate poderia ser desativado, independente da disponibilidade nutricional no solo. Entretanto, MÜLLER *et al.* (2004) verificaram que, na maior parte dos genes avaliados, trocas na atividade transcricional em raízes sob alto P e logo após sob limitação desse nutriente, precederam as ocorridas na parte aérea, demonstrando que as raízes não necessitam do sinal da parte aérea, e vice-versa, para que haja resposta à deficiência de P. Essa resposta independente da parte aérea e, especialmente das raízes, se justifica pelo fato do solo apresentar sítios com concentrações distintas de nutrientes. Assim, a resposta radical se relaciona à disponibilidade

de P no solo, de forma que deverá haver menor desenvolvimento da raiz primária em sítio com limitação de P e, em contrapartida, estímulo ao desenvolvimento radical no local de suprimento adequado.

Além do *status* de P na planta, da percepção radical da quantidade de P presente no meio externo, outros candidatos a sinais sistêmicos à limitação de P são os hormônios. Balanço interno dos níveis de ácido abscísico, auxinas, etileno e citocininas são importantes no desenvolvimento e aclimatação da planta a estresses como a limitação de P. Entre os principais efeitos hormonais estão organização da arquitetura radical, emissão de raízes laterais e formação de pêlos radicais (VANCE *et al.*, 2003). Para exemplificar, a concentração de citocininas reduz sob limitação de P e N e, nessa condição, pode incrementar relação raízes/parte aérea e proliferação de raízes laterais, além de reprimir genes induzidos pela limitação de P (WAGNER & BECK, 1993). Auxinas controlam densidade e alongação de pêlos radicais e alongação da ponta de raiz sob limitação de P (BATES & LYNCH, 1996; SCHIEFELBEIN, 2000). Por sua vez, o etileno atua na regulação do crescimento e da alongação da raiz e formação de raízes adventícias e pêlos radicais, com efeito pronunciado na arquitetura radical.

O isolamento ou construção de mutantes simples ou duplos propiciou avanços relevantes em diversas áreas, permitindo avaliar o efeito simples ou a interação dos genes mutados em resposta a estresses abióticos, uma vez que muitas das respostas são complexas, como é o caso da limitação por P. Em *arabidopsis*, isso é facilitado pelo fato de seu genoma estar seqüenciado e haver disponibilidade de mutantes a diferentes estresses e, por isso é considerada espécie modelo para estudos biológicos. Outras vantagens de

arabidopsis são: seu pequeno tamanho, curto tempo de geração, reprodução autógama, acessibilidade e facilidade de manipulação genética, grande produção de sementes, pequeno tamanho do genoma, ampla conservação de mecanismos fisio-genéticos, bioquímicos e moleculares. Além disso, essa espécie não interage com micorrizas e apresenta a maioria das respostas clássicas de plantas à deficiência nutricional.

Considerando estes aspectos e buscando identificar componentes regulatórios da rota de sinalização à P, CHEN *et al.* (2000) e TICCONI *et al.* (2001) desenvolveram seleções genéticas baseadas na habilidade condicional de arabidopsis usar compostos orgânicos como fonte de P quando está sob limitação por P mineral. Nesta etapa, estes autores e DELATORRE (2009) identificaram, entre outros mutantes, *pdr1*, *pdr2*, *p9*, *p23* e *p37*, os quais são incapazes de crescer normalmente em substratos contendo ácidos nucléicos como única fonte de P, mas recuperam crescimento sob altos níveis de P.

O mutante *pdr1* possui crescimento radical reduzido relativamente à COL sob deficiência de P e mesmo na presença deste, enquanto quando o nitrato é removido do meio há restabelecimento do fenótipo radical de COL neste mutante, sugerindo a ocorrência de interação de P e N (DELATORRE, 2009). *pdr2* apresenta raiz primária extremamente curta sob limitação de P e, segundo TICCONI *et al.* (2009), *PDR2* codifica uma P₅-type ATPase, que em conjunto com outras proteínas, auxilia no ajuste da atividade do meristema em função da disponibilidade de P. Embora não sejam objeto específico de estudo no presente trabalho, estes dois mutantes, *pdr1* e *pdr2*, mesmo em

condição de suficiência de P (+P) o fenótipo radical é um pouco mais curto que o de COL, ficando em cerca de 80 % do obtido no ecótipo.

Por outro lado, PINTO (2005) iniciou a caracterização de *p9*, *p23* e *p37*. A autora verificou que *p9* reduziu (58%) o comprimento da raiz principal em relação à COL em ambiente -P/+RNA. Em *p23*, nas mesmas condições de crescimento, a redução foi ainda mais drástica, porém houve emissão de mais raízes laterais, efeito apenas parcialmente revertido sob condição de suficiência de fósforo (1,0 mM). Por sua vez *p37* em ambiente -P/+RNA também teve raiz primária menor que a de COL, sendo similar ao comprimento de *p23*. Na presença de P, *p37* teve redução de 50 % no crescimento da raiz principal relativamente à COL, efeito parcialmente compensado pela maior emissão de raízes laterais. Essas reduções no comprimento da raiz principal nos mutantes *p9* e *p37* foram atribuídas, principalmente, a menor alongação de células radicais e à redução na taxa de divisão celular (PINTO, 2005).

Nesses estudos de caracterização de mutantes, PINTO (2005) verificou que apesar de acumular amido sob -P/+RNA, diferente dos demais mutantes estudados, *p37* não acumulou antocianinas. A divisão celular no meristema apical radical desse mutante é parcialmente afetada, assim como a alongação das células da raiz. Por outro lado, *p9* apresenta acúmulo de amido e antocianinas, não reduz os níveis de P na parte aérea e não evidencia haver defeitos na indução de enzimas nucleolíticas (PINTO, 2005). *p23* degrada ácidos nucléicos mais lentamente, porém não acumula amido nestas condições, diferente do esperado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local dos estudos e material vegetal

Os estudos desta tese foram conduzidos em duas condições laboratoriais de pesquisa. No primeiro e segundo anos do período de doutoramento (Proc. 473050/2006-4 e Proc. 140725/2006-7 - CNPq) utilizaram-se as condições de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia e de Fisiologia Vegetal da Faculdade de Agronomia da UFRGS, em cujo período se buscou obter sementes dos diferentes mutantes e avançar os cruzamentos para geração das populações recombinantes para mapeamento e também daqueles com as plantas transgênicas.

Posteriormente, no terceiro ano da pesquisa, por ocasião da realização do curso de doutorado sanduíche (Proc. 201660/2007-5 - CNPq) os estudos foram conduzidos junto ao laboratório do professor PhD., Steffen Abel, na Universidade da Califórnia em Davis-CA, EUA. Os dados apresentados neste trabalho foram todos os obtidos nas condições laboratoriais dos EUA. As etapas desenvolvidas no Brasil consistiram no desenvolvimento do material vegetal, permitindo que se pudesse conduzir toda diversidade de estudos conduzidos, apesar do tempo restrito dispendido nos EUA.

Foram adotados os mutantes *p9*, *p23* e *p37*, e como controle (testemunha), plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh do ecótipo

Columbia (COL). Esses três mutantes têm como base genética o ecótipo COL e foram desenvolvidos via mutação química, usando EMS (etil-metano-sulfonato) e selecionados por DELATORRE (2009). Além das sementes destes quatro genótipos, em alguns estudos foram ainda incluídas sementes dos mutantes *pdr1* e *pdr2*, anteriormente identificados e caracterizados junto ao mesmo laboratório na UC Davis pela orientadora da presente tese. Em alguns estudos, conforme ressalvas oportunas, adotaram-se apenas dois dos três mutantes, uma vez que se buscou refinar o comportamento de alguns resultados, sendo desnecessário conduzir determinado ensaio para o mutante ao qual não se aplicava.

Também foram realizados cruzamentos dos três mutantes com plantas do ecótipo *Landsberg erecta* (LER) e com alguns transgenes, sendo os mutantes os receptores de pólen e LER e as linhagens transgênicas usadas como doadores de pólen. A adoção de LER se deve ao fato deste ecótipo de *Arabidopsis* apresentar desenvolvimento radical maior que o de COL e dos mutantes em estudo em condições de deficiência de P e, portanto, facilitar a seleção das plantas por ocasião do desenvolvimento das populações para mapeamento da mutação.

Por outro lado, as linhagens transgênicas adotados foram *CycB1::GUS* (CÓLON-CARMONA *et al.*, 1999), *AtACP5::GUS* e *QC25::GUS*, cujas construções permitem visualização da atividade gênica diretamente no tecido sem necessidade de extração de RNA por exemplo, como anteriormente frisado. Além disso, a opção por estes transgenes deve-se ao fato de permitirem a visualização da expressão gênica de genes envolvidos em rotas importantes de resposta à limitação por P.

A análise de *CycB1::GUS* deve-se ao fato de estar relacionado ao processo de divisão celular, ou seja, essa construção permite avaliar a atividade de divisão celular (mitose), células na transição das fases G2 e M do ciclo celular. Assim, com esta construção é possível avaliar se há ou não divisão celular em função de determinada condição de P, permitindo inferir sobre qual o tipo de resposta que a planta está desencadeando como resposta ao ambiente ao qual está submetida. Por outro lado, a análise de *AtACP5::GUS* é importante em termos de remobilização do P imobilizado, uma vez que o gene *AtACP5* está relacionado com a síntese de ácidos orgânicos que auxiliam na disponibilização do P imobilizado. Assim, teoricamente, quanto maior a expressão deste gene, maior é a quantidade de ácidos orgânicos sintetizados pelas raízes e liberadas no ambiente, os quais auxiliam na mobilização de parte do P imobilizado. Por fim, *QC25::GUS* relaciona-se ao centro quiescente da planta, região no meristema vegetal que consiste de poucas células e que é indicativo da atividade do meristema, de que novas células continuam sendo geradas.

3.2 Condições de crescimento

Boa parte dos resultados de pesquisa gerados neste trabalho foi desenvolvida em câmara de crescimento com condições ambientais controladas. O ambiente de germinação e crescimento de plantas ocorreu sob temperatura de 22 a 24° C, com intensidade luminosa de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h de luz, seguido de 8 h de ausência de luz.

Nestes estudos foram adotadas placas de petri estéreis quadradas com dimensões 100 x 100 x 15 mm. Na maioria dos estudos, as sementes foram

distribuídas em linha única sobre o meio de cultura, na parte superior da placa. Após isolamento com fita adesiva microporosa ou plástico microporoso, as placas foram dispostas em posição vertical sob estribos de alumínio, facilitando o desenvolvimento vertical das raízes e posterior mensuração do comprimento e contagem de raízes laterais. O período de desenvolvimento nestas condições dependeu do objetivo do estudo, sendo apresentado em mais detalhes na descrição de cada experimento conduzido.

Para manter o ambiente da placa estéril, a superfície das sementes foi desinfestada em solução de hipoclorito de sódio a 1 % e Tween 20 (polioxietileno sorbitano monolaureato) a 0,1 % por cinco minutos sob agitação constante, seguido de cinco lavagens com água purificada/esterilizada. A uniformização da emergência e quebra de dormência foi obtida através da manutenção das sementes em geladeira, sob temperatura de 4° C por 48 h.

Por outro lado, o desenvolvimento das populações recombinantes para mapeamento da mutação, o avanço de gerações das linhagens obtidas a partir do cruzamento dos mutantes com as plantas transgênicas, bem como dos próprios mutantes para produção de sementes, foi realizado em sua totalidade em condições de solo. Para tal, adotou-se substrato padrão para crescimento de plantas Sunshine mix1 (Sungro Horticulture Canadá LTDA), no qual a cada 12 a 15 dias foi realizada suplementação com solução nutritiva prontamente disponibilizada pela equipe técnica responsável por todo o ambiente das câmaras de crescimento. As condições de luz e temperatura foram similares àquelas da câmara de crescimento onde se adotou as placas de petri.

3.3 Preparo e composição de meios de cultura

Para preparação dos diferentes meios de cultura além dos nutrientes e vitaminas ainda foi necessária a adição de agente solidificante, que permite às sementes e plantas permanecerem na superfície do meio de cultura, bem como a disposição vertical das placas para crescimento da raiz. Foi adotado o Micropropagation Agar type – I (Caisson Laboratories, Inc.). Com o objetivo de extrair componentes que pudessem afetar a composição final dos meios de cultura procedeu-se a lavagem do referido, conforme descrito abaixo. Esta etapa foi assertiva, já que em estudo recente JAIN *et al.* (2009) demonstraram que as características e, especialmente, a composição do agar pode afetar a morfologia e a resposta do sistema radical de arabis, especialmente sob limitação de P, que é o foco do presente trabalho.

3.3.1 Tratamento do agar

Cerca de 100 g de agar foram diluídos em recipiente contendo 3 L de água destilada, a qual foi brevemente agitada e a solução mantida em ambiente sob 4° C até haver decantação do agar. Esta operação foi repetida cinco vezes, sempre se descartando o sobrenadante e iniciando nova lavagem com água pura/estéril. Depois das lavagens, o agar foi tratado com trocador aniônico básico para remoção de P, garantindo precisão nas concentrações previstas nos tratamentos. Para tal, colocaram-se na solução, duas membranas microporosas com cinco centímetros de comprimento contendo o trocador aniônico DOWEX G-55 (Sigma-Aldrich). Essa solução foi mantida sob agitação constante a 4° C durante cerca de 12 h (*overnight*). Em seguida, a solução foi mantida sem agitação para ocorrer decantação do agar,

quando se procedeu a remoção da água sobrenadante e filtragem da parte líquida/sólida, usando bomba de vácuo, através da adaptação de um funil com filtro interno. A parte sólida resultante (agar) foi secada em incubador durante 24 a 36 horas sob temperatura de 42°C. Após estar completamente seco, foi armazenado em temperatura ambiente até ser usado na preparação dos meios de cultura.

3.3.2 Purificação do ácido ribonucléico

O uso de RNA (ácido ribonucléico oriundo da levedura *Torula*, type VI – Sigma) como fonte única de fósforo orgânico (P) às plantas foi estratégia passível de ser adotada porque em estudos anteriores com estes três mutantes, PINTO (2005) e DELATORRE (2009) evidenciaram defeitos no crescimento radical destes quando crescidos nesta condição. Assim, especula-se que esses mutantes possuem enzimas não ativas, mas que podem ser induzidas sob limitação de P e, desta forma, auxiliar na degradação de DNA ou RNA. Desta forma, as mutações podem estar relacionadas a genes regulatórios e não em genes estruturais.

Para remover contaminantes do RNA, como proteínas, polissacarídeos e outros contaminantes de baixo peso molecular, todo RNA usado como fonte de fósforo orgânico passou por processos de purificação e cromatografia de permeação. O procedimento de purificação consistiu da diluição de 5 a 8 g de RNA em 50 ml de Tris-HCl 1 M (pH 9,0) e posterior adição de 50 ml de tampão TE 1x [Tris-HCL 10 mM (pH 8,0) e EDTA 1 mM (ácido etileno diamino dissódico)]. Essa solução foi centrifugada por 15 minutos a 10000 rpm e o sobrenadante transferido para outro tubo, adicionando-se o equivalente a

1,5 x do seu volume de cloreto de lítio 8 M. Após a mistura dos reagentes, esta solução foi armazenada em temperatura de 4° C por pelo menos 12 h (*overnight*) para permitir precipitação dos componentes indesejáveis. Após, a solução foi novamente homogeneizada e procedida centrifugação de 30 minutos a 10000 rpm, quando se manteve o sobrenadante e se descartou as partes remanescentes.

Nesta solução sobrenadante foram realizadas duas lavagens com clorofórmio (50 ml por vez), seguida de centrifugação de 30 minutos a 10000 rpm, para remoção de contaminantes com tamanhos maiores. Em seguida, a extração do RNA ocorreu pela adição de 50 ml de fenol:clorofórmio (1:1 equilibrado), seguida por outra centrifugação. O sobrenadante foi mantido e o restante dispensado em recipiente adequado para descarte de químicos. Esta etapa foi repetida até que a interface aquosa-orgânica se tornou fina e transparente, o que em geral ocorreu após duas repetições. Obtidas estas condições, adicionou-se 0,1 x do volume obtido de acetato de sódio (pH 5,2) 3M e 1,5 x de etanol absoluto (99,5 %) gelado (-20° C). Após breve agitação, a solução foi mantida por 12 h (*overnight*) a -80° C para ocorrer a precipitação do ácido ribonucléico. Esta solução foi novamente centrifugada 30 minutos a 10000 rpm, quando se coletou o *pellet* formado, o qual foi secado em temperatura ambiente e, posteriormente re-suspendido em 30 ml de Tris-HCl (pH 8) 10 mM e EDTA 1 mM.

Terminada a etapa de purificação propriamente dita, iniciou-se o processo de permeação em coluna cromatográfica para remoção de moléculas pequenas contaminantes, especialmente P. Para tal, adotou-se bomba peristáltica, com vazão de 60 ml h⁻¹, na qual foi adaptada coluna de

vidro com dimensões de 100 x 3 cm, que foi preenchida com SEPHADEX G-25 COARSE (Amersham-Biosciences), hidratado com tampão TE 1x e NaCl 50 mM (pH 8,0). Após a adição de 15 ml de RNA purificado a essa coluna, acionou-se a bomba peristáltica, coletando-se amostras em *falcons* de 50 ml, sendo os primeiros 75 ml descartados e os 150 ml seqüenciais com coloração amarelada (indicativo da presença de RNA) mantidos para uso nos meios de cultura. A essa solução de aproximadamente 150 ml foram adicionados acetato de sódio 3M (pH 5,5) em quantidade equivalente a 0,1x o volume coletado e, ainda 1,5x do volume em etanol absoluto gelado (-20° C). Esses reagentes e a solução foram misturados e mantidos a -80° C por 15 minutos, permitindo nova precipitação do RNA, quando se procedeu nova centrifugação por 15 minutos a 10000 rpm. O *pellet* formado foi re-suspendido em 50 ml de tampão TE 1x e a solução obtida filtro-esterilizada, amostrada em espectrofotômetro para avaliar concentração de RNA e, posteriormente armazenada a -20° C até realizar-se preparação de meio de cultura e/ou solução nutritiva.

3.3.3 Composição geral dos meios de cultura

Nos primeiros estudos desenvolvidos com *arabidopsis* o meio de cultura foi obtido a partir do preparo de soluções salinas (MP), conforme será melhor descrito. Em alguns estudos, também se adotou o meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), porém em 50% de sua composição original, ou seja, utilizou-se ½ MS. Esta concentração, ½ MS, corresponde à composição padrão do meio de cultura adotado por diversos grupos de pesquisa, incluindo o do laboratório do PhD Steffen Abel (UCDavis).

A composição padrão do meio MS, 1x MS, pode ser adquirida em formulação com ou sem P (Caisson Laboratories, Inc.), no qual apenas é necessária diluição do pó concentrado comercial em água destilada, além da adição de sacarose e ágar, seguido de autoclavagem da solução. Entretanto, na presente tese, para obter meio ½ MS, adotou-se apenas a metade da quantidade de pó concentrado indicado pelo fabricante no mesmo volume de meio a preparar. Desta forma, a concentração final de cada nutriente nestes dois meios de cultura (MP e ½ MS) é apresentada na Tabela 1. Em razão de variações expressivas em alguns nutrientes, em cada estudo conduzido fez-se descrição de qual dos dois meios de cultura foram adotados, se aquele a partir dos sais (MP) ou o meio de cultura comercial (½ MS).

No caso do meio MP, aquele referido como tratamento +P (meio completo - alto teor de P), foi constituído pelas seguintes concentrações finais de nutrientes: 5 mM de KNO_3 , 2,5 mM de KH_2PO_4 (pH 4,5), 2 mM de MgSO_4 , 2 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 50 μM de Fe-EDTA, 70 μM de H_3BO_3 , 14 μM de MnCl_2 , 10 μM de NaCl, 1 μM de ZnSO_4 , 0,5 μM de CuSO_4 , 0,2 μM de NaMoO_4 e 0,01 μM de CoCl_2 .

Em razão das diferenças nas quantidades de alguns nutrientes entre os dois meios de cultura e para tornar mais próxima as concentrações de cada nutriente entre os dois meios de cultura, na presente tese adotou-se o meio comercial na formulação ½ MS, portanto seguindo a concentração de nutrientes apresentada na tabela 1. Por outro lado, no meio MP, as quantidades de nutrientes adotadas foram às apresentadas na tabela 1, com exceção do P, cuja concentração foi reduzida de 2,5 mM para 1,0 mM, com intuito desta estar mais próxima daquela presente no meio ½ MS.

TABELA 1. Composição nutricional de dois meios de cultura adotados nos estudos com arabidopsis.

Nutriente	Meio a partir dos sais (MP)	Meio comercial ($\frac{1}{2}$ MS)	Relação MS/MP ¹
N (mM)	9,00 (NO ₃)	19,21 (NO ₃) + 9,12 (NH ₄)	3,15
P (mM)	2,50	0,63	0,25
K (mM)	7,50	10,02	1,34
Ca (mM)	2,00	1,49	0,75
Mg (mM)	2,00	0,75	0,38
S (mM)	2,00	0,93	0,47
Fe (μ M)	50,00	49,98	1,00
B (μ M)	70,00	50,15	0,72
Mn (μ M)	14,00	55,95	4,00
Na (μ M)	10,20	0,52	0,05
Zn (μ M)	1,00	26,64	26,64
Cu (μ M)	0,50	50,00	100
Co (μ M)	0,01	52,50	5250
Mo (μ M)	0,20	0,50	2,50

¹ Refere-se à relação entre concentração do nutriente no meio $\frac{1}{2}$ MS dividido pela presente no meio MP.

Para o meio de crescimento sem P, tratamento -P, durante o preparo da solução foi omitido o KH₂PO₄. Já, para o meio de cultura contendo ácidos nucléicos como única fonte de P, tratamento -P/+RNA, o KH₂PO₄ foi substituído por 0,6 mg ml⁻¹ de RNA torula purificado, cuja quantidade de RNA corresponde à cerca de 1,0 mM de P, porém P não disponível (presente nos componentes do RNA). Por outro lado, na testemunha positiva (+P/+RNA), foram adicionados 0,6 mg ml⁻¹ de RNA torula purificado ao meio de cultura com alto teor de P (+P). Essa concentração de RNA no meio é baseada em estudos anteriores que verificaram que níveis entre 0,4 e 0,6 mg ml⁻¹ eram

suficientes para obter desenvolvimento satisfatório dos genótipos e viável em termos de demanda de purificação de RNA. Essa ressalva é importante, pois durante o processo de purificação do RNA, menos da metade do RNA inicialmente suspenso na solução é recuperada ao final deste processo. Logo, implica em custos de aquisição do RNA torula e demanda considerável de tempo para executar o processo de purificação.

Sempre que o tratamento -P/+RNA foi adotado, objetivou-se simular condição com limitação de P prontamente disponível, mas ao mesmo tempo fazer com que houvesse P orgânico, passível de assimilação pela planta em caso de deficiência. Assim, ao invés da total ausência deste nutriente, optou-se pela adição de ácidos nucléicos ao meio de cultura, como fonte única de fosfato orgânico, condição que pode induzir sistema de resgate e uso de fontes alternativas de nutrientes não prontamente disponíveis.

Em todos os meios de cultura (MP e ½ MS), adicionaram-se vitaminas. Em cada litro de solução de meio de cultura foi acrescentada, solução contendo 100 mg de mioinositol, 0,5 mg de ácido nicotínico, 0,5 mg de piridoxina e 0,1 mg de tiamina, previamente filtrada em filtro estéril com 0,20 µm. Além das vitaminas ainda adicionaram-se 0,5 % de sacarose e 0,8 % de Micropropagation Agar type I (Caisson Laboratories, Inc.), como agente solidificante, sendo o pH da solução ajustado para 5,5 pela adição de KOH ou KCl. Por fim, nos meios de cultura MP, foi adicionado MES [2-(N₂₂ morfolino ácido etanosulfônico)] 2,5 mM em pH 5,5 como agente tamponante de pH.

3.4 Caracterização geral dos mutantes *p9*, *p23* e *p37*

Cada um dos estudos de caracterização geral dos mutantes foi conduzido pelo menos em dois momentos distintos durante a condução desta tese. Em cada ocasião desta repetição experimental e em todos os estudos descritos abaixo, além dos aspectos e avaliações eventualmente descritos em cada experimento, adotaram-se 17 sementes por placa e duas placas por tratamento, desta forma obtendo-se cerca de 25 plantas amostradas para cada avaliação.

A condição geral de crescimento e desenvolvimento das plantas foi de oito dias após a emergência das plantas (8DAE), quando as placas foram fotografadas com câmera digital (Sony DSC-F707). Nestas fotos, fez-se mensuração do comprimento radical das raízes primárias, e em parte dos estudos, ainda contagem do número de raízes laterais, estimativa da densidade de raízes laterais e da taxa de crescimento radical. O comprimento da raiz principal foi obtido através de análise das fotos no *software* IMAGE J, de domínio público e obtido a partir do *site* <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, seguindo orientações disponibilizadas no manual *online* deste.

3.4.1 Alterações na disponibilidade de fósforo, dose resposta à fósforo e formulações contrastantes de meios de cultura

Como demonstrado na Tabela 1, os dois meios de cultura adotados nos estudos conduzidos, meio de cultura comercial ($\frac{1}{2}$ MS) e meio obtido a partir dos sais (MP) apresentam constituição nutricional distinta, especialmente quanto aos teores de N e P e alguns micronutrientes. Portanto, num dos experimentos comparou-se o desenvolvimento do sistema radical dos quatro

genótipos de arábido em estudo nas duas formulações de meio de cultura, MP e ½ MS. Este estudo foi conduzido para ambas as condições de P, ou seja, com e sem deficiência (-P e +P).

Em outro estudo, buscou-se estabelecer a resposta da planta, em termos de crescimento radical, à presença de níveis crescentes de P no meio de cultura, o estudo da dose resposta. Os níveis de P testados foram: 0, 10, 50, 100, 250, 500, 1000 e 2500 µM de P, na forma de KH₂PO₄. Para o preparo destas soluções, inicialmente fez-se o preparo de meio de cultura -P, usando-se as soluções de sais, para que todos os tratamentos estivessem sob as mesmas concentrações dos demais constituintes do meio de cultura. Uma vez preparado o volume de meio padrão sem P, este foi subdividido em vários frascos, aos quais se adicionou KH₂PO₄, conforme cada nível de P proposto. Este estudo de dose resposta foi conduzido para ambas as formas de obtenção de meio de cultura, o meio MP e o ½ MS.

Em outro estudo, com intuito de avaliar a capacidade dos mutantes de perceberem a presença de P prontamente disponível ou de P não prontamente disponível no meio de cultura, adotaram-se diferentes condições de suprimento de P. A exemplo do estudo de comparação de formulações dos meios de cultura, no presente estudo sementes dos três mutantes (*p9*, *p23* e *p37*) e do ecótipo COL foram dispostas em placas de petri quadradas contendo meio de cultura com as seguintes condições de P: +P/+RNA (1,0 mM/0,6 mg ml⁻¹ – controle positivo), +P/-RNA (1,0 mM/0,0 mg ml⁻¹ – tratamento +P), -P/+RNA (0,0 mM/0,6 mg ml⁻¹ – tratamento com ácidos nucléicos) e -P/-RNA (0,0 mM/0,0 mg ml⁻¹ - controle negativo, -P).

3.4.1.1 Análise qualitativa de amido

No experimento com uso de ácidos nucléicos no meio de cultura em combinação com ou sem presença de P, além das avaliações relacionadas ao sistema radical, ainda procedeu-se análise qualitativa do acúmulo de amido na parte aérea.

A análise qualitativa de amido consistiu da coleta da parte aérea da planta, seguida de remoção de pigmentos (clorofila, xantofilas, carotenóides), pela imersão em etanol 95% durante dois ciclos seqüenciais de 6 horas. Após remoção dos pigmentos, a parte aérea foi imersa em solução iodine (1,5% iodeto de potássio e 0,3% de iodo) durante 7 min para reação histoquímica, sendo após lavada várias vezes para remoção do excesso de corante. Em seguida obtiveram-se fotos digitais de plantas representativas de cada um dos tratamentos. Por fim, as plantas foram discriminadas entre ocorrência ou não de acúmulo de amido em função do tratamento adotado e/ou da resposta de cada genótipo.

3.4.2 Resposta à deficiência nutricional distinta de fósforo

Além destes dois estudos sobre disponibilidade de P e da dose resposta à P, buscou-se averiguar a ocorrência de interações nutricionais da deficiência de P com a limitação de outros nutrientes. Para tal, sementes dos três mutantes foram dispostas sobre meio de cultura com limitação de outros nutrientes, sendo cada nutriente ausente numa condição de suficiência de P (1,0 mM) e em outra sob deficiência de P (0,0 mM). Em ambas as situações de P (+P e -P), prepararam-se meios com deficiência em ferro (-Fe), em nitrogênio (-N), em enxofre (-S) e em potássio (-K).

Para conseguir estas deficiências nutricionais, no tratamento com deficiência de ferro omitiu-se o Fe-EDTA. No com deficiência de nitrogênio omitiu-se KNO_3 , além do $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ter sido substituído por CaCl_2 . O meio de cultura com deficiência de potássio não teve em sua constituição KNO_3 , o KH_2PO_4 foi substituído por $\text{Na}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, a concentração de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ aumentada de 2 mM para 5 mM e o pH corrigido com NaOH ao invés de usar o KOH. No meio deficiente em enxofre substituiu-se o MgSO_4 por MgCl_2 , o CuSO_4 por CuCl_2 e o ZnSO_4 por ZnCl_2 .

3.5 Estudos de transferência de plantas entre meios de cultura e análise de divisão celular

Após condução de alguns experimentos, verificou-se que além do efeito de P no desenvolvimento e na arquitetura do sistema radical, o N também pode alterar o padrão de crescimento dos mutantes em estudo. Assim, foram desenvolvidos estudos sob dois enfoques, sendo um com alteração na disponibilidade de P e outro através de mudanças no fornecimento de N.

No estudo sobre alteração na disponibilidade de P, as plantas foram inicialmente crescidas durante cinco dias sob condições normais de P (+P= 1,0 mM). Posteriormente, foram transferidas para duas condições com limitação de P, uma com ausência total de P (-P= 0,0 mM) e outra com presença de ácidos nucléicos (-P/+RNA, 0,6 mg ml⁻¹) como única fonte de P. Após a transferência para estas duas condições nutricionais de P, as plantas cresceram por mais oito dias, realizando-se amostragens e avaliações diárias em pelo menos cinco plantas de cada linhagem adotada. Estas amostragens

diárias ocorreram entre um e quatro dias após a transferência e, após quatro dias, a cada dois dias (6º e 8º dia).

Neste estudo, as avaliações foram focadas na reação histoquímica nos tecidos radicais, avaliando a indução de genes relacionados ao sistema de resgate de P. As linhagens adotadas neste estudo foram sementes da geração F3 do cruzamento dos mutantes *p9* e *p23* com linhagens transgênicas *CycB1::GUS*, *QC25::GUS* e *AtACP5::GUS*. Posteriormente, serão apresentados mais detalhes de como estas linhagens foram selecionadas e qual a importância de avaliação destes genes.

É importante ressaltar que este estudo de transferência de mutantes entre meios de cultura foi conduzido somente para a condição MP. Isso se deveu especialmente ao fato de ter sido esta a condição em que os mutantes foram inicialmente selecionados. Além da análise da atividade de divisão celular por reação histoquímica, como descrito posteriormente, ainda fez-se avaliação do comprimento da raiz principal, do recrescimento desta após transferência para o segundo meio de cultura. Ainda procedeu-se contagem do número de raízes laterais e estimativa do número destas por unidade de comprimento da raiz principal. Nestas avaliações utilizaram-se sementes dos mutantes não transgênicas.

3.6 Alterações na arquitetura radical pela presença de ferro sob contrastes no suprimento de fósforo

Foram conduzidos estudos de dose resposta à Fe em três condições de P em câmara de crescimento, sendo em ambientes +P, -P ou -P/+RNA, em todos seguindo-se as concentrações nutricionais para o meio MP. Ou seja, o

meio de cultura adotado foi o obtido a partir das soluções salinas. Os tratamentos em cada experimento consistiram de quatro níveis de Fe (0, 10, 50 e 100 μM , na forma de Fe-EDTA). Na condição -P/+RNA adicionou-se ainda o nível de 25 μM Fe-EDTA.

O objetivo destes experimentos foi avaliar se níveis crescentes de Fe no meio de cultura também podem inibir o crescimento e desenvolvimento radical de COL e dos mutantes em estudo e se esse efeito depende ou não da condição de P.

Os experimentos nas três condições de P foram conduzidos em separado, cada qual sob o delineamento de blocos casualizados, com duas placas por tratamento e com 15 plantas por placa. Em todos os estudos adotaram-se *p9*, *p23* e *p37* e o ecótipo COL e, na condição -P/+RNA ainda o mutante *pdr1*.

3.7 Alterações na arquitetura radical pela presença de níveis e fontes de nitrogênio sob contrastes no suprimento de fósforo

Por conta dos dados obtidos no estudo de comparação das formulações de meio de cultura (MP e $\frac{1}{2}$ MS), buscou-se avaliar efeito de fontes e doses de N no desenvolvimento radical dos mutantes, já que os meios de cultura diferem consideravelmente quanto a estes. O estudo foi conduzido apenas para a condição +P, adotando-se como tratamentos 10 níveis de N (0, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 5000 e 10000 mM) e duas fontes de N (apenas amônia, na forma de sulfato de amônio, ou somente nitrato, na forma de nitrato de potássio). Adotaram-se os mesmos quatro genótipos dos

demais ensaios, os quais se desenvolveram durante oito dias, quando se obteve fotos e se procedeu mensuração do comprimento da raiz primária.

3.8 Alterações na arquitetura radical em função de interações nutricionais de níveis de ferro e fontes e níveis de nitrogênio

Foram realizados dois estudos separados, um em condição com (+P) e outro sem (-P) suprimento de fósforo, os tratamentos consistiram de quatro níveis de Fe (0, 10, 50 e 100 μM , na forma de Fe-EDTA) e duas condições de N (9,0 mM de NO_3 e 19,2 mM de NO_3 + 9,1 mM de NH_4). A primeira condição de N buscou simular o meio de cultura MP enquanto a segunda o meio $\frac{1}{2}$ MS.

Em outro estudo para entender melhor esta interação tríplice, foram avaliados os efeitos de níveis de Fe e duas condições de P em meio sem suprimento de N. Assim, os tratamentos constaram de quatro níveis de Fe (0, 10, 50 e 100 μM , na forma de Fe-EDTA) e duas condições de P (0,0 e 2,5 mM) em meio de cultura sem suprimento de N (0,0 mM). Além dos três mutantes sob investigação, ainda incluiu-se o *pdr1* como controle, o qual foi previamente caracterizado como responsivo à fonte de N.

Como o isolamento dos mutantes foi inicialmente efetuado sob condição de limitação de P e, portanto são mutantes de P, ainda era necessário checar se há resposta à interação $P_i \times N$. Para tal, conduziu-se outro experimento adotando meio de cultura -P/+RNA (seguindo concentrações nutricionais descritas anteriormente), porém sem a presença de N. Neste estudo usaram-se apenas os mutantes *p23* e *p37* e ainda *pdr1*, novamente adotado como controle.

Em outro experimento de transferência de plantas entre meios de cultura buscou-se verificar se os mutantes que demonstram interação P x N podem reverter, mesmo que apenas parcialmente, o fenótipo da planta selvagem (COL), desde que sejam crescidos em condição sem a presença de N no meio. Este estudo foi conduzido em duas condições:

(i) Desenvolvimento dos mutantes durante cinco dias nos três meios de cultura padrão (+P, -P/+RNA e -P, todos com suprimento de N). Em seguida plantas de cada um destes tratamentos foram transferidas para placas de petri contendo os tratamentos: +P/-N e -P/-N;

(ii) Procedeu-se estudo inverso: os mutantes estiveram inicialmente submetidos durante cinco dias aos tratamentos +P/-N ou -P/-N. Posteriormente, foram transferidas aos três meios padrão (+P, -P/+RNA e -P, todos estes com suprimento de N).

Neste experimento os níveis nutricionais são os do meio MP, exceto o de P, que foi reduzido para 1,0 mM, por ser este considerado nível de suficiência para este nutriente. Assim, os demais nutrientes correspondem aos níveis apresentados na Tabela 1 para o meio MP. Por outro lado, as avaliações consistiram da mensuração do recrescimento da raiz primária e contagem do número de raízes laterais emitidas após transferência ao segundo meio de cultura. Estas avaliações foram efetuadas três e seis dias após a transferência.

3.9 Desenvolvimento radical sob contrastes de fósforo e nitrogênio na presença de reguladores de crescimento vegetais

Os efeitos da deficiência nutricional por P tem ampla relação com o desenvolvimento celular, uma vez que uma das respostas mais clássicas da planta a esta condição é o menor crescimento da raiz principal e aumento no número de raízes laterais. Por conta disso, levantou-se a hipótese de que a mutação presente nos mutantes em estudo pudesse relacionar-se às alterações na síntese hormonal. Assim, estes estudos foram conduzidos para os hormônios auxina e citocinina, especialmente pela sua importância junto ao transporte e ao desenvolvimento celular.

Para ambos os hormônios, auxinas e citocininas, adotaram-se cinco níveis hormonais e sempre duas condições de suprimento de P, com (+P) e sem (-P) presença de P no meio de cultura. Cada condição de P foi considerada experimento individual. Em todos os estudos relacionados aos níveis de citocininas adotaram-se as seguintes concentrações: 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M. Nas auxinas, os níveis adotados foram: 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} M. Para suprir auxinas adotou-se como fonte de auxinas o 2,4-D (ácido diclorofenoxi acético) enquanto as citocininas via benzil amino purina (BAP). O delineamento foi de blocos completamente casualizados, com duas placas por tratamento e cerca de 15 plantas/placa.

No caso de citocininas e, especialmente para os mutantes *p23* e *p37*, em razão do efeito de N nestes mutantes, ainda conduziu-se estudo sem P, porém com a presença de ácidos nucléicos (-P/+RNA), além de outro com a presença de P (+P). Para ambos os estudos, além dos cinco níveis de

citocininas, adotou-se duas condições de N, um com (+N) e outro sem (-N) suprimento nutricional por N.

Em todos estes estudos de avaliação do efeito de hormônios no desenvolvimento radical dos mutantes adotou-se o meio de cultura MP e, assim como referenciado anteriormente, no estudo com presença de P foram adicionados 1,0 mM de P na forma de KH_2PO_4 .

3.10 Desenvolvimento de linhagens recombinantes a partir do cruzamento dos mutantes com transgenes

Linhagens transgênicas foram usadas para avaliar aspectos relacionados à divisão celular em meristemas (*CycB1::GUS*), da capacidade de secreção de fosfatases ácidas (*AtACP5::GUS*) e para averiguar o grau de diferenciação celular junto ao centro quiescente radical (*QC25::GUS*). A avaliação da cinética de expressão destes genes é importante uma vez que a maior parte das avaliações realizadas no presente trabalho relaciona-se a aspectos de desenvolvimento do sistema radical. Assim, através destes marcadores busca-se identificar em que regiões da raiz estão ocorrendo diferenças entre o desenvolvimento do ecótipo COL e o dos mutantes.

Em todas estas linhagens transgênicas, os promotores dos genes de interesse estão fusionados com o gene repórter GUS, cuja construção permite avaliar a expressão dos genes de interesse sem destruição dos tecidos. Isso é possível através da avaliação da expressão do gene repórter GUS, o qual expressa a enzima β -glucuronidase apenas nos tecidos e momentos em que o gene de interesse seria expresso.

O processo de seleção destas populações para cada um dos cruzamentos feitos com os três mutantes seguiu processo similar ao efetuado para as populações recombinantes com LER (item 3.11.1). Assim, sementes F1 dos cruzamentos tiveram o crescimento e desenvolvimento do sistema radical avaliado em meio de cultura -P/+RNA para verificar a eficiência do cruzamento, selecionando-se aquelas com fenótipo de raiz longa, similar ao de COL, que foram transferidas para solo para autofecundarem. Essa estratégia é eficiente na checagem da eficiência do cruzamento uma vez que os mutantes apresentam fenótipo radical curto em ambiente -P/+RNA, enquanto LER apresenta raiz longa. Assim, sementes oriundas de plantas onde houve fertilização cruzada entre o mutante e LER resultam em plantas com raiz longa neste ambiente de crescimento.

Sementes F2 destes cruzamentos foram coletadas individualmente por planta F1, as quais foram dispostas em meio de cultura -P/+RNA e posteriormente testadas para selecionar plantas contendo a mutação, verificada pela ocorrência de raízes primárias com tamanho similar às dos mutantes, ou seja, raiz curta em condição de P limitante. Nessa avaliação na geração F2 foi possível selecionar os mutantes homozigotos (mutação recessiva), porém com esta análise não há certeza quanto à presença do transgene GUS, o qual pode ser heterozigoto.

Para confirmar a presença do transgene nestas plantas F2 com fenótipo recessivo, cerca de 20 plantas F2 com fenótipo radicular dos mutantes foram transferidas para solo, das quais se obteve sementes individualizadas por planta F2, que foram dispostas em meio de cultura com P limitante (-P e -P/+RNA). Após crescerem por oito a 10 dias, fez-se a reação

de GUS com 15 plantas de cada linhagem de plantas F3. Uma vez confirmado o fenótipo de raiz do mutante e ainda a presença do transgene, este através da presença de coloração azulada na raiz após a reação de GUS, manteve-se as sementes da linhagem da qual estas plantas foram originadas, descartando-se aquelas onde ocorreram plantas sem o transgene (linhagem mãe heterozigota).

Antes de realizar a reação de GUS propriamente dita, fez-se a fixação do material vegetal (toda a planta) em acetona 80 % e a incubação em gelo por 20 minutos. Após remoção da acetona, o material vegetal foi imerso durante três ciclos sucessivos de 10 minutos em solução tampão contendo 50 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,2), 0,5 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e 0,5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. Posteriormente, adicionou-se ao tecido substrato X-GLUC 1 mM [5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucuronidase dissolvido em N,N dimetil formamida (USB)], cuja reação foi incubada em temperatura de 37° C por cerca de 12 h.

Após o período de reação, o material vegetal foi lavado e fixado em soluções etílicas com concentrações crescentes (15, 50, 75 e 100 %) e, após, em soluções etílicas com níveis decrescentes (75, 50, 15 e 0 %). Os tecidos foram mantidos em cada uma destas soluções durante 15 minutos, sendo ao final do processo de lavagem e fixação suspensas em solução contendo glicerol 50 %. Sempre que possível, imediatamente após as reações histoquímicas procedeu-se montagem das raízes em lâminas histológicas e análise em microscópio ótico, capturando-se imagens nos aumentos de 100 x e 400 x. No caso da construção *Cyc::B1::GUS* o indicativo de reação positiva e de atividade de divisão celular, células na transição das fases G2 e M do

ciclo celular, foi obtido pela análise comparativa do grau de tingimento em cor azulada dos meristemas de cada tratamento. Em cada tratamento analisaram-se pelo menos seis raízes em cada momento de avaliação. Os dados apresentados representam o comportamento e coloração obtidos na média das plantas avaliadas, ou seja, representam o padrão verificado na maioria das plantas no caso de haver alguma planta com comportamento radical ou de coloração distinto das demais, sendo esta descartada.

3.11 Mapeamento da mutação a um dos cinco cromossomos de *arabidopsis*

3.11.1 Desenvolvimento de populações recombinantes e seleção entre gerações autofecundadas

O desenvolvimento de populações recombinantes entre os mutantes do ecótipo COL e o ecótipo LER teve como objetivo identificar o cromossomo e, posteriormente, um refinamento em torno da região cromossômica da provável localização da mutação. Este processo é facilitado pela disponibilidade franca de amplo banco de dados contendo *INDELS* entre os ecótipos COL e LER (www.arabidopsis.org), cujas seqüências foram usadas para projetar *primers*.

A etapa de mapeamento havia sido inicialmente prevista para os três mutantes (*p9*, *p23* e *p37*), ressaltando que para o mutante *p37* alguns cruzamentos já haviam sido efetuados por PINTO (2005) e a geração F2 do cruzamento com LER já estava disponível. Entretanto, após serem conduzidos alguns estudos de caracterização destes mutantes junto à UCDavis, constatou-se que o material relacionado ao mutante *p37* havia sido

contaminado com outras sementes. Assim, todas as sementes foram descartadas e o processo de purificação reiniciado a partir de sementes armazenadas deste mutante. Por conta disso e do curto tempo dispendido junto à UCDavis (11 meses), a etapa de mapeamento foi desenvolvida com melhores resultados nos mutantes *p9* e *p23*.

No processo de desenvolvimento das populações recombinantes para o mapeamento da mutação, os mutantes *p9* e *p23* foram inicialmente cruzados com o ecótipo *Landsberg erecta* (LER), nesta situação adotado como doador de pólen. Sementes F1 destes cruzamentos tiveram o crescimento e desenvolvimento radical avaliado em meio de cultura -P/+RNA para verificar a eficiência do cruzamento. Entre as que germinaram, selecionaram-se 14 plantas oriundas de cada genótipo que apresentaram fenótipo de raiz primária similar ao de LER (raiz longa). Estas 14 plantas foram transferidas para meio +P por seis dias para fortalecer o desenvolvimento da parte aérea e das raízes. Com isso, fica facilitada a adaptação destas plantas ao ambiente solo, já que após este breve período foram transplantadas ao solo para autofecundarem.

Além desta checagem de crescimento radical em meio de cultura, ainda utilizou-se marcadores moleculares, uma segunda forma de verificação da eficiência do cruzamento realizado. Após transferência das plantas F1 para solo e destas apresentarem parte aérea bem desenvolvida, coletaram-se três folhas por planta. Neste tecido, fez-se extração de DNA, seguindo-se protocolo proposto por EDWARDS *et al.* (1991). O DNA obtido foi analisado em PCR (Applied BioSystems 2720) para confirmar eficiência do cruzamento. Marcadores moleculares polimórficos entre os ecótipos COL e LER, cuja

seqüência nucleotídica é apresentada na Tabela 2, foram usados para confirmar a informação obtida pela análise do fenótipo radical no meio de cultura -P/+RNA.

TABELA 2. Sequência nucleotídica dos *primers* usados nas ampliações durante mapeamento das mutações nos mutantes *p9* e *p23*.

Nome primer	Cromosomo alvo	Sentido primer	Seqüência nucleotídica do primer
F1K23	1	Senso	CAGTTTTCTTGATGCAAATCCATAG
		Anti-senso	CATCAGTAGTTGTGGCATAATTTTG
F23M19	1	Senso	GAACTCATTGCTGTTGCTTCCGATTATT
		Anti-senso	CAGAAGCACAACAACAATGATTGAACAGAA
F28J9	1	Senso	CTCTTCTATGTTGGATTCAAGCACTTCCCC
		Anti-senso	GATTAGCCGAGAAGGGATTGATGATTATCA
F28L22	1	Senso	ACCTACAGCAGGAACTTTTTCCGTTGAGAA
		Anti-senso	CAGTACGCATTCAGATCTTGGACCCATTT
F7F22	1	Senso	GCTCTTCAGTACAGAAGCTCACACTTTCCA
		Anti-senso	AACCCTTGGAAGCGTAGACCCAGC
T24P13	1	Senso	AATCATGCTCAATTGCTCATAATGAAATGC
		Anti-senso	CGGCCATTATGCTTGATGATATTTTG
NGA392	1	Senso	GGTGTAAATGCGGTGTTC
		Anti-senso	TTGAATAATTTGTAGCCATG
T17H7	1	Senso	GCCTTTCCTTATTATTCTGATCCCGAGAT
		Anti-senso	TTGTCATTTGTCAAATAAAAGCATGGG
CIW1	1	Senso	ACATTTTCTCAATCCTTACTC
		Anti-senso	GAGAGCTTCTTTATTTGTGAT
C1W3	2	Senso	GAAACTCAATGAAATCCACTT
		Anti-senso	TGAACTTGTTGTGAGCTTTGA
NGA168	2	Senso	GAGGACATGTATAGGAGCCTCG
		Anti-senso	TCGTCTACTGCACTGCCG
CIW11	3	Senso	CCCCGAGTTGAGGTATT
		Anti-senso	GAAGAAATTCCTAAAGCATTC
CIW4	3	Senso	GTTCATTAACTTGCGTGTGT
		Anti-senso	TACGGTCAGATTGAGTGATTC
F2N1	4	Senso	ATGTCGGACCACAGTTGATAAG
		Anti-senso	CCTAATTGATAAAAGGGCCCTA
F17I23	4	Senso	CGTTACGAGGTCCGCTGCAT
		Anti-senso	CTCCCGGGATTGCAACTTTT
NGA139	5	Senso	GGTTTCGTTTCACTATCCAGG
		Anti-senso	AGAGCTACCAGATCCGATGG
CIW9	5	Senso	CAGACGTATCAAATGACAAATG
		Anti-senso	GACTACTGCTCAAACCTATTCCG

Para confirmar molecularmente as observações obtidas no meio -P/+RNA foi necessário que a planta apresente bandas de ambos os ecótipos

(COL e LER). Esta análise foi realizada em 14 plantas F1 de cada uma das duas populações recombinantes, as quais já haviam sido confirmadas como de cruzamento eficiente com base na seleção realizada no meio de cultura -P/+RNA. Plantas duplamente checadas na geração F1 cresceram e desenvolveram em solo, realizando-se coleta de sementes F2 individualizada por planta.

Estas sementes F2 foram novamente testadas em meio -P/+RNA, onde cresceram durante 10 dias após a emergência, mantendo-se somente plantas que apresentaram fenótipo radical similar ao do mutante, ou seja, raiz primária mais curta que COL, o que, teoricamente, representa cerca de $\frac{1}{4}$ das plantas F2 de cada população. Estas plantas com fenótipo mutante e recessivo foram transferidas para solo e permitida autofecundação. Já, plantas F1 que resultaram em sementes F2 com fenótipo dominante (raízes médias ou longas) foram descartadas, uma vez que estes fenótipos demonstram ocorrência de segregação para a característica em análise.

Desta análise, selecionaram-se 130 plantas F2 originárias de cada mutante, constituindo desta forma duas populações recombinantes, uma de *p9* e outra de *p23*. Estas plantas foram transferidas para solo e, após desenvolvimento adequado, realizada coleta de tecido (cerca de três folhas por planta) e extração de DNA, de forma individualizada por planta. A solução de DNA foi armazenada em temperatura de -80° C até ser usada nas reações de PCR, sendo este o material genético adotado em todas as análises realizadas para fins de mapeamento.

Antes de iniciar as atividades de análise de DNA de todas estas plantas, sementes F3 foram coletas de forma individualizada em cada uma

das 130 plantas F2 de cada população recombinante, as quais após passarem por breve período de secagem e quebra de dormência, foram re-testadas quanto ao fenótipo radical em meio -P/+RNA. Esta etapa foi necessária para verificar se as plantas F2 selecionadas realmente apresentavam homozigose para a mutação.

Com essa estratégia de seleção, manter apenas plantas com fenótipo radical do mutante e recessivas para mutação de interesse foi possível reduzir drasticamente o número de plantas a serem analisadas nas gerações seguintes, uma vez que plantas com fenótipo de raiz longa ou de tamanho intermediário não são geneticamente recessivas para a mutação de interesse. Além disso, reduziu o tempo e recursos dispendidos para analisar plantas falso-positivas, cujos dados posteriormente seriam descartados uma vez confirmado que seu fenótipo radical não é condizente com o esperado.

As etapas de extração de DNA adotadas na geração F1 também foram usadas na seleção e confirmação de fenótipo e genótipo das plantas F2. Nesta etapa, testaram-se 130 plantas F2 de ambas as populações de mapeamento recombinantes, número considerado suficiente para avançar nesta etapa do mapeamento parcial da mutação. Além do DNA das duas populações recombinantes ainda fez-se extração de DNA dos ecótipos COL e LER para ser usado como controle nas análises moleculares seqüenciais.

3.11.2 Em busca do cromossomo e da região de localização da mutação em *p9* e *p23*

O DNA obtido em cada planta da população recombinante dos mutantes *p9* e *p23* foi analisado em PCR testando-se diferentes *primers*. Os

marcadores *INDELS* foram projetados a partir do banco de dados disponível em www.arabidopsis.org, de modo a permitirem distinção dos indivíduos da população recombinante de cada mutante entre homozigotos ou heterozigotos em relação à COL e LER.

Seqüências genômicas com *INDELS* entre COL e LER foram usadas para projetar os *primers* através do uso do *software* Vector NTI Advance 9.0 (Invitrogen). A síntese destes *primers* foi solicitada junto à MWG Oligo Synthesis nos EUA. Estes *primers* foram, inicialmente testados nos ecótipos COL e LER e, após verificada amplificação nestes, conduziram-se reações de amplificação no DNA genômico em todas as linhagens desenvolvidas para mapeamento em cada um dos mutantes.

Nestas análises, num primeiro momento testaram-se dois *primers* em cada um dos cinco cromossomos de arabidopsis, em cada planta constituinte das duas populações de mapeamento. Posteriormente, as reações de PCR foram concentradas nos cromossomos e, especialmente, nas regiões onde se obteve as menores taxas de recombinação durante a primeira etapa. Na segunda etapa, testaram-se outros seis *primers* em reações de PCR nestas regiões, buscando confirmar a informação inicial e ao mesmo tempo refiná-la, desta forma, diminuindo a distância genética entre o *primer* projetado e o gene mutado que se busca identificar.

A reação molecular para amplificação de DNA dos indivíduos das duas populações de mapeamento e dos dois ecótipos (COL e LER) constou de: 2 μ l solução tampão de *Taq* 10 x, 0,8 μ l de *primers* (*forward* + *reverse*) na concentração de 0,3 pmol μ l⁻¹, 0,6 μ l dNTP 5 mM, 0,3 μ l *Taq* polimerase, 6 μ l

de DNA na concentração de $85 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ e água deionizada até completar $20 \mu\text{l}$ por amostra.

A configuração geral da reação de PCR constou de volume final da reação de $20 \mu\text{l}$, dos quais $10 \mu\text{l}$ foram usados por ocasião da revelação dos produtos obtidos. As temperaturas e tempo de reação constaram de: desnaturação durante 5 min a 94°C , seguido de 40 ciclos de 30 s a 94°C + 30 s a 55°C para pareamento dos *primers* e 30 s à 72°C para a enzima fazer extensão da fita complementar. Ao final dos 40 ciclos seqüenciais houve outro período de 7 min a 72°C e, então por tempo indeterminado conservação na máquina de PCR a 10°C , até as amostras serem retiradas e mantidas em refrigerador ou revelação dos resultados em gel de agarose. As temperaturas de pareamento variaram com as características dos *primers* projetados, mas em sua maioria ficaram em 55 ou 56°C . A seqüência nucleotídica dos *primers* usados pode ser visualizada na Tabela 2.

A maior parte das análises de PCR foi efetuada em placas multi canal com 96 poços. A revelação dos resultados obtidos efetuada em gel de agarose entre 2,5 e 3,0%, com tempo de migração em torno de duas e meia horas cada, seguido de revelação em transiluminador de UV. Este gel, em função dos custos da agarose foi reutilizado quatro vezes, sendo reaquecido após seu segundo uso e descartado após o quarto. O volume de produto da PCR usado em cada poço de migração foi de $10 \mu\text{l}$.

A imagem obtida do gel foi posteriormente analisada, discriminando-se as bandas formadas entre aquelas com tamanho ou peso molecular similar àquela verificada em COL e as semelhantes a LER, além de agrupar as que apresentam bandas de ambos os ecótipos. Este processo foi efetutado para

cada *primer* testado e em todas as plantas disponíveis na população mapeamento. Ao final, estimou-se proporção de cromossomos com padrão de bandas LER dividido pelo número total de cromossomos em que se obteve bandas. Com isso, se obtêm a porcentagem de cromossomos LER em relação ao total de cromossomos, cuja taxa de recombinação é estimativa da distância genética entre o *primer* e o gene mutado.

3.12 Análise estatística

Os resultados foram analisados através do uso do pacote estatístico SAS (*Statistical Analysis System*). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando-se o modelo significativo a 5% para efeitos simples e 10% para efeitos duplos ou triplos. Quando alcançada significância estatística, as médias das variáveis foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% no caso de efeito simples ou pelo teste DMS a 5%, no caso de interações duplas ou triplas.

4 RESULTADOS

Para facilitar o entendimento da seqüência de experimentos conduzidos e dar uma visão geral de como os resultados estão descritos e organizados, fez-se uma breve descrição do organograma de experimentos e estudos conduzidos para obtenção desta tese.

De forma geral, os estudos desenvolvidos buscaram fazer uma caracterização geral dos mutantes, avaliar respostas a deficiências nutricionais isoladas, experimentos de transferência de plantas entre meios de cultura e mapeamento da mutação a um dos cinco cromossomos. Ainda conduziram-se diversos estudos buscando elucidar respostas de interações nutricionais e com hormônios.

Em termos de caracterização geral dos mutantes, buscou-se desenvolver experimentos avaliando como estes respondem a contrastes na disponibilidade de fósforo, seja através de fontes de P ou via níveis de P. Além disso, adotaram-se meios com deficiências distintas daquela por P, como por exemplo, por nitrogênio e ferro, os quais buscaram identificar se a mutação presente nos mutantes é específica de P ou se ainda está relacionada a algum outro nutriente. Ainda nesta etapa, identificou-se que os mutantes apresentam respostas distintas dependendo do meio de cultura adotado nos experimentos, o que motivou diversos estudos buscando

identificar qual ou quais os fatores presentes nos meios de cultura que seriam os responsáveis por este comportamento. A partir desta identificação, fez-se a opção por um dos meios de cultura, cuja formulação passou a ser padrão para os estudos seqüenciais com todos os mutantes.

De posse dos dados dos experimentos de caracterização, investigou-se o efeito do ferro e de nitrogênio, este último em termos de fonte e níveis, no desenvolvimento radical dos mutantes sob contrastes no suprimento de P. Posteriormente, os estudos tornaram mais complexos, pois se investigou respostas de interações nutricionais, cuja demanda surgiu a partir da obtenção dos resultados da caracterização geral dos mutantes e dos efeitos de Fe e de N. Nesta etapa, foram conduzidos diversos experimentos para elucidar o efeito combinado do suprimento ou deficiência de P, N e Fe. A adição de hormônios auxinas e citocininas em meios de cultura com contrastes no suprimento de P e N buscou averiguar se algum dos fenótipos radicais é causado ou afetado por defeitos na síntese e/ou percepção destes hormônios.

Outra etapa importante foram os estudos de transferência de plantas entre meios de cultura, nos quais as plantas inicialmente crescem em condição de suprimento normal de nutrientes e posteriormente são brevemente transferidas para condição com limitação de algum nutriente, e vice-versa. Nestes estudos, as respostas dos mutantes são bastante distintas entre si, permitindo inclusive recuperação parcial do fenótipo radical.

Em paralelo a estes estudos de respostas fisiológicas e nutricionais dos mutantes, ainda conduziu-se o mapeamento da mutação a um dos cinco cromossomos. Nesta etapa, desenvolveram-se as populações recombinantes

entre os mutantes e o ecótipo *Landsberg erecta*, cujo trabalho embora esteja apenas em fase inicial, será muito importante para seguimento da busca pelo gene mutado em cada um dos mutantes.

A seguir estão descritos os resultados obtidos em todos os experimentos conduzidos, obedecendo sempre que possível, o organograma brevemente apresentado acima.

4.1 Comparação de formulações de meio de cultura, alterações na disponibilidade e dose resposta à fósforo

Dois meios de cultura foram adotados na condução dos estudos desenvolvidos. Um baseado em SOMERVILLE & OGRE (1982) obtido via preparo de soluções padrão a partir de sais, o meio MP, o qual é indicado pela empresa Lehle Seeds que forneceu as sementes mutagenadas e no qual os três mutantes foram selecionados. O outro meio adotado é o meio comercial MS - MURASHIGE & SKOOG (1962), que é adquirido comercialmente na forma de pó concentrado, sendo apenas necessária sua diluição em água destilada. Na presente tese, este meio de cultura foi adotado na forma de $\frac{1}{2}$ MS, ou seja, adotou-se apenas metade da quantidade de pó concentrado indicada pelo fabricante.

Em razão das diferenças nas quantidades de alguns nutrientes entre os dois meios de cultura e para tornar mais próxima as concentrações de cada nutriente entre os dois meios de cultura, na presente tese adotou-se o meio comercial na formulação $\frac{1}{2}$ MS, portanto seguindo a concentração de nutrientes apresentada na tabela 1. Por outro lado, no meio MP, as quantidades de nutrientes adotadas foram as apresentadas na tabela 1, com

exceção do P, cuja concentração foi reduzida de 2,5 mM para 1,0 mM, com intuito desta ser mais próxima daquela presente no meio $\frac{1}{2}$ MS.

Ao analisar a composição de cada formulação de meio de cultura constatou-se variações consideráveis de concentração para macro e micronutrientes. Ressalta-se em especial, as relacionadas ao suprimento dos micronutrientes Mn, Zn, Cu e Co que estão em concentrações bem superiores e S e Mg inferiores no meio $\frac{1}{2}$ MS em relação ao meio MP (Tabela 1). Estas variações nas concentrações entre meios de cultura, podem individualmente ou via interações com outros nutrientes serem responsáveis por respostas não esperadas no comportamento radical dos genótipos avaliados, como será melhor discutido.

Além de diferenças expressivas no nível de micronutrientes entre os dois meios de cultura, ainda há variações consideráveis em macronutrientes. O suprimento de P no meio $\frac{1}{2}$ MS corresponde à apenas $\frac{1}{4}$ do fornecido pelo meio MP, enquanto a quantidade de N é superior a 3x àquela fornecida pelo meio MP. Outra diferença expressiva entre os meios é a fonte de N, sendo o N do meio MP suprido via nitrato de potássio, enquanto o do meio $\frac{1}{2}$ MS na forma de nitrato de potássio e de nitrato de amônio. Assim, o meio $\frac{1}{2}$ MS possui $\frac{1}{3}$ (9,12 mM) de seu N na forma de amônio, quantidade correspondente ao total de N fornecido pelo meio MP, enquanto $\frac{2}{3}$ são supridos na forma de nitrato (Tabela 1).

Por conta destas diferenças de concentração nutricional entre os meios $\frac{1}{2}$ MS e MP, conduziram-se estudos, buscando avaliar de que forma estas podem afetar o desenvolvimento radical dos genótipos em estudo. Num destes estudos, avaliou-se o comprimento da raiz primária (CRP) do ecótipo

COL e dos mutantes *p9*, *p23* e *p37* em meio de cultura preparado a partir das duas formulações, MP e ½ MS. Ambos os meios foram usados na condição com (+P) e sem (-P) suprimento de P, sendo os contrastes de P de cada meio considerados estudos independentes.

No experimento com meios +P verificou-se efeito simples de genótipo no CRP (Tabelas 3 e 4). Não se verificou diferenças no CRP entre os dois meios de cultura, na média dos quatro genótipos. Entre genótipos, COL teve CRP maior que os três mutantes, enquanto *p23* e *p37* tiveram o menor CRP e *p9* intermediário a estes, na média dos meios de cultura ½ MS e MP (Tabela 4). O comprimento da raiz de *p23* e *p37* foi de apenas 15 e 20%, respectivamente, relativo àquele ocorrido em COL.

TABELA 3. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de formulações de meios de cultura (MP e ½ MS) em meio com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM), na média de quatro genótipos de *Arabidopsis thaliana*.

Formulações de meio de cultura	Comprimento raiz primária (cm)
Comercial - ½ MS	4,16 a*
A partir de sais - MP	4,11 a

* Letras iguais não diferem pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). Coeficiente de variação= 15,8.

As diferenças entre COL e os mutantes na condição +P já eram esperadas, especialmente as de *p23* e *p37*, uma vez que estes dois mutantes sempre apresentaram desenvolvimento radical menor que o de COL desde sua seleção em meio limitante em P, enquanto o CRP de *p9* é mais próximo daquele de COL em meio +P. Estes resultados demonstram que para a condição +P, ambos os meios podem ser adotados sem prejuízo ao

desenvolvimento radical de COL ou dos mutantes, portanto não afetando o comportamento dos genótipos.

Por outro lado, ao conduzir o mesmo estudo na condição com deficiência de P (-P), observou-se que o CRP variou em função da interação genótipos e composição do meio de cultura (Tabela 5). Em ambos os meios de cultura, o maior CRP ocorreu em COL, enquanto o menor ocorreu em *p23* e *p37* no meio $\frac{1}{2}$ MS e em *p23* no meio MP. No meio $\frac{1}{2}$ MS, *p9* teve desenvolvimento radical intermediário ao de COL e dos demais mutantes. No meio MP, o CRP de *p9* foi intermediário ao de COL e *p23*, não diferindo do verificado em *p37* (Tabela 5).

TABELA 4. Comprimento da raiz primária de quatro genótipos de *Arabidopsis thaliana* oito dias após germinação em meio com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM), na média de duas formulações de meios de cultura (MP e $\frac{1}{2}$ MS).

Genótipos	Comprimento raiz primária (cm)
COL	6,39 a*
<i>p9</i>	5,73 b
<i>p23</i>	0,93 c
<i>p37</i>	1,27 c

* Letras iguais não diferem pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). Coeficiente de variação= 15,8.

Comparando os dois meios de cultura, COL, *p23* e *p37* tiveram melhor desenvolvimento radical no meio obtido a partir dos sais - MP, em relação ao meio comercial - $\frac{1}{2}$ MS. Por outro lado, *p9* teve comportamento inverso ao dos demais genótipos, pois seu CRP foi maior no meio $\frac{1}{2}$ MS relativamente ao MP (Tabela 5). Nesta condição de P (-P), *p23* e *p37* tiveram redução de 40% no CRP entre o meio MP e o $\frac{1}{2}$ MS, enquanto *p9* aumento de 24%. Diferente do

esperado, COL teve as maiores alterações de desenvolvimento radical, com redução de 52% (1,43 cm) no CRP entre MP para ½ MS. Essa resposta diferencial, possivelmente se relacione às diferenças expressivas nas concentrações nutricionais dos meios de cultura ½ MS e MP. O efeito negativo do meio ½ MS no desenvolvimento radical de COL fez com que seu CRP ficasse mais próximo daquele verificado em *p9* em ambiente -P (Tabela 5).

TABELA 5. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de interação dupla de genótipos de *Arabidopsis thaliana* e formulações de meios de cultura (MP e ½ MS), sob ausência de fósforo (-P= 0,0 mM).

Genótipos	Formulações de meios de cultura	
	Comercial - ½ MS	A partir de sais - MP
	Comprimento da raiz primária (cm)	
COL	A 1,28 b*	A 2,71 a
<i>p9</i>	B 0,97 a	B 0,78 b
<i>p23</i>	C 0,30 b	C 0,49 a
<i>p37</i>	C 0,39 b	B 0,65 a

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre formulações de meios de cultura no mesmo genótipo e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre genótipos na mesma formulação de meio de cultura, não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficiente de variação= 16,6.

Ainda para demonstrar que as diferenças nas concentrações nutricionais dos meios de cultura ½ MS e MP (Tabela 1) afetam o desenvolvimento radical de *Arabidopsis*, especialmente COL e *p9*, conduziu-se estudo com estes dois genótipos, incrementando os níveis de P em ambos os meios. Neste estudo, o CRP variou em função da interação tripla de nível de P, formulação de meio de cultura e genótipo (Tabela 6). No meio ½ MS, *p9*

teve CRP maior que o de COL nos níveis de P entre 100 e 500 μM , enquanto em níveis inferiores ambos tiveram desenvolvimento radical similar (Tabela 6). Por outro lado, no meio de cultura MP, ocorreu comportamento inverso, sendo o maior CRP sempre verificado em COL, independente do nível de P adotado.

TABELA 6. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de interação tripla de genótipos de *Arabidopsis thaliana*, níveis de fósforo (P) e formulação do meio de cultura.

Níveis de P (μM)	Formulação do meio de cultura/Genótipos			
	Comercial - $\frac{1}{2}$ MS		A partir de sais - MP	
	COL	<i>p9</i>	COL	<i>p9</i>
	Comprimento da raiz primária (cm)			
0	F 1,29 a*	E 1,41 a	E 2,25 a	G 1,03 b
25	F 1,53 a	DE 1,65 a	D 3,81 a	F 1,56 b
50	E 1,90 a	D 1,79 a	C 4,20 a	E 3,03 b
100	D 2,19 b	C 2,89 a	B 5,62 a	D 4,15 b
250	C 2,50 b	C 3,39 a	A 6,66 a	C 5,38 b
500	B 3,45 b	B 3,89 a	A 6,82 a	B 6,06 b
1000	A 4,34 a	A 4,37 a	A 6,67 a	A 6,35 b

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre genótipos no mesmo nível de P e formulação do meio e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre níveis de P no mesmo genótipo e formulação do meio, não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficiente de variação= 11,6.

Em ambos os meios de cultura o incremento nos níveis de P resultou em raízes primárias mais longas, com comportamento linear, cujas diferenças ocorrem inclusive nos níveis mais baixos de P, como entre 0 e 25 μM (Tabela 6). Além disso, em *p9* em ambos os meios ($\frac{1}{2}$ MS e MP) e em COL no meio $\frac{1}{2}$ MS, ocorreu diferença no CRP entre os diferentes níveis de P. Em COL, este

efeito foi observado somente até 100 μM de P no meio MP, pois a partir de 250 μM de P o desenvolvimento radical foi similar.

Estes dados demonstram que *p9* possui a mesma resposta ao incremento nos níveis de P em ambos os meios de cultura, ao contrário de COL do qual é originário, já que COL não percebe níveis de P superiores à 250 μM no meio MP. Entretanto, a razão entre o CRP dos níveis extremos de P em *p9* muda de 3,1 no meio $\frac{1}{2}$ MS para 6,2 no meio MP, enquanto em COL varia pouco, sendo 3,4 e 3,0, respectivamente. Assim, *p9* consegue responder melhor ao P disponível no meio de cultura, especialmente sob meio MP. O meio MP permite diferenciar *p9* de COL na ausência de P. Já no meio $\frac{1}{2}$ MS, COL, *p23* e *p37* possuem crescimento de raiz limitados por algum fator distinto de P, pois reduziram seu CRP do meio MP ao $\frac{1}{2}$ MS, ao contrário de *p9*, que o incrementou (Tabela 5).

Em função da interação tripla verificada neste estudo, também comparou-se o CRP de cada genótipo nos dois meios em cada nível de P. Em COL, o CRP sempre foi maior no meio MP, independente do nível de P adotado (Tabela 7). Em *p9*, este comportamento apenas não ocorreu sob ausência de P, onde o CRP foi maior no meio $\frac{1}{2}$ MS e ainda em 25 μM , onde o desenvolvimento radical foi similar entre os dois meios de cultura (Tabela 7). Estes dados sugerem que *p9* pode requer níveis mínimos de P para conseguir usar os demais nutrientes, característica esta que parece não ser ocorrente em COL.

A seleção inicial dos três mutantes em estudo ocorreu em meio contendo organofosfatos (DNA) como única fonte de P (DELATORRE, 2009). Considerando este aspecto, conduziu-se estudo com contraste no suprimento

de P, ausência total ou com suprimento de P combinado com ou sem adição de ácidos nucleicos. Na Tabela 8 são apresentados os resultados de CRP em função da interação dupla de genótipos e suprimentos contrastantes de P, sendo o comportamento dos mutantes distinto do obtido em COL. Neste estudo, o tipo de meio adotado foi o MP, já que estas foram as condições nas quais os mutantes foram selecionados. Vale ressaltar, que com este meio de cultura ao contrário do que teria ocorrido caso tivesse adotado o meio $\frac{1}{2}$ MS, DELATORRE (2009) não conduziu seleção para o fator amônio e/ou contrastes em outros nutrientes, conforme apresentado na Tabela 1.

TABELA 7. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de interação tripla de genótipos de *Arabidopsis thaliana*, níveis de fósforo (P) e formulação do meio de cultura ($\frac{1}{2}$ MS= meio comercial e MP= meio a partir de sais).

Níveis de P (μ M)	Genótipos/Formulação do meio de cultura			
	COL		p9	
	$\frac{1}{2}$ MS	MP	$\frac{1}{2}$ MS	MP
Comprimento da raiz primária (cm)				
0	1,29 b*	2,25 a	1,41 a	1,03 b
25	1,53 b	3,81 a	1,65 a	1,56 a
50	1,90 b	4,20 a	1,79 b	3,03 a
100	2,19 b	5,62 a	2,89 b	4,15 a
250	2,50 b	6,66 a	3,39 b	5,38 a
500	3,45 b	6,82 a	3,89 b	6,06 a
1000	4,34 b	6,67 a	4,37 b	6,35 a

* Médias seguidas de mesma letra na linha, comparação entre formulações do meio de cultura no mesmo genótipo e nível de P, não diferem pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficiente de variação= 11,6.

Para o mesmo tratamento de P, COL teve CRP maior que *p9*, *p23* e *p37*, independente da condição de suprimento de P, exceto no meio +P/-RNA, onde COL e *p9* tiveram CRP similar (Tabela 8 e Figura 1). Ainda em COL, no meio -P, a adição de organofosfatos (-P/+RNA) afetou positivamente o desenvolvimento radical, incrementando-o em 27% em relação à condição -P sem organofosfatos (-P/-RNA). Além disso, COL teve o mesmo desenvolvimento radical no meio +P, independente da presença de organofosfatos.

TABELA 8. Comprimento da raiz primária em quatro genótipos de *Arabidopsis thaliana* aos oito dias após germinação em quatro meios de cultura da formulação MP (+P= 1,0 mM, +RNA= 0,6 mg ml⁻¹).

Tratamento	Genótipos			
	COL	<i>p9</i>	<i>p23</i>	<i>p37</i>
Comprimento da raiz primária (cm)				
+P/+RNA	A 3,88 a*	B 1,26 b	B 0,44 c	B 0,51 c
+P/-RNA	A 4,02 a	A 4,18 a	A 0,96 b	A 1,05 b
-P/+RNA	B 2,61 a	D 0,36 b	B 0,33 b	B 0,35 b
-P/-RNA	C 2,04 a	C 0,67 b	B 0,43 c	B 0,50 bc

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre genótipos e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre níveis de P, não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficiente de variação= 16,1.

Diferente do esperado, os três mutantes apresentaram redução no CRP quando se adicionou organofosfatos no meio com suprimento normal de P (Tabela 8 e Figura 1). Nos tratamentos +P/+RNA e -P/-RNA, *p23* e *p37* tiveram CRP menor que o de *p9*, evidenciando que os mutantes possuem respostas de desenvolvimento radical e mutações distintas entre si. Da

mesma forma que verificado em COL, os mutantes possuem CRP mais curto sob condições limitantes de P (-P e -P/+RNA) em relação à condição com presença de P (+P/-RNA).

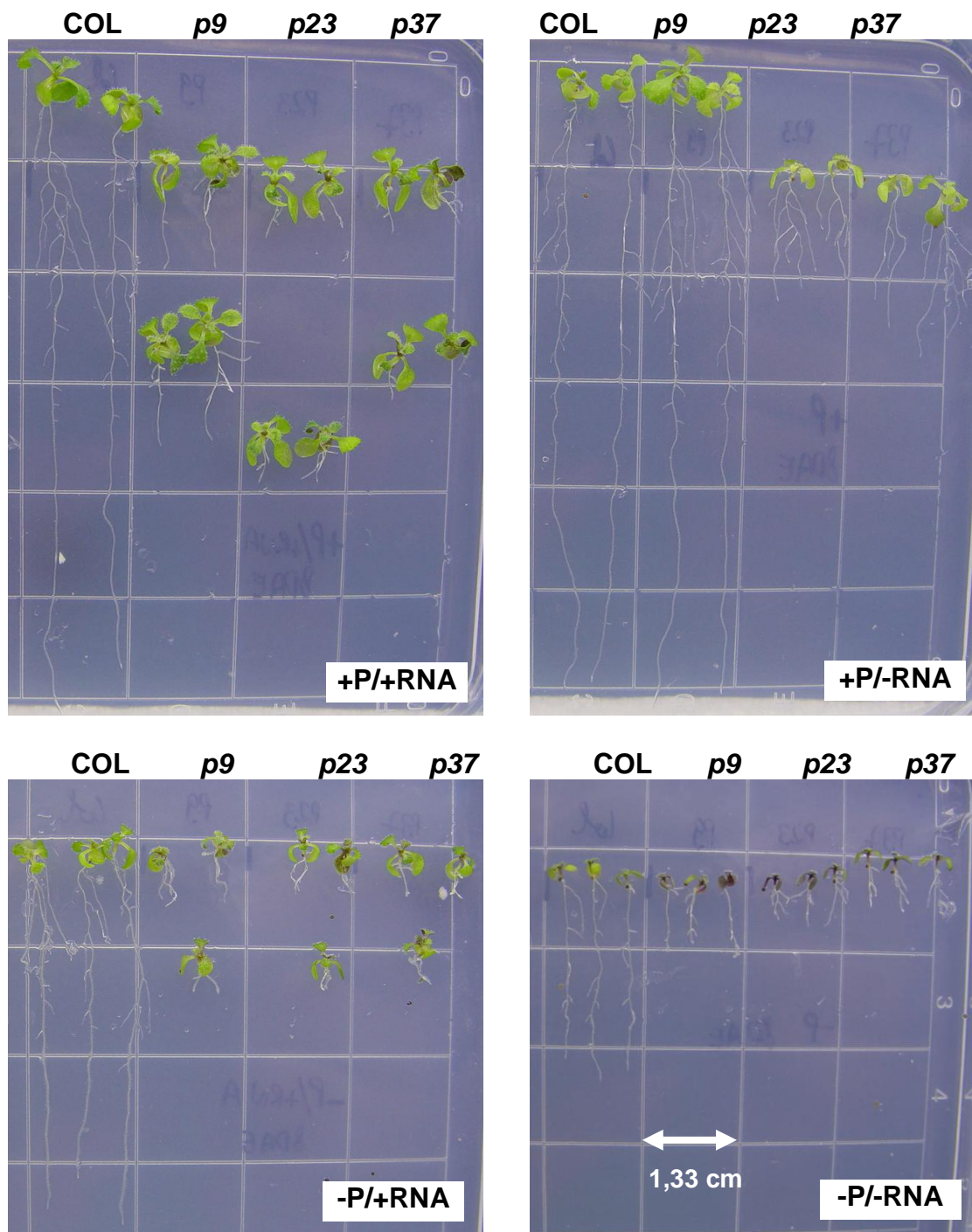


FIGURA 1. Desenvolvimento radical oito dias após a germinação de quatro genótipos de *Arabidopsis thaliana* em quatro meios de cultura da formulação MP, onde +P= 1,0 mM e +RNA= 0,6 mg ml⁻¹.

Entre formas de suprimento de P e/ou organofosfatos em cada genótipo, constatou-se que o maior CRP ocorre em +P/-RNA, independente do genótipo avaliado. No ecótipo COL, a presença de P no meio de cultura resultou em CRP maior que o da condição com deficiência de P, independente da presença de organofosfatos (Tabela 8 e Figura 1). Além disso, em COL a menor raiz primária ocorreu sob deficiência completa de P (-P/-RNA). Esta resposta já era esperada, uma vez que na presença de RNA no meio, COL tem habilidade de fazer uso de parte do fósforo constituinte do RNA, através da ação de enzimas secretadas pelas raízes, que auxiliam no processo de degradação destes compostos.

Por outro lado, ao contrário do esperado, não houve variação no desenvolvimento radical de *p23* e *p37* nos tratamentos +P/+RNA, -P/+RNA e -P/-RNA (Tabela 8). Este resultado evidencia que estes dois mutantes não são capazes de perceber a presença do RNA no meio de cultura, portanto sendo mutantes insensíveis à presença de organofosfatos no meio, como também previamente reportado por PINTO (2005) quando conduziu estudos com estes dois mutantes.

Além destas evidências, nos três mutantes, mas especialmente em *p9*, houve diferença no desenvolvimento radical entre todos os tratamentos de P adotados, sendo sempre o menor CRP verificado em -P/+RNA e o maior em +P/-RNA. Curioso e não esperado é que o CRP no meio +P/+RNA em *p9*, *p23* e *p37* é, respectivamente, 70, 56 e 51 % menor que o obtido em +P/-RNA, diferindo muito da resposta obtida em COL.

Esperava-se que, no meio com alto suprimento de P (2,5 mM) acrescido de RNA (+P/+RNA), que o sistema radical dos mutantes se

desenvolvesse de modo similar ao da condição +P/-RNA conforme verificado em COL. Estes dados sugerem que as mutações presentes em *p9*, *p23* e *p37* sensibilizem a planta a algum intermediário da hidrólise do RNA, o qual causa inibição severa no crescimento radical. Para *p9*, essas evidências também são parcialmente suportadas nos meios deficientes em P (-P/+RNA e -P/-RNA), nos quais a presença de ácidos nucleicos no meio inibiu seu desenvolvimento radical em 46 %.

Na parte aérea das plantas verificou-se diferenças marcantes no crescimento e na coloração destas quando crescidas em meio -P/-RNA e -P/+RNA (Figura 1). A maior alocação de fotoassimilados e, portanto de massa seca para a parte aérea na presença de ácidos nucleicos, sugere que as plantas estejam obtendo P desta fonte, pelo menos parcialmente. Outra possibilidade é que a presença do RNA ou algum outro composto de sua hidrólise sinalize para mudança na alocação dos fotoassimilados do sistema radical para a parte aérea.

Outra avaliação realizada neste estudo foi o acúmulo de amido na parte aérea, contudo apenas no controle positivo (+P/+RNA). Avaliações nos demais tratamentos foram procedidas por PINTO (2005) ao trabalhar com estes mutantes, sugerindo não ser necessário refazer esta análise. No estudo de PINTO (2005), em meio -P/+RNA COL e *p23* não apresentaram acúmulo de amido, enquanto *p9* e *p37* tiveram acúmulo de amido nesta condição.

No presente estudo, no tratamento +P/+RNA, nenhum dos genótipos apresentou acúmulo de amido na parte aérea (Figura 2). Apesar da presença do RNA no meio +P ter sido prejudicial ao desenvolvimento radical dos mutantes, especialmente de *p9*, não foi verificado acúmulo de amido, na parte

aérea (Figura 2). Estes dados suportam a idéia de que a presença do RNA não afeta a percepção e uso do P presente no meio de cultura pelas plantas. Ainda considerando os dados de PINTO (2005) e os obtidos no presente estudo, há evidências de que apesar do maior crescimento da parte aérea de *p9* e *p37*, estes ainda estariam sob deficiência de P.

Dos três mutantes, a resposta mais contrastante ocorreu em *p9*, pois a presença do ácido nucléico (RNA) afetou negativamente o desenvolvimento radical em ambos os suprimentos de P (+P e -P). Em *p23* e *p37* também houve redução no CRP com presença de ácidos nucléicos no meio de cultura, porém essa redução foi menos expressiva nestes dois mutantes, quando comparada ao efeito verificado em *p9*. Em princípio, considerou-se a possibilidade da presença de algum contaminante no meio de cultura +P/+RNA, o qual poderia ter sido fornecido via ácido nucléico e, desta forma, prejudicar o desenvolvimento normal do mutante. Entretanto, esta hipótese foi em princípio descartada, porque antes de fazer uso do RNA no meio, este passa por processo de lavagem/limpeza com solução de fenol e clorofórmio para remoção de contaminantes, seguido de permeação em coluna cromatográfica, conforme descrito no item 3.3.2. Além disso, não foi observado efeito negativo em COL, o que ocorreria se o efeito se devesse a algum contaminante. Especula-se que *p9* tenha habilidade de secretar enzimas capazes de atuarem na degradação de organofosfatos, similar ao que ocorre em COL, e neste caso, algum subproduto desta degradação poderia ser tóxico ou ter algum efeito sinalizador, afetando a alocação e seu desenvolvimento.

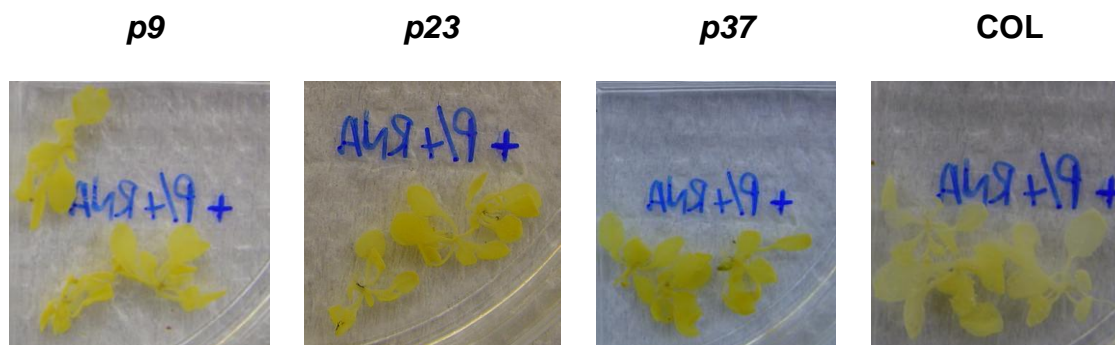


FIGURA 2. Ausência de acúmulo de amido na parte aérea em quatro genótipos de *Arabidopsis thaliana*, 10 dias após emergência, em meio de cultura da formulação MP com suficiência de fósforo (+P= 1,05 mM) e com organofosfatos (0,6 mg de RNA ml⁻¹).

Os dados apresentados demonstram que a presença do RNA no meio de cultura afeta o padrão de crescimento normal das raízes dos mutantes, como pode ser observado no controle experimental positivo (+P/+RNA). Além disso, como este mesmo efeito não ocorreu em COL, especula-se que este comportamento relaciona-se à mutação presente nos mutantes, já que o efeito negativo do RNA na presença de P é mais expressivo em *p9* (70%), *p23* (54%) e *p37* (51%) em relação a COL (3%).

Por outro lado, em função destes efeitos negativos da presença de organofosfatos (RNA) no desenvolvimento radical dos mutantes, poder-se-ia supor que estas plantas estivessem acionando algum sistema de resgate à P, já que estas plantas devem estar sob deficiência de P. Entretanto, o não acúmulo de amido na parte aérea em nenhum dos genótipos, rejeita esta premissa. Desta forma, fica reforçada a especulação de que algum componente da hidrólise do RNA afete o comportamento dos mutantes, especialmente *p9*, porém não COL.

Em três dos quatro tratamentos de P e RNA deste mesmo estudo, ainda avaliou-se a divisão celular no ápice radical através do transgene

CycB1::GUS no ecótipo COL e no mutante *p23*. Nestas plantas transgênicas, é possível observar a ocorrência de divisão celular no meristema radical, quando estes estão submetidos a meios de cultura distintos (Figura 3). Quando há suficiência de P (+P/-RNA), ambos os genótipos apresentam intensa divisão celular entre sete e 11 dias de crescimento, demonstrando que a raiz continua em desenvolvimento (Figura 3). Entretanto, sob limitação de P (-P/+RNA) ou ausência total deste (-P/-RNA), COL continua apresentando intensa atividade de divisão celular entre sete e nove dias, porém há redução considerável para o 11º dia no meio -P/-RNA, embora ainda seja visível ocorrência de divisão celular radical.

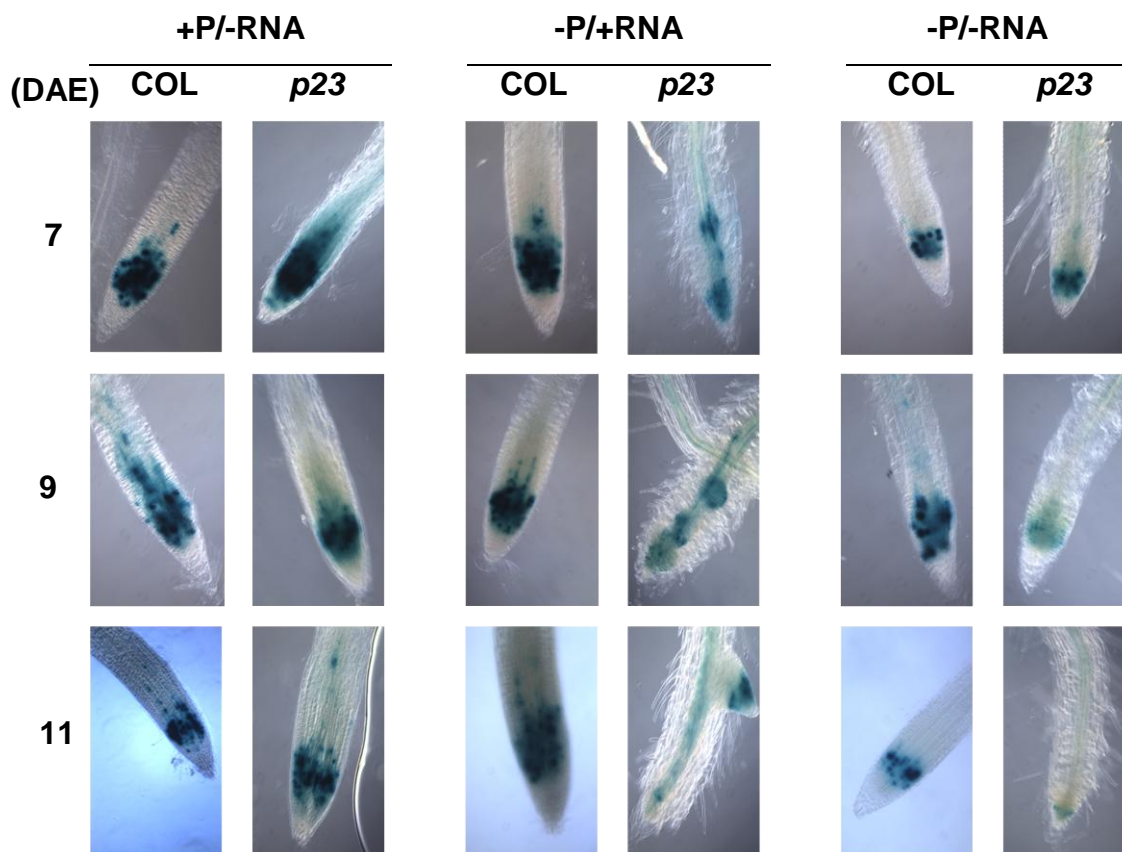


FIGURA 3. Efeito da disponibilidade de fósforo na cinética da expressão de *CycB1::GUS* na raiz primária de dois genótipos de *Arabidopsis thaliana* crescidos em meio de cultura MP com contrastes no suprimento de fósforo (+P, -P/+RNA e -P) durante oito dias. DAE= dias após emergência.

Por outro lado, à medida que a raiz permanece mais dias nos meios sob limitação de P, há intensa redução na divisão celular no mutante *p23*, a qual é praticamente ausente após nove dias de tratamento (Figura 3). Ainda neste mutante, com redução da divisão celular no meristema radical, iniciam-se divisões em células do periciclo da raiz primária, resultando na emissão de raízes secundárias e terciárias, as quais são curtas e pouco longevas.

Desta forma, a arquitetura radical de *p23* fica completamente alterada, com emissão de grande número de raízes laterais, porém o comprimento destas parece ser pouco efetivo em termos de absorção de nutrientes, já que a planta continua emitindo uma após a outra, o que deve gerar grande demanda por energia dos fotoassimilados, porém sem retorno efetivo à planta. Comportamento similar ao de *p23*, ou seja, emissão desordenada de raízes laterais e pouco longevas também foi reportado por DELATORRE (2009) ao estudar respostas de *pdr2* à limitação por P. Isso sugere que ambos os mutantes podem apresentar mutações em rotas similares em resposta à deficiência por P, porém estudos mais conclusivos são necessários.

Por terem sido isolados em condição limitante de P, os três mutantes podem apresentar resposta distinta ao suprimento de níveis de P. Assim, conduziu-se estudo de avaliação da dose resposta a P, com intuito de estabelecer até quais níveis de P a planta incrementa o desenvolvimento radical e se o padrão dos mutantes difere daquele de COL. Neste estudo, o CRP variou em função da interação dupla de genótipos e níveis de P (Tabela 9). Entre genótipos, COL teve o maior CRP em relação aos mutantes em estudo, independente do nível de P.

No mesmo nível de P, o CRP dos mutantes sempre foi menor que o de COL. *p23* e *p37* tiveram desenvolvimento radical similar entre si e sempre menor que o de *p9* e de COL, independente do teor de P (Tabela 9). Com isso, pode-se dizer que o sistema radical destes dois mutantes é constitutivamente menor que o de COL e de *p9*, independente do nível de P. Apesar deste resultado, ambos demonstram resposta ao aumento nos níveis de P, porém em escala inferior à de COL e de *p9*, justificando portanto, serem classificados como mutantes de P, e como demonstrado anteriormente, também são insensíveis à presença de organofosfatos no meio de cultura (Tabela 8).

TABELA 9. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de interação dupla de genótipos de *Arabidopsis thaliana* e níveis de fósforo (P) em meio de cultura MP.

Níveis de P (μM)	Genótipos			
	COL	<i>p9</i>	<i>p23</i>	<i>p37</i>
Comprimento da raiz primária (cm)				
0	E 2,25 a*	F 1,03 b	C 0,46 c	B 0,50 c
25	D 3,81 a	E 1,56 b	BC 0,57 c	B 0,55 c
50	C 4,20 a	D 3,03 b	B 0,71 c	B 0,65 c
100	B 5,62 a	C 4,15 b	B 0,86 c	B 0,82 c
250	A 6,66 a	B 5,38 b	B 0,78 d	A 1,39 c
500	A 6,82 a	A 6,06 b	A 1,56 c	A 1,69 c
1000	A 6,67 a	A 6,35 b	A 1,31 d	A 1,68 c

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre genótipos e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre níveis de P, não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficiente de variação= 11,6.

Entre níveis de P, COL e *p37* incrementaram o CRP até 250 μM de P, enquanto em *p9* e *p23* essa resposta ocorreu até 500 μM de P (Tabela 9). Contudo, plantas de *p37* não conseguiram distinguir níveis de P entre zero e 100 μM , enquanto em *p23* esse comportamento ocorreu entre 25 e 250 μM . Diferente de *p23* e *p37*, o ecótipo COL e o mutante *p9* conseguiram perceber inclusive a presença dos menores teores de P no meio de cultura (25 μM). A razão entre maior e menor CRP de cada genótipo é similar em COL (3,0) e os mutantes *p23* (3,8) e *p37* (3,3), ao passo que em *p9* essa razão é de 6,1.

Estes dados obtidos em condição de meio MP demonstram que em meio com estas características, *p9* é o mutante mais responsivo ao incremento nos níveis de P e, desta forma, o mais dependente da presença de P no meio de cultura para seu pleno desenvolvimento. Por outro lado, *p23* e *p37* possuem problema na resposta a baixos teores de P no meio de crescimento. Assim, pode-se especular que a mutação de *p23* e *p37* pode relacionar-se à defeitos na percepção do P no meio externo, além de sugerir alterações em transportadores de P de alta afinidade. Por outro lado, em *p9* os dados sugerem que os transportadores de alta e baixa afinidade funcionam normalmente.

Este estudo de dose resposta a P também foi conduzido para a formulação comercial, meio $\frac{1}{2}$ MS. O desenvolvimento radical também variou em função da interação dupla de genótipos e níveis de P, a exemplo do verificado no meio MP. Entretanto, no meio $\frac{1}{2}$ MS o comportamento dos genótipos, especialmente COL e *p9*, foi mais irregular, verificando-se diversas respostas não esperadas. Entre estas está o CRP de *p9* ser similar ao de COL entre 0 e 50 μM e em 500 e 1000 μM e ainda mais surpreendente, ser maior

que o de COL em 100 e 250 μM (Tabela 10). Em contrapartida, *p23* e *p37* continuaram apresentando raízes de tamanho similar entre eles e mais curtas que as de COL e *p9*, independente do nível de P, a exemplo do verificado no meio MP (Tabela 9).

TABELA 10. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de interação dupla de genótipos de *Arabidopsis thaliana* e níveis de fósforo (P) em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS.

Níveis de P (μM)	Genótipos			
	COL	<i>p9</i>	<i>p23</i>	<i>p37</i>
Comprimento da raiz primária (cm)				
0	F 1,18 a*	E 1,36 a	B 0,42 b	B 0,48 b
25	E 1,50 a	D 1,68 a	AB 0,60 b	AB 0,64 b
50	D 1,81 a	D 1,78 a	AB 0,61 b	A 0,69 b
100	D 2,09 b	C 3,22 a	A 0,70 c	A 0,72 c
250	C 2,40 b	BC 3,29 a	A 0,76 c	A 0,70 c
500	B 3,36 a	B 3,56 a	AB 0,61 b	AB 0,67 b
1000	A 4,24 a	A 4,27 a	A 0,75 b	A 0,79 b

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre genótipos e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre níveis de P, não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficiente de variação= 10,9.

Estes dados de *p9* podem indicar que este mutante tem sensibilidade diferenciada à presença de amônio no meio de cultura, relativamente ao ecótipo COL, pois este mutante tem comportamento bastante distinto entre os meios MP e $\frac{1}{2}$ MS. Entretanto, como descrito posteriormente (Tabela 17), no estudo de níveis de amônio, considerando-se o maior e menor CRP obtido, verificou-se que em *p9* essa relação é próxima de 4x, enquanto em COL é de

apenas 2,2x, ou seja, *p9* demonstra ser mais sensível e responsivo à presença de amônio no meio de cultura em relação à COL.

Por outro lado, *p23* e *p37* não conseguiram distinguir a presença de níveis de P entre 25 e 1000 μM (Tabela 10), exacerbando o comportamento verificado no meio MP (Tabela 9). O incremento no CRP entre níveis extremos de P, 1,8 e 1,6x para *p23* e *p37*, respectivamente, foi apenas metade do verificado no meio MP. Assim, reforça-se a hipótese destes dois mutantes apresentarem defeitos em transportadores de P e/ou na percepção do P do meio externo. O ecótipo COL e o mutante *p9* apresentaram aumento do CRP com aumento dos níveis de N, similar àquele obtido no meio MP. Entretanto, o desenvolvimento radical final foi menor para ambos no meio $\frac{1}{2}$ MS e o incremento entre os níveis extremos de P foi de 3,6x em COL (similar ao meio MP) e 3,1x em *p9*, cerca de metade do obtido em meio MP (Tabelas 9 e 10).

Os experimentos de dose resposta à P reforçam evidências de que não é possível adotar o meio $\frac{1}{2}$ MS indiscriminadamente, especialmente em condições com presença de baixos níveis de P ou de sua total ausência. O fato de *p9* e COL apresentarem CRP similar nos menores níveis de P do meio $\frac{1}{2}$ MS, faria com que este mutante não tivesse sido selecionado como mutante de P. Fato similar poderia ter ocorrido com *p23* e *p37* por ocasião de sua seleção, pois embora haja diferença significativa entre 0 e 100 e 0 e 50 μM de P, respectivamente, em termos absolutos a variação de CRP entre os níveis extremos de P é apenas próxima à 0,3 cm (Tabela 10). Assim, pode-se dizer que o meio $\frac{1}{2}$ MS causa redução do crescimento potencial da raiz primária de COL, cujos efeitos podem ser causados pelos fatores anteriormente citados ou ainda combinados com deficiências ou toxidez

causadas por outros nutrientes constituintes dos meios MP e ½ MS, conforme apresentado na Tabela 1.

4.2 Resposta à deficiência nutricional distinta de fósforo

Os resultados apresentados direcionam para que os mutantes sejam classificados como mutantes de P devido as suas respostas em relação à deficiência no suprimento de P. Entretanto, apesar destas evidências, também foi necessário avaliar se o menor desenvolvimento radical verificado nesta condição é específico à deficiência de P ou se ainda há efeito de outra limitação nutricional isolada ou mesmo interação de nutrientes. Este estudo foi conduzido sob condição de suficiência de P (+P= 1,0 mM) e sem suprimento de P (-P= 0,0 mM), neste caso, havendo dupla deficiência. As deficiências nutricionais avaliadas foram as de N, Fe, K e S.

Em ambas as condições (+P e -P), consideradas estudos separados, o desenvolvimento radical variou em função de genótipo (Tabelas 11 e 12 e Figuras 4, 5, 6 e 7). Sob condição de alto P e com deficiência de N, o CRP de *p23* e *p37* foi similar ao de COL, portanto havendo, resgate do fenótipo de COL nestes dois mutantes, enquanto o de *p9* foi menor relativamente aos demais genótipos (Tabela 11 e Figuras 4 e 5). Sob deficiência de Fe, *p9* teve desenvolvimento radical similar ao de COL, havendo assim, resgate de fenótipo de COL neste mutante, enquanto *p23* e *p37* apresentaram raízes mais curtas que as de COL.

TABELA 11. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de deficiências nutricionais distintas de fósforo, em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM).

Nutriente não suprido	Genótipos			
	COL	<i>p9</i>	<i>p23</i>	<i>p37</i>
Comprimento da raiz primária (cm)				
Controle	6,67 a	6,35 b	1,31 d	1,68 c
Nitrogênio	2,22 a*	1,33 b	1,96 a	2,11 a
Ferro	6,40 a	6,29 a	2,12 b	1,95 b
Potássio	1,83 a	0,93 b	0,97 b	0,95 b
Enxofre	7,53 a	5,73 b	1,18 c	1,33 c

* Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). Coeficientes de variação: N= 9,3; Fe= 10,6; K= 11,3 e S= 9,4.

Por outro lado, nas condições com deficiência nutricional por K ou S, os três mutantes apresentaram CRP menor que o de COL (Figura 5). Estes resultados demonstram que a mutação de *p23* e a de *p37* podem ser também relacionadas à N, enquanto a de *p9* pode relacionar-se à Fe, respostas estas que não eram esperadas em razão da forma como foi realizada a seleção. Para confirmar ou rejeitar estas hipóteses, outros estudos foram conduzidos, cujos resultados são apresentados na seqüência.

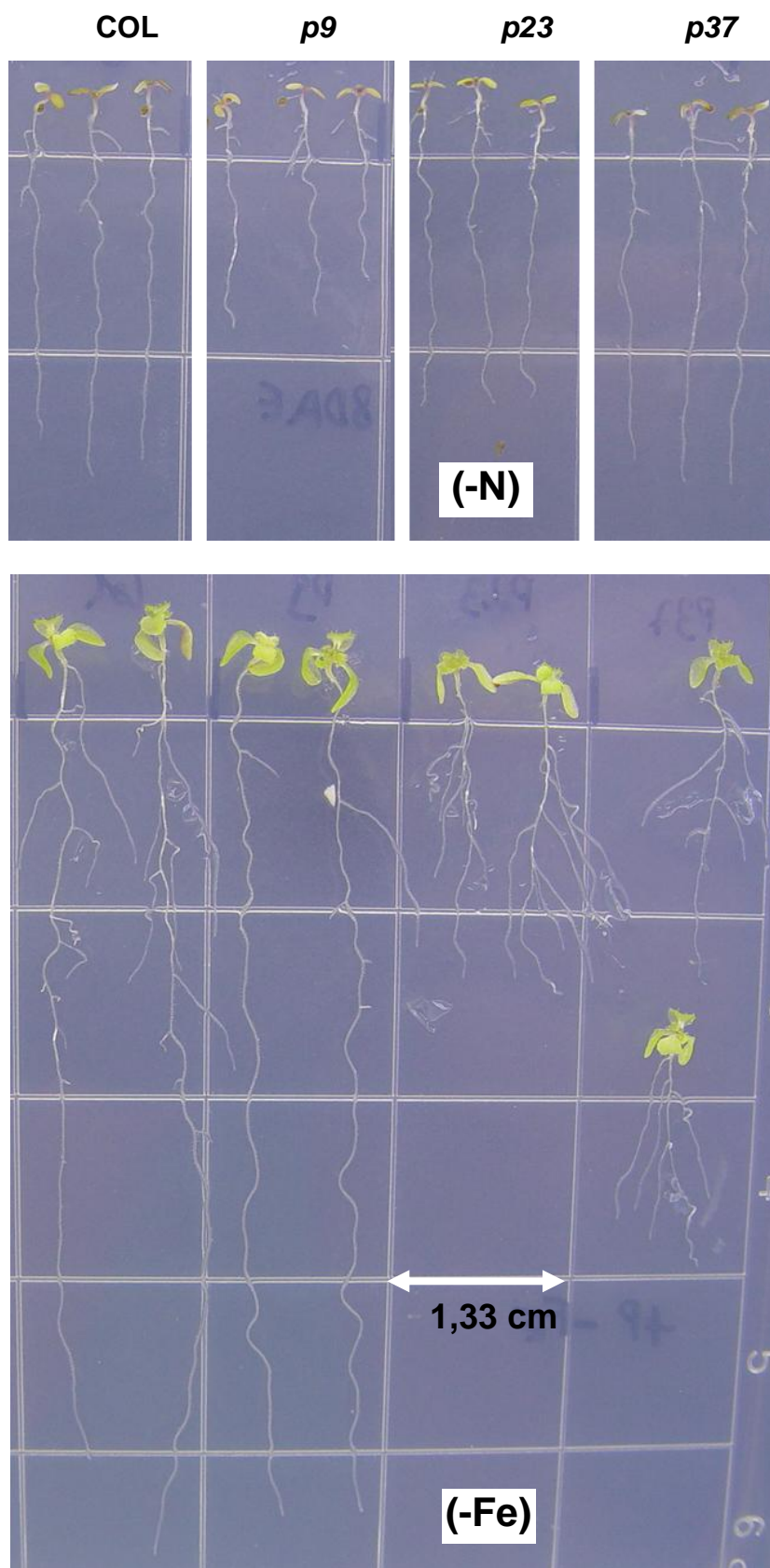


FIGURA 4. Desenvolvimento radical oito dias após a germinação de quatro genótipos de *Arabidopsis thaliana* em meio de cultura MP sem suprimento de nitrogênio (-N) ou ferro (-Fe), em meio com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM).

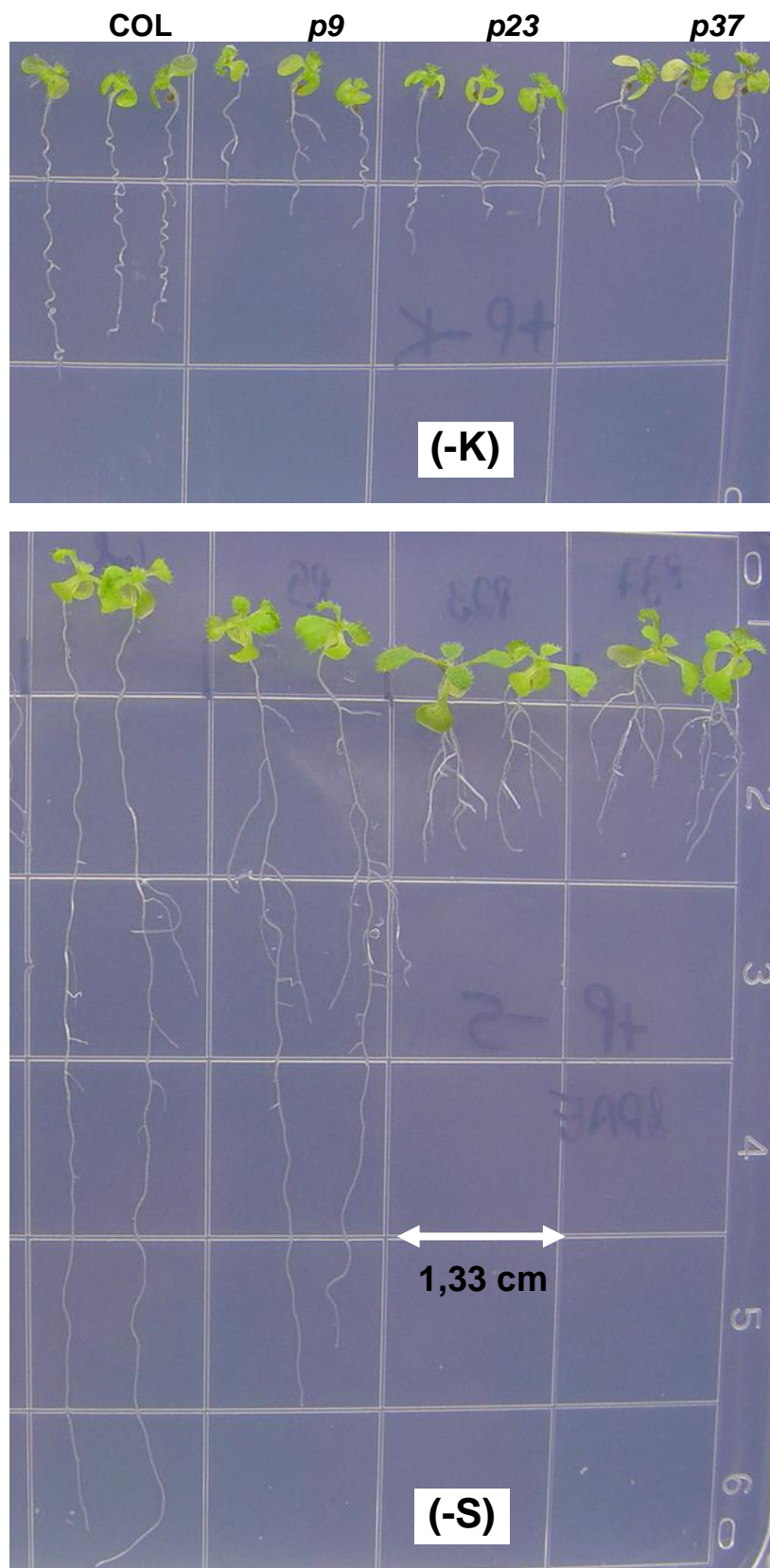


FIGURA 5. Desenvolvimento radical oito dias após a germinação de quatro genótipos de *Arabidopsis thaliana* em meio de cultura MP sem suprimento de potássio (-K) ou enxofre (-S), em meio com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM).

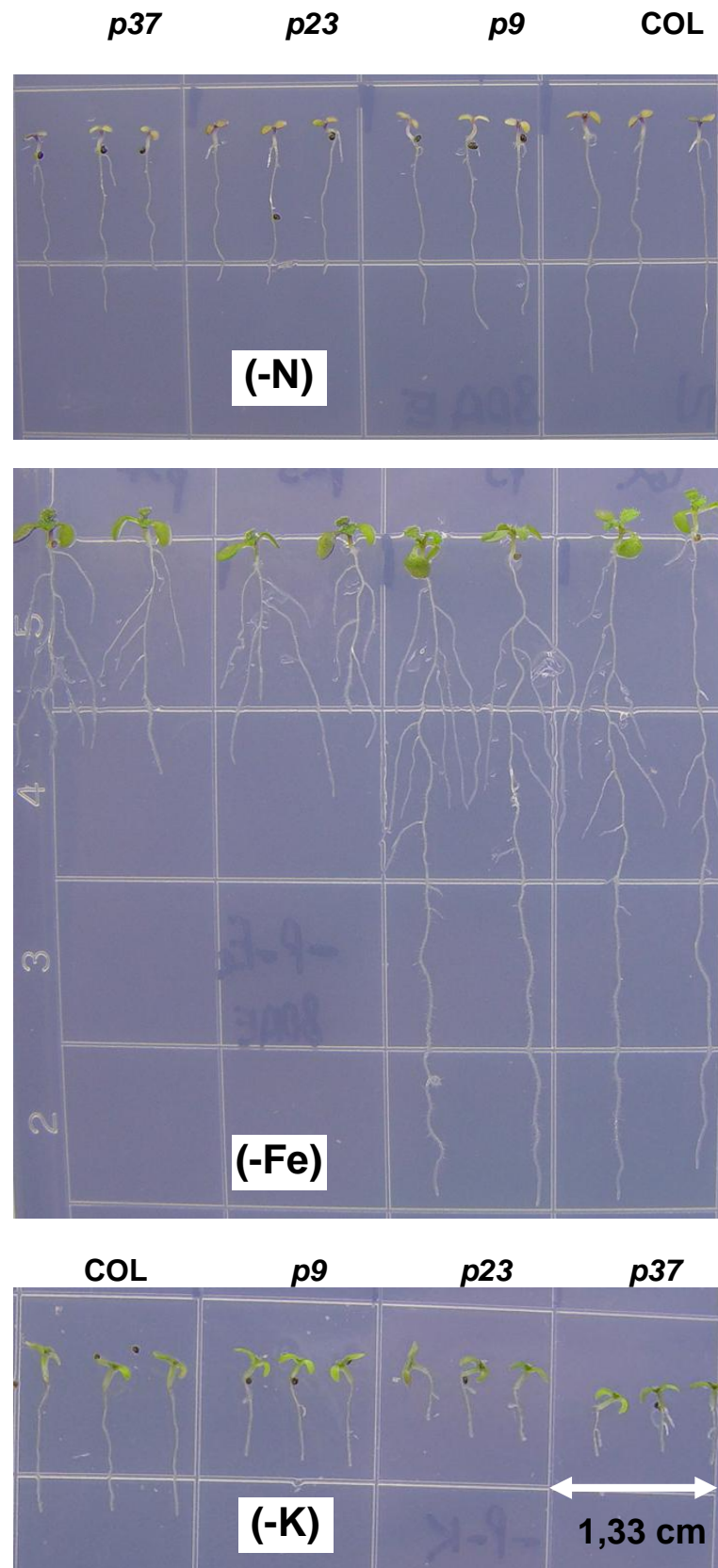


FIGURA 6. Desenvolvimento do sistema radical oito dias após a germinação de quatro genótipos de *Arabidopsis thaliana* em meio de cultura MP sem suprimento de nitrogênio (-N), ferro (-Fe) ou potássio (-K), sob ausência de fósforo (-P= 0,0 mM).

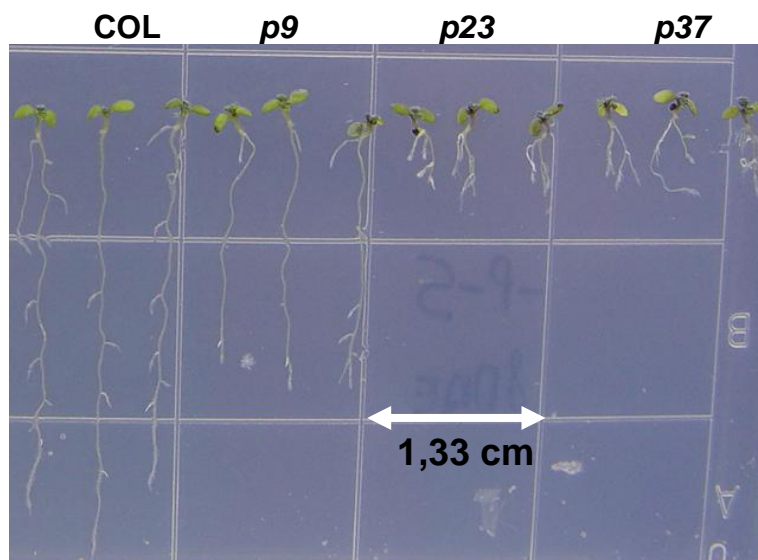


FIGURA 7. Desenvolvimento do sistema radical oito dias após a germinação de quatro genótipos de *Arabidopsis thaliana* em meio de cultura MP sem suprimento de enxofre, sob ausência de fósforo (-P= 0,0 mM).

Na condição com dupla deficiência nutricional, -P e ainda ausência de N, Fe, K ou S, em valores absolutos, as raízes primárias mais longas foram verificadas no meio -P/-Fe, enquanto as mais curtas no -P/-K (Tabela 12 e Figuras 6 e 7). Nos meios -P/-N e -P/-Fe, *p9* e COL apresentaram CRP similar entre si e maior que o de *p23* e *p37*, sendo que estes dois últimos também não diferiram entre si (Tabela 12 e Figura 6). A remoção de N não foi capaz de resgatar o fenótipo de *p23* e *p37* na ausência de P, diferindo do verificado na condição com presença de P (Tabela 11). Assim, o resgate do fenótipo radical de COL nestes dois mutantes é dependente da presença de P. Além disso, mesmo na ausência de P, a supressão do Fe do meio de cultura possibilitou desenvolvimento adequado de COL e *p9*, reforçando a hipótese de *p9* também ser mutante de Fe, portanto da interação P x Fe.

Em contrapartida, no meio -P/-K, os três mutantes não diferiram entre si, porém o sistema radical destes se desenvolveu menos que o de COL,

evidenciando que essa dupla deficiência causa forte inibição do desenvolvimento radical, seja através de menor atividade mitótica ou via menor alongação celular. Sob meio -P/-S, o maior CRP ocorreu em COL e o menor nos mutantes *p23* e *p37*, sem que estes diferissem entre si, enquanto *p9* teve raiz primária com tamanho intermediário à COL e *p23* e *p37* (Tabela 12 e Figura 7). Desta forma, estas duas deficiências duplas de nutrientes, -P/-K e -P/-S, demonstram não estar relacionadas a mutação presente nos mutantes em estudo. Por outro lado, para as condições -P/-N e -P/-Fe há evidências de que o desenvolvimento radical é dependente da interação nutricional destes. A confirmação ou não destes resultados será melhor explorado em experimentos descritos posteriormente.

TABELA 12. Comprimento da raiz primária em quatro genótipos de *Arabidopsis thaliana* oito dias após germinação em função de deficiências nutricionais distintas de fósforo, em meio de cultura MP sem suprimento de fósforo (-P= 0,0 mM).

Nutriente	Genótipos			
	COL	<i>p9</i>	<i>p23</i>	<i>p37</i>
não suprido				
Comprimento da raiz primária (cm)				
Controle	2,25 a	1,03 b	0,46 c	0,50 c
Nitrogênio	1,99 a*	1,78 a	1,38 b	1,36 b
Ferro	5,35 a	5,27 a	1,26 b	1,55 b
Potássio	0,95 a	0,59 b	0,37 b	0,34 b
Enxofre	2,85 a	1,88 b	0,48 c	0,47 c

* Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). Coeficientes de variação: N= 10,3; Fe= 9,4; K= 11,2 e S= 9,9.

Um aspecto interessante em ambos os estudos (+P e -P) de deficiência nutricional distinta de P, é que o desenvolvimento da parte aérea parece não ser afetado pela ausência do suprimento de N, Fe, K e S, independente da condição de P (Figuras 4, 5, 6 e 7). Assim, o efeito da ausência de algum destes nutrientes têm efeito marcante sobre o desenvolvimento do sistema radical e, portanto, foi acertada a estratégia de focar as análises deste estudo apenas na avaliação do CRP.

4.3 Estudos de transferência de plantas entre meios de cultura: análise de divisão celular e crescimento radical após a transferência

Inicialmente o objetivo deste estudo era avaliar somente o efeito da deficiência de P após as plantas crescerem em ambiente com suficiência de P (1,0 mM). Entretanto, no decorrer das análises e obtenção dos resultados, verificou-se que além do efeito de P no comprimento da raiz primária e na arquitetura radical, o N também afeta o padrão de crescimento de COL e dos mutantes. Assim, os estudos de transferência de plantas entre meios de cultura foram desenvolvidos sob dois enfoques, um com alteração na disponibilidade de P e outro com mudanças no fornecimento de N.

É importante ressaltar que as análises nestes ensaios não foram realizadas com todos os mutantes, em geral sendo apresentados resultados para o ecótipo COL e mais um mutante. No caso de *p9*, ocorreu seleção equivocada da linhagem *CycB1::GUS*, levando a não existência de padrão entre as plantas em análises na linhagem adotada nos estudos conduzidos. Desta forma, optou-se por descartar as análises relacionadas a cinética de

expressão deste gene e reiniciar a obtenção de linhagem com padrão mais satisfatório. Fato semelhante ocorreu com *p23* para a cinética de expressão do gene *QC25::GUS*, sendo as análises igualmente descartadas e reiniciada a seleção de outra linhagem mais homogênea.

Além destes inconvenientes com *p9* e *p23*, nos primeiros estudos conduzidos com *p37*, constatou-se que Havaí mistura de sementes de procedências distintas, pois sementes coletadas das mesmas plantas resultavam em plantas com fenótipo radical curto e em outras em raízes longas. Com isso, como previamente reportado neste trabalho, houve necessidade de fazer sua re-seleção, assim como de todos os cruzamentos pertinentes para eliminar outras mutações, retardando consideravelmente os cruzamentos com as plantas transgênicas. Desta forma, não houve tempo hábil para obtenção de linhagens suficientemente homozigotas para a mutação e a presença do transgene e, desta forma, as incluir nestas análises.

Por outro lado, estas limitações no uso de mais genótipos nas análises ocorreram apenas nos estudos de análise da expressão gênica *in situ*, neste caso os relacionados à limitação de P. Assim, todos os mutantes foram avaliados nos estudos relacionados à deficiência por N, já que as avaliações foram direcionadas à parte fenotípica, não sendo necessário ter linhagem homozigota do cruzamento dos mutantes com as linhagens transgênicas.

No estudo relativo à transferência para meio com alteração na disponibilidade de P, as análises consistiram da avaliação da cinética de expressão de genes, adotando-se linhagem de gene com promotor fusionado a marcadores. Com essa estratégia, não é necessária extração de RNA e nem análises de PCR, já que se avalia a expressão *in situ*, no caso *AtACP5::GUS*,

através de reação histoquímica nos tecidos, conforme previamente reportado no item 3.5, p.31.

Como esperado, a cinética de expressão do gene *AtACP5* em COL, *p9* e *p23* aumenta à medida que a deficiência por P se prolonga (Figura 8). Este gene (*AtACP5*) codifica uma fosfatase ácida induzida durante a deficiência de P (DEL POZO *et al.*, 1999). Dentro do esperado, em nenhum dos genótipos verificou-se expressão de *AtACP5::GUS* quando as plantas cresceram em meio de cultura completo (Figura 8). Entretanto, quando as plantas foram transferidas do meio +P ao -P, mesmo apenas dois dias após esta transferência já foi possível verificar início de expressão deste gene em *p9*. A indução deste gene foi ainda mais nítida a partir de três dias da transferência para os mutantes *p9* e *p23*, enquanto em COL é verificada expressão bem reduzida. Além disso, a partir do quarto dia, este gene é mais induzido em *p23* em relação à *p9* e à COL, sendo que estes dois últimos apresentaram padrão de expressão similar entre si em todo período avaliado (Figura 8).

Quando estes genótipos foram transferidos do meio +P ao meio -P/+RNA, a expressão de *AtACP5::GUS* foi menos intensa relativamente àquela da transferência para -P. Exceção ocorreu em *p23*, que apresentou expressão similar entre os meios -P/+RNA e -P, igualmente apresentando forte indução entre o terceiro e quarto dia após transferência (Figura 8). Por outro lado, em COL a expressão deste gene é praticamente ausente, mesmo oito dias após transferência, enquanto em *p9* ocorre pequena indução após quatro dias de transferência para -P/+RNA, a qual se mantém estável até oito dias de transferência (Figura 8).

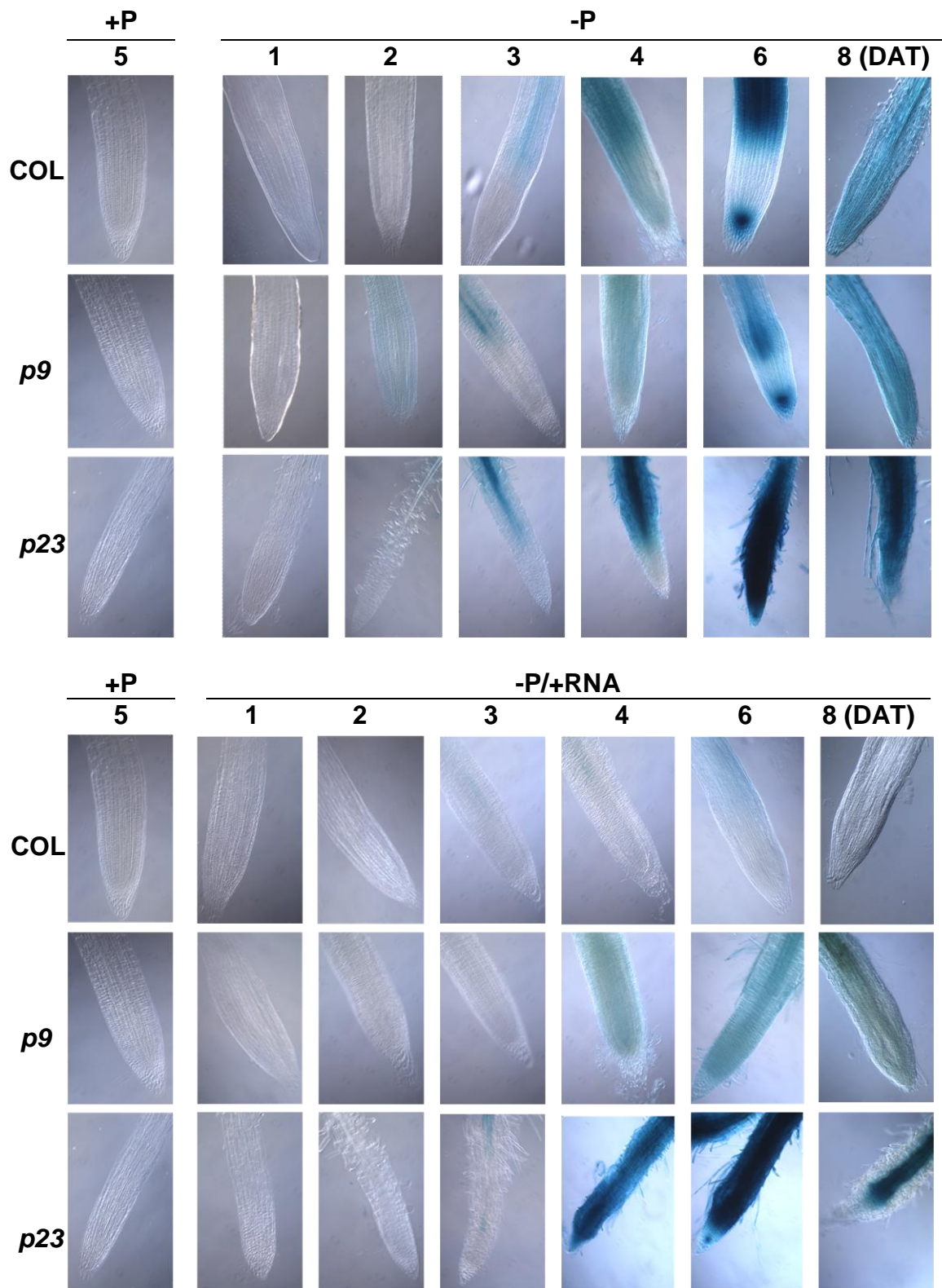


FIGURA 8. Efeito da disponibilidade de fósforo na cinética da expressão de *AtACP5::GUS* na raiz primária de três genótipos de *Arabidopsis thaliana* crescidos por cinco dias em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM) e após transferidos para meio sem suprimento de fósforo (-P= 0,0 mM) ou com limitação deste (-P/+RNA) durante oito dias. DAT= dias após transferência.

Estes dados, demonstram que quanto maior a expressão deste gene, potencialmente maior é a quantidade de P disponibilizado a partir dos ácidos nucléicos presentes no meio de cultura, já que o produto da expressão de *ACP5* é capaz de atuar na degradação de ácidos orgânicos, neste caso por exemplo o RNA do meio -P/+RNA. É importante ressaltar, que durante o desenvolvimento da presente tese não foi realizada nenhuma avaliação direta da quantidade de P disponibilizado desta forma, aspecto que deverá ser contemplado na continuação dos estudos com os mutantes, especialmente com *p23*, que foi o que apresentou maior nível de expressão do referido gene.

Outro gene que teve sua expressão *in situ* avaliada foi *QC25::GUS*, o qual relaciona-se às células do centro quiescente (CQ) no meristema radical. Esta região tem sido considerada importante no entendimento de como as plantas respondem a estresses como a limitação por P. Isso ocorre porque em *arabidopsis* engloba apenas quatro células, as quais são indiferenciadas e consideradas as células tronco vegetais e são circundadas por primórdios de células meristemáticas (SABATINI *et al.*, 2003; NAWY *et al.*, 2005). Assim, podem dar origem a qualquer tipo de célula dependendo do estímulo ou sinal que recebem, evento que segundo TICCONI *et al.* (2009) visualiza ser ainda mais relevante e decisivo na sobrevivência da planta durante estresses.

Em ambos os genótipos (COL e *p9*), houve expressão deste gene no tratamento com suficiência de P. Após transferência de plantas para meio -P ou -P/+RNA, houve pequena alteração na expressão deste gene no ecótipo COL, ocorrendo redução desta a partir do sexto dia (Figura 9). Por outro lado, em *p9* verificou-se alteração no padrão de expressão desse gene entre os dois meios de cultura. Em meio -P, a expressão diminuiu a partir do segundo

dia da transferência, culminando na exaustão completa do CQ entre quatro e seis dias após a transferência (Figura 9). Além disso, a transferência ao meio - P/+RNA acelerou ainda mais o consumo do CQ em *p9*. Entre um e dois dias após a transferência, observou-se redução na expressão de *QC25::GUS* e ausência total desta entre três e quatro dias.

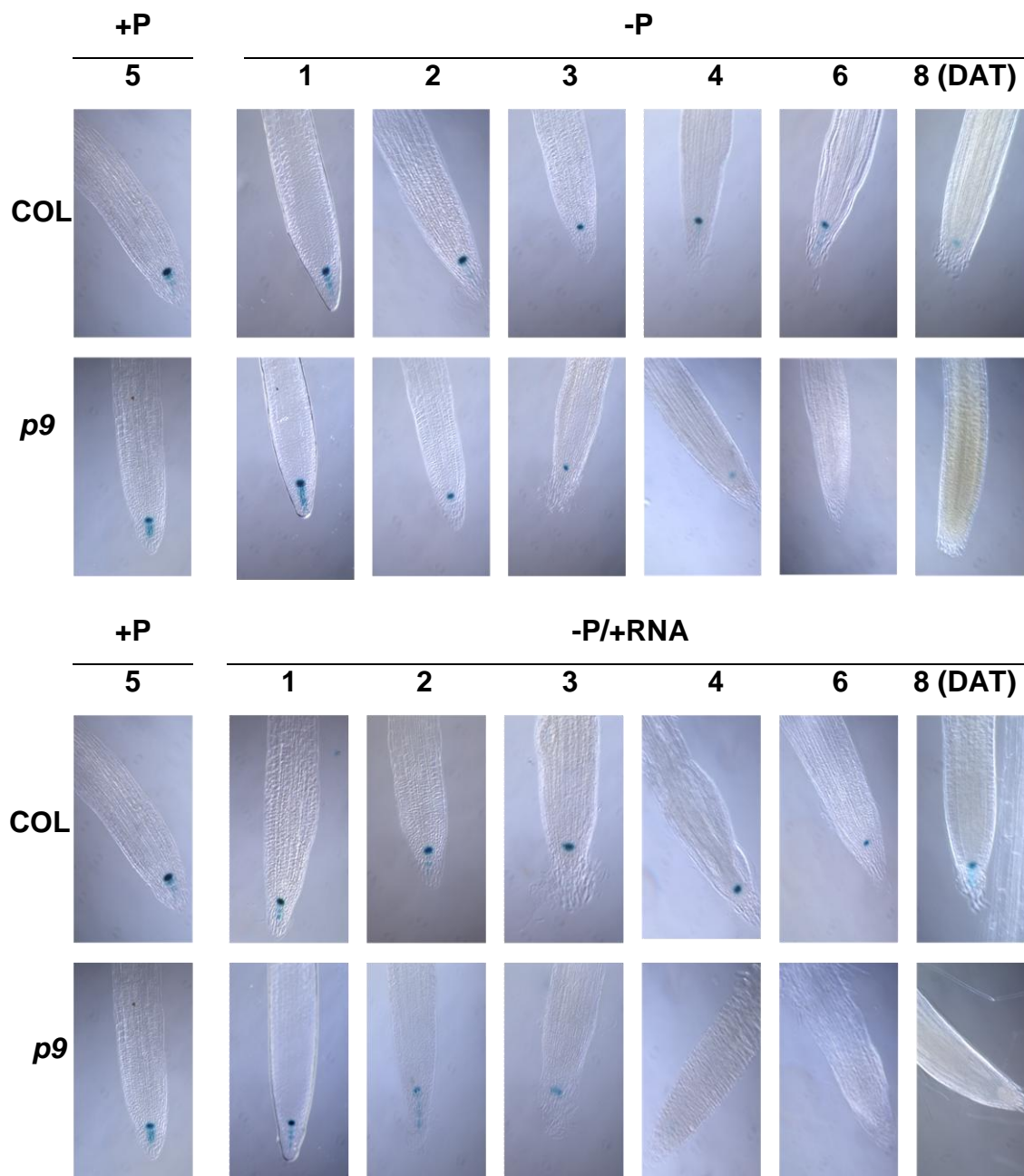


FIGURA 9. Efeito da disponibilidade de fósforo na cinética da expressão de *QC25::GUS* na raiz primária de dois genótipos de *Arabidopsis thaliana* crescidos durante cinco dias em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM) e após transferidos para meio sem suprimento de fósforo (-P= 0,0 mM) ou com limitação deste (-P/+RNA) durante oito dias. DAT= dias após transferência.

Em consonância com atividade de *QC25::GUS* em COL está a de *CycB1::GUS*. À medida que aumenta o tempo de exposição de COL à deficiência total de P ocorre redução gradual na divisão celular, visível através

da menor intensidade da coloração azulada na região meristemática (Figura 10). Por outro lado, em ambiente -P/+RNA, este genótipo não apresentou alteração na atividade de divisão celular com incremento no tempo de exposição a este ambiente. Assim, COL demonstra ter habilidade de obter, pelo menos parte do P necessário aos processos de desenvolvimento da planta, através da fonte de P não prontamente disponível (RNA).

Embora em *p23* não se tenha dados da atividade de *QC25::GUS*, neste mutante verificou-se redução na atividade de *CycB1::GUS* à medida que aumenta o tempo de exposição aos ambientes com ausência de P, a exemplo de COL (Figura 10). Entretanto, em *p23* a redução na expressão desse gene já foi expressiva um dia após transferência para -P, enquanto a partir do quarto dia após a transferência não tenha sido verificada divisão celular (Figura 10). Ainda em *p23*, no meio -P/+RNA, a atividade de *CycB1::GUS* no primeiro dia após transferência é similar àquela do ambiente +P, porém reduz a partir do segundo dia, sendo ainda menor a partir do quarto (Figura 10). Entretanto, diferente da condição de ausência de P, aos seis dias após a transferência para meio -P/+RNA ainda foi possível observar expressão de *Cyc::B1::GUS* em *p23*. Estes dados podem sugerir que *p23* também pode ser capaz de mobilizar parte do P presente no RNA, a exemplo do que ocorre com COL.

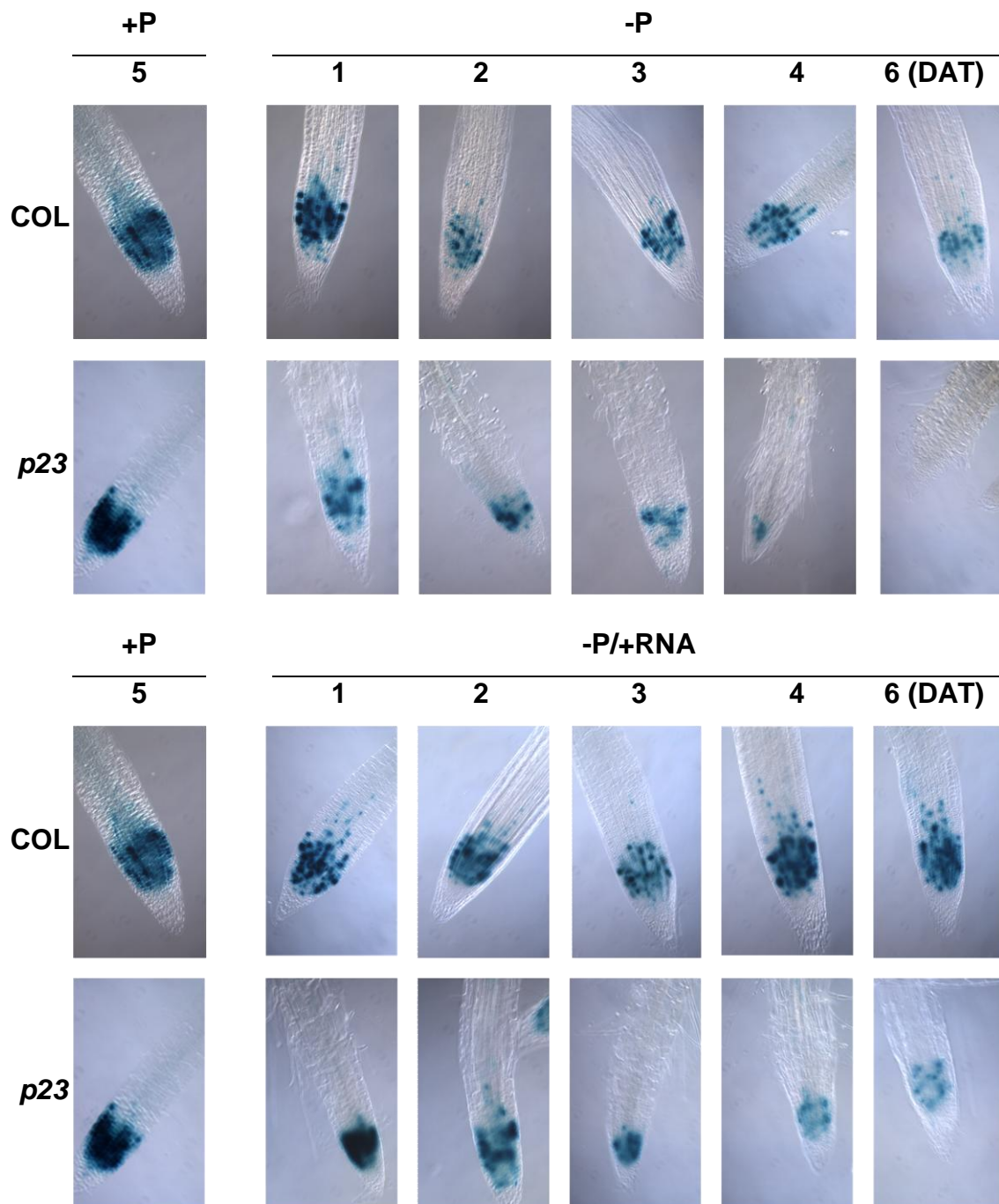


FIGURA 10. Efeito da disponibilidade de fósforo na cinética da expressão de *CycB1::GUS* na raiz primária de dois genótipos de *Arabidopsis thaliana* crescidos durante cinco dias em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM) e após transferidos para meio sem suprimento de fósforo (-P= 0,0 mM) ou com limitação deste (-P/+RNA) durante seis dias. DAT= dias após transferência.

Um controle importante e que demonstra a efetividade dos tratamentos propostos nestes estudos com marcadores é que sob condições de suficiência

de P tanto nos mutantes quanto em COL não se observou diferenças de comportamento, independente do marcador analisado. Com isso, os resultados verificados nos tratamentos aplicados após a transferência das plantas são exclusivamente advindos desta condição, não sendo influenciados pela condição ambiental anterior.

Em outra parte dos estudos de transferência de plantas, os mutantes foram crescidos inicialmente em condição +P e, posteriormente transferidos para meio -P ou -P/+RNA. Diferente dos estudos anteriores, onde se avaliou a cinética de expressão de genes marcadores, no presente estudo buscou-se averiguar o crescimento da raiz primária em dois momentos, após quatro e sete dias da transferência (4 e 7 DAT) de +P aos meios -P ou -P/+RNA.

Como já apresentado, enquanto estiveram em meio +P, verificou-se que o CRP de COL e *p9* são similares e ambos diferem de *p23* e *p37*, que por sua vez não diferem entre si (Tabelas 8 e 13). Em ambos os momentos de avaliação do crescimento ocorrido após transferência ao meio -P ou -P/+RNA (4 e 7 DAT), portanto pode-se considerar este como continuação do crescimento, ocorreu interação dupla de genótipo e meio ao qual foram transferidos (Tabela 13).

Em ambas as avaliações, 4 e 7 DAT, *p9* e COL tiveram crescimento radical continuado similar, independente do meio ao qual foram transferidos. Aos 4 DAT, este crescimento em *p9* foi 93% e 74% do CRP inicial e em COL de 108% e 81%, respectivamente nos meios -P e -P/+RNA. Crescimento radical ainda maior ocorreu 7 DAT, onde constatou-se 116% e 121% do CRP inicial em *p9* e 128% e 133% em COL, respectivamente nos meios -P e -P/+RNA. Estes dados sugerem que COL e *p9* apresentam crescimento

radical similar após serem transferidos para meio -P ou -P/+RNA, independente do momento em que se fez a avaliação.

Estes dados de crescimento radical continuado de *p9* são relativamente inconsistentes com os da atividade de *QC25::GUS* neste mutante, pois há continuação de crescimento radical após sua transferência para meio -P, enquanto a atividade no centro quiescente reduz a partir do terceiro e é ausente a partir do sexto dia da transferência (Figura 9). Entretanto, deve-se lembrar que o crescimento radical não se dá apenas pelo processo de divisão celular, mas também via alongamento das células já divididas, porém ainda não diferenciadas, cujo processo pode ser afetado pela síntese de brassinosteróides. Neste sentido, dados de PINTO (2005) sugerem que à medida que incrementa a intensidade da limitação por P, ou seja, a planta passa da condição +P para a de -P/+RNA ou ainda para -P, ocorre menor alongamento celular. Com isso, apesar da ausência de atividade no CQ, pode haver crescimento radical suportado via alongamento das células anteriormente originadas, portanto justificando os dados verificados para *p9*.

Como esperado, em *p23* e *p37* a capacidade de crescimento após a transferência é mais limitada, independente do meio de cultura apresentar ou não P orgânico (RNA). Embora em menor grau que em *p9*, ambos os mutantes apresentaram crescimento radical continuado após transferência para meio deficiente em P, especialmente até 4 DAT. Este crescimento continuado foi de 28% e 17% do CRP inicial em *p23* e 78% e 38% em *p37* aos 4 DAT, respectivamente nos meios -P e -P/+RNA. Aos 7 DAT constatou-se 49% e 17% do CRP inicial em *p23* e 100% e 44% em *p37*, respectivamente nos meios -P e -P/+RNA. Com isso, em ambos os meios *p23* e *p37* tiveram

crescimento continuado efetivo da raiz primária somente até 4 DAT, já que houve apenas pequena variação entre 4 e 7 DAT.

TABELA 13. Comprimento da raiz primária sete dias após germinação (0 dias após transferência - 0 DAT) e crescimento continuado da raiz primária aos quatro e sete dias após transferência (4 e 7 DAT) para meio de cultura MP com limitação de fósforo (-P ou -P/+RNA), em função da interação dupla de genótipos de *Arabidopsis thaliana* e tratamentos de fósforo.

Tratamento	Genótipos			
	COL	<i>p9</i>	<i>p23</i>	<i>p37</i>
Comprimento da raiz primária 0 DAT (cm)				
+P	3,02 a*	3,29 a	0,98 b	0,73 b
Crescimento continuado da raiz primária 4 DAT (cm)				
-P	A 3,27 a	A 3,09 a	A 0,27 b	A 0,57 b
-P/+RNA	B 2,46 a	B 2,43 a	A 0,17 b	B 0,28 b
Crescimento continuado da raiz primária 7 DAT (cm)				
-P	A 3,86 a	A 3,81 a	A 0,48 b	A 0,73 b
-P/+RNA	A 4,03 a	A 3,98 a	B 0,17 b	B 0,32 b

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre genótipos e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre tratamentos de P na mesma característica radical, não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficientes de variação: 7,8, 9,8 e 11,1, respectivamente.

Os resultados destes dois mutantes reforçam aqueles verificados na atividade de *CycB1::GUS* em *p23* e sugerem que em *p37* a atividade meristemática de divisão celular seja similar à de *p23*. Contudo, vale salientar que em *p37* não foi realizada esta avaliação, sendo apenas uma especulação em razão do padrão similar deste ao de *p23* em termos de crescimento após a transferência para os meios deficientes em P. Segundo PINTO (2005), *p37*

apresenta redução de 57 % na divisão celular em meio -P/+RNA em relação ao ecótipo COL, enquanto em meio +P essa redução é de apenas 19 % relativamente à COL.

Entre tratamentos de P, ocorreu comportamento similar entre os genótipos aos 4 e 7 DAT, com tendência de maior crescimento continuado no meio -P em relação ao -P/+RNA. Aos 4 DAT para o meio -P, este crescimento foi 33%, 27% e 103% maior que o obtido em -P/+RNA, respectivamente nos genótipos COL, *p9* e *p37*, enquanto em *p23* não houve diferença. Por outro lado, aos 7 DAT o crescimento continuado de *p9* e COL não diferiu entre os meios de cultura, ficando em torno de 4 cm por planta nos dois meios (Tabela 13). Em *p23* e *p37* este crescimento foi de 128% e 182% superiores em ambiente -P relativamente ao -P/+RNA.

Estas diferenças de resposta entre os mutantes nos dois momentos de avaliação, devem-se principalmente à ausência de crescimento em *p23* e *p37* entre 4 e 7 DAT no ambiente -P/+RNA, ao contrário do verificado em -P. Por outro lado, *p9* teve crescimento continuado expressivo entre 4 e 7 DAT ao meio -P/+RNA, evidenciando que neste ambiente ainda houve divisão celular ou pelo menos alongamento celular, diferente de *p23* e *p37*, que não recresceram. Entretanto, ressalta-se que nessa condição de experimentação, experiência prévia com +P e posterior transferência para meio limitante em P (-P/+RNA), o RNA não foi tóxico para *p9*, ao contrário do verificado anteriormente (Tabela 8). Os dados destes estudos sugerem que o crescimento inicial em ambiente +P ameniza o efeito negativo do RNA no sistema radical de *p9* e/ou ainda, talvez através de acúmulo de P durante esta fase para uso posterior, em eventual momento de deficiência/limitação.

Neste mesmo estudo, ainda avaliou-se o número de raízes laterais (NRL) emitidas após transferência do meio +P aos deficientes em P. Da mesma forma que verificado no crescimento continuado da raiz primária, o NRL variou em função da interação dupla de genótipos e tratamentos de P (Tabela 14). No dia da transferência aos meios deficientes em P, o NRL foi de cerca de uma raiz lateral em cada raiz primária, independente do genótipo, enquanto quantidade superior foi verificada 4 e 7 DAT, independente do meio ao qual as plantas foram transferidas (Tabela 14 e Figuras 11 e 12).

TABELA 14. Número de raízes laterais sete dias após germinação (0 dias após transferência - 0 DAT) e aos quatro e sete dias após transferência (4 DAT e 7 DAT) para meio de cultura MP com limitação de fósforo (-P ou -P/+RNA) em função da interação dupla de genótipos de *Arabidopsis thaliana* e tratamentos de fósforo.

Tratamentos	Genótipos			
	COL	p9	p23	p37
Raízes laterais 0 DAT (nº)				
+P	1,16 a*	1,18 a	1,00 a	1,07 a
Raízes laterais 4 DAT (nº)				
-P	A 10,01 b	B 11,16 a	A 4,72 c	B 3,83 d
-P/+RNA	B 5,67 b	A 13,81 a	A 5,22 b	A 5,27 b
Raízes laterais 7 DAT (nº)				
-P	A 21,17 a	B 21,83 a	A 10,51 b	A 10,15 b
-P/+RNA	B 17,67 b	A 27,60 a	B 7,55 c	B 8,14 c

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre genótipos e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre tratamentos de P na mesma característica radical, não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficientes de variação: 0DAT= 7,3, 4DAT= 9,9 e 7DAT= 11,9.

Aos 4 DAT ao meio -P, o maior NRL ocorreu em *p9* e o menor em *p37*. Nesta condição, COL e *p23* que diferiram entre si, tiveram NRL intermediários aos de *p9* e *p37* (Tabela 14). No meio -P/+RNA, COL, *p23* e *p37* não diferiram entre si e tiveram cerca de 5 raízes secundárias por raiz primária, enquanto *p9* teve mais de 2,5x a quantidade de raízes laterais verificadas em *p23* e *p37*. Aos 7 DAT no meio -P, o NRL de *p9* e COL não diferiu, sendo ao redor de 21 raízes laterais por raiz primária. Estes dois genótipos apresentaram mais de 2x o NRL obtido em *p23* e *p37*, que também não diferiram entre si. Em -P/+RNA, *p9* teve NRL 56% superior ao de COL, enquanto *p23* e *p37* menos da metade das obtidas em COL e ainda menos de 1/3 das de *p9*.

Entre meios de cultura, dentro de cada genótipo, aos 4 DAT o comportamento dos mutantes foi similar, sendo o maior NRL verificado no meio -P/+RNA em relação ao -P, embora a diferença não seja significativa em *p23* (Tabela 14). Em COL, o comportamento foi inverso, verificando-se 76% mais raízes laterais em -P relativamente à -P/+RNA. Aos 7 DAT, o maior NRL nos genótipos COL, *p23* e *p37* ocorreu em -P, enquanto em *p9* o maior NRL foi verificado em -P/+RNA. Além disso, deve-se considerar o aumento expressivo na emissão de raízes laterais entre 4 e 7 DAT, independente do genótipo e tratamento de P (Tabela 14).

Em ambos os meios aos quais as plantas foram transferidas, pode-se observar que em COL a maioria das raízes laterais emitidas ocorreu na parte da raiz principal que se desenvolveu após transferência ao meio -P. Por outro lado, em *p23* e *p37* a emissão de raízes laterais ocorreu predominantemente na raiz principal desenvolvida ainda no meio +P, enquanto em *p9* ao longo de toda extensão da raiz primária (Figuras 11 e 12).

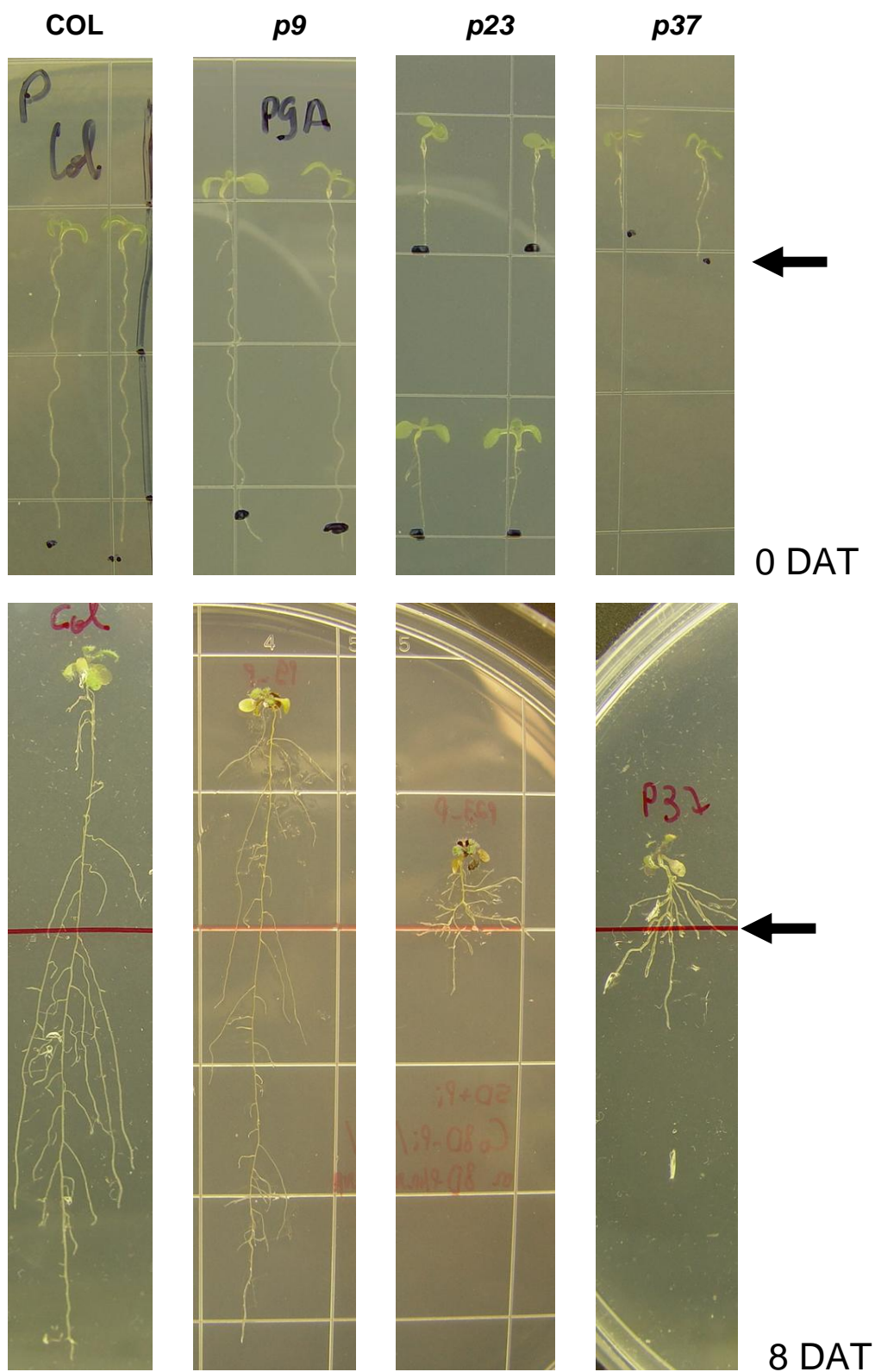


FIGURA 11. Desenvolvimento radical no ecótipo COL e mutantes *p9*, *p23* e *p37*, inicialmente crescidos em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM) durante cinco dias (0 DAT) e após transferidos para meio com ausência de fósforo (-P= 0,0 mM) durante oito dias (8 DAT). Pontos pretos ou linha vermelha indicam o local a partir do qual ocorreu crescimento radical continuado após a transferência, entre 0 DAT e 8 DAT.

Ainda se verificou comportamento distinto dos mutantes quando se analisa o NRL emitidas por unidade de CRP, ou seja, a densidade de raízes laterais. Estes dados, embora não diretamente apresentados, podem ser constatados nas Figuras 11 e 12 e pela análise dos resultados das Tabelas 13 e 14. Enquanto o crescimento da raiz primária e o NRL após a transferência foram maiores em *p9* relativamente à *p23* e *p37*, estes dois últimos desenvolveram maior número de raízes laterais por unidade de CRP comparativamente à *p9*. Isto demonstra que a atividade de divisão celular ou de alongamento celular, como possivelmente ocorre em *p9*, por unidade de CRP em *p23* e *p37*, são maiores do que as de *p9*, como também verificado por ocasião dos estudos de cinética de divisão celular para estes dois mutantes. Ainda como observado e descrito anteriormente, em *p23* e *p37* ocorre inclusive emissão de raízes terciárias e quaternárias. Comportamento similar também foi reportado para *pdr2* (DELATORRE *et al.*, 2004) em condições contrastantes de suprimento de P.

Em conjunto, estes dados dos estudos de transferência de plantas entre meios de cultura e avaliação do desenvolvimento radical e emissão de raízes secundárias, seguida de terciárias e ainda de quaternárias demonstram que esse processo é bastante complexo e ordenado. A emissão de raízes ocorre em momentos distintos, sendo que uma de grau superior somente é emitida quando a de grau anterior já começa apresentar redução na divisão celular meristemática, similar ao observado em *pdr2*. Com isso, pressupõe-se que a estratégia da planta seja de emissão de maior número de possível de raízes laterais, visando possivelmente, melhor exploração do ambiente do entorno e, desta forma obtenção do nutriente faltante. Para tornar essa

resposta ainda mais complexa, especula-se que haja também regulação através de hormônios, especialmente auxinas e citocininas, cujos efeitos foram explorados em estudos posteriores.

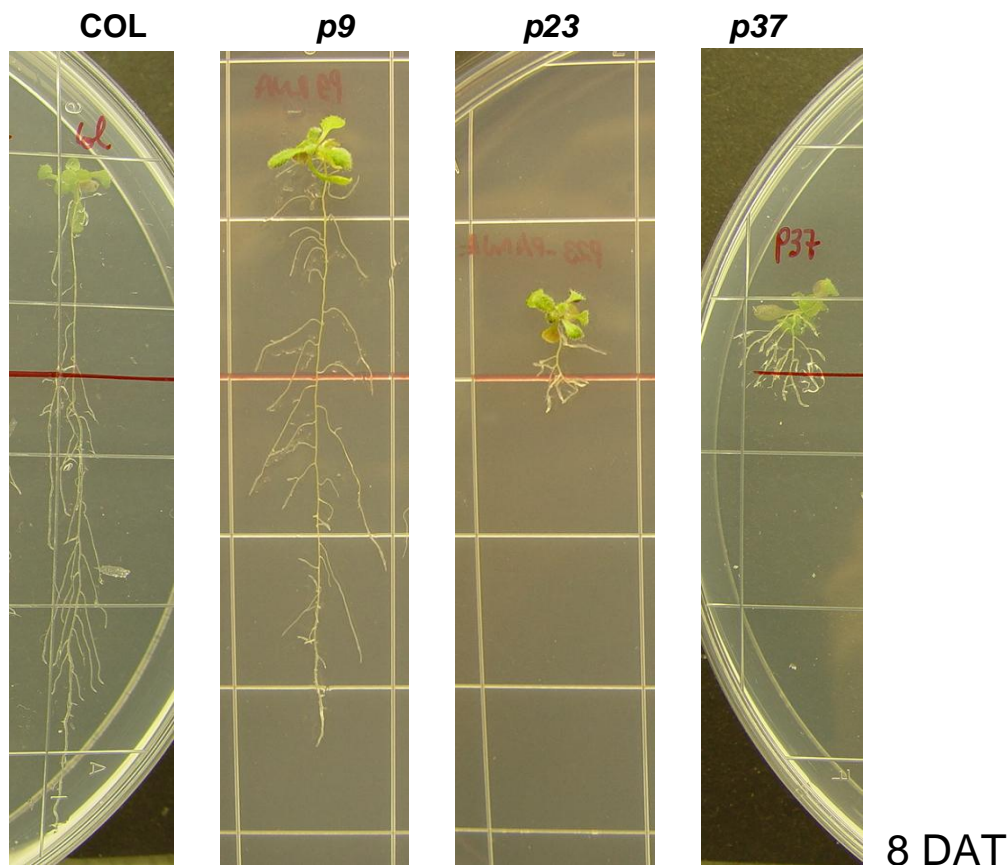


FIGURA 12. Desenvolvimento radical no ecótipo COL e mutantes *p9*, *p23* e *p37*, inicialmente crescidos por cinco dias em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM) e transferidos para meio com limitação de fósforo (-P/+RNA) por oito dias (8 DAT). Desenvolvimento radical logo após transferência (0 DAT) é o mesmo da Figura 11.

Ao adotar esta estratégia de ajuste do sistema radical, no mesmo tempo em que há emissão destas raízes de grau superior, as anteriores entram em colapso, perdendo sua função e razão de existirem. Devido a sua complexidade e necessidade de aporte de tecidos, esse processo demanda energia considerável, entretanto, sem chegar ao seu real objetivo que é o de aumentar superfície de exploração do meio e contato com nutrientes e, assim,

maior absorção nutricional. Ainda pode-se especular que a redução da divisão celular nas raízes de grau inferior seja o sinal indutor para emissão de outras de grau superior. Neste caso, o mecanismo é desencadeado por alteração nos níveis hormonais que podem resultar em quebra da dominância radical, desta forma, induzindo formação de raízes novas.

Outra constatação importante destes estudos é que a atividade de expressão de *QC25::GUS* em COL corroboram com os do comportamento deste genótipo em outros estudos apresentados. Entre estes, o crescimento de sua raiz primária em meio -P, com cerca de 2 cm, enquanto os mutantes crescem menos de 0,7 cm, além da existência de atividade meristemática no CQ mesmo 8 DAT para meio -P ou -P/+RNA. Assim, a experiência prévia em meio +P no ecótipo COL, possivelmente permite acúmulo/armazenamento de P nas células, o qual pode ser usado num eventual momento posterior de escassez deste nutriente, como foi o caso do período que estas plantas estiveram em ambiente com deficiência de P (-P e -P/+RNA). Por outro lado, em *p9*, *p23* e *p37*, este mecanismo de acúmulo de P para uso posterior parece ter sido afetado pela mutação. Isso é especialmente verdade em *p23* e *p37*, nos quais o crescimento continuado após a transferência aos meios deficientes em P foi muito pequeno, diferindo muito do padrão verificado em COL. Em *p9*, observou-se crescimento radical similar ao de COL, embora a atividade no CQ não tenha sido consistente com este, fato que pode relacionar-se ao maior alongamento celular, conforme observado por PINTO (2005) para este mutante.

Além destes aspectos, chama atenção o padrão de expressão de *QC25::GUS* de *p9*, diferindo do esperado e do obtido nas avaliações de

crescimento radical aos 4 e 7 DAT aos meios -P ou -P/+RNA. Como esse crescimento foi de cerca de 4 cm em ambas as situações de P aos 7 DAT, esperava-se que a atividade do CQ continuasse ativa, o que não ocorreu (Figura 9). Como especulado anteriormente, mesmo que não tenha sido verificada divisão celular no meristema radical e nem atividade no CQ deste mutante após transferência das plantas do meio com suficiência de P (+P) para os com deficiência de P (-P e -P/+RNA), ainda assim estes dados podem ser consistentes. Isso porque o crescimento radical se dá de duas formas, formação de novas células, portanto divisão celular, e ainda via alongamento das células recém originadas e ainda não diferenciadas, o qual pode ser afetado pelo hormônio brassinosteróide. Assim, mesmo que haja pouca atividade de divisão celular ou mesmo sua ausência, a raiz pode continuar crescendo por conta do alongamento das células mais jovens e não diferenciadas, desta forma suportando os dados obtidos para *p9*, a exemplo do que foi reportado por PINTO (2005).

4.4 Alterações na arquitetura radical pela presença de ferro sob contrastes de fósforo

Redução no comprimento da raiz primária e aumento no número de raízes laterais são respostas clássicas de plantas à deficiência nutricional por P. Este comportamento é verificado em COL e nos três mutantes em estudo, porém a intensidade da redução é mais intensa nos mutantes. Além do P, outros fatores (a)bióticos podem ser responsáveis por este fenótipo radical. SVISTOONOFF *et al.* (2007) e WARD *et al.* (2008) demonstraram que o Fe é um destes, sendo o desenvolvimento radical menor com o aumento da

disponibilidade deste elemento. O efeito negativo do Fe no sistema radical é agravado em ambiente deficiente em P. Ainda segundo os autores, nesta condição há redução na formação de quelatos entre Fe e P e, assim há aumento na disponibilidade de Fe, cujos níveis podem tornar-se tóxicos à planta e afetar o sistema radical.

Neste sentido, conduziram-se experimentos com o intuito de ajudar a elucidar o efeito da interação P x Fe no desenvolvimento radical de *arabidopsis*. Além disso, é importante caracterizar de que forma e em que situações o Fe é mais efetivo na inibição do desenvolvimento radical, especialmente nos estudos de caracterização dos mutantes.

Em termos de condições experimentais, deve-se ressaltar que o nível de Fe nos dois meios de cultura previamente descritos e caracterizados é de 50 μM , em ambos na forma de Fe-EDTA (Tabela 1). Além disso, nos estudos conduzidos para investigar a relação P x Fe, adotou-se o meio MP, por não possuir amônio como fonte de N em sua composição, o qual pode alterar o efeito de Fe na raiz, como será descrito e discutido. Com isso, a condição de N nestes estudos relacionados à P e Fe não foi mantida constante.

Num dos estudos conduzidos, adotaram-se quatro níveis de Fe (0, 10, 50 e 100 μM) e quatro genótipos de *arabidopsis*, COL e os três mutantes. O efeito de Fe foi ainda avaliado em duas condições de P, uma com e outra sem limitação, cada qual considerada estudo isolado. Em ambas as condições de P, verificou-se interação dupla de níveis de Fe e genótipos (Tabela 15). Independente do nível de Fe e da condição de P, COL apresentou maior CRP relativamente aos mutantes.

No experimento com suprimento de P (1,0 mM), *p9* teve CRP maior que *p37*, enquanto *p23* teve o menor desenvolvimento de raiz, exceto na ausência de Fe (controle), onde *p23* e *p37* não diferiram (Tabela 15). No ambiente +P, dentro do mesmo genótipo, COL e *p9* tiveram melhor desenvolvimento radical sob 50 μ M de Fe, enquanto o menor CRP de COL ocorreu sob ausência de Fe e, em *p9* em 0 e 100 μ M de Fe. Diferente de COL e *p9*, em *p23* e *p37* ocorreu redução no CRP à medida que incrementou o nível de Fe, entretanto sem que houvesse diferença entre 50 e 100 μ M.

TABELA 15. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação dupla de genótipos de *Arabidopsis thaliana* e níveis de ferro (Fe) em meio de cultura MP, com e sem suprimento de fósforo.

Níveis de Fe (μ M)	Genótipos			
	COL	<i>p9</i>	<i>p23</i>	<i>p37</i>
Comprimento da raiz primária (cm) em meio +P				
0	D 4,69 a*	C 2,68 b	A 2,13 c	A 2,02 c
10	B 6,04 a	B 4,70 b	B 1,35 d	B 1,67 c
50	A 6,41 a	A 5,34 b	C 0,74 d	C 1,22 c
100	C 5,69 a	C 2,78 b	C 0,78 d	C 1,11 c
Comprimento da raiz primária (cm) em meio -P				
0	A 6,56 a	A 6,38 b	A 1,33 d	B 1,58 c
10	A 5,96 a	A 5,61 b	A 1,24 d	A 1,82 c
50	B 1,55 a	B 0,71 b	B 0,35 c	C 0,45 c
100	C 1,08 a	C 0,26 b	B 0,21 b	D 0,20 b

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre genótipos e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre níveis de Fe, não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficientes de variação= +P=8,3 e -P= 7,0.

No estudo sob deficiência de P, o comportamento dos genótipos dentro do mesmo nível de Fe foi similar ao verificado em condição +P. O maior CRP ocorreu em COL, seguido de *p9*, enquanto *p23* apresentou o menor CRP, exceto sob 50 μM , onde não diferiu de *p37* e, em 100 μM , onde os três mutantes apresentaram raízes de comprimento similar (Tabela 15). Ainda para esta condição de P, havia sido estabelecida a hipótese de que sob níveis contrastantes de Fe, o desenvolvimento radical seria distinto do obtido em meio +P. Esta hipótese se confirmou em todos os genótipos avaliados. O maior desenvolvimento radical ocorreu sob 10 μM de Fe, embora o CRP de COL, *p9* e *p23* não tenha diferido entre 10 μM de Fe e a ausência de Fe. Além disso, independente do genótipo, o menor CRP ocorreu quando se adotou o maior nível de Fe, embora não haja diferença em *p23* entre 50 e 100 μM (Tabela 15).

Estudo similar foi conduzido em ambiente -P/+RNA, incluindo-se ainda *pdr1*, que possui CRP similar ao de *p9*, *p23* e *p37* em meio -P/+RNA. Neste experimento, as hipóteses elaboradas foram: (i) se *p9* é mutante de P dependente do nível de Fe, portanto mutante da interação P x Fe, este deve recuperar o fenótipo radical de COL apenas na condição 0 μM de Fe. Nos demais níveis de Fe, o CRP de *p9* deve ser menor que o de COL, e (ii) em *p23* e *p37*, por não serem mutantes da interação P x Fe, o CRP deve sempre ser mais curto que o de COL, independente da condição de P e de Fe. Vale salientar, que no meio de cultura -P/+RNA, o P é disponibilizado via RNA, já que parte do P constituinte do RNA pode ser liberado através da ação de enzimas sobre o RNA. Entretanto, como o processo de degradação do RNA é lento, não é esperada grande disponibilização de P desta fonte. Ou seja, não

é esperado que haja acúmulo de P no meio de cultura e, desta forma, não haveria efeito quelante do P do RNA na redução da disponibilidade de Fe.

Assim como verificado nos experimentos com e sem deficiência de P, sob -P/+RNA o desenvolvimento radical também variou em função da interação dupla de níveis de Fe e genótipos (Tabela 16). Independente do nível de Fe adotado, o ecótipo COL teve o melhor desenvolvimento radical relativamente aos mutantes. *p23*, *p37* e *pdr1* tiveram raízes primárias sempre mais curtas que *p9* sob zero, 10 e 25 μM de Fe-EDTA, enquanto sob 50 e 100 μM de Fe-EDTA não ocorreu diferença entre os mutantes (Tabela 16). No entanto, a redução no CRP entre a condição de ausência de Fe e a presença de 10 μM de Fe-EDTA foi muito maior em *p9* (73 %) relativamente aos demais mutantes (10 a 15 %) e COL. Estes dados sugerem que a sensibilidade de *p9* à interação P x Fe seja maior que a dos demais mutantes em ambientes com deficiência de P, porém ainda mais em condição onde o P é suprido através de ácidos nucleicos. Interessante notar que sem adição de Fe-EDTA não se observou o efeito negativo no CRP em *p9* pela presença de RNA no meio, pois seu CRP foi similar ao de COL (Tabela 16).

Por outro lado, na comparação entre níveis de Fe, em todos os genótipos o melhor desenvolvimento radical ocorreu na ausência de Fe, embora em *p23* e *p37* não tenha ocorrido diferença entre 0, 10, 25 e 50 μM de Fe e em *pdr1* entre 0, 10 e 25 μM (Tabela 16). Em todos os genótipos, o menor CRP ocorreu no maior nível de Fe (100 μM), embora não haja diferença entre os dois maiores níveis de Fe em *p9*, e entre todos os tratamentos com presença de Fe no meio de cultura em *p23*, *p37* e *pdr1*.

TABELA 16. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de interação dupla de genótipos de *Arabidopsis thaliana* e níveis de ferro (Fe) em meio de cultura MP com limitação de fósforo (-P/+RNA).

Níveis de Fe (μM)	Genótipos				
	COL	<i>p9</i>	<i>p23</i>	<i>p37</i>	<i>pdr1</i>
Comprimento da raiz primária (cm) em meio -P/+RNA					
0	A 6,80 a*	A 6,48 a	A 0,51 b	A 0,60 b	A 0,63 b
10	B 5,10 a	B 1,74 b	AB 0,44 c	AB 0,51 c	AB 0,56 c
25	C 3,97 a	C 0,73 b	AB 0,37 c	AB 0,49 bc	AB 0,46 c
50	D 3,36 a	D 0,37 b	AB 0,33 b	AB 0,48 b	B 0,39 b
100	E 3,16 a	D 0,20 b	B 0,29 b	B 0,35 b	B 0,35 b

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre genótipos e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre níveis de Fe, não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficiente de variação= 7,6.

4.5 Alterações na arquitetura radical decorrentes de níveis e de fontes de nitrogênio

A participação em diferentes processos vitais ao desenvolvimento adequado da planta faz do N um dos nutrientes que mais freqüentemente limitam a produção da maioria das culturas na agricultura mundial. Além do efeito *per se* de níveis e fontes de N (WALCH-LIU, 2006; WANG *et al.*, 2007, DELATORRE, 2009), este ainda pode interagir com outros nutrientes, entre eles com P e/ou Fe (CHEVALIER *et al.*, 2003; WARD *et al.*, 2008). A fonte de N no meio de cultura é outro fator que afeta significativamente a arquitetura e a resposta de crescimento do sistema radical de *arabidopsis*.

Segundo ROBINSON (2001) o desenvolvimento radical em zonas ricas em P é similar ao que ocorre quando N é abundante, ou seja, há estímulo para emissão de raízes laterais e aumento do influxo de P. Esta resposta

diferenciada em sítios com maior disponibilidade nutricional pode compensar a menor absorção do restante da raiz em contato com sítios de menor suprimento. Entretanto, segundo este autor e estudos de FORDE & CLARKSON (1999) nem sempre um sistema radical melhor desenvolvido é sinônimo de maior absorção nutricional, pois a estrutura radical mais extensa a ser formada implica em custo energético e, desta forma, pode comprometer outros processos vitais da planta.

Com base nestas considerações, embora o objeto principal dos estudos conduzidos tenha sido verificar e estabelecer respostas das plantas a P, também se considerou relevante investigar de que forma P e N podem afetar o comportamento radical dos mutantes. Este estudo se justifica ainda pelo fato de em alguns estudos ter-se adotado meios de cultura distintos, $\frac{1}{2}$ MS e MP, os quais como já reportado (Tabelas 5 e 6) resultam em respostas contrastantes para P, dependendo da condição de N adotada. Além disso, o manejo do suprimento de N foi capaz de resgatar o fenótipo de COL em dois mutantes em estudo na presença de P, justificando estudos mais aprofundados sobre a interação P x N (Tabela 11 e Figura 4).

Neste estudo, adotaram-se duas fontes de N (sulfato de amônio ou nitrato de potássio), 10 níveis de N, além de quatro genótipos (Tabela 17). A concentração de Fe-EDTA foi de 50 μ M e a de P foi a de suficiência (1,0 mM). Pelos dados obtidos, o CRP variou em função da interação tripla de fontes de N, níveis de N e genótipos (Tabela 17).

TABELA 17. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de interação tripla de genótipos de *Arabidopsis thaliana*, fontes e níveis de nitrogênio (N) em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM).

Fontes de N	Níveis de N (μM)	Genótipos			
		COL	p9	p23	p37
Comprimento da raiz primária (cm)					
Sulfato de amônio	0	E 1,74 a*	C 1,16 b	A 1,65 a	A 1,64 a
	25	D 2,12 a	E 0,57 c	C 0,64 c	C 0,97 b
	50	D 2,30 a	E 0,63 b	C 0,61 b	D 0,80 b
	100	C 3,34 a	DE 0,66 c	BC 0,81 c	BC 1,05 b
	250	C 3,37 a	DE 0,69 c	C 0,67 c	CD 0,94 b
	500	BC 3,46 a	DE 0,67 b	C 0,72 b	CD 0,83 b
	1000	AB 3,66 a	D 0,84 b	C 0,65 c	CD 0,84 b
	2500	AB 3,61 a	A 2,19 b	B 0,96 d	B 1,19 c
	5000	A 3,78 a	A 2,22 b	BC 0,87 c	CD 0,87 c
	10000	AB 3,66 a	B 1,51 b	BC 0,82 c	CD 0,92 c
Nitrato de potássio	0	G 1,74 a	F 1,16 b	A 1,65 a	A 1,64 a
	25	F 2,87 a	G 0,64 b	D 0,60 b	D 0,75 b
	50	E 3,59 a	F 1,00 bc	C 0,87 c	C 1,09 b
	100	D 4,58 a	E 1,73 b	C 1,00 c	AB 1,53 b
	250	C 4,97 a	D 2,21 b	C 0,86 d	AB 1,42 c
	500	B 5,24 a	C 3,04 b	C 0,93 d	AB 1,48 c
	1000	A 5,50 a	B 3,49 b	C 0,89 d	AB 1,47 c
	2500	BC 5,04 a	A 4,69 b	B 1,38 c	AB 1,54 c
5000	C 4,96 a	A 4,62 b	B 1,43 c	AB 1,50 c	
10000	B 5,22 a	A 4,79 b	B 1,37 c	B 1,38 c	

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre genótipos e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre níveis de N na mesma fonte de N, não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficiente de variação= 12,6.

Entre genótipos, em ambas as fontes de N e em todos os níveis testados deste nutriente, COL teve maior CRP, enquanto entre os mutantes o comportamento foi variado (Tabela 17 e Figura 13). Sob condições de sulfato de amônio, entre 25 e 1000 μM de N, o CRP de *p37* normalmente foi maior que o de *p9* e *p23*, enquanto em 2500, 5000 e 10000 μM o melhor desenvolvimento radical ocorreu em *p9* em relação à *p23* e *p37*. Por outro lado, é interessante notar que sob ausência de N, *p23* e *p37* tiveram CRP similar ao de COL, enquanto o de *p9* foi menor que destes, confirmando desta forma, resultados anteriormente apresentados nesta tese (Tabela 11).

Adotando sulfato de amônio, com o amônio sendo uma das fontes de N do meio $\frac{1}{2}$ MS, o ecótipo COL incrementou o desenvolvimento radical à medida que aumentaram os teores de N. Comportamento similar ocorreu em *p9*, embora não tenha sido verificada diferença de CRP entre 25 e 500 μM (Tabela 17). Por sua vez em *p23* e *p37* ocorreram poucas diferenças no desenvolvimento radical com incremento dos níveis de N. Nestes dois mutantes, chamou atenção o comportamento radical em meio -N, onde ocorreu o maior CRP.

Por outro lado, ao adotar nitrato de potássio como fonte de N, que é a fonte de N adotada no preparo do meio de cultura MP, o CRP entre mutantes apresentou comportamento distinto do obtido sob sulfato de amônio. Com exceção do nível de 25 μM de N, onde o CRP dos três mutantes foi similar, e em 50 25 μM de N onde *p23* teve o menor CRP e *p37* o maior CRP, embora ambos não tenham diferido de *p9*, em todos os demais níveis de N, *p9* teve raiz primária mais longa que *p23* e *p37*. Entre 50 e 1000 μM de N o CRP de

p37 foi maior que o de *p23*, enquanto em níveis superiores o CRP de ambos foi similar (Tabela 17).

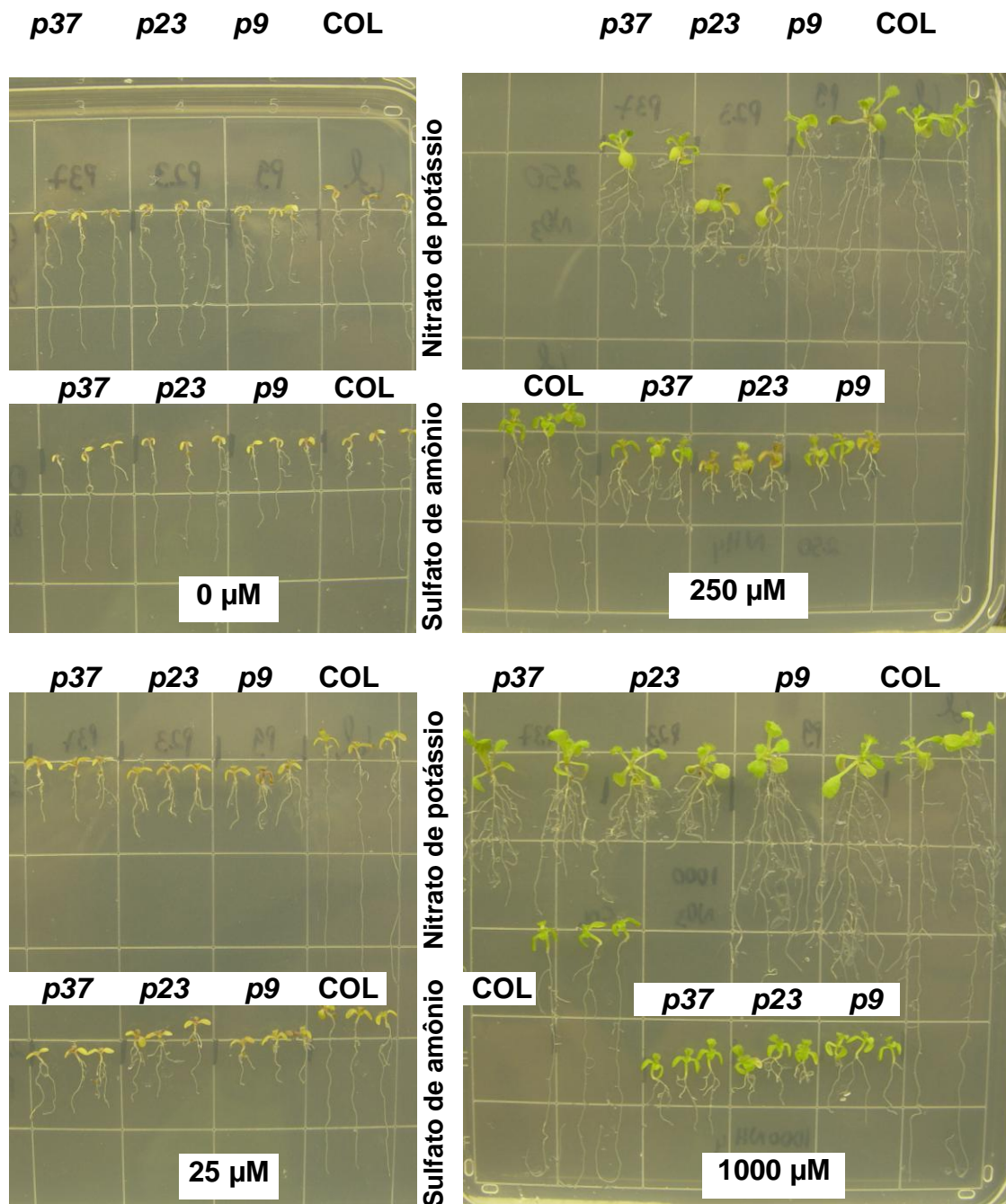


FIGURA 13. Desenvolvimento radical de quatro genótipos de *Arabidopsis thaliana* oito dias após germinação em meio de cultura MP com fontes (sulfato de amônio ou nitrato de potássio) e níveis de nitrogênio (0 μM , 25 μM , 250 μM e 1000 μM), sob condição de suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM).

Adotando nitrato de potássio como fonte de N, o CRP de COL incrementou entre zero e 1000 μM de N e reduziu em níveis superiores. Em *p9*, o comportamento foi similar ao verificado sob sulfato de amônio e, ao de COL, sendo o CRP maior à medida que o nível de N aumentou. Em *p23*, o menor CRP ocorreu sob 25 μM , não ocorrendo diferenças no desenvolvimento radical de 50 a 1000 μM , assim como entre 2500 a 10000 μM . Em *p37*, o menor CRP ocorreu sob 25 μM , seguido de 50 μM , não se verificando diferenças no desenvolvimento radical de 100 à 10000 μM (Tabela 17). Ainda em *p37*, o CRP foi similar nos níveis 0 μM de N e de 100 à 5000 μM .

Outra comparação em razão da interação obtida é a de fontes de N no mesmo genótipo e nível de N. O CRP foi similar em ambas as fontes de N no nível 25 μM nos três mutantes, em todos os níveis entre 100 e 1000 μM em *p23* e em 250 μM de N para *p37*. Em todas as demais comparações de fontes de N, constatou-se que o desenvolvimento radical dos genótipos em estudo foi beneficiado pela adoção de nitrato de potássio como fonte de N em relação ao sulfato de amônio (Tabela 18).

TABELA 18. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função de interação tripla de genótipos de *Arabidopsis thaliana*, fontes e níveis de nitrogênio (N) em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM).

Níveis de N (μM)	Fontes de N	Genótipos							
		COL	p9	p23	p37				
Comprimento da raiz primária (cm)									
25	NH ₄ SO ₄	2,12	b*	0,57	a	0,64	a	0,97	a
	KNO ₃	2,87	a	0,64	a	0,60	a	0,75	a
50	NH ₄ SO ₄	2,30	b	0,63	b	0,61	b	0,80	b
	KNO ₃	3,59	a	1,00	a	0,87	a	1,09	a
100	NH ₄ SO ₄	3,34	b	0,66	b	0,81	a	1,05	b
	KNO ₃	4,58	a	1,73	a	1,00	a	1,53	a
250	NH ₄ SO ₄	3,37	b	0,69	b	0,67	a	0,94	a
	KNO ₃	4,97	a	2,21	a	0,86	a	1,42	a
500	NH ₄ SO ₄	3,46	b	0,67	b	0,72	a	0,83	b
	KNO ₃	5,24	a	3,04	a	0,93	a	1,48	a
1000	NH ₄ SO ₄	3,66	b	0,84	b	0,65	a	0,84	b
	KNO ₃	5,50	a	3,49	a	0,89	a	1,47	a
2500	NH ₄ SO ₄	3,61	b	2,19	b	0,96	b	1,19	b
	KNO ₃	5,04	a	4,69	a	1,38	a	1,54	a
5000	NH ₄ SO ₄	3,78	b	2,22	b	0,87	b	0,87	b
	KNO ₃	4,96	a	4,62	a	1,43	a	1,50	a
10000	NH ₄ SO ₄	3,66	b	1,51	b	0,82	b	0,92	b
	KNO ₃	5,22	a	4,79	a	1,37	a	1,38	a

* Médias seguidas de mesma letra na coluna, comparação entre fontes de N no mesmo nível de N, não diferem pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficiente de variação= 12,6.

4.6 Alterações na arquitetura radical em função de interações nutricionais de fósforo, níveis de ferro e fontes de nitrogênio

Os resultados dos estudos apresentados anteriormente demonstram que os mutantes em estudo são responsivos a P, portanto são mutantes de P (Tabelas 8 e 9), como também reportado por PINTO (2005) e DELATORRE (2009). Além disso, há evidências de que além do efeito de P há interação com outros nutrientes, como por exemplo P x Fe em *p9* e ainda efeito de fonte de N (amônio), além da possível interação P x N em *p23* e *p37*. Considerando dados de CHEVALIER *et al.* (2003), SVISTOONOFF *et al.* (2007) e WARD *et al.* (2008) no ecótipo COL e os resultados previamente apresentados neste trabalho, há evidências que justificam a investigação dos efeitos destas interações no desenvolvimento radical dos mutantes *p9*, *p23* e *p37*. A identificação da interação nutricional ocorrente em cada mutante pode dar importante direcionamento sobre a função do gene mutado.

Nesta etapa, buscou-se avaliar efeito de níveis de Fe em condições contrastantes de P e em duas fontes de N. Para tal, inicialmente dois estudos foram conduzidos, um com e outro sem suplementação de P. Em cada condição de P foram testados níveis crescentes de Fe no meio de cultura (0, 10, 50 e 100 μ M na forma de Fe-EDTA) e duas fontes de N (nitrato de potássio - fonte do meio MP, e nitrato de amônio - fonte de N do meio $\frac{1}{2}$ MS). Desta forma, a quantidade total de N nos tratamentos deste experimento serão aquelas apresentadas na Tabela 1 (p. 27), ou seja, 9,0 mM quando a fonte de N foi o nitrato de potássio e 19,2 mM de nitrato + 9,1 mM de amônio quando se adotou o nitrato de amônio.

Estas duas concentrações de N são as mesmas da condição normal de Fe (50 μM) em ambos os meios de cultura (MP e $\frac{1}{2}$ MS) (Tabela 1), que configuram portanto, os dois tratamentos testemunhas em relação aos demais estudos conduzidos anteriormente relativamente aos níveis de Fe em condições contrastantes de P. Além disso, as concentrações dos demais nutrientes foram as mesmas do meio MP, sendo portanto, apenas a quantidade e fonte de N variáveis e os níveis de Fe.

Similar ao demonstrado por SVISTOONOFF *et al.* (2007) e WARD *et al.* (2008) no ecótipo COL, no presente estudo também ocorreu interação de Fe e P no desenvolvimento radical. Em ambas as situações de P, o CRP variou em função da interação tripla de genótipos, fontes de N e níveis de N (Tabelas 19 e 20). O desenvolvimento radical dos mutantes foi distinto daquele de COL. Independente da fonte de N e do nível de Fe, o maior CRP ocorreu em COL, seguido de *p9*, que em geral diferiu de *p23* e *p37*. Sob nitrato de amônio, *p23* e *p37* apresentaram CRP similar, exceto sob 10 μM de Fe-EDTA, onde a raiz primária de *p23* foi menor. Por outro lado, sob nitrato de potássio, o CRP de *p9* foi maior que o de *p37*, enquanto *p23* teve as raízes mais curtas entre os mutantes (Tabela 19).

Entre níveis de Fe, os três mutantes apresentaram redução no CRP à medida que aumentou o nível de Fe no ambiente com nitrato de amônio como fonte de N. Comportamento similar ocorreu em *p23* e *p37* sob nitrato de potássio, embora em ambas as fontes de N não haja diferença entre 50 e 100 μM de Fe-EDTA nestes mutantes. Em COL, sob nitrato de amônio, o melhor desenvolvimento radical ocorreu sob 10 μM de Fe-EDTA e o menor sob 100 μM de Fe-EDTA, sendo a diferença entre estes níveis de 68% no CRP. Por

outro lado, quando o N foi suprido via nitrato de potássio, em COL e *p9* o maior CRP ocorreu em 50 μM de Fe-EDTA, enquanto as raízes mais curtas ocorreram nas doses extremas, em zero e em zero e 100 μM de Fe-EDTA, respectivamente (Tabela 19).

TABELA 19. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação tripla de genótipos de *Arabidopsis thaliana*, fontes de nitrogênio (N)¹ e níveis de ferro (Fe) em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM).

Fontes de N ¹	Níveis de Fe (μM)	Genótipos			
		COL	<i>p9</i>	<i>p23</i>	<i>p37</i>
Comprimento da raiz primária (cm)					
NH₄NO₃	0	B 6,14 a*	A 4,99 b	A 0,84 c	A 1,09 c
	10	A 6,33 a	B 4,64 b	AB 0,65 d	AB 0,97 c
	50	C 5,17 a	C 0,90 b	B 0,48 c	B 0,76 bc
	100	D 2,04 a	D 0,28 c	B 0,41 bc	B 0,56 b
KNO₃	0	D 4,69 a	C 2,68 b	A 2,13 c	A 2,02 c
	10	B 6,04 a	B 4,70 b	B 1,35 d	B 1,67 c
	50	A 6,41 a	A 5,34 b	C 0,74 d	C 1,22 c
	100	C 5,69 a	C 2,78 b	C 0,78 d	C 1,11 c

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre genótipos e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre níveis de Fe na mesma fonte de N, não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$); ¹ Quantidades de N em cada fonte de N (NH₄NO₃= 9,1 + 19,2 mM; KNO₃= 9,0 mM) são as mesmas da Tabela 1 - Composição dos meios de cultura ½ MS e MP. Coeficiente de variação= 10,1.

É interessante observar a expressiva redução no desenvolvimento radical em *p9* entre 10 e 0 μM de Fe-EDTA (43%) e entre 50 e 100 μM de Fe-EDTA (48%) sob nitrato de potássio e entre 10 e 50 μM de Fe-EDTA (81%) sob nitrato de amônio, além de COL entre 50 e 100 μM de Fe-EDTA (61%)

sob nitrato de amônio. Ainda sob nitrato de potássio, *p23* e *p37* tiveram incremento progressivo no CRP com redução dos níveis de Fe, chegando a variar 81 e 173% o CRP entre os níveis extremos de Fe, respectivamente. Essas tendências entre o CRP dos níveis extremos de Fe não foram verificadas em COL e *p9*. Entretanto, se para *p9* considerar-se variação de CRP entre 10 e 100 μM de Fe-EDTA, verifica-se incremento de 70% nesta característica, enquanto na mesma condição de COL este é de apenas 6%.

Entre fontes de N no mesmo nível de Fe, com exceção de COL e *p9* sob 10 μM de Fe-EDTA, em todos os demais tratamentos com presença de Fe no meio, o uso do nitrato de potássio como fonte de N favoreceu o desenvolvimento radical dos genótipos relativamente à condição com nitrato de amônio (Tabela 20). Com ausência de Fe no meio, este comportamento foi verificado apenas em *p37*, enquanto os demais genótipos tiveram resposta inversa, pois o maior CRP ocorreu sob nitrato de amônio.

No estudo sem suprimento de P, entre genótipos, o comportamento foi similar ao verificado na condição +P, ou seja, COL teve o maior CRP, seguido de *p9*, enquanto o menor comprimento radical ocorreu em *p23* e *p37*. Com exceção de 100 μM de Fe-EDTA, onde os três mutantes tiveram o mesmo desenvolvimento radical, nos demais níveis de Fe, o CRP de *p9* foi maior que o de *p23* e *p37*, independente da fonte de N considerada (Tabela 21). Assim, a resposta do sistema radical destes dois mutantes aos tratamentos propostos foi similar, porém diferiu daquela de COL e *p9*. Em *p23* e *p37*, níveis de Fe inferiores ao padrão (50 μM), possibilitaram apenas pequeno incremento no CRP (cerca de 1,0 cm), independente da fonte de N adotada (Tabela 21).

TABELA 20. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação tripla de genótipos de *Arabidopsis thaliana*, níveis de ferro (Fe) e fontes de nitrogênio (N) em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM).

Níveis de Fe (μM)	Fontes de N ¹	Genótipos			
		COL	p9	p23	p37
Comprimento da raiz primária (cm)					
0	NH ₄ NO ₃	6,14 a*	4,99 a	0,84 a	1,09 b
	KNO ₃	4,69 b	2,68 b	2,13 b	2,02 a
10	NH ₄ NO ₃	6,33 a	4,64 a	0,65 b	0,97 b
	KNO ₃	6,04 a	4,70 b	1,35 a	1,67 a
50	NH ₄ NO ₃	5,17 b	0,90 b	0,48 b	0,76 b
	KNO ₃	6,41 a	5,34 a	0,74 a	1,22 a
100	NH ₄ NO ₃	2,04 b	0,28 b	0,41 b	0,56 b
	KNO ₃	5,69 a	2,78 a	0,78 a	1,11 a

* Médias seguidas de mesma letra na coluna, comparação de fontes de N no mesmo nível de Fe, não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). ¹ Quantidades de N em cada fonte de N (NH₄NO₃= 9,1 + 19,2 mM; KNO₃= 9,0 mM) são as mesmas apresentadas na Tabela 1 - Composição dos meios de cultura ½ MS e MP. Coeficiente de variação= 10,1.

Com isso, os dados sugerem que diferente de p9, que possui resposta expressiva ao manejo do Fe no meio de cultura, os mutantes p23 e p37 apesar de apresentarem incremento no CRP com aumento dos níveis de Fe na condição com nitrato de potássio como fonte de N, essa resposta é muito menos expressiva que a verificada em p9. Além disso, nos três mutantes, o nitrato de amônio intensificou o efeito negativo do Fe no desenvolvimento do sistema radical, pois o CRP sempre foi menor nessa condição em relação à de nitrato de potássio. Assim, evidencia-se que essa resposta à Fe também é dependente da fonte de N adotada.

TABELA 21. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação tripla de genótipos de *Arabidopsis thaliana*, fontes de nitrogênio (N) e níveis de ferro (Fe) em meio de cultura MP sem suprimento de fósforo (-P).

Fontes de N ¹	Níveis de Fe (µM)	Genótipos			
		COL	p9	p23	p37
Comprimento da raiz primária (cm)					
NH₄NO₃	0	A 4,21 a*	A 3,81 b	A 0,66 d	A 1,53 c
	10	B 2,52 a	B 1,36 b	A 0,55 c	B 0,53 c
	50	C 1,09 a	C 0,51 b	B 0,27 c	C 0,14 c
	100	D 0,81 a	D 0,13 b	B 0,12 b	C 0,18 b
KNO₃	0	A 6,56 a	A 6,38 b	A 1,33 d	B 1,58 c
	10	A 5,96 a	A 5,61 b	A 1,24 d	A 1,82 c
	50	B 1,55 a	B 0,71 b	B 0,35 c	C 0,45 c
	100	C 1,08 a	C 0,26 b	B 0,21 b	D 0,20 b

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre genótipos e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre níveis de Fe na mesma fonte de N, não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$); ¹ As quantidades de N em cada fonte de N (NH₄NO₃= 9,1 + 19,2 mM; KNO₃= 9,0 mM) são as mesmas apresentadas na Tabela 1 - Composição dos meios ½ MS e MP. Coeficiente de variação= 10,3.

Nesta condição sem suprimento de P, os maiores comprimentos de raiz primária ocorreram sob nitrato de potássio como fonte de N. Os incrementos no CRP com redução nos níveis de Fe foram próximos a 4x em COL, p23 e p37 e quase 9x em p9, reforçando dados de estudos anteriores, de que p9 é o mutante mais afetado pela disponibilidade de Fe no meio de cultura com deficiência de P. Estas inferências são melhor visualizados na Tabela 22, onde as fontes de N estão comparadas no mesmo nível de Fe. Com exceção de 0 µM de Fe-EDTA em p37, de 50 µM em p23 e 100 µM de Fe-EDTA nos três mutantes, em cujos tratamentos o CRP não diferiu entre as fontes, em

todas as demais situações o melhor desenvolvimento radical ocorreu sob nitrato de potássio relativamente à nitrato de amônio, independente do genótipo (Tabela 22).

TABELA 22. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação tripla de genótipos de *Arabidopsis thaliana*, níveis de ferro (Fe) e fontes de nitrogênio (N) em meio de cultura MP sem suprimento de fósforo (-P).

Níveis de Fe (μM)	Fontes de N ¹	Genótipos			
		COL	p9	p23	p37
Comprimento da raiz primária (cm)					
0	NH ₄ NO ₃	4,21 b*	3,81 b	0,66 b	1,53 a
	KNO ₃	6,56 a	6,38 a	1,33 a	1,58 a
10	NH ₄ NO ₃	2,52 b	1,36 b	0,55 b	0,53 b
	KNO ₃	5,96 a	5,61 a	1,24 a	1,82 a
50	NH ₄ NO ₃	1,09 b	0,51 b	0,27 a	0,14 b
	KNO ₃	1,55 a	0,71 a	0,35 a	0,45 a
100	NH ₄ NO ₃	0,81 b	0,13 a	0,12 a	0,18 a
	KNO ₃	1,08 a	0,26 a	0,21 a	0,20 a

* Médias seguidas de mesma letra na coluna, comparação entre fontes de N no mesmo nível de Fe, não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$); ¹ Quantidades de N em cada fonte de N (NH₄NO₃= 9,1 + 19,2 mM; KNO₃= 9,0 mM) são as mesmas apresentadas na Tabela 1 - Composição dos meios de cultura ½ MS e MP. Coeficiente de variação= 10,3.

O uso de nitrato de potássio como fonte de N fez com que a maior redução no CRP ocorresse de 10 para 50 μM de Fe-EDTA, enquanto sob nitrato de amônio essa redução foi gradual entre 0 e 100 μM de Fe-EDTA. Em geral, as raízes foram mais curtas no ambiente com nitrato de amônio relativamente ao com nitrato de potássio, independente do nível de Fe.

Também para avançar na identificação da causa do menor comprimento radical de *p23* e *p37*, além do já caracterizado efeito de P, levantou-se a hipótese de interação P x N, porém não dependente de Fe. Essa premissa se justifica pelos resultados obtidos nos estudos de dose resposta à N, especialmente sob ausência de N (Tabelas 17 e 18 e Figura 13), e ainda a tendência de ocorrer apenas resgate parcial do fenótipo radical de COL nestes dois mutantes sob níveis reduzidos de Fe.

Para averiguar este fato, sementes dos três mutantes em estudo, além de *pdr1*, foram dispostas em meio de cultura sem presença de N, sob quatro níveis de Fe (0, 10, 50 e 100 μM na forma de Fe-EDTA). Estas condições de N e Fe foram conduzidas em condição com e sem limitação de P. Adoção do mutante *pdr1* deu-se pelo fato de anteriormente ter sido caracterizado como mutante responsivo a interação P x N (DELATORRE, 2009), portanto, servindo como mais uma testemunha nestes estudos.

Embora conduzidos separadamente, os resultados de ambas as condições de P demonstram que o desenvolvimento radical variou em função da interação dupla de níveis de Fe e genótipos (Tabela 23). Com suficiência de P, COL apresentou CRP maior que os mutantes nos tratamentos com presença de Fe no meio de cultura, embora não tenha diferido de *p23* no maior nível de Fe. Na condição normal de Fe (50 μM) o CRP de *p23*, *p37* e *pdr1* foi superior ao de *p9*, porém ainda menor que o de COL. Sob 10 μM de Fe-EDTA, *p37* teve desenvolvimento radical favorecido em relação aos demais mutantes, porém ainda assim inferior ao de COL (Tabela 23). Na ausência de Fe e, conforme esperado e verificado em estudos anteriores, *p9*

teve melhor desenvolvimento radical relativamente aos demais genótipos, com *p23* e COL não diferindo entre si, assim como *p37* e *pdr1*.

TABELA 23. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação dupla de genótipos de *Arabidopsis thaliana* e níveis de ferro (Fe), em meio de cultura MP com ou sem suprimento de fósforo, na ausência de nitrogênio (+P-N e -P-N).

Níveis de Fe (μM)	Genótipos				
	COL	<i>p9</i>	<i>p23</i>	<i>p37</i>	<i>pdr1</i>
Comprimento da raiz primária (cm) em meio +P-N					
0	B 2,50b*	A 2,78 a	A 2,39 b	B 2,05 c	A 2,02 c
10	A 2,70 a	B 2,13 c	B 2,04 c	A 2,44 b	A 1,98 c
50	D 0,99 a	D 0,36 c	D 0,82 b	D 0,69 b	C 0,74 b
100	C 1,38 a	C 0,84 c	C 1,35 a	C 0,96 bc	B 1,10 b
Comprimento da raiz primária (cm) em meio -P-N					
0	A 1,10 b	A 1,28 a	A 0,96 b	A 0,97 b	A 1,04 b
10	B 0,82 a	B 0,72 a	B 0,73 a	A 0,84 a	B 0,70 a
50	C 0,65 a	C 0,39 b	B 0,58 a	B 0,56 a	B 0,57 a
100	D 0,36 a	D 0,25 a	C 0,32 a	B 0,25 a	C 0,29 a

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre genótipos e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre níveis de Fe no mesmo suprimento de P, não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficientes de variação +P= 9,2 e -P= 13,4.

Por outro lado, ao contrário do verificado sob +P, no ambiente com deficiência de P, o comportamento entre os mutantes foi mais estável. O CRP não variou entre os cinco genótipos nos tratamentos com presença de Fe, exceto *p9* que teve menor desenvolvimento radical na condição normal de Fe (50 μM). Na ausência de Fe e confirmando estudos anteriores, *p9* teve o maior CRP, enquanto os demais mutantes e COL não diferiram entre si.

No ambiente com suprimento de P, dentro do mesmo genótipo, níveis de Fe menores que os usualmente adotados (50 μ M, na forma de Fe-EDTA) no meio favoreceram o desenvolvimento radical de todos os genótipos, embora sob ausência de Fe, COL e *p37* demonstrem que níveis baixos de Fe (10 μ M) são melhores que a ausência completa deste nutriente. Por outro lado, na ausência de suprimento de P, em todos os genótipos, menores níveis de Fe afetaram positivamente o desenvolvimento radical (Tabela 23). Em todos os genótipos o maior CRP na condição -P ocorreu na ausência de Fe, enquanto o menor CRP ocorreu no maior nível de Fe, embora em *p37* não tenha ocorrido diferença entre os dois menores e os dois maiores níveis de suprimento de Fe.

Os resultados destes dois estudos, especialmente sob limitação de P, reforçam a hipótese do efeito de N em *p23* e *p37* e que este não é dependente de Fe. Além disso, estudo com suprimento de P via fosfato orgânico (-P/+RNA) e com ausência de N, demonstrou que *p23*, *p37* e *pdr1* possuem CRP menor que COL (Tabela 24). Estes resultados comprovam mais uma vez que estes três genótipos são mutantes de P, a exemplo do apresentado nas Tabelas 8 e 9, onde houve suprimento de N. Com isso, *p23* e *p37* podem ser classificados como mutantes da interação P x N.

Por conta dos resultados de *p23* e *p37* nos estudos de interação P x N, conduziram-se experimentos de transferência de plantas entre meios de cultura. Nestes estudos, o mutante *p9* não foi avaliado, uma vez que sua resposta radical não é variável com o suprimento de N. Foram adotadas condições nutricionais normais no início do desenvolvimento e após as plantas foram transferidas para condições limitantes em P e/ou N ou vice-

versa, adotando-se limitação nos primeiros dias de desenvolvimento e condições mais favoráveis num segundo momento. Com este experimento pretende-se identificar se a experiência prévia em meio de cultura sem suprimento de N é condição que afeta seu comportamento após transferência para condição com suprimento. Para tal, os genótipos foram inicialmente crescidos por cinco dias em cada um dos meios de cultura previstos, sendo posteriormente transferidos aos demais meios de cultura. Mais detalhes sobre estes estudos podem ser obtidos no item 3.8 do material e métodos (p.35).

TABELA 24. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em quatro genótipos de *Arabidopsis thaliana* em meio de cultura MP com limitação de fósforo (-P/+RNA) e ausência de nitrogênio (-N).

Genótipos	Comprimento raiz primária (cm)
COL	1,26 a*
p23	0,37 c
p37	0,44 c
pdr1	0,63 b

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). Coeficiente de variação= 10,9.

Como já verificado em outros estudos previamente conduzidos, na primeira fase de crescimento, o CRP variou em função da interação de genótipos de *arabidopsis* e características do meio de cultura (Tabela 25). Nos meios de cultura completo (+P+N), no de organofosfatos (-P/+RNA+N) e no sob deficiência de P (-P+N), portanto, todos com suprimento de N, o melhor desenvolvimento radical ocorreu em COL, não havendo diferenças entre *p23*, *p37* e *pdr1* (Tabela 25 e Figura 14).

TABELA 25. Comprimento da raiz primária cinco dias após germinação (no dia da transferência para os demais meios de cultura) em função de interação dupla de genótipos de *Arabidopsis thaliana* e combinações de suprimento de fósforo (P) e de nitrogênio (N) em meio de cultura MP.

Tratamentos	Genótipos			
	COL	<i>p23</i>	<i>p37</i>	<i>pdr1</i>
Comprimento da raiz primária (cm)				
+P+N	A 2,22 a*	B 0,83 b	B 0,92 b	B 0,76 b
-P/+RNA+N	C 1,69 a	C 0,43 b	C 0,38 b	C 0,43 b
-P+N	D 1,37 a	C 0,35 b	C 0,45 b	C 0,40 b
+P-N	B 1,96 a	A 1,85 a	A 1,86 a	A 1,32 b
-P-N	E 0,96 a	B 0,89 a	B 0,89 a	BC 0,63 b

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre genótipos e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre níveis de P e N, não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficiente de variação= 7,5.

Por outro lado, ao adotar meio deficiente em N e em ambos os ambientes de P (+P e -P), os genótipos COL, *p23* e *p37* tiveram CRP similar entre eles e maior que *pdr1*. Estes resultados confirmam os obtidos em estudos já descritos, onde em condição de ausência de N, houve resgate do fenótipo radical de COL nos mutantes *p23* e *p37*. Vale ressaltar que esta resposta não é verificada quando há N no meio de cultura, sendo portanto específica da condição -N, independente da condição de suprimento de P.

Por outro lado, o comportamento de COL entre os meios de cultura diferiu daquele dos mutantes. Em COL, o melhor desenvolvimento radical ocorreu no meio completo (+P+N), seguido de +P-N e após no meio com organofosfatos. Ainda em COL, os menores CRP ocorreram no meio limitante em P, seguido da condição com dupla deficiência. Entre os mutantes, o

desenvolvimento radical foi similar e favorecido pelo meio deficiente em N, porém com suprimento de P. Não se verificaram diferenças no CRP entre +P+N e -P-N, assim como -P/+RNA+N resultou em desenvolvimento radical similar ao de -P+N (Tabela 25 e Figura 14).

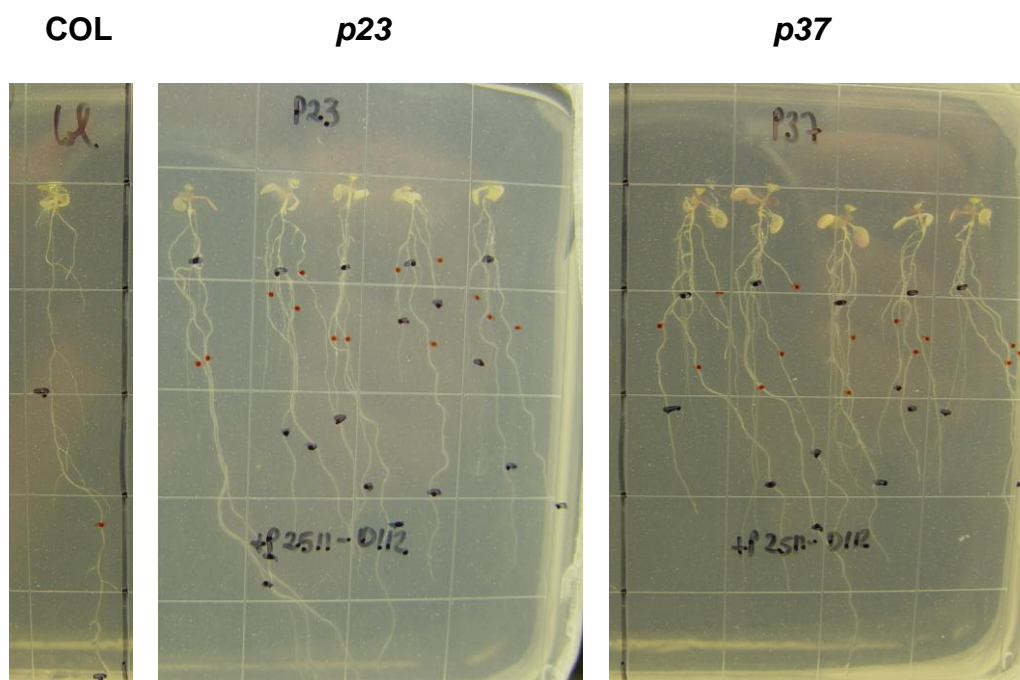


FIGURA 14. Desenvolvimento radical no ecótipo COL e mutantes *p23* e *p37*, inicialmente crescidos por cinco dias em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM) e após transferidos para meio com suficiência de fósforo mas sem nitrogênio (+P-N) durante sete dias.

Depois de mensurar o desenvolvimento radical ocorrido após crescerem cinco dias nestes meios de cultura e confirmar resultados obtidos em estudos anteriores, avaliou-se capacidade dos mutantes e de COL continuarem a crescer após transferência para meios contrastantes àqueles do desenvolvimento inicial.

Nas plantas que inicialmente estiveram em meio completo (+P+N), as características avaliadas variaram em função da interação dupla de genótipo e

condição nutricional do meio de cultura (Tabela 26). Em ambos os meios aos quais foram transferidos, COL teve o maior crescimento radical após a transferência, seguido de *pdr1*, os quais diferiram de *p23* e *p37*, que por sua vez tiveram o menor crescimento. Ainda nesta condição, o comprimento total de raízes secundárias de plantas transferidas ao meio +P-N foi maior em *p23*, seguido de *p37* e, posteriormente de *pdr1*, enquanto COL foi o genótipo menos responsivo (Tabela 26 e Figura 14). Nas plantas transferidas para meio com dupla deficiência (-P-N), o melhor crescimento de raízes secundárias ocorreu em *p37* e após *p23*, enquanto COL e *pdr1* os menos responsivos.

Neste mesmo estudo ainda avaliou-se o número de raízes laterais (NRL), que no meio +P-N foi maior em COL, seguido de *p23*, enquanto *p37* e *pdr1* tiveram a menor resposta. No ambiente com dupla deficiência, houve emissão de maior NRL em *p37* e *p23*, enquanto em COL a menor quantidade. Ainda merece destaque a diferença expressiva (na média, cerca de 2,5x) no comprimento médio das raízes laterais de *p23* e *p37* relativamente às de COL, independente do meio para o qual as plantas foram transferidas (Tabela 26 e Figura 14).

TABELA 26. Desenvolvimento radical sete dias após transferência para meio de cultura MP com os tratamentos listados em função de interação dupla de genótipos de *Arabidopsis thaliana* e suprimentos de fósforo (+P e -P) na ausência de nitrogênio (-N), em plantas oriundas de meio de cultura MP com suficiência de fósforo e de nitrogênio (+P+N).

Tratamentos	Genótipos			
	COL	<i>p23</i>	<i>p37</i>	<i>pdr1</i>
Crescimento da raiz primária após a transferência (cm)				
+P-N	A 3,52 a*	A 0,97 c	A 1,13 c	A 1,34 b
-P-N	B 1,46 a	B 0,54 bc	B 0,42 c	B 0,70 b
Comprimento total de raízes secundárias (cm)				
+P-N	A 8,54 d	A 23,11 a	A 13,58 b	A 9,96 c
-P-N	B 1,67 c	B 7,22 b	B 8,45 a	B 0,90 d
Raízes laterais (nº)				
+P-N	A 11,58 a	A 8,58 b	B 4,60 d	A 4,91 c
-P-N	B 3,91 d	B 5,20 b	A 5,60 a	B 4,41 c
Comprimento médio de raízes secundárias (cm)				
+P-N	A 0,77 d	A 2,75 b	A 2,99 a	A 2,08 c
-P-N	B 0,56 c	B 1,37 b	B 1,49 a	B 0,59 c

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre genótipos e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre tratamentos de P na mesma característica radical, não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficientes de variação= 11,6, 12,4, 8,7 e 9,6, respectivamente, para as características avaliadas.

Outro resultado relevante nas características avaliadas, é que em geral a transferência de plantas ao meio com deficiência de nitrogênio (+P-N) foi mais benéfica, em termos de crescimento da raiz primária, em relação aquela com dupla deficiência (-P-N). Além disso, com exceção do número de raízes laterais em *p37*, em todos os demais genótipos e em características avaliadas, a deficiência de N desencadeou maior acúmulo de fotoassimilados e gasto

energético para a raiz primária, desde que nessa condição (-N) ocorresse suprimento de P no meio de cultura. Com isso, em condição de dupla deficiência, o desenvolvimento radical ficou muito prejudicado, possivelmente inviabilizando uma resposta da planta para tentar buscar estes nutrientes no meio de cultura. Contudo, quando do suprimento de P, a raiz continuou a desenvolver e houve uma reestruturação radical parcial, uma evidência de que a planta desenvolveu mais o sistema radical para explorar sítios do meio de cultura que, eventualmente, poderiam apresentar o nutriente em limitação, neste caso, o N.

Diferente do verificado nas plantas oriundas de meio completo, plantas provenientes de ambiente +P-N tiveram crescimento continuado da raiz primária variável em função de efeitos simples de genótipo ou de meio de cultura ao qual foram transferidas (Tabela 27). Assim, os três mutantes tiveram crescimento de cerca de 1 cm entre si, enquanto em COL este foi superior a 3 cm, na média dos três meios de transferência das plantas.

TABELA 27. Crescimento continuado da raiz primária em quatro genótipos de *Arabidopsis thaliana* aos sete dias após transferência entre meios de cultura MP, em plantas oriundas de meio de cultura com suficiência de fósforo e ausência de nitrogênio (+P-N), na média de três tratamentos de P (+P+N, -P/+RNA+N e -P+N).

Genótipos	Crescimento continuado da raiz primária (cm)
COL	3,35 a*
p23	1,05 b
p37	0,93 b
pdr1	1,09 b

* Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). Coeficiente de variação= 7,8.

Na média dos quatro genótipos, o crescimento continuado da raiz primária foi favorecido pelo meio completo relativamente aos dois com limitação de P (-P/+RNA+N e -P+N) (Tabela 28). Comportamento similar também ocorreu nas plantas que inicialmente estiveram em ambiente com suplementação nutricional adequada (+P+N) e, posteriormente transferidas para meio +P-N (Tabela 28). Estes dados sugerem que a ausência de N em alguma destas duas fases de desenvolvimento radical (antes ou após transferência) é condição importante para obter crescimento radical satisfatório mesmo após transferência para ambiente com N, independente do genótipo.

TABELA 28. Crescimento continuado da raiz primária sete dias após transferência entre meios de cultura MP com três tratamentos de fósforo (P), em plantas oriundas de meio com suficiência de P e deficiência de nitrogênio (+P-N), na média de quatro genótipos de *Arabidopsis thaliana*.

Tratamentos	Crescimento continuado da raiz primária (cm)
+P+N	2,41 a*
-P+RNA+N	1,16 b
-P+N	1,03 b

* Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$). Coeficiente de variação= 8,4.

As demais características avaliadas nas plantas oriundas de meio +P-N variaram em função da interação dupla de genótipo e característica do meio ao qual foram transferidas (Tabela 29). Plantas de COL, *p23* e *p37* transferidas para meio completo tiveram comprimento total de raízes laterais similares, enquanto *pdr1* foi o menos responsivo. A transferência ao meio -P/+RNA+N favoreceu apenas COL, enquanto os três mutantes tiveram raízes

laterais mais curtas. No meio -P+N, não houve diferença no comprimento de raízes laterais para nenhum dos quatro genótipos. Ainda para esta característica, observou-se que a presença de P no meio ao qual as plantas foram transferidas resultou em raízes laterais mais longas relativamente aos dois meios nos quais o P esteve ausente ou suprido na forma de organofosfatos (Tabela 29).

Em termos de emissão de raízes laterais não houve diferença entre os genótipos transferidos do meio +P-N ao meio completo. No meio -P/+RNA+N COL e *p23* foram favorecidos em termos de emissão de raízes laterais, embora *p23* também apresente NRL similar ao dos outros dois mutantes. Por outro lado, sob -P+N apenas *p37* teve aumento no NRL, sem resposta nos demais genótipos. Ainda nessa característica, observou-se que apenas plantas de COL transferidas para meio -P+N e *p37* para meio com organofosfatos tiveram efeito negativo na emissão de raízes laterais, enquanto em todas as demais situações o NRL foi similar entre os meios para os quais as plantas foram transferidas (Tabela 29).

TABELA 29. Desenvolvimento radical sete dias após transferência para tratamentos listados em função de interação dupla de genótipos de *Arabidopsis thaliana* e combinações de suprimento de fósforo (P), em plantas oriundas de meio de cultura MP com suficiência de P e deficiente em nitrogênio (+P-N).

Tratamentos	Genótipos			
	COL	<i>p23</i>	<i>p37</i>	<i>pdr1</i>
Comprimento total de raízes secundárias (cm)				
+P+N	A 9,88 a*	A 9,69 a	A 9,32 a	A 8,00 b
-P/+RNA+N	A 8,86 a	B 2,45 b	B 1,78 b	B 1,84 b
-P+N	B 1,98 a	B 1,95 a	B 2,79 a	B 1,39 a
Raízes laterais (nº)				
+P+N	A 9,66 a	A 9,40 a	A 9,80 a	A 8,16 a
-P/+RNA+N	A 10,41 a	A 8,00 ab	B 6,40 b	A 7,16 b
-P+N	B 6,16 b	A 7,60 b	A 10,00 a	A 7,41 b
Comprimento médio de raízes secundárias (cm)				
+P+N	A 1,05 a	A 1,03 a	A 0,95 a	A 1,01 a
-P/+RNA+N	B 0,88 a	B 0,31 b	B 0,29 b	B 0,26 b
-P+N	C 0,34 a	B 0,25 ab	B 0,28 ab	B 0,19 b

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre genótipos e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre tratamentos de P na mesma característica radical, não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficientes de variação= 9,4, 10,1 e 9,7, respectivamente, para as características avaliadas.

Plantas de *p23* e *p37* oriundas de meio com suplementação de P, porém com ausência de N (+P-N), apresentaram melhor desenvolvimento radical quando transferidas para meio completo (+P+N) relativamente ao meio com N, porém sem P ou suprimento deste via ácidos nucléicos (-P/+RNA+N ou -P+N) (Tabela 29 e Figuras 15 e 16). Entretanto, ao contrário do verificado

anteriormente, nesta situação a experiência prévia em ambiente -N não foi suficiente para que o crescimento da raiz primária após a transferência fosse similar ao de COL, já que nos mutantes este foi de apenas 1/3 do ocorrido em COL (Tabela 27). Interessante notar que este crescimento ocorreu principalmente nos três primeiros dias após transferência (Figuras 15, 16 e 17), evidenciando que a planta consegue perceber rapidamente a presença do N no meio, bem como ausência de P, cujas deficiências determinam mudanças na estratégia de desenvolvimento radical dos mutantes relativamente à COL.

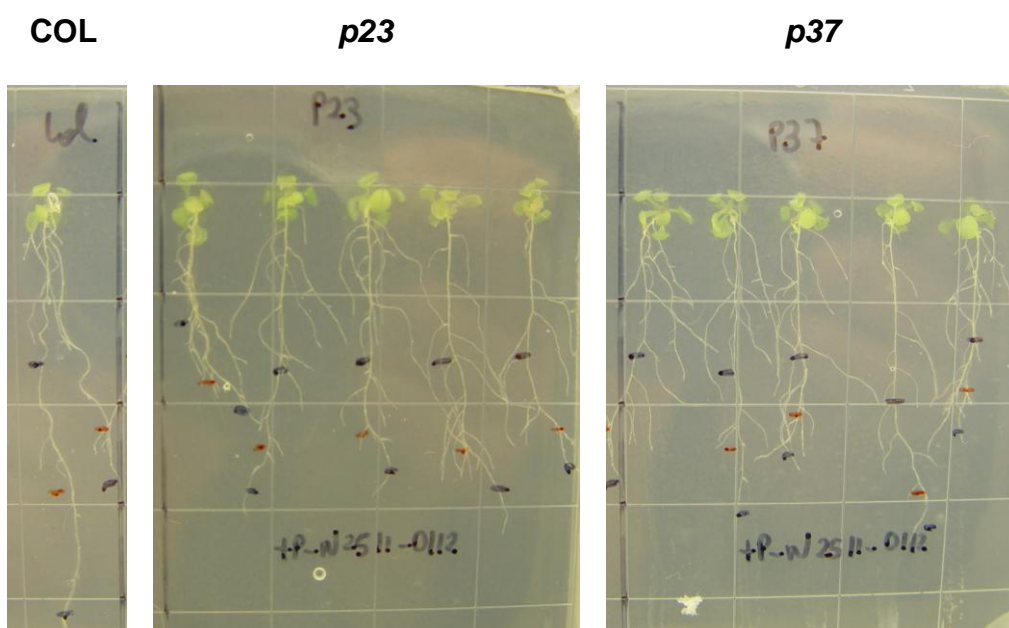


FIGURA 15. Desenvolvimento radical no ecótipo COL e mutantes *p23* e *p37*, inicialmente crescidos por cinco dias em meio de cultura MP com suficiência de fósforo e ausência de N(+P-N) e após transferidos para meio completo (+P+N) durante sete dias.

Outra análise realizada neste estudo foi a estimativa do comprimento médio das raízes laterais. A transferência para meio completo não afetou essa característica em nenhum dos genótipos. Porém, a transferência dos mutantes

ao meio com organofosfatos (RNA) ou com ausência de P reduziu o comprimento médio de raízes laterais relativamente à COL, embora no meio -P+N não haja diferença entre COL, *p23* e *p37*. Assim como verificado no comprimento total das raízes laterais, a transferência dos quatro genótipos do meio +P-N ao meio completo incrementou o comprimento médio de raízes laterais em relação aos meios com limitação de P (Tabela 29).

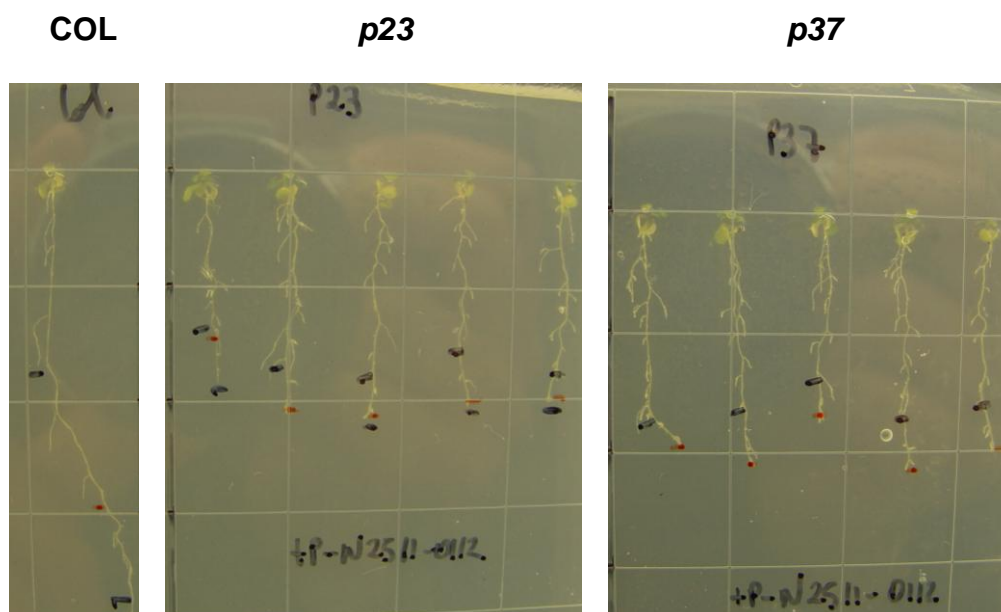


FIGURA 16. Desenvolvimento radical no ecótipo COL e mutantes *p23* e *p37*, inicialmente crescidos por cinco dias em meio de cultura MP com suficiência de fósforo e ausência de nitrogênio (+P-N) e após transferidos para meio de cultura com ausência de fósforo (-P+N) durante sete dias.

Comportamento similar ao dos mutantes e em COL transferidos para ambiente -P/+N ocorreu quando as plantas foram transferidas para meio -P/+RNA+N. Entretanto, nesta situação e, especialmente em COL, verificaram-se maiores número e comprimento de raízes laterais (Figura 17) em relação ao obtido nas plantas transferidas para meio -P+N (Figura 16).

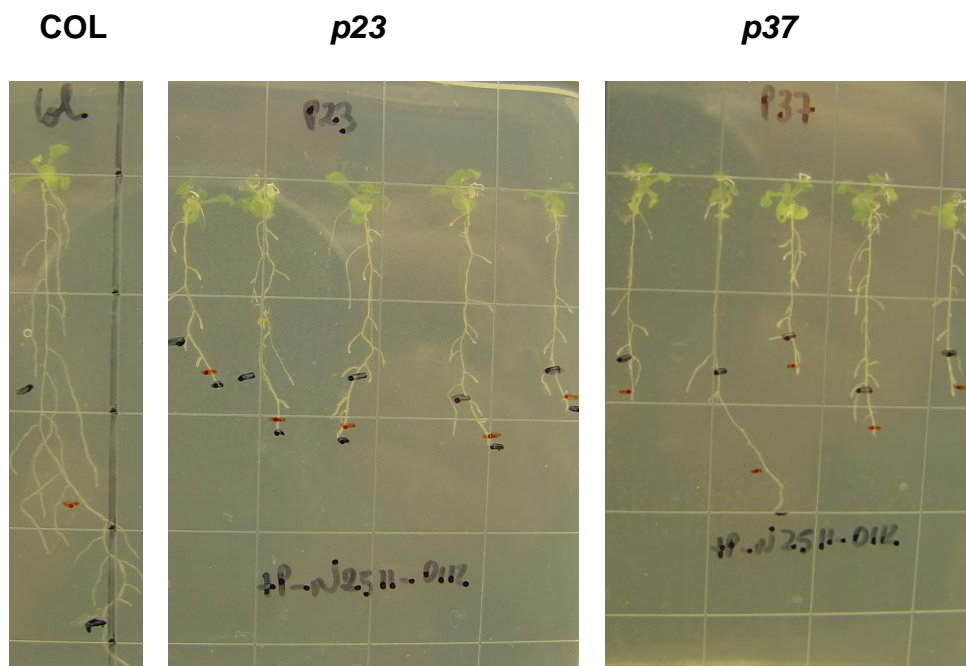


FIGURA 17. Desenvolvimento radical no ecótipo COL e mutantes *p23* e *p37*, inicialmente crescidos por cinco dias em meio de cultura MP com suficiência de fósforo e ausência de nitrogênio (+P-N) e após transferidos para meio com limitação de fósforo (-P/+RNA+N) durante sete dias.

4.7 Desenvolvimento radical sob contrastes de fósforo e nitrogênio na presença de reguladores de crescimento vegetais

Hormônios são compostos produzidos pelas próprias plantas que exercem papel importante em diferentes processos envolvidos no crescimento e desenvolvimento das plantas. Diferentes grupos de pesquisa encontraram relação entre alterações na regulação hormonal e o desenvolvimento radical de *arabidopsis* em ambiente sem suprimento de P. Os ajustes na arquitetura radical em condição deficiente em P, além das interações anteriormente descritas, podem ainda relacionar-se a interação P x citocininas ou auxinas, embora também haja relatos da influência de giberelinas e etileno, estes dois últimos especialmente atuantes na atividade meristemática.

Neste sentido, os três mutantes foram submetidos a experimentos relacionados à interação P x níveis hormonais. Como já descrito, o suprimento de auxinas ocorreu via 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) e o de citocininas via benzil amino purina (BAP).

Nos estudos conduzidos para o hormônio auxina, em ambas as condições de P (+P e -P), o desenvolvimento radical variou em função da interação dupla de genótipos e níveis de auxinas (Tabela 30). No controle, sem adição do hormônio e nos três menores níveis de auxinas o desenvolvimento radical de COL foi maior que o verificado nos três mutantes, independente da condição de P. Nestas mesmas condições, o CRP de *p9* foi superior ao de *p23* e *p37*, exceto no controle da condição -P, onde não houve diferença entre genótipos. Ainda assim, em ambas as condições de P, nos três menores níveis de auxinas e nos controles, *p23* e *p37* apresentaram desenvolvimento radical similar (Tabela 30).

Sob condição de suficiência de P, a resposta dos mutantes ao incremento nos níveis de auxinas, especialmente *p23* e *p37*, diferiu da obtida em COL. Em *p23*, o CRP foi similar entre o controle e os quatro menores níveis de auxinas e, em *p37* entre o controle e os três menores níveis hormonais (Tabela 30). Por outro lado, em COL e *p9*, houve a formação de três classes de CRP, com o maior desenvolvimento radical ocorrendo sob ausência de auxinas e o menor nos dois níveis mais altos de auxinas, além de classe intermediária a estas duas. Em termos relativos, do controle ao maior nível de auxinas, COL e *p9* tiveram redução de mais de 40x no desenvolvimento radical, enquanto em *p23* e *p37* foi de cerca de 13x.

TABELA 30. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação dupla de genótipos de *Arabidopsis thaliana* e níveis do hormônio auxina, em meio de cultura MP sob dois suprimentos de fósforo (+P e -P).

Níveis de auxinas (M)	Genótipos			
	COL	p9	p23	p37
Comprimento da raiz primária (cm) em meio +P				
Controle	A 4,52 a*	A 3,77 b	A 0,78 c	A 1,07 c
10 ⁻¹⁰	B 4,09 a	A 2,88 b	A 0,58 c	A 0,97 c
10 ⁻⁹	B 3,90 a	B 1,90 b	AB 0,46 c	AB 0,77 c
10 ⁻⁸	B 4,03 a	B 2,21 b	A 0,70 d	A 1,30 c
10 ⁻⁷	C 0,41 a	C 0,28 a	AB 0,25 a	B 0,28 a
10 ⁻⁶	C 0,11 a	C 0,08 a	B 0,06 a	B 0,07 a
Comprimento da raiz primária (cm) em meio -P				
Controle	B 2,25 a	C 0,74 b	A 0,50 b	A 0,59 b
10 ⁻¹⁰	A 3,60 a	B 2,34 b	A 0,52 c	A 0,63 c
10 ⁻⁹	A 3,64 a	A 2,79 b	A 0,53 c	A 0,63 c
10 ⁻⁸	B 2,27 a	C 1,13 b	A 0,49 c	AB 0,56 c
10 ⁻⁷	C 0,23 a	D 0,29 a	A 0,27 a	B 0,25 a
10 ⁻⁶	C 0,14 a	D 0,21 a	A 0,21 a	B 0,17 a

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre genótipos e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre níveis de auxinas no mesmo tratamento de P (+P ou -P), não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficientes de variação: +P= 10,6 e -P= 9,5.

Analisando-se o efeito de auxinas no ambiente sem suprimento de P, p23 e p37 tiveram comportamento similar ao da condição +P. Assim, em p23 o CRP não diferiu entre níveis de auxinas e em p37 os três maiores níveis causaram efeito negativo na raiz em relação aos demais teores deste hormônio. Estes dados demonstram que p23 e p37 são mutantes menos

sensíveis e menos responsivos a presença de auxinas no meio de cultura, independente da condição de suprimento de P. Os dados evidenciam ainda que em *p23* e *p37* não há resgate do fenótipo de COL, independente do nível de auxinas e do suprimento de P.

Por outro lado, em condição de ausência de P (-P), *p9* e COL tiveram maior CRP sob 10^{-9} M de auxinas, e maior redução no desenvolvimento radical sob níveis hormonais superiores a este (Tabela 30). Ainda nesta condição -P é interessante notar a resposta distinta de COL e *p9* em relação a *p23* e *p37*. Entre o tratamento controle (sem auxinas) e o com 10^{-10} M, COL e, especialmente *p9* apresentam incremento expressivo no CRP, enquanto os demais mutantes apresentam desenvolvimento radical constante em todos os níveis de auxinas. A resposta verificada em *p9* sugere que o menor desenvolvimento radical sob ausência de P é devido, mesmo que apenas parcialmente, a defeitos na síntese de auxinas, uma vez que sob níveis baixos de auxinas no meio (10^{-10} e 10^{-9} M) o CRP de *p9* foi de 65 e 77% daquele de COL nestas condições e similar aos valores de COL no controle. Este melhor desenvolvimento radical em *p9* com adição de auxinas em meio com deficiência de P permitiu resgatar parcialmente o fenótipo de COL em *p9*, sugerindo que a mutação em *p9* também pode relacionar-se a auxinas.

Em outro estudo, fez-se avaliação dos efeitos de níveis crescentes de citocininas em duas condições de P. Nestes dois experimentos, a exemplo do verificado com auxinas, ocorreu interação dupla de genótipos e níveis de citocininas (Tabela 31). Em ambas as condições de P, nos três menores níveis de citocininas e no controle sem citocininas, o CRP dos três mutantes foi menor que o de COL. Nestes mesmos níveis de citocininas, de modo geral,

o CRP de COL foi maior que o de *p23* e *p37*, os quais não diferiram entre si. Além disso, seguindo padrão dos estudos com auxinas, nos dois maiores níveis de citocininas e em ambas as condições de P, o desenvolvimento radical não diferiu entre genótipos. Entretanto, diferente dos estudos com auxinas, o efeito dos níveis de citocininas no CRP de COL foi menos expressivo, pois na variação de um nível para outro o efeito na raiz foi menor.

Na condição +P, o desenvolvimento radical de COL e *p9* reduziu à medida que os níveis de citocininas aumentaram. Em *p23*, apenas houve diferença entre níveis extremos de citocininas, enquanto os demais resultaram em CRP similar. Em *p37*, os dois menores níveis de citocininas permitiram o maior CRP, enquanto os dois maiores níveis resultaram no menor desenvolvimento radical (Tabela 31).

Por outro lado, no ambiente com deficiência de P, a presença de teores baixos de citocininas permitiu melhor desenvolvimento radical em *p9* e COL em relação ao controle, enquanto o menor CRP ocorreu no nível mais alto de citocininas. Em *p23*, o CRP foi estável em cinco dos seis níveis adotados, sendo verificada diferença apenas entre o maior e os demais níveis de citocininas (Tabela 31), sugerindo menor sensibilidade deste mutante a este hormônio. Por sua vez, *p37* teve maior CRP em 10^{-8} M, enquanto nos demais níveis de citocininas não ocorreu diferença, exceto no maior nível, onde o desenvolvimento radical foi o mais prejudicado.

TABELA 31. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação dupla de genótipos de *Arabidopsis thaliana* e níveis do hormônio citocinina, em meio de cultura MP sob dois suprimentos de fósforo (+P e -P).

Níveis de citocininas (M)	Genótipos			
	COL	<i>p9</i>	<i>p23</i>	<i>p37</i>
Comprimento da raiz primária (cm) em meio +P				
Controle	A 4,52 a*	A 3,77 b	A 0,78 c	A 1,07 c
10⁻⁸	B 3,77 a	B 2,56 b	AB 0,55 c	A 0,81 c
10⁻⁷	C 1,35 a	C 0,94 b	AB 0,45 c	B 0,55 c
10⁻⁶	D 0,69 a	D 0,39 ab	B 0,30 b	B 0,58 ab
10⁻⁵	E 0,38 a	D 0,21 a	AB 0,36 a	C 0,21 a
10⁻⁴	E 0,17 a	D 0,13 a	B 0,08 a	C 0,12 a
Comprimento da raiz primária (cm) em meio -P				
Controle	B 2,25 a	B 0,74 b	A 0,50 b	AB 0,59 b
10⁻⁸	A 2,63 a	A 1,14 b	A 0,33 d	A 0,74 c
10⁻⁷	C 1,42 a	B 0,57 b	A 0,30 c	B 0,48 bc
10⁻⁶	D 0,59 a	C 0,38 b	A 0,37 b	B 0,43 ab
10⁻⁵	D 0,41 a	CD 0,25 a	A 0,42 a	B 0,42 a
10⁻⁴	E 0,09 a	D 0,08 a	B 0,05 a	C 0,05 a

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre genótipos e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre níveis de citocininas no mesmo tratamento de P (+P ou -P), não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficientes de variação: +P= 11,8 e -P= 10,5.

Os dados dos quatro estudos acima, dois sob níveis crescentes de auxinas e dois de citocininas, demonstram que há diferenças entre COL e os mutantes *p23* e *p37* e que há comportamento semelhante entre COL e *p9*. Entretanto, as diferenças verificadas ainda não são suficientes para

estabelecer relação entre o efeito destes hormônios e a mutação a P, apesar de haver tendência do efeito de auxinas em *p9*, já que há apenas resgate parcial de fenótipo.

Por outro lado, anteriormente demonstrou-se que *p23* e *p37* apresentam efeito da interação P x N, justificando que essa interação também seja explorada em condições contrastantes de citocininas, já que existe relação entre P e citocininas. Além disso, outros grupos de pesquisa estudando a deficiência por P, também reportaram relação entre citocininas e deficiências nutricionais, como as causadas por N e P (LOPEZ-BÚCIO *et al.*, 2002; FRANCO-ZORRILLA *et al.*, 2002; 2005; SAKAKIBARA, 2003). Neste sentido, a interação P x N verificada em *p23* e *p37*, pode ainda ser causada parcialmente por defeitos na rota de síntese de citocininas. Com isso, conduziram-se outros quatro estudos com o hormônio citocinina, adotando-se níveis crescentes em ambiente com presença de P ou onde P é suprido via organofosfatos, além de duas condições de N, com e sem deficiência. Assim, os seis níveis de citocininas foram aplicados nos meios de cultura +P+N, +P-N, -P/+RNA+N e -P/+RNA-N.

Em todos estes estudos de relação P x N x citocininas, o desenvolvimento radical variou em função da interação dupla de genótipos e níveis de citocininas (Tabela 32). Na condição +P+N, no controle e nos dois menores níveis de citocininas o desenvolvimento radical de COL foi melhor que o verificado nos mutantes, ao passo que entre os mutantes *p9* foi o que teve maior CRP, sem haver diferença entre *p23* e *p37*. Nos três maiores níveis de citocininas, o CRP dos mutantes foi similar ao de COL, embora sob 10^{-6} M

de citocininas *p23* apresente raiz primária mais curta que COL, porém não diferindo de *p9* e *p37* (Tabela 32).

TABELA 32. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação dupla de genótipos de *Arabidopsis thaliana* e níveis do hormônio citocinina, em meio de cultura MP com suficiência de fósforo (+P= 1,0 mM), sob dois suprimentos de nitrogênio (+N e -N).

Níveis de citocininas (M)	Genótipos			
	COL	<i>p9</i>	<i>p23</i>	<i>p37</i>
Comprimento da raiz primária (cm) em meio +P+N				
Controle	A 4,52 a*	A 3,77 b	A 0,78 c	A 1,07 c
10⁻⁸	B 3,77 a	B 2,56 b	AB 0,55 c	A 0,81 c
10⁻⁷	C 1,35 a	C 0,94 b	AB 0,45 c	B 0,55 c
10⁻⁶	D 0,69 a	D 0,39 ab	B 0,30 b	B 0,58 ab
10⁻⁵	E 0,38 a	D 0,21 a	AB 0,36 a	C 0,21 a
10⁻⁴	E 0,17 a	D 0,13 a	B 0,08 a	C 0,12 a
Comprimento da raiz primária (cm) em meio +P-N				
Controle	B 2,19 a	B 0,99 b	A 2,12 a	A 2,07 a
10⁻⁸	A 2,46 a	AB 1,13 d	B 1,48 c	A 2,10 b
10⁻⁷	C 1,75 a	A 1,30 b	C 0,80 c	B 1,36 b
10⁻⁶	D 1,09 a	C 0,49 b	C 0,56 b	C 0,92 a
10⁻⁵	D 0,85 a	C 0,50 b	C 0,48 b	D 0,65 ab
10⁻⁴	E 0,17 a	D 0,08 a	D 0,08 a	E 0,10 a

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre genótipos e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre níveis de citocininas no mesmo tratamento de N (+N ou -N), não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficientes de variação: +P+N= 9,1 e +P-N= 11,6.

No ambiente +P-N, o desenvolvimento da raiz primária foi distinto daquele de +P+N, especialmente entre os mutantes. COL continuou a ter

melhor desenvolvimento radical relativamente aos mutantes nos níveis 10^{-8} e 10^{-7} M, porém não diferiu de *p37* em 10^{-6} e 10^{-5} M. Assim, o comportamento de COL e *p37* foi similar na maioria dos níveis de citocininas em +P-N, sendo que ambos, de modo geral, tiveram resposta distinta da obtida em *p9* e *p23*. Por outro lado, na testemunha - sem adição de citocininas, COL, *p23* e *p37* tiveram CRP maior que *p9*, enquanto no maior nível de citocininas (10^{-4} M) não se verificou diferença no desenvolvimento radical de nenhum dos genótipos (Tabela 32). Nesta condição de citocininas (10^{-4} M), houve inibição severa no desenvolvimento radical dos quatro genótipos como também verificado nos estudos de FRANCO-ZORRILLA *et al.* (2002; 2005).

Entre níveis de citocininas, na condição +P+N, o comportamento de *p9* e *p37* foi similar ao de COL, já que houve redução no desenvolvimento radical à medida que incrementaram os níveis de citocininas (Tabela 32). Em *p23*, houve menor variação no CRP entre níveis de citocininas relativamente aos demais genótipos. Interessante notar que na condição +P+N, a relação entre o CRP dos níveis extremos de citocininas é superior à 26x em COL e de 29x em *p9*, enquanto em *p23* e *p37* essa relação é de apenas cerca de 9x.

Por sua vez, na condição +P-N, COL e *p9* tiveram melhor desenvolvimento radical em 10^{-8} M de citocininas, enquanto em *p23* o maior CRP ocorreu no controle. No mutante *p37* o CRP não variou entre o controle e o menor nível de citocininas adicionado ao meio. Nos demais níveis de citocininas e em todos os genótipos, verificou-se redução gradual no CRP com aumento nos níveis de citocininas (Tabela 32). Ainda nestas condições de crescimento (+P-N), considerando-se a relação entre o menor e o maior

CRP, COL e *p9* tiveram redução próxima de 13x no desenvolvimento radical entre os níveis de citocininas, enquanto *p23* e *p37* de 26x e 21x.

A adição de citocininas no meio +P-N remove o efeito da retirada do N no fenótipo de *p23*, sugerindo que o efeito inibitório do N no desenvolvimento da raiz primária deste mutante esteja relacionado à produção ou sensibilidade a citocininas. Por outro lado, *p37* não apresenta a mesma resposta, pois apresenta comportamento mais similar ao verificado em COL. Com isso, apesar de *p23* e *p37* ambos serem responsivos à interação P x N, como previamente reportado, os resultados dos estudos de citocininas sugerem que os genes mutados nestes dois mutantes tenham ações diferentes em relação a citocininas (Tabela 32).

Nos estudos finais de avaliação do efeito de citocininas, verificou-se que em ambos os ambientes, -P/+RNA+N e -P/+RNA-N, o comportamento dos mutantes diferiu daquele de COL, exceto na condição sem N e no nível mais alto de citocininas (10^{-4} M), onde o CRP dos quatro genótipos foi similar (Tabela 33). No meio -P/+RNA+N, o desenvolvimento radical não diferiu entre mutantes, enquanto sob -P/+RNA-N, o CRP de *p9* foi superior ao de *p23* e *p37*, exceto no controle para ambos os mutantes e em 10^{-5} M em *p37*, onde o desenvolvimento radical foi similar.

Ainda em -P/+RNA+N, o aumento nos níveis de citocininas em geral não afetou o desenvolvimento radical dos mutantes, sendo os ganhos em termos de CRP inferiores a duas vezes o comprimento obtido no controle sem hormônio. Diferente dos mutantes, em COL, níveis crescentes de citocininas causaram redução de cerca de 5x no CRP entre os níveis extremos. No meio -

P/+RNA-N, p23 e p37 tiveram comportamento similar ao da condição com suprimento de N (Tabela 33).

TABELA 33. Comprimento da raiz primária oito dias após germinação em função da interação dupla de genótipos de *Arabidopsis thaliana* e níveis do hormônio citocinina, em meio de cultura MP com limitação de fósforo (-P/+RNA), sob dois suprimentos de nitrogênio (+N e -N).

Níveis de citocininas (M)	Genótipos			
	COL	p9	p23	p37
Comprimento da raiz primária (cm) em meio -P/+RNA+N				
Controle	A 2,89 a	A 0,48 b	A 0,31 c	AB 0,37 bc
10⁻⁸	B 1,17 a	AB 0,39 b	A 0,34 b	AB 0,39 b
10⁻⁷	C 0,98 a	A 0,46 b	A 0,32 b	A 0,46 b
10⁻⁶	D 0,83 a	AB 0,38 b	A 0,30 b	AB 0,38 b
10⁻⁵	E 0,72 a	A 0,44 b	A 0,27 c	A 0,44 b
10⁻⁴	F 0,58 a	B 0,27 b	A 0,24 b	B 0,27 b
Comprimento da raiz primária (cm) em meio -P/+RNA-N				
Controle	D 0,49 a	CD 0,27 b	A 0,24 b	A 0,38 ab
10⁻⁸	A 2,94 a	A 1,62 b	A 0,23 c	A 0,36 c
10⁻⁷	B 2,28 a	A 1,47 b	A 0,26 c	A 0,30 c
10⁻⁶	C 1,43 a	B 0,66 b	A 0,25 c	A 0,29 c
10⁻⁵	C 1,02 a	C 0,31 b	A 0,10 c	A 0,27 bc
10⁻⁴	E 0,10 a	D 0,15 a	A 0,10 a	B 0,06 a

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, comparação entre genótipos e, antecedidas de mesma letra maiúscula na coluna, comparação entre níveis de citocininas no mesmo tratamento de N (+N ou -N), não diferem entre si pelo teste DMS ($p \leq 0,05$). Coeficientes de variação: -P/+RNA+N= 11,2 e -P/+RNA-N= 11,5.

Por outro lado, em COL e *p9* a resposta foi distinta daquela da condição com suprimento de N. Nestes dois genótipos, o suprimento de P via organofosfatos em meio com ausência de N causa inibição severa no CRP. Interessante neste estudo é que a deficiência de N em COL e *p9* pode ser revertida pela adição de baixos níveis de citocininas (10^{-8} e 10^{-7} M), fato que não ocorre em *p23* e *p37* (Tabela 33). Esses dados demonstram que em COL e *p9* o menor desenvolvimento radical que ocorre sob ausência de N pode relacionar-se à deficiência na produção de citocininas, enquanto em *p23* e *p37* não há defeitos na síntese deste hormônio, independente da condição de N. Além disso, os maiores níveis de citocininas sob ausência de N foram mais prejudiciais em *p9* relativamente aos demais genótipos, já que causaram inibição expressiva no crescimento radical deste mutante e efeito menor nos demais genótipos.

De forma conjunta, os resultados dos estudos com presença de níveis crescentes de auxinas e de citocininas apontam para dois caminhos. Em *p23* e *p37*, os resultados obtidos demonstram que não há relação de suas mutações com deficiências na síntese de auxinas ou citocininas, independente da condição de P ou de N, embora ambos tenham sido caracterizados nesta tese como mutantes da interação P x N. Por conta desta interação, esperava-se que houvesse efeito de P x citocininas x suprimento de N, mas os dados demonstram que isso não ocorre. Estes mutantes, *p23* e *p37*, não conseguiram resgatar, mesmo que apenas parcialmente, o fenótipo do ecótipo COL em nenhuma das condições experimentais adotadas, reforçando a não relação de suas mutações com deficiências na síntese de auxinas e citocininas.

Por outro lado, os resultados obtidos em *p9* sugerem que seu fenótipo radical distinto de COL em condição limitante de P esteja relacionado a deficiências na síntese de auxinas e ainda a citocininas, porém esta última apenas na ausência de N. Com isso, sob deficiência de P, *p9* conseguiu melhorar seu desenvolvimento radical quando se adicionou níveis baixos destes hormônios, permitindo restabelecer parcialmente o fenótipo radical de COL neste mutante na condição. Neste sentido, sugere-se que o fenótipo de raiz curta em meio deficiente em P ocasionado pela mutação de *p9* é parcialmente causado por defeitos na síntese e/ou percepção de auxinas e citocininas, embora estudos mais conclusivos sejam requeridos.

4.8 Mapeamento da mutação de *p9* e *p23* a um dos cinco cromossomos de arabis

Outra etapa importante no estudo dos mutantes é estabelecer a localização do gene mutado. A etapa de mapeamento foi desenvolvida para *p9* e *p23*.

Após realização dos cruzamentos dos mutantes com o ecótipo LER (fornecedor de pólen), sementes F1 deste cruzamento foram testadas quanto ao desenvolvimento radical em condição -P/+RNA. Nesta geração, mantiveram-se plantas com fenótipo radical similar a LER (raiz primária longa), demonstrando sucesso no cruzamento dos mutantes com LER. Mesmo adotando esta forma de checagem, ainda optou-se por uma segunda análise de eficiência do cruzamento, desta vez molecularmente. Para tal, as 14 plantas de cada genótipo consideradas de cruzamento eficiente através da

seleção em meio -P/+RNA, foram crescidas em solo e, posteriormente procedeu-se coleta de três folhas por planta e extração de DNA.

Dois marcadores moleculares que resultam em bandas com tamanho distinto em COL e LER, portanto permitem diferenciar estes ecótipos, foram testados no DNA de cada planta F1. As seqüências nucleotídicas destes *primers* e dos adotados nas demais análises de mapeamento da mutação estão apresentadas na Tabela 2.

As plantas oriundas do cruzamento dos mutantes com LER que foram selecionadas com base no fenótipo radical no meio -P/+RNA tiveram a eficiência do cruzamento confirmada pela análise molecular. O perfil eletroforético obtido para o *primer* NGA168, resultou em uma banda para COL, *p9* e *p23* e em duas bandas em LER e em todas as plantas F1 (Figura 18). Para chegar a este perfil nas plantas F1, uma das bandas necessariamente precisa ser oriunda de LER, portanto confirmando a eficiência do cruzamento entre mutantes e o ecótipo.

Da mesma forma, para o *primer* F17I23, o ecótipo COL e os mutantes *p9* e *p23* apresentaram produto de amplificação de DNA de tamanho maior que o de LER (Figura 18). O perfil eletroforético das mesmas 14 plantas analisadas anteriormente demonstra ocorrência de duas bandas, fato que somente é possível se o cruzamento entre LER e o mutante foi eficiente.

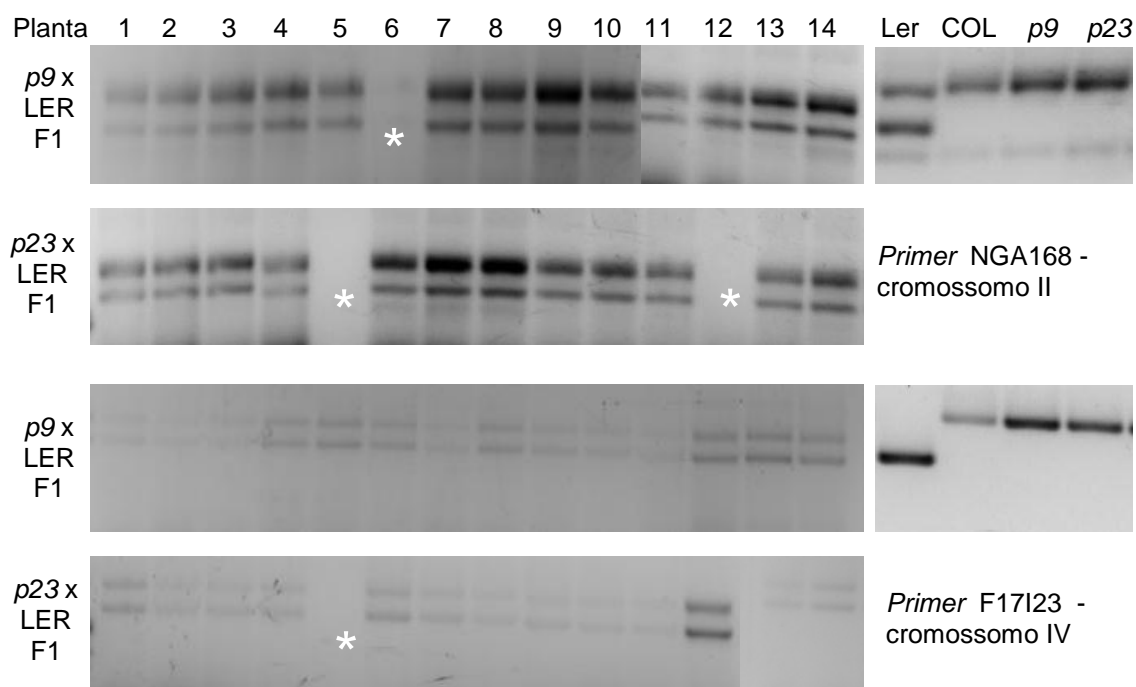


FIGURA 18. Análise genética de produtos dos *primers* NGA168 e F17I23 em 14 plantas F1 de duas populações recombinantes de *p9* e *p23* com *Landsberg erecta* (LER), para confirmar perfil genético de plantas anteriormente checadas quanto ao fenótipo radical.

Com isso, os dados dos dois *primers* testados nas 14 plantas F1 de cada cruzamento confirmam a eficiência da seleção baseada em fenótipo radical, efetuada no meio contendo organofosfatos como única fonte de P. Das três plantas em que não se verificou amplificação pelo *primer* NGA168 (indicadas com asterisco), apenas uma delas (quinta planta de *p23*) também não amplificou a partir do *primer* F17I23, indicando problema com o DNA. Baseado nisso, tal planta foi descartada, mantendo-se portanto 14 plantas F1 de *p9* x LER e 13 plantas *p23* x LER para produção de sementes F2.

Estas plantas F1 confirmadas foram transferidas para solo e permitida autofecundação. Das sementes F2 resultantes de cada planta, selecionou-se, previamente 150 plantas para cada população recombinante, as quais foram analisadas e re-selecionadas com base em fenótipo radical. Após esta nova seleção, das 150 plantas F2 da população de *p9*, apenas 32 populações F3

apresentaram fenótipo radical desejado - raiz curta, similar ao do mutante, o que representa 21,3% das plantas originalmente selecionadas. Em *p23*, mantiveram-se 38 populações F3, ou seja, 25,3% das plantas selecionadas na F2. O DNA individualizado destas plantas F2 de cada população foi utilizado para inicialmente testar dois *primers* de cada um dos cinco cromossomos de *arabidopsis*. Em ambas as populações, as taxas de recombinação foram variáveis entre os *primers* dos cinco cromossomos. De modo geral, as taxas de recombinação nos cromossomos 2, 3, 4 e 5 foram em torno de 50% para as populações de *p9* e *p23* (Figuras 19 e 20).

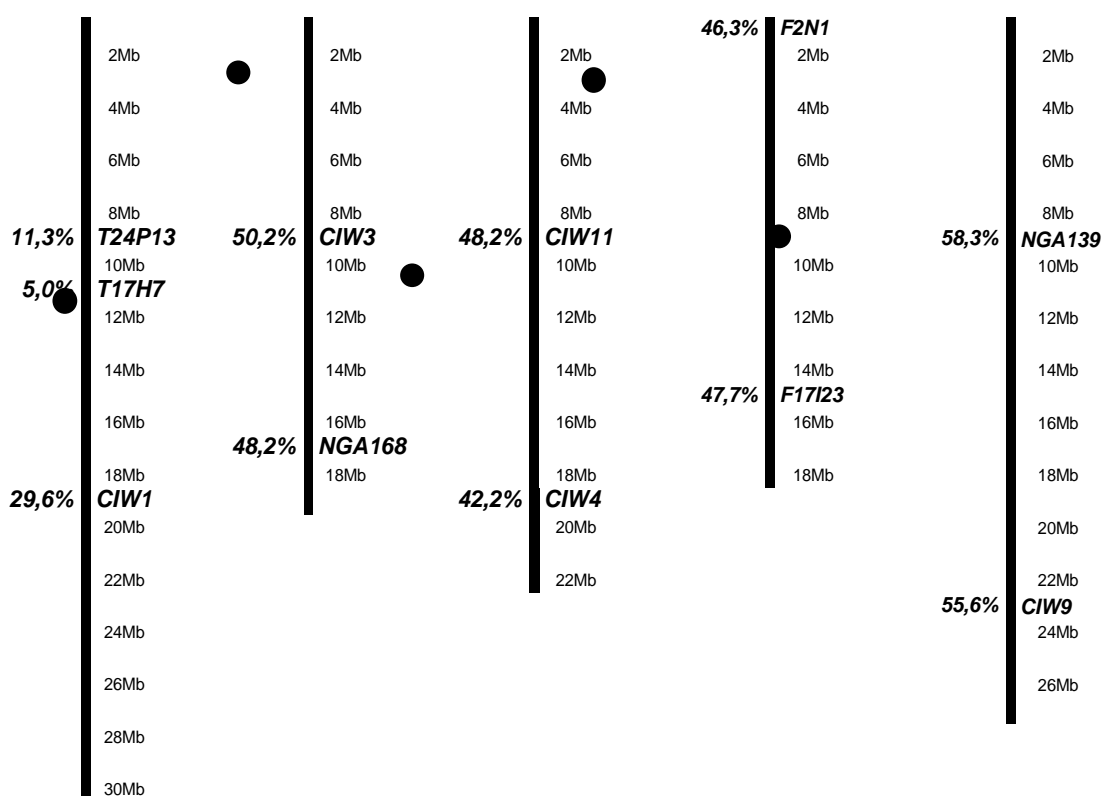


FIGURA 19. Taxas médias de recombinação cromossômica no DNA de 32 indivíduos da geração F2 com genótipo confirmado, nos quais testaram-se 11 *primers* no mutante *p9Ler* de *Arabidopsis thaliana*.

Entretanto, no cromossomo 1 as taxas de recombinação foram bem menores para ambas as populações. Na população recombinante de *p9*, verificou-se taxa de recombinação entre 5% e 30%, respectivamente nos *primers* T17H7 e CIW1 (Figura 19). Por outro lado, na população de *p23* a variação entre as taxas de recombinação foi menor, sendo de cerca de 13% no *primer* T17H7 e em torno de 21% no T24P13 (Figura 20). De forma conjunta, estes resultados de ambas as populações demonstram que a mutação está localizada no cromossomo 1, na região do braço superior do cromossomo, já que as taxas de recombinação nesta região foram inferiores às verificadas nas demais regiões cromossômicas.

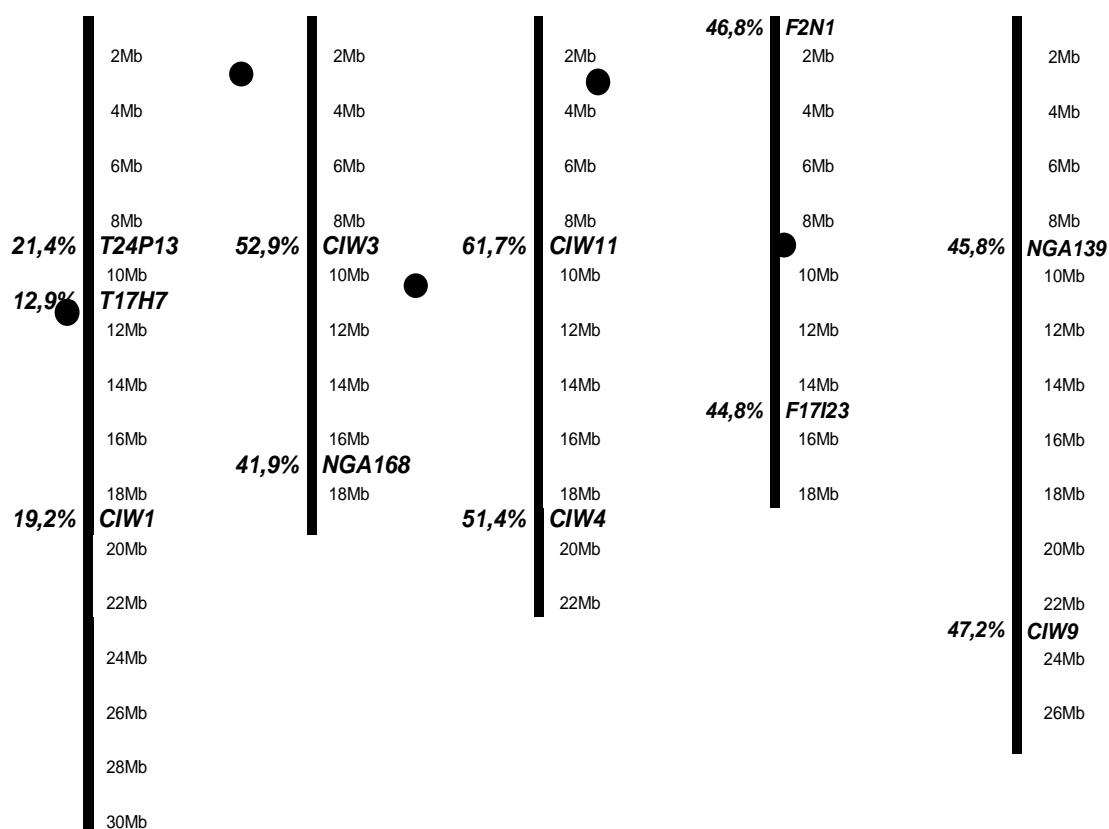


FIGURA 20. Taxas médias de recombinação cromossômica no DNA de 38 indivíduos da geração F3 com genótipo confirmado, nos quais testaram-se 11 *primers* no mutante *p23Ler* de *Arabidopsis thaliana*.

Uma vez identificado o cromossomo de localização da mutação em ambas as populações recombinantes, novos *primers* foram projetados, com intuito de refinar a informação previamente obtida. Estes novos *primers* foram testados no mesmo DNA usado anteriormente. Como a região de localização dos genes mutados evidencia estar em região não muito distante uma da outra no cromossomo 1, os *primers* projetados foram testados nas populações recombinantes dos dois mutantes.

As taxas de recombinação verificadas com estes novos *primers* projetados confirmaram os dados previamente obtidos, já que possibilitaram chegar mais próximo à localização do gene mutado em ambas as populações recombinantes. Em *p9*, obteve-se taxa de recombinação zero no *primer* F23M19 e valores inferiores a 13% em outros seis *primers* localizados no entorno daquele *primer* (Figura 21).

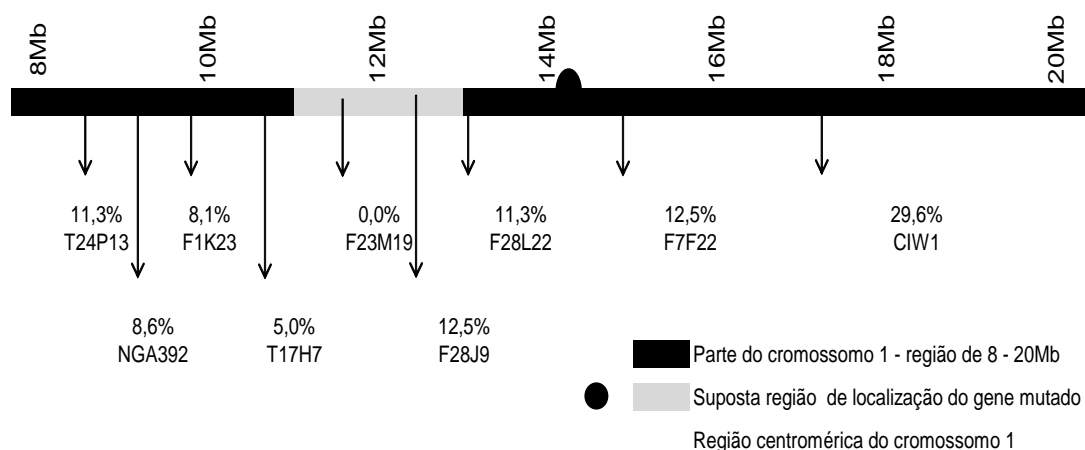


FIGURA 21. Taxas médias de recombinação cromossômica no DNA de 32 indivíduos da geração F2 com genótipo confirmado, nos quais testaram-se nove *primers* no mutante *p9Ler* de *Arabidopsis thaliana*.

Estes mesmos *primers* foram testados na população recombinante de *p23*, na qual entretanto, houve menor refinamento da informação previamente

obtida com dois *primers*. Mesmo assim, obteve-se taxa de recombinação próxima a 8% no *primer* F23M19 (Figura 22).

As taxas de recombinação verificadas no cromossomo 1 em ambas as populações permitem afirmar que o *primer* F23M19 está relacionado às mutações de *p9* e *p23*. Apesar de ter-se atingido recombinação de 0% em *p9* ainda não é possível dizer com precisão que o gene mutado está no exato local da ocorrência do *primer* F23M19. Isto ocorre porque em *primers* adjacentes a este foram obtidas taxas de recombinação próximas a 8%, sugerindo que novos *primers* devem ser projetados entre estes para que se possa efetivamente chegar a localização e clonagem do gene mutado.

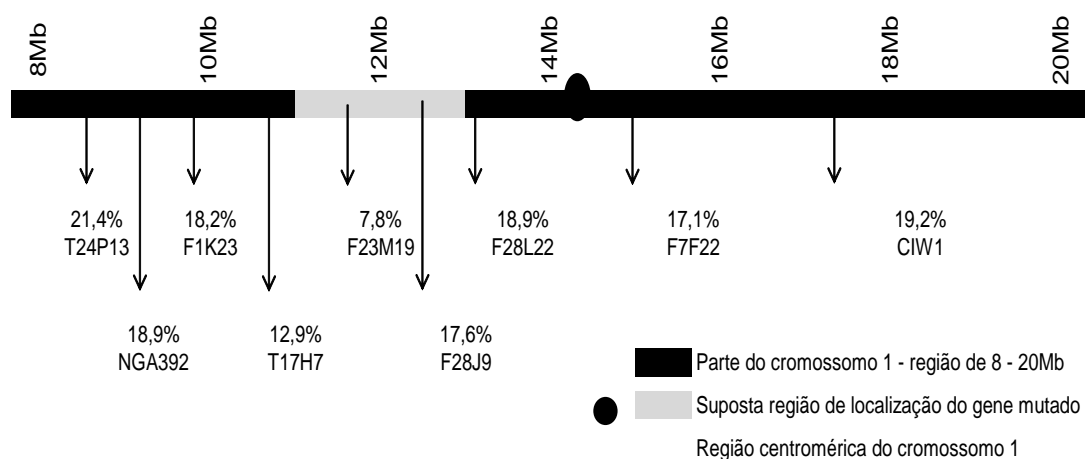


FIGURA 22. Taxas médias de recombinação cromossômica no DNA de 38 indivíduos da geração F2 com genótipo confirmado, nos quais testaram-se nove *primers* no mutante *p23* de *Arabidopsis thaliana*.

5 DISCUSSÃO

Estima-se que mais da metade da performance produtiva da maioria das culturas de interesse agrícola é prejudicada pela interferência negativa de fatores (a)bióticos durante seu ciclo de desenvolvimento (CASAGRANDE *et al.*, 2001). Entre os estresses abióticos, deficiências nutricionais por N e P, em conjunto com limitação por água, são considerados os três principais fatores limitantes ao desenvolvimento de plantas e podem resultar em perdas produtivas superiores a 90 %.

No caso da deficiência por P, objeto de estudo no presente trabalho, a quantidade total presente no solo é inclusive bem superior à demanda da planta. Contudo, apenas parte deste P está prontamente disponível às plantas, especialmente devido à sua baixa mobilidade no solo, deixando-o indisponível para absorção pelo sistema radical - rizosfera, além da alta capacidade de adsorção à matéria orgânica, argilas e superfícies de carbonatos de cálcio e magnésio. Deve-se ainda considerar o efeito do Al e Fe tóxicos, com os quais forma quelatos e precipita, reduzindo sua disponibilidade.

Desta forma, os mecanismos envolvidos e a regulação em torno da limitação por P em vegetais pode ser considerado processo complexo e apesar do conhecimento atualmente disponível sobre o tema, ainda apresenta

diversas etapas por serem melhor elucidadas. Isso decorre, especialmente pela verificação de que é dependente de diversos fatores que, por vezes atuam isoladamente e em outras situações demonstram interação. No presente trabalho, ficaram evidenciadas ambas as situações, já que em alguns estudos foram verificados efeitos simples de P e em outras interações duplas ou triplas de tratamentos. Estas respostas demonstram novamente a complexidade da resposta de *Arabidopsis* à limitação de P, sendo respostas similares também verificadas em outras espécies vegetais.

Para contribuir na elucidação deste processo, no presente trabalho adotaram-se mutantes de *Arabidopsis thaliana*. Esta espécie é considerada um dos modelos vegetais para estudos biológicos, apresentando seu genoma seqüenciado e disponibilidade de mutantes a diferentes estresses. Esta espécie ainda apresenta outras vantagens, como pequeno tamanho, curto tempo de geração, reprodução autógama, acessibilidade e facilidade de manipulação genética, grande produção de sementes, pequeno tamanho do genoma, ampla conservação de mecanismos fisio-genéticos, bioquímicos e moleculares. Estas características, segundo DELATORRE & SILVA (2008), são fundamentais para um organismo ser considerado modelo de estudos biológicos. Além disso, essa espécie não interage com micorrizas, aspecto relevante para estudos relacionados ao nutriente P, além de demonstrar maioria das respostas clássicas de plantas à deficiência nutricional.

Apesar de haver diversos mutantes isolados para diferentes processos e eventos de estresse abiótico, como o caso da limitação por P, e outros mutantes que foram construídos com base em estratégias genético-moleculares, os mutantes adotados neste trabalho são oriundos de isolamento

e seleção de integrantes do próprio grupo de pesquisa. Os mutantes adotados são oriundos do ecótipo COL e foram obtidos através de *screening* de sementes mutagenadas pelo método químico de EMS (etil-metil sulfonato) e isoladas por CHEN *et al.* (2000) e DELATORRE (2009).

A condição na qual foram isolados tinha como fonte de P os ácidos nucleicos, DNA ou RNA. Com esta estratégia, os autores preconizaram a seleção de mutantes com defeitos em aspectos regulatórios da rota de sinalização a P. Isso se justifica pelo fato de que durante o processo de resposta à limitação por P, entre outras respostas, a planta é capaz de acionar enzimas capazes de atuar sobre estas fontes de P não prontamente disponíveis e, desta forma, conseguir disponibilizar parte do P presente para absorção pelas plantas. O fato dos mutantes apresentarem desenvolvimento radical prejudicado nesta situação, relativamente ao ecótipo COL, é evidência consistente da ocorrência de algum defeito nesta rota metabólica.

De modo geral, os mutantes *p9*, *p23* e *p37* apresentam menor desenvolvimento radical relativamente ao ecótipo COL quando dispostos em condição com limitação de P, seja sua total ausência ou em ambiente onde o P é fornecido apenas via ácidos nucleicos (Tabela 8), como o RNA obtido da levedura *Torula*. Por outro lado, quando são dispostas em condição com suficiência de P, o desenvolvimento radical de *p9* é similar ao de COL, enquanto o de *p23* e *p37* é significativamente menor que o de COL e de *p9*, porém ainda assim mais de duas vezes maiores que o verificado em ambiente com limitação de P (Tabela 8). Além disso, os resultados indicam que *p9* apresenta fenótipo radical similar ao de *pdr2*, enquanto *p23* e *p37* apresentam desenvolvimento radical similar ao de *pdr1*.

Estes dois mutantes, *pdr1* e *pdr2*, foram isolados durante o mesmo *screening* e previamente caracterizados por DELATORRE *et al.*, (2004) e DELATORRE (2009). *pdr2* possui menor crescimento radical que COL, cuja resposta é condicionada a baixos níveis de P, devido à inibição da divisão celular e diferenciação precoce do meristema apical da raiz. Assim, *pdr2* consegue obter parte do P presente em ácidos nucléicos, no entanto os níveis de P no meio são mantidos baixos, evidenciando existência de percepção local, dependente dos níveis externos de P (DELATORRE *et al.*, 2004).

Por outro lado, *pdr1* possui crescimento radical reduzido relativamente à COL seja em condição com suficiência de P ou em condição de deficiência de P, assim como também verificado em *p23* e *p37*. Além disso, em ambiente onde os autores removeram o nitrato do meio de cultura, verificaram restabelecimento do fenótipo radical de COL neste mutante, sugerindo ocorrência de interação de P e N (DELATORRE, 2009). Em função destas características de *pdr1* e semelhança no comportamento radical com *p23* e *p37*, este mutante também foi inserido em alguns estudos conduzidos para se ter testemunha padrão que permita melhor comparação relativa entre os mutantes em estudo.

Assim como há variações consideráveis em termos de características físicas, químicas e biológicas do solo e/ou ainda nas condições meteorológicas ambientais de cultivo das espécies, a adoção de meios de cultura/substratos também pode resultar em comportamentos distintos dos esperados. Neste sentido e considerando os primeiros estudos conduzidos neste trabalho, fez-se comparação de duas formulações de meio de cultura avaliando seus efeitos no desenvolvimento radical dos quatro genótipos.

Embora não previsto inicialmente, este estudo foi fundamental para chegar às conclusões obtidas nos diferentes experimentos conduzidos. A principal justificativa para realização deste estudo foi a obtenção de resultados divergentes em relação a estudos conduzidos anteriormente com estes mesmos genótipos por PINTO (2005).

Para investigar as razões destas divergências, adotaram-se duas formulações de meios de cultura, meio comercial MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), nesta tese referido como $\frac{1}{2}$ MS, e o meio MP (SOMERVILLE & OGRE, 1982), os quais são, respectivamente, os meios de cultura usuais nos laboratórios do Dr. Steffen Abel junto à UCDavis e no de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal da UFRGS. Este experimento contribuiu para explicar a não resposta em termos de crescimento radical de *p9* quando submetido a níveis crescentes de P no meio $\frac{1}{2}$ MS, comportamento distinto do verificado por PINTO (2005) ao adotar o mesmo mutante, porém no meio MP.

Esperava-se que o desenvolvimento radical dos três mutantes e do ecótipo COL ocorresse normalmente em ambos os meios de cultura, uma vez que ambas as formulações são adotadas por diferentes grupos de pesquisa interessados em respostas vegetais à limitação por P. Entretanto, após condução de alguns experimentos e obtenção de resultados divergentes dos esperados, verificou-se que este padrão era válido somente na condição com suficiência de P (1,0 mM), quando há suprimento de P. Por outro lado, quando se adota a condição de limitação de P, seja ausência total deste ou suprimento via ácidos nucléicos, verifica-se que há diferenças significativas no desenvolvimento radical de todos os genótipos em estudo entre os dois meios de cultura (Tabela 5).

Uma das respostas mais interessantes neste estudo e ao mesmo tempo contraditória relaciona-se ao comportamento de *p9*, que ao contrário de *p23*, *p37* e COL, apresenta desenvolvimento radical maior no meio $\frac{1}{2}$ MS em relação ao MP. Outra constatação para este mutante é que ao incrementar os níveis de P no meio $\frac{1}{2}$ MS, o CRP de *p9* foi similar ao de COL em praticamente todos os níveis de P testados (Tabela 6). Entretanto, ao adotar o mesmo mutante, porém usando o meio MP, PINTO (2005) demonstrou que há diferenças expressivas no comportamento destes dois genótipos quando os níveis de P são incrementados neste meio de cultura. Deve-se salientar que o meio MP foi aquele adotado como padrão em todos os estudos conduzidos por PINTO (2005) ao realizar parte da caracterização dos três mutantes. O meio MP também foi condição na qual DELATORRE (2009) fez o isolamento dos mutantes *p9*, *p23* e *p37*, bem como de *pdr1* e *pdr2* adotados como testemunhas em alguns estudos conduzidos.

Com isso, levantou-se a hipótese da existência de algum componente destas duas condições de crescimento, especialmente do meio $\frac{1}{2}$ MS, estar afetando o comportamento dos mutantes e de COL. Objetivando identificar este fator, primeiramente fez-se análise mais detalhada de cada formulação nutricional. Ao fazer análise dos constituintes e níveis nutricionais de cada meio de cultura, $\frac{1}{2}$ MS e MP, verificaram-se desde teores similares nas concentrações nutricionais de alguns nutrientes até diferenças muito expressivas entre a concentração do mesmo nutriente entre os dois meios de cultura.

Entre os micronutrientes, as diferenças mais expressivas ocorrem nos níveis de Mo, Mn, Zn, Cu e Co, os quais são 2,5, 4, 26,7, 100 e 5250x,

respectivamente maiores no meio $\frac{1}{2}$ MS relativamente ao meio MP. Em relação aos micronutrientes deve-se considerar que para a planta há variação pequena entre o nível considerado adequado ao desenvolvimento vegetal e o que pode ser nível tóxico. Por conta disso, pode-se especular que os níveis destes micronutrientes no meio $\frac{1}{2}$ MS já poderiam ser tóxicos à planta e, desta forma, afetar alguma das características avaliadas nos estudos conduzidos.

Além destas variações, ainda há outras variações consideráveis em pelo menos dois macronutrientes. O suprimento de P no meio $\frac{1}{2}$ MS corresponde a apenas $\frac{1}{4}$ do fornecido pelo meio MP, enquanto a quantidade de N é superior a 3x àquela fornecida pelo meio MP. Outra diferença expressiva entre os meios é a fonte de N, sendo o N do meio MP suprido exclusivamente via nitrato de potássio, enquanto o do meio $\frac{1}{2}$ MS na forma de nitrato de potássio + de nitrato de amônio. Assim, é estimado que o meio $\frac{1}{2}$ MS possua $\frac{1}{3}$ (9,12 mM) de seu N na forma de amônio, quantidade que corresponde ao total de N fornecido pelo meio MP, enquanto $\frac{2}{3}$ são supridos na forma de nitrato (Tabela 1).

As variações nos níveis individuais ou ainda o efeito de interações nutricionais que podem ocorrer nos meios de cultura, podem ser fatores responsáveis pelas respostas distintas no comportamento dos mutantes. Pelos resultados obtidos, estes aspectos são especialmente importantes em *p9* e em COL, sobretudo quando se comparou os meios de cultura com limitação de P (Tabela 5).

COL, *p23* e *p37* possuem desenvolvimento radical prejudicado no meio $\frac{1}{2}$ MS em relação ao meio MP (Tabela 5), o que poderia ser indicativo de que

estes genótipos podem ser mais sensíveis a maiores níveis dos micronutrientes, como reportado para o meio MP. Entretanto, como pode ser verificado pelo comportamento dos dados, em princípio as diferenças de composição não afetaram o desempenho destes mutantes em outros estudos conduzidos. Todavia, os efeitos negativos do meio $\frac{1}{2}$ MS em relação ao MP no mutante *p9*, incitaram novos estudos, portanto mudando em parte a direção dos estudos inicialmente previstos para este mutante.

Outro aspecto relevante na comparação do desenvolvimento radical dos genótipos em duas formulações de meio é que as diferenças foram mais expressivas sob deficiência de P (Tabelas 5, 6 e 7), enquanto apenas pequenas diferenças foram observadas no ambiente com suficiência de P (Tabelas 3 e 4). Além disso, supondo que CHEN *et al.* (2000) e DELATORRE (2009) tivessem adotado o meio $\frac{1}{2}$ MS para fazer o isolamento destes mutantes, possivelmente *p9* não teria sido isolado naquela seleção, já que seu fenótipo radical é mais difícil de diferir daquele de COL, quando comparado aos padrões destes dois genótipos verificados na condição MP. Ou seja, os autores teriam deixado de isolar um mutante de P com características interessantes em termos de resposta à deficiência nutricional por P, apenas pelo fato de ter usado meio de cultura com características distintas daquela adotada por ocasião de sua seleção.

Com base nestes aspectos e considerando a performance dos mutantes, pode-se dizer que o comportamento do sistema radical e do desenvolvimento geral das plantas de *arabidopsis* pode ser alterado pelo tipo de meio de cultura adotado. A composição do meio de cultura adotado nos estudos deve ser aspecto a ser considerado por ocasião da interpretação dos

resultados de pesquisa, especialmente em estudos de limitação por P. Neste sentido, estas considerações são vitais no presente trabalho, uma vez que na maioria dos estudos adotaram-se condições de não suprimento (-P) e/ou suprimento limitado de P, via ácidos nucléicos (-P/+RNA).

Ainda considerando as diferenças nos níveis e de algumas fontes nutricionais entre os meios MP e $\frac{1}{2}$ MS, no presente trabalho a maioria dos estudos foi conduzida adotando a condição MP. A adoção desta é mais trabalhosa e requer maiores cuidados por ocasião do preparo do meio, pois requer adição de pequenas quantidades de várias soluções a base de sais. Por outro lado, ao usar o meio $\frac{1}{2}$ MS, apenas é preciso dissolver o pó comercial em água filtrada e proceder autoclavagem, portanto sendo mais rápido e com menores chances de incorrer em erros no momento de seu preparo. Apesar destas desvantagens operacionais do uso do meio MP em relação ao $\frac{1}{2}$ MS, ainda assim considerou-se ser mais correto adotar o meio MP, pois estudos conduzidos demonstraram que o desenvolvimento e a resposta dos mutantes e de COL é mais estável nesta condição.

Nesta mesma linha, entre outros fatores que afetam o desenvolvimento radical sob deficiência de P pode-se citar alterações no pH (CHEVALIER *et al.*, 2003; SVISNOOTOFF *et al.*, 2007), presença de níveis tóxicos de micronutrientes como Fe (SVISNOOTOFF *et al.*, 2007; WARD *et al.*, 2008) ou As (ABERCROMBIE *et al.*, 2008), altos teores de sacarose (KARTHIKEYAN *et al.*, 2007) e o efeito do agente solidificante do meio líquido (JAIN *et al.*, 2009).

Nas condições experimentais adotadas no presente trabalho, preparo de meio de cultura e disposição deste em placas de petri, há necessidade de

se adicionar agente solidificante. Exemplos de produtos solidificantes são o agar e o fitagel, obtidos respectivamente de algas vermelhas e de bactérias, os quais permitem disposição vertical das placas de petri e fácil avaliação do comprimento radical. Este agente solidificante é considerado fator inerte no meio de cultura, portanto não deve afetar o desenvolvimento radical. Contudo, JAIN *et al.* (2009) verificaram que o agar pode alterar expressivamente o padrão de desenvolvimento radical de *arabidopsis* através de efeitos no comprimento da raiz primária e na repressão ou indução da emissão de pêlos e raízes laterais.

Além disso, este componente de meio de cultura altera expressão de genes relacionados à limitação nutricional causada por P. Outros estudos conduzidos por NOWAK & ASIEDU (1992), SCHOLTEN & PIERIK (1998) e BERUTO *et al.* (1999) observaram tendência similar em ecótipos e mutantes de *arabidopsis* distintos dos estudados aqui.

Segundo JAIN *et al.* (2009), variações no desenvolvimento radical podem ocorrer tanto entre marcas comerciais distintas destes agentes, assim como entre lotes distintos do produto oriundos do mesmo fabricante. Em razão destes aspectos, é importante salientar que, em todos os experimentos conduzidos neste trabalho, se adotou agar oriundo do mesmo fabricante e mesmo lote. Por conta disso, se minimizou eventual efeito negativo de algum contaminante presente no agente solidificante através do uso do mesmo agar (marca e lote) em todos os experimentos, fato que poderia alterar o comportamento de um ou mais mutantes durante os estudos conduzidos.

Entre as razões para as respostas divergentes com uso de lotes ou marcas diferentes do agente solidificante, os autores ressaltam a ocorrência

de alterações nas propriedades físico-químicas, como alterações na taxa de difusão de nutrientes, impurezas orgânicas e, especialmente contaminação nutricional.

Estes aspectos são ainda mais importantes quando se estuda resposta da planta à deficiência de um ou mais nutrientes. Neste caso, a presença de quantidades mínimas de determinado nutriente já pode ser suficiente para afetar os resultados obtidos, dependendo da sensibilidade da planta a este. Corroborando estas evidências, verificou-se que a alteração de níveis de P de zero para 25 μM já é condição suficiente para obter CRP estatisticamente distinto em COL (Tabela 9). Resultados similares também foram reportados por LÓPEZ-BUCIO *et al.* (2002), DELATORRE *et al.* (2004) e DELATORRE (2009). Assim, reforça-se a premissa de que contaminações mínimas já podem ser suficientes para mascarar resultados e alterar o padrão de crescimento radical das plantas, sobretudo, quando estas apresentam alta sensibilidade a estes.

De posse destas informações e considerando os resultados obtidos, visualiza-se que além dos agentes “inertes” poderem afetar o desenvolvimento radical como reportado, alterações pouco ou bem expressivas nos níveis de algum(ns) nutriente(s) e mesmo da fonte do nutriente podem resultar em variação significativa da performance de plantas mutadas e não mutadas. Por isso, na maioria dos estudos se adotou o meio MP, o qual se mostrou mais adequado ao desenvolvimento dos mutantes e foi o meio no qual os mutantes foram isolados inicialmente. Em sua maioria, o meio $\frac{1}{2}$ MS foi apenas adotado para demonstrar diferenças de

comportamento entre mutantes pela alteração no meio de cultura adotado, sendo realizadas ressalvas nestes casos.

O desenvolvimento radical das plantas apresenta plasticidade muito grande e sensível a alterações nas condições ambientais de crescimento ocasionadas por fatores (a)bióticos. Entre as razões da reestruturação radical está a imobilidade de plantas após seu estabelecimento, portanto dependem do desenvolvimento de adaptações para que consigam sobreviver às condições ambientais vigentes.

Em termos abióticos, variações espaciais e temporais no suprimento de nutrientes como N, P e Fe causam efeito marcante na arquitetura radical em vegetais. Os sinais indutores destas alterações radicais são bastante específicos, mas podem atuar de forma conjunta, através da ocorrência de interações nutricionais (ZHANG *et al.*, 1999; LÓPEZ-BÚCIO *et al.*, 2003; WARD *et al.*, 2008).

Em *arabidopsis*, a resposta do ecótipo COL à limitação por P pode ativar ou desativar algumas rotas metabólicas, como por exemplo o acúmulo de amido nos cloroplastos e proteção de fotossistemas pela síntese de antocianinas contra o excesso de luz. Apesar desta estratégia adaptativa importante, a resposta típica à deficiência por P é a remodelagem na arquitetura radical, através de incremento no número e comprimento de raízes laterais e de emissão de pêlos radicais em detrimento do desenvolvimento da raiz principal (MARSCHNER, 1995; BATES & LYNCH, 1996; WILLIAMSON *et al.*, 2001; ABEL *et al.*, 2002; LÓPEZ-BUCIO *et al.*, 2002; SÁNCHEZ-CALDERÓN *et al.*, 2006; DELATORRE, 2009; TICCONI *et al.*, 2009).

Essa remodelagem da arquitetura radical varia em função de: (i) ajustes nas taxas de divisão e alongação celular na raiz primária, que determina a extensão desta; (ii) emissão de raízes laterais, que incrementam a capacidade do sistema radical como um todo de explorar maior volume de solo e, (iii) formação de pêlos radicais, os quais incrementam significativamente a superfície total da raiz primária e das laterais (BARLOW, 1976; CELENZA *et al.*, 1995). Estas diferentes estratégias de ajuste da arquitetura radical contribuem para melhorar a exploração do solo, através do aumento da superfície da planta em contato com o solo, resultando também em melhor exploração da camada mais superficial dos solos, que devido a aplicação sucessiva de fertilizantes nas áreas agrícolas e baixa mobilidade do P no solo, normalmente concentra as maiores quantidades deste.

Os meristemas da planta controlam todo desenvolvimento de órgãos desta através da regulação da divisão e alongação celular. Nas raízes, o centro quiescente (CQ) está localizado na parte mais distal do meristema radical, sendo formado por quatro células, que são circundadas por células indiferenciadas, mas que podem dar origem a células de diferentes tecidos, dependendo do sinal que recebem.

Embora boa parte da atividade meristemática seja previamente estabelecida durante o desenvolvimento embrionário, o ambiente tem grande efeito sobre este processo. A limitação nutricional é um destes fatores havendo diversas evidências de um papel importante do P em toda regulação de atividade meristemática, através de seu efeito na transdução de sinal entre as diferentes camadas celulares no entorno do CQ (LÓPEZ-BUCIO *et al.*, 2003; SÁNCHEZ-CALDERÓN *et al.*, 2005). Estes autores verificaram que

durante à deficiência de P, o menor CRP deve-se a menor alongação celular e rápida e progressiva redução no tamanho do meristema, oriundos da redução na atividade mitótica celular no meristema.

Resultados similares foram obtidos por PINTO (2005) ao verificar que com suficiência de P (1,0 mM) a taxa de crescimento radical de COL e, especialmente de *p9* e *p37* foram maiores que em ambiente com fornecimento de P via ácidos nucleicos. Além disso, a autora verificou que a taxa de crescimento radical foi maior no meio -P/+RNA relativamente ao com ausência total de P no meio (-P), além do fato de que esse crescimento foi mais pronunciado nos mutantes em relação à COL. Neste mesmo estudo, foi verificada tendência similar ao ser avaliado o comprimento de células diferenciadas na raiz primária destes genótipos e condições contrastantes de suprimento de P.

No presente trabalho, obtiveram-se resultados similares quando se conduziram estudos de transferência de plantas para meios com limitação de P, em cujas plantas se avaliaram respostas de genes repórteres. A adoção de repórteres para verificar o padrão de divisão celular em resposta à limitação de P deve-se ao fato deste ser um mecanismo vital para a planta, especialmente para conseguir absorver água e nutrientes do solo para seu pleno desenvolvimento.

A divisão celular, que pode ser monitorada através do uso do repórter *CycB1::GUS*, torna-se ainda mais importante sob eventos de estresse, como é o caso da deficiência de P. Nesta situação, a planta necessita adotar estratégias que permitam superá-la através do estímulo ao maior desenvolvimento de raízes para sítios do solo com maior disponibilidade de P.

Além desta estratégia, a planta pode ainda estimular a secreção de compostos capazes de ajudar a disponibilizar parte do P imobilizado nos minerais do solo, como é o caso de fosfatases ácidas, cuja expressão pode ser avaliada pelo uso do repórter *AtACP5::GUS*. Há ainda outros compostos capazes de ajudar na liberação de P não prontamente disponível, como as nucleases e fosfodiesterases, as quais, entretanto não foram avaliadas no presente trabalho.

Além destes dois repórteres, um de divisão celular e outro de secreção de fosfatases, também se adotou repórter relacionado ao centro quiescente, o *QC25::GUS*. Esta região tem despertado atenção de diversos grupos de pesquisa e se mostrado relevante, por ser região de poucas células, as quais não estão diferenciadas. Assim, a diferenciação destas ocorre em função de condições ambientais ocorrentes, ou seja, uma estratégia ainda mais importante e relevante em condições de estresse.

A avaliação da cinética de expressão de *CycB1::GUS* no primeiro dia após transferência de plantas de condição +P para a deficiente em P (-P) mostrou que *p23* teve sensível redução na atividade mitótica celular (Figura 10). Na avaliação aos quatro dias após a transferência para meio -P, *p23* teve atividade mitótica bem reduzida, a qual foi ausente no sexto dia. Por outro lado, nas mesmas condições, COL apenas apresentou redução na cinética de expressão de *CycB1::GUS* a partir do segundo dia após transferência, sendo no sexto dia ainda possível observar divisões celulares junto ao meristema radical (Figura 10).

Comportamento distinto foi verificado quando se transferiu as plantas do meio +P para aquele com suprimento de P via RNA (-P/+RNA). Pôde-se

verificar que ambos os genótipos tiveram atividade de *CycB1::GUS* mais intensa e mais persistente do que a verificada no meio -P (Figura 10), independente do tempo de exposição às condições estressantes. Interessante notar que em COL, praticamente não há alteração da atividade de *CycB1::GUS* ao longo do tempo em que as plantas cresceram em ambiente -P/+RNA, enquanto em *p23* há redução considerável nesta atividade no terceiro dia, embora ainda no sexto após a transferência ainda haja divisão celular (Figura 10).

Em outro experimento, comparando suprimentos distintos de P, também se verificou, à medida que a raiz permanece mais dias nos meios sob limitação de P, há intensa redução na divisão celular em *p23*, a qual é praticamente ausente após nove e 11 dias de tratamento (Figura 3). Ainda neste mutante, com redução da divisão celular no meristema radical, iniciam-se divisões celulares em células do periciclo da raiz primária, resultando na emissão de raízes secundárias, terciárias e quaternárias, as quais são curtas e pouco longevas. Embora não tenha sido mensurado, neste mutante também é típico o desenvolvimento de pêlos radicais, os quais aumentam a superfície de absorção de água e nutrientes.

Comportamento similar a este de *p23* foi reportado por DELATORRE *et al.* (2004) e DELATORRE (2009) ao estudarem respostas de *pdr2* à limitação por P. Em *p23*, a morte celular de tecidos diferenciados parece anteceder a emissão de novas raízes laterais, as quais poderiam encontrar em menor tempo novos sítios com presença de P prontamente disponível, ao invés da planta continuar alocar energia no crescimento das já existentes em sítios limitados em P. A exemplo de *p23*, o mutante *pdr2* apresenta emissão

elevada de raízes laterais quando em ambiente -P, sugerindo inclusive descontrole na emissão destas. Entretanto, em ambos o desenvolvimento destas raízes é pequeno e pouco eficiente em termos de estratégia para superação da deficiência de P, pois estas raízes não se conservam por longo tempo, ocorrendo morte do meristema celular em poucos dias. Como discutido posteriormente, essa alteração na emissão de raízes laterais pode também relacionar-se a defeitos na síntese hormonal, como é o caso de auxinas. Neste sentido, PÉREZ-TORRES *et al.* (2008) evidenciaram que a maior emissão de raízes laterais em plantas sob deficiência de P é, pelo menos em parte, atribuída ao incremento na sensibilidade de raízes destas plantas a auxinas.

Os resultados destes experimentos demonstram que *p23* e COL conseguem manter atividade meristemática por tempo maior quando transferidos para meio -Pi/+RNA relativamente a -P. Além disso, no mesmo momento de avaliação, *p23* possui divisão celular menor que a verificada em COL, sugerindo exaustão mais rápida do CQ. Estes dados suportam que *p23*, ao contrário de COL, possivelmente não tenha capacidade de fazer uso do P presente no RNA, o que pode relacionar-se a defeitos na síntese de enzimas degradadoras destes ácidos nucléicos. Com isso, a mutação de *p23* se relaciona à componente regulatório da resposta sinalizadora à limitação por P.

Por outro lado, a atividade de fosfatases e de nucleases ajuda na remobilização de P de metabólitos celulares em condição de deficiência de P (DUFF *et al.*, 1994; BARIOLA *et al.*, 1994). Estes compostos, quando secretados pelas plantas, ajudam na liberação de parte do P imobilizado, sobretudo em condições limitantes de P. Com isso, desempenham papel

regulatório importante na cascata de sinalização à deficiência por P, cujos aumentos na indução e expressão normalmente ativam toda cascata de sinalização. A atividade de *AtACP5::GUS* é reconhecida como resposta de remobilização interna de P (DEL POZO *et al.*, 1999).

Assim como observado no estudo com *CycB1::GUS*, houve diferença na cinética de expressão de *AtACP5::GUS* entre COL e os mutantes, com *p9* apresentando performance similar à de COL (Figura 8). Por outro lado, a partir do quarto dia da transferência ao meio -P ou -P/+RNA, *p23* apresenta intensa atividade de *AtACP5::GUS*, enquanto COL e *p9* possuem atividade fraca até o oitavo dia da transferência (Figura 8). Em *p23*, a indução ocorre em tecidos radicais meristemáticos e ainda em outros já diferenciados, como pêlos radiculares, diferente de COL e *p9*. Desta forma, para este gene há comportamento similar entre COL e *p9*, enquanto *p23* apresenta indução crescente à medida que o estresse por limitação de P se prolonga, sugerindo ainda que a indução deste gene seja mais rápida em *p23* que nos demais genótipos.

Considerando o comportamento de ambos os genes repórteres avaliados, a atividade de *AtACP5::GUS* de *p23* diverge um pouco das evidências obtidas na avaliação em *CycB1::GUS*. A intensa atividade de *AtACP5::GUS* em *p23*, sugerindo indução da síntese de fosfatases ácidas, e por outro lado ausência desta em COL e *p9*, evidencia que apenas *p23* é capaz de usar P presente nos ácidos nucléicos, já que as fosfatases auxiliam na liberação de parte do P imobilizado.

A atividade de *AtACP5::GUS* de *p23* é mais intensa durante o período no qual a divisão celular já é bem menor, sugerindo que a indução deste

mecanismo de superação da deficiência por P ocorreu tardiamente. Ou seja, no momento da indução de *AtACP5::GUS* a planta estava apenas com níveis críticos de P, impossibilitando que este mecanismo conseguisse reverter a parada no desenvolvimento radical e o processo de morte meristemática. A indução do sistema de resgate deve ocorrer antes, em momento onde a planta ainda possui P suficiente para suas funções até que parte do P imobilizado seja disponibilizado, via ação destas fosfatases.

Essa premissa é suportada pela atividade de *CycB1::GUS*, que demonstra que a divisão celular é praticamente inibida a partir do quarto dia da transferência para os meios deficientes em P. Assim, especula-se que em *p23* haja rápida exaustão da atividade celular no CQ como consequência da deficiência de P, intensificando redução na atividade mitótica e a capacidade de diferenciação de células do entorno do CQ.

Por outro lado, em COL e *p9* é possível observar indução de fosfatases, mesmo que pequena, quando ainda é possível observar considerável divisão celular (Figura 8). Estes dados sugerem que a indução de genes relacionados a fosfatases e nucleases deve ocorrer antes de haver severa redução na divisão celular no meristema para que essa estratégia ainda possa ser efetiva em ajudar a superar a limitação por P. Este padrão verificado em COL, que difere do obtido em *p23*, é válido tanto para a condição de ausência total de P quanto na com suprimento via ácidos nucléicos (Figura 8). Neste sentido, pode-se dizer que a resposta à deficiência de P passa por complexo controle transcricional, cujos mecanismos de ativação e tempo de resposta podem ser as possíveis causas pelas quais *p23* evidencia apresentar falhas nesta comunicação.

Além da atividade de divisão celular no meristema e de gene relacionado à síntese de fosfatases ácidas, ainda checkou-se a cinética de expressão de *QC25::GUS*. Após transferir plantas de COL e *p9* de condição de suficiência de P (1,0 mM) para os meios -P e -P/+RNA, verificou-se que COL mantém atividade mitótica durante todo período de estresse por P, enquanto em *p9* esta atividade já diminui a partir do segundo dia da transferência, independente do meio ao qual é transferido (Figura 9). Neste mutante, a atividade de divisão celular é completamente inibida após o quarto ou quinto dia de limitação por P, enquanto em COL esta se mantém pelo menos até o oitavo dia, independente do grau de deficiência por P. Com isso, a atividade de *QC25::GUS* em COL é consistente com a verificada em *CycB1::GUS* e *AtACP5::GUS*, ao passo que em *p9* há inconsistência entre as observações para *QC25::GUS* e de *AtACP5::GUS*.

Entre as razões dessa inconsistência em *p9* pode estar a seleção equivocada da linhagem de *p9* com gene marcador *QC25::GUS* usada neste experimento. Os dados de *AtACP5::GUS* em princípio são consistentes, pois o mutante apresenta muitas das respostas verificadas em COL. Exemplo disso é a cinética do gene *CycB1::GUS* em *p9* que segundo PINTO (2005) segue o padrão verificado em COL, ou seja, há intensa atividade de divisão celular em ambiente com suprimento de P via ácidos nucléicos aos cinco dias, porém esta diminui muito quando as plantas encontram-se na condição -P.

Além destes aspectos deve-se considerar que a parada total do desenvolvimento radical ocorre obrigatoriamente em momento posterior ao do término da divisão celular, já que após a divisão estas células ainda precisam se alongar antes de ocorrer sua diferenciação propriamente dita. Desta forma,

para estabelecer o verdadeiro padrão de atividade no CQ de *p9* é importante que nos próximos estudos sejam testadas outras linhagens já desenvolvidas entre o mutante e a linhagem com o marcador. Vale salientar, que no presente trabalho foram desenvolvidas várias outras linhagens, que antes de serem adotadas nos experimentos, devem ser analisadas quanto ao grau de homogeneidade e padrão de expressão do gene repórter em todas as plantas.

O reduzido crescimento após transferência para meio -P demonstra que a exaustão da atividade mitótica celular na região meristemática pode ser bastante rápida, corroborando dados de TICCONI *et al.* (2009). Estes autores verificaram comportamento similar no mutante *pdr2*, o qual foi identificado e isolado nas mesmas condições dos mutantes em estudo. Da mesma forma como se verificou rápida exaustão do CQ em *p23* e *p37*, especula-se que em *p9* o comportamento possa ser similar, uma vez que a atividade de *QC25::GUS* verificada neste é similar àquela de *pdr2*. Contudo, novamente dados de PINTO (2005) demonstram que a atividade de divisão celular em *p9* é similar e inclusive superior à verificada em COL, independente da condição de suprimento de P. Por fim, deve-se considerar que além da divisão celular, o crescimento radical se dá via alongamento celular, o qual conforme demonstrado por PINTO (2005), se intensifica à medida que a limitação por P se torna mais intensa. Ou seja, mesmo que tenha havido exaustão do CQ e término da divisão celular por conta da limitação por P, ainda pode estar ocorrendo crescimento celular, porém desta vez devido ao alongamento das células, portanto justificando os dados para *p9*, onde não há mais atividade no CQ, porém foi verificado crescimento continuado sob ausência de atividade no

de divisão celular no CQ, sobretudo nas plantas que foram transferidas para meios com limitação de P.

De posse destes resultados, pode-se dizer que à medida que aumenta o tempo de exposição à deficiência de P e quanto mais severa for a limitação, maior é a redução na divisão celular junto ao meristema radical, especialmente em *p23*, embora isso também ocorra em COL. Considerando os resultados de PINTO (2005) e os obtidos neste trabalho, *p23* e *p37* seguem padrões similares de divisão celular no meristema radical, sendo ambos bastante afetados pela deficiência de P. Para estes dois mutantes é sugerido que a mutação seja relacionada à etapa regulatória, pois não conseguem ativar o sistema de resgate a tempo de ser efetivo para superação da limitação de P, mesmo que haja P não prontamente disponível no ambiente (RNA). Por outro lado, também considerando ambos os trabalhos, *p9* segue o comportamento de COL, assim sendo mais eficiente na ativação do sistema de resgate e, possivelmente no uso do P não prontamente disponível, fornecido via ácidos nucleicos (RNA).

Por fim, embora não mensurada no presente trabalho, ainda deve-se considerar a remobilização interna de P, outra estratégia importante para a planta superar a deficiência nutricional. No caso da limitação por P, a planta recicla P de tecidos mais velhos para tecidos mais novos ou ainda remobiliza parte do P de usos menos essenciais para outros mais relevantes. Em princípio, em nenhum dos mutantes estudados foi verificada maior alocação de recursos no sistema radical em detrimento do desenvolvimento da parte aérea durante o período de estresse por falta de P. Contudo, esta pode ser uma das características a ser avaliada em estudos futuros com os mutantes,

já que como relatado, *p23* e *p37* apresentam intensa emissão de raízes laterais, que pode ser reflexo de re-alocação de fotoassimilados da parte aérea para o sistema radical. Ao analisar a razão parte aérea/raízes, a qual pode ser adotada como medida indireta da alocação, PINTO (2005) não encontrou diferença entre COL e os mutantes em meio -P. Entretanto, a autora verificou que em meio +P, *p37* teve maior razão parte aérea/raízes que COL e *p9*. Outro resultado interessante deste estudo foi que *p9* e *p37* incrementaram esta relação em meio -P/+RNA, o que pode ser inferido no presente trabalho pela comparação das fotografias da parte aérea apresentadas na Figura 1.

Esta complexa rede de processos que governa a resposta da planta à limitação por P ainda não está completamente elucidada. Inicialmente especulava-se que apenas *SCR* (*Scarecrow*) era importante em todo mecanismo de resposta à limitação por P, já que é predominantemente expresso no CQ e, portanto teria papel primordial (DI LAURENZIO *et al.*, 1996; SABATINI *et al.*, 2003). Entretanto, estudos posteriores demonstraram que *SCR* é apenas mais uma das diversas proteínas que atuam nesse intrincado e integrado sistema de resposta vegetal. HELARIUTTA *et al.* (2000) demonstraram que a transcrição de *SHR* (*Short Root*) é restrita aos feixes vasculares, embora a proteína *SHR* se mova para células adjacentes, ativando expressão de *SCR* e, desta forma, controlando a diferenciação da endoderme. Mais recentemente, TICCONI *et al.* (2009) verificaram que *PDR2* (*Phosphate Deficient Response*) ajuda manter a identidade das células tronco vegetais da raiz, as células do centro quiescente, bem como o nível de *SCR* quando as plantas estão em ambiente com P limitante.

Outro aspecto relevante é que PDR2, uma bomba ATP do tipo V com substrato ainda desconhecido, atua conjuntamente com LPR1 (*Low Phosphate Response*), outro mediador e regulador do sistema radical em resposta à limitação por P e que interage geneticamente com PDR2 (TICCONI *et al.*, 2009). Segundo estes autores, LPR1 e PDR2 são proteínas que se localizam no retículo endoplasmático e ainda não está claro como conseguem manter os níveis de SCR no núcleo durante a deficiência de P. Embora não confirmado, há evidências de que isso ocorra via controle de qualidade das proteínas decorrentes deste processo ou da interação destas proteínas com outras, ou seja, teriam papel no processamento e qualidade das proteínas resultantes do retículo endoplasmático.

Além dos efeitos simples da limitação de P na remodelagem da arquitetura radical, ainda deve ser considerada a possibilidade de sua interação com outros nutrientes. A interação P x Fe é uma delas, na qual a deficiência de P e níveis altos de Fe agravam o efeito negativo da interação na redução do desenvolvimento da raiz primária, em favor da emissão de raízes laterais (SÁNCHEZ-CALDERÓN *et al.*, 2005; SVISTOONOFF *et al.*, 2007; WARD *et al.*, 2008). A ocorrência de interações de P com macronutrientes como K e micronutrientes como Zn também foram verificadas em espécies vegetais comerciais (HUANG *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2002).

Por muito tempo, se considerou que o menor desenvolvimento radical do ecótipo COL de *arabidopsis* em condição limitante de P devia-se unicamente à baixa disponibilidade deste nutriente. Nesta condição, haveria reduções no alongamento celular e taxas de divisão celular até exaustão completa das reservas das células do entorno e do próprio centro quiescente,

responsável por coordenar toda organização meristemática celular. Estudos recentes continuam reportando a influência de P, porém que este efeito é primordialmente dependente de outros fatores do ambiente, como toxidez nutricional por Fe e Al (MARSCHNER, 1995), além de evidências consistentes de fontes de N (CHEVALIER *et al.*, 2003), como também verificado no presente estudo, o efeito do amônio.

A relação Fe e P fundamenta-se na disponibilidade de ambos os nutrientes no meio de cultura ou no solo, que ainda pode ser afetada por alterações momentâneas de pH, plausível por exemplo, em ambiente de lavoura de arroz irrigado recém estabelecida, onde logo após o início da irrigação ocorrem expressivos incrementos em termos de pH.

Em condição com baixa disponibilidade de P, o maior efeito inibitório do Fe no desenvolvimento radical deve-se à sua maior disponibilidade relativamente aquele com teores maiores de P. Isto porque nesta situação, há menor formação de quelatos ou precipitados devido à ausência de P no meio de cultura, culminando com mais Fe livre, o qual é passível de absorção pela planta. Além disso, SVISTOONOFF *et al.* (2007) verificaram que mantendo a limitação de P e o nível padrão de Fe (50 μM) o desenvolvimento radical foi aumentando à medida que o pH foi elevado de 5,3 para 6,5. Embora os autores não tenham discutida esta resposta, especula-se também com base nos dados obtidos no presente estudo, de que o melhor desenvolvimento radical com aumento do pH deve-se a maior disponibilidade de nutrientes, entre estes P, e desta forma, menor disponibilidade de Fe. Com isso, SVISTOONOFF *et al.* (2007) demonstraram que alterações no pH são apenas

mais um fator que deve ser considerado durante a interpretação de resultados obtidos em plantas em resposta à limitação por P.

Buscando entender melhor a influência de Fe e da fonte de N amônio na performance dos mutantes sob condições limitantes de P, diversos experimentos foram conduzidos. Como demonstrado nas Tabelas 15 e 16, o crescimento e desenvolvimento radical é influenciado pela condição nutricional à qual a planta está submetida, tanto os mutantes quanto o ecótipo COL.

Em dois estudos de deficiência nutricional, um sob condição de suficiência de P (1,0 mM) e outro sob deficiência deste (-P), verificou-se que o efeito de Fe é mais intenso sob deficiência de P comparativamente a situação com suficiência de P (Tabela 15), como também previamente reportado por SVISTOONOFF *et al.* (2007) e WARD *et al.* (2008). Além disso, também houve resposta distinta entre os genótipos analisados. COL e *p9* apresentaram performance similar àquela obtida por SVISTOONOFF *et al.* (2007) e WARD *et al.* (2008) para o ecótipo COL, enquanto *p23* e *p37* tiveram similar entre si, porém resposta radical bastante distinta daquela dos outros dois genótipos (Tabela 15). Desta forma, sugere-se que além de apresentar sensibilidade distinta à presença de Fe no meio de cultura, a qual é dependente da condição de P, os mutantes em estudo apresentam necessidade distinta de Fe para seu pleno desenvolvimento.

No estudo com suficiência de P, COL e *p9* tiveram redução no CRP de 0 para 10 μ M de Fe-EDTA, enquanto *p23* e *p37* continuaram a incrementar o desenvolvimento radical (Tabela 15). Este comportamento, possivelmente esteja relacionado ao fato de COL e *p9* serem dependentes de níveis mínimos

de Fe para garantir desenvolvimento satisfatório de seu sistema radical, embora o excesso desse seja tóxico. Estas evidências são reforçadas pelos resultados de COL e *p9* sob limitação de P, onde houve incremento no CRP à medida que o nível de Fe foi reduzido.

Resultados de ambos os estudos reforçam hipótese de necessidade de níveis mínimos de Fe, pois mesmo sem adicionar Fe ao meio de cultura há traços deste nutriente nos meios preparados. Este Fe é oriundo de contaminações junto aos demais nutrientes adicionados ao meio de cultura, como verificado em estudo conduzido com o supervisor na UC Davis - Steffen Abel (dados não apresentados). Neste estudo, foi adicionado o quelante 3-(2-pyridyl)-5,6 diphenyl-1,2,4-triazine sulphonate (Ferrozine) ao meio de cultura, o qual em reação com Fe torna a parte do meio analisada rosada, demonstrando quelação do Fe.

Confirmando a hipótese da necessidade de níveis mínimos para COL e *p9* em ambiente +P, está correto o comportamento de ambos, ou seja, menor desenvolvimento radical em ambiente com 0 μM de Fe-EDTA em relação ao de 10 μM de Fe-EDTA sob suprimento de P. Isso se justifica pelo fato de nesta condição (+P) as quantidades mínimas de Fe oriundas de contaminações, possivelmente tenham sido queladas pelo P do meio, tornando-o indisponível à planta. Contudo, na ausência de P, este pequeno teor de Fe já poderia ser suficiente (Tabelas 15 e 16), uma vez que Fe é um micronutriente e, portanto é requerido em apenas pequenas quantidades para desenvolvimento adequado da planta.

Estes estudos com níveis de Fe e suprimentos distintos de P também sugerem que a mutação de *p9* relaciona-se à interação P x Fe, pois em

ambas as condições de limitação de P (ausência de P e suprimento de P via RNA) foi possível observar recuperação do fenótipo radical de COL neste mutante à medida que se diminuiu a quantidade de Fe (Tabelas 15 e 16). A redução de 50 para 10 μM de Fe-EDTA no meio -P foi responsável por incremento de cerca de 9x no CRP de *p9*, enquanto em COL esta recuperação foi apenas próxima a 4x.

Por outro lado, no meio com ácidos nucleicos (-P/+RNA) os maiores incrementos (3,7x) no CRP de *p9* ocorreram de 10 para 0 μM de Fe-EDTA, enquanto nos demais genótipos avaliados os incrementos no CRP foram bem menos expressivos, independente do intervalo de redução do nível de Fe considerado (Tabela 16).

Embora não tenha sido avaliado no presente estudo, SVISTOONOFF *et al.* (2007) demonstraram que a adoção de 10 μM de FeSO_4 ou 10 μM FeCl_2 causam o mesmo efeito no desenvolvimento radical que o de 10 μM de Fe-EDTA. Com isso, os autores demonstraram que o fenótipo radical apresentado em meio com limitação de P deve-se à interação P x Fe, ou seja, ausência de P e presença de Fe, no entanto, sem ter relação com o EDTA.

Por outro lado, em *p23* e *p37* este ajuste radical não ocorre quando se reduz os níveis de Fe, demonstrando que estes dois mutantes não possuem mutação relacionada a Fe. Resultados similares aos obtidos em *p23* e *p37* foram recentemente reportados por TICCONI *et al.* (2009) para o mutante *pdr2*. Neste estudo, os autores demonstraram que apesar de *pdr2* apresentar CRP bastante inferior ao de COL em ambiente com deficiência de P, este fenótipo não se relaciona à presença de Fe tóxico. Interessante neste estudo de TICCONI *et al.* (2009) foi a padronização da quantidade de Fe livre em

todos os níveis de P adotados no experimento, demonstrando que a resposta padrão de *pdr2* ao incremento nos níveis de P não é alterada, apesar dos meios com diferentes níveis de P apresentarem os mesmos teores de Fe livre. Assim, os autores sugerem que o fenótipo radical de *pdr2* em condição limitante de P não é dependente de Fe, portanto diferindo do reportado por SVISTOONOFF *et al.* (2007) para o ecótipo COL e o mutante *lpr1-1* e WARD *et al.* (2008) para os ecótipos COL e LI-0, e do verificado no presente estudo em *p9*.

A adoção de níveis similares de Fe livre em concentrações distintas de P é relevante, pois para uma mesma quantidade de Fe presente no meio de cultura ocorre relação inversa entre a disponibilidade deste e níveis crescentes de P neste meio. Considerando-se o padrão de 50 μM de Fe-EDTA presente nos meios $\frac{1}{2}$ MS e MP e aumentos nos níveis de P de 0 para 1000 μM , respectivamente os níveis extremos de P no estudo de dose resposta à P, a disponibilidade de Fe vai diminuindo com aumento do teor de P. Com isso, os 50 μM de Fe-EDTA iniciais de Fe do meio vão perdendo importância na capacidade de inibir o desenvolvimento radical, pois grande parte deste estará sendo imobilizada junto ao P, à medida que aumenta o teor deste no meio.

Neste sentido, é importante ressaltar que nos estudos conduzidos não foi realizado monitoramento da quantidade de nutrientes que efetivamente estiveram disponíveis para absorção pela planta. Ou seja, em todos os estudos o meio de cultura foi preparado com quantidades padronizadas de cada nutriente, conforme apresentado na Tabela 1, sem ser efetuado ajuste nas quantidades de um nutriente em função da presença maior de outro.

Os resultados dos estudos conduzidos para avaliar a interação P x Fe, confirmam as hipóteses elaboradas anteriormente. Em condição limitante de P, o efeito negativo do Fe no sistema radical é mais intenso que o verificado sob suficiência de P. Em ambiente -P/+RNA, *p9* possui raiz curta em todos os níveis de Fe testados, culminando com incremento de 3,7x no CRP entre 0 e 10 μ M de Fe-EDTA, enquanto nos demais mutantes os incrementos não são significativos. Neste mesmo estudo, entre a condição normal de Fe (50 μ M) e a ausência deste no meio, o CRP de *p9* aumenta mais de 17x, enquanto em COL este incremento é de apenas 2x.

De forma conjunta, os estudos relacionados ao efeito da limitação de P e níveis crescentes de Fe confirmam a hipótese de que *p9* é mutante dependente da interação P x Fe, enquanto *p23* e *p37* apresentam fenótipo radical de mutantes de P, porém independem dos teores de Fe no meio de cultura (Tabelas 15 e 16). Além disso, apesar estudos mais detalhados serem requeridos, há evidências de que a mutação em *p9* tenha papel distinto daquele atribuído à PDR2, pois *p9* e *pdr2* possuem resposta distinta a baixos níveis de Fe.

Além disso, a função distinta de ambos ainda é suportada pelo comportamento diferente destes em meio +P/+RNA, enquanto *p9* apresenta forte inibição no desenvolvimento radical neste meio de cultura (Tabela 8). Por outro lado, deve-se considerar que em níveis intermediários de Fe a resposta em termos de CRP é similar para *p9* e *pdr2*, assim como ocorre quando ambos são crescidos em condição limitante de P, onde o CRP não difere e é bem inferior ao do ecótipo COL (Tabela 15 e dados de *pdr2* de DELATORRE, 2009).

Na continuação do presente trabalho deverá ser previsto o domínio de *software* como o *The Visual Minteq Program* que permita estimar a disponibilidade efetiva dos diferentes nutrientes constituintes do meio de cultura, como por exemplo, a quantidade de Fe e de P livre. Esta ferramenta foi adotada pelos estudos mais recentes que investigaram efeitos de Fe no desenvolvimento radical de *arabidopsis* (WARD *et al.*, 2008) e de atribuição da função à *pdr2* (TICCONI *et al.*, 2009).

Da mesma forma, sugere-se que o estudo de dose resposta à P seja reconduzido, porém desta vez observando a estratégia adotada por TICCONI *et al.* (2009) Ou seja, obter o mesmo nível de Fe livre nos diferentes teores de P presente no meio de cultura. Espera-se que com esta medida, seja confirmada novamente que *p9* é mutante de P, porém seu fenótipo radical extremo sob limitação de P é intensificado pela toxidez de Fe, a exemplo do que ocorre com COL, porém não com os mutantes *p23*, *p37*, *pdr1* e *pdr2*.

Outro aspecto relevante observado no presente trabalho foi o efeito do N. Como já previamente discutido, o nível de N do meio $\frac{1}{2}$ MS é mais de 3x àquele do meio MP, além de apresentar fonte distinta de N (Tabela 1). O meio $\frac{1}{2}$ MS possui $\frac{1}{3}$ de seu N fornecido via amônio, quantidade correspondente ao total de N fornecido pelo meio MP na forma de nitrato, enquanto os demais $\frac{2}{3}$ são supridos na forma de nitrato. Estas variações na quantidade de N e nas fontes adotadas geram alterações consideráveis no CRP dos mutantes e de COL.

Por conta destas variações, conduziram-se estudos para entender melhor de que forma os resultados de desenvolvimento radical sob limitação de P poderiam ser afetados pelos níveis e fontes de N ou ainda pela interação

de P x N e Fe. Na primeira parte dos estudos relacionados às fontes e níveis de N em ambiente com suficiência de P (1,0 mM), verificou-se variação expressiva entre níveis de N utilizados para o mesmo fenótipo e, também resposta distinta entre fontes e mesmo nível de N entre os genótipos (Tabela 17 e 18 e Figura 13).

De modo geral, o uso de duas fontes de N nos meios de cultura, em condição de suficiência de P (+P= 1,0 mM), demonstra que o desenvolvimento radical de COL e dos mutantes foi beneficiado pelo nitrato de potássio como fonte de N relativamente ao sulfato de amônio (Tabelas 17 e 18 e Figura 13). Sob nitrato de potássio como fonte de N, o incremento no CRP entre os níveis extremos de N foi de 3x em COL, 4x em *p9*, 0,8x em *p23* e *p37*, enquanto no meio com sulfato de amônio esta resposta foi de 2,1x em COL, 1,3x em *p9*, 0,5x em *p23* e 0,6x em *p37*. Este comportamento reforça premissa inicial de que a presença exclusiva de amônio no meio de cultura, relativamente à presença única de nitrato, tem efeito negativo no desenvolvimento do sistema radical dos mutantes e também de COL, cujo efeito entre os mutantes é mais intenso em *p9* (Tabela 17 e Figura 13).

Embora não tenha sido avaliado na presente tese, WANG *et al.* (2000; 2007) demonstraram que a presença de níveis elevados de amônio causa alterações expressivas em mais de uma centena de genes. Ainda segundo os autores, a maioria destes genes está localizada nas raízes e seus produtos atuam em variadas funções no desenvolvimento da planta. Segundo WANG *et al.* (2007) níveis de amônio como 20 mM podem suprimir a expressão de diversos genes induzidos por nitrato, evidenciando que pode ocorrer

antagonismo entre a presença de amônio e a expressão de genes relativos ao nitrato.

Além disso, ao contrário de outros autores como DELATORRE (2009), no presente trabalho não se verificou morte de plantas pela presença de fontes únicas de N, mesmo nos maiores níveis de suprimento de cada fonte (10000 μM), independente do genótipo considerado. Este fato, possivelmente esteja relacionado ao curto período que as plantas permanecem em cada meio de cultura, que na maioria das avaliações realizadas foi de oito dias. Acredita-se, que em períodos maiores de crescimento, especialmente em condição de suprimento único de N via amônio, de fato possa ocorrer morte de plantas.

Como esperado, o amônio foi mais prejudicial ao desenvolvimento radical dos genótipos, uma vez que essa fonte é capaz de causar forte inibição no desenvolvimento radical quando é a única forma de suplementação de N do meio. Segundo MAYNARD & BARKER (1969) e MARSCHNER (1995) este efeito na raiz deve-se ao fato da absorção do amônio causar acidificação do meio externo da célula devido ao transporte antiporte de H^+ .

Considerando estes aspectos, levantou-se a hipótese de que esta resposta a amônio relacione-se a alterações no pH do meio de cultura, reduzindo-o e, desta forma, haver efeito indireto do amônio no sistema radical, de modo que não é o amônio *per se* o causador do efeito negativo em *arabidopsis*, mas sim a alteração no pH. Além disso, como discutido previamente, esta alteração no pH do meio pode também mudar a

disponibilidade de diversos nutrientes, como por exemplo de P, e desta forma, contribuir para o rearranjo da arquitetura radical.

No presente trabalho, entretanto durante o preparo dos meios de cultura o pH sempre foi ajustado para 5,5 em todos os tratamentos e em todos os estudos conduzidos, ainda adicionando-se MES como tamponante para evitar possíveis flutuações de pH pela absorção de íons. Embora não tenha sido feita avaliação neste sentido, acredita-se que mesmo com este ajuste de pH, ainda assim possa ter ocorrida pequena variação neste, porém dentro de limites aceitáveis.

As alterações de pH podem ocorrer porque ao utilizar fontes de N como nitrato de amônio, o amônio pode ser re-convertido a nitrato via nitrificação, em cujo processo há liberação de prótons. Apesar da importância e necessidade da nitrificação durante o ciclo do N, deve-se lembrar que nas condições de estudo adotadas, placas de petri estéreis e meio autoclavado, esse processo não ocorre. Isso porque é dependente de bactérias, as quais são eliminadas por ocasião da autoclavagem do meio de cultura, além de não conseguirem transpor a fita adesiva adotada para fechar as placas.

Entretanto, acredita-se que os prótons liberados ao meio externo da planta durante a absorção de amônio podem reduzir o pH neste ambiente e, desta forma aumentar a disponibilidade de Fe, que em níveis tóxicos prejudica o desenvolvimento radical de arabidopsis e leva interpretações errôneas de resposta de plantas à limitação por P. No presente trabalho, a fonte de N mais comumente usada nos estudos foi nitrato de potássio, que não apresenta este problema potencial de alteração do pH. Entretanto, em alguns estudos adotou-se nitrato de amônio para averiguar a importância da interação P, N e

Fe, sendo realizada a devida ressalva e, passível de ter ocorrido este efeito de alteração de pH. Para confirmar estas hipóteses, na seqüência deste trabalho podem ser adotadas estratégias de mensuração do pH, sugerindo-se o método da *ferrosine* citado anteriormente ou outro método colorimétrico que dê indicativo rápido e preciso de pH.

Entre as estratégias para aliviar o efeito negativo causado pelo amônio no desenvolvimento radical de plantas CAO *et al.* (1993) e MARSCHNER (1995) sugerem o suprimento de pelo menos 10% do N na forma de nitrato. Segundo estes autores, muitas plantas apresentam performance melhorada quando são supridas pela mistura de amônio e nitrato, possivelmente porque a absorção de nitrato reduz a quantidade de prótons na rizosfera oriundos da absorção do amônio. Além disso, a redução do nitrato para nitrito na célula, através da nitrato redutase, produz hidroxilas que ajudam na neutralização dos prótons H^+ gerados durante a absorção de amônio. Também há evidências de que a adição de cátions como potássio pode ajudar a diminuir os efeitos tóxicos do amônio no desenvolvimento radical, embora ainda não esteja claro como isso ocorre (WANG *et al.*, 2007).

Outro resultado relevante nestes estudos de dose resposta à N e a fontes deste nutriente é que diferente de *p9* e com exceção da testemunha (0 μM de N), os mutantes *p23* e *p37* apresentaram raízes mais curtas que as de COL, independente da fonte de N. Ainda diferente de COL e de *p9*, para *p23* e *p37*, a fonte de N presente no meio praticamente não afeta arquitetura da raiz primária (Tabelas 17 e 18 e Figura 13), sugerindo que eventuais alterações de pH oriundas da absorção de amônio pelas raízes destes mutantes não são prejudiciais ao seu desenvolvimento. Apesar disto, e considerando-se

especialmente o tratamento sem N, há evidências de que a mutação em *p23* e *p37* também se relaciona à N, a exemplo do que ocorre em *pdr1*, isolado no mesmo *screening* por DELATORRE (2009), enquanto a de *p9* não é afetada por N. Esta evidência está suportada no resgate integral do fenótipo radical de COL nos mutantes *p23* e *p37* quando crescidos na ausência de N, o que não ocorre em *p9*.

Resultados dos estudos apresentados anteriormente demonstram que os mutantes *p9*, *p23* e *p37* são responsivos a P, portanto são mutantes de P (Tabelas 8 e 9), como também reportado por PINTO (2005) e por DELATORRE (2009). Além do efeito de P, há interação com outros nutrientes, como por exemplo, com Fe em *p9* e com N em *p23* e *p37*. Outros mutantes isolados nesta mesma seleção, *pdr1* e *pdr2*, também demonstram evidências da ocorrência de interação como reportado por DELATORRE (2009) em *pdr1* e em estudos com *pdr2* acompanhados na UCDavis.

Evidências destes estudos, juntamente com os dados de SVISTOONOFF *et al.* (2007) e WARD *et al.* (2008) no ecótipo COL e os resultados previamente apresentados no presente trabalho, reforçam a necessidade de se investigar em mais detalhes os efeitos destas interações no desenvolvimento radical dos mutantes *p9*, *p23* e *p37* e não apenas o efeito isolado da deficiência por P. Além dos estudos previamente sugeridos, deve-se prever a condução de experimentos com alterações no pH do meio, mantendo-se constante o nível de P e Fe e também a relação entre eles e em outro utilizando níveis variados destes dois nutrientes.

O efeito de fontes de N na performance dos mutantes, independente do nível de N considerado, levantou dúvidas se este também poderia alterar a

resposta aos níveis de Fe em ambiente com limitação de P. Isto porque ao ocorrer redução de pH, evento plausível durante absorção de amônio como previamente reportado, pode haver solubilização de parte do Fe quelado, potencializando seu efeito tóxico nas raízes dos genótipos em estudo, especialmente em *p9*. Baseado nestes aspectos e nos resultados obtidos no estudo de interações P x N e de P x Fe, conduziram-se estudos com e sem suprimento de P, níveis crescentes de Fe e ainda com ou sem fornecimento de N, ou seja, experimento considerando a interação P x N x Fe (Tabelas 19, 20, 21, 22 e 23).

Embora conduzidos separadamente, em ambas as situações de P, o CRP variou com o genótipo, fonte de N e nível de N adotado (Tabelas 19 e 20). Em ambos os suprimentos de P, os resultados demonstram que o desenvolvimento radical dos mutantes foi distinto daquele de COL. Também verificaram-se diferenças no comportamento dos mutantes, com *p9* apresentando CRP maior que o de *p23* e *p37*. Com suprimento de P e sob nitrato de amônio, *p23* e *p37* tiveram CRP similar, enquanto com adoção de nitrato de potássio *p37* teve raízes mais longas que *p23*, independente da condição de Fe (Tabela 19). De modo geral, nos tratamentos com presença de Fe no meio de cultura (10, 50 e 100 μ M na forma de Fe-EDTA) os quatro genótipos foram beneficiados pela presença do nitrato de potássio relativamente ao nitrato de amônio (Tabela 20).

Diferindo do comportamento verificado em condição com suficiência de P, sob ausência de P e em ambas as fontes de N houve incremento no CRP quando o nível de Fe foi reduzido (Tabela 21), independente do genótipo. Entretanto, os menores efeitos de Fe foram observados sob nitrato de

potássio em todos os genótipos, evidenciando novamente que o amônio também afeta esta resposta em arabidopsis. Com isso, neste estudo volta-se a confirmar que Fe é um dos responsáveis pelo menor desenvolvimento radical em arabidopsis sob condição -P, sendo entretanto, este efeito ainda dependente da fonte de N adotada. Também cabe salientar que nos quatro genótipos, níveis de 10 μM ou 0 μM de Fe-EDTA permitiram maior CRP em relação à 50 μM de Fe-EDTA (nível tradicional). Este resultado também confirma evidências apresentadas na Tabela 15, onde apesar do Fe apresentar potencial para se tornar tóxico à planta, este elemento também é necessário ao desenvolvimento adequado da planta, porém em níveis reduzidos (Tabela 21).

Por fim, os dados reunidos destes estudos de interação P x Fe e fonte de N demonstram novamente que *p9* apresenta mutação relacionada a Fe, cujos efeitos negativos no sistema radical podem ser intensificados dependendo da fonte de N. O efeito de Fe em *p23* e *p37* é bem menos evidente que o verificado em *p9*, independente da fonte de N, apesar de ambos incrementarem o comprimento da raiz nos menores níveis de Fe, como pode ser verificado na condição nitrato de potássio (Tabela 19). Apesar dessa resposta em *p23* e *p37*, em nenhuma das condições da interação P x Fe x fonte de N foi possível obter recuperação total do fenótipo de COL nestes mutantes, comprovando que a mutação destes mutantes não está relacionada aos níveis de Fe (Tabelas 19, 20, 21 e 22).

A diferença fundamental entre o comportamento dos três mutantes é que a redução dos níveis de Fe no meio permite restabelecer completamente o fenótipo radical de COL em *p9* quando em ambiente limitado em P. Por

outro lado, em *p23* e *p37* este resgate é apenas parcial, em geral entre 20 e 40%. Com isso, a mutação de *p23* e *p37* não está relacionada à Fe, porém há resgate de fenótipo interessante ao manejar os níveis de P e N.

Baseado nestes aspectos, nestes dois mutantes, *p23* e *p37* foi levantada a hipótese de que suas mutações relacionam-se à interação P x N, porém não dependente de Fe. Esta premissa fundamenta-se nos resultados obtidos nos estudos de dose resposta à N, especialmente sob ausência de N, onde *p23* e *p37* tiveram desenvolvimento radical similar ao de COL (Tabelas 17 e 18 e Figura 13).

Para confirmar ou rejeitar esta hipótese, dois experimentos foram conduzidos, um com e outro sem suprimento de P, sendo em cada um testados quatro níveis de Fe (0, 10, 50 e 100 μ M na forma de Fe-EDTA) e quatro mutantes (*p9*, *p23*, *p37* e *pdr1*), além de COL. Ambos os estudos foram conduzidos em ambiente sem suprimento de N. Adoção do mutante *pdr1* deu-se por ter sido caracterizado por DELATORRE (2009) como responsivo à interação P x N, neste caso usado como testemunha.

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a hipótese estabelecida, pois sob deficiência de P o CRP de *p23* e *p37*, assim como o da testemunha *pdr1* foram similares aos verificados em COL, independente do teor de Fe presente no meio de cultura (Tabela 23). Como esperado, na condição com suficiência de P (1,0 mM), estes três mutantes apresentaram CRP inferior ao de COL em todas as condições de suprimento de Fe (10, 50 e 100 μ M de Fe-EDTA), porém ainda assim, em geral o CRP destes foi maior que o obtido em *p9* (Tabela 23). Considerando estes efeitos e ainda os resultados relatados em estudos prévios (Tabelas 17, 18, 21, 22 e 23) há evidências concretas de

que *p23* e *p37* conseguem restaurar o fenótipo radical de COL quando há supressão do fornecimento de N. Desta forma, confirma-se que *p23* e *p37* são mutantes responsivos à interação P x N, independente do teor de Fe do meio de cultura.

Mesmo com estas evidências para o desempenho de *p23* e *p37* em resposta à P e N, ainda conduziu-se estudos visando reforçar os resultados descritos acima. Desta vez, optou-se por fazer transferência de plantas de condição normal de suprimento de nutrientes para outra com limitação por P ou por N ou ainda de ambas.

A performance dos genótipos nesta primeira etapa, primeiros cinco dias de crescimento, propiciaram resultados interessantes. Sempre que houve suprimento de N, o CRP dos mutantes foi menor que o de COL, independente da condição de suprimento de P (Tabela 25 e Figura 14). Por outro lado, quando N foi omitido do meio de cultura não houve diferença no CRP de COL, *p23* e *p37*, os quais inclusive apresentaram CRP maior que o da testemunha *pdr1*, independente da condição de P (Tabela 25 e Figuras 15 e 16). Estes dados reforçam a capacidade de *p23* e *p37* recuperarem o fenótipo radical de COL em ambiente sem suprimento de N, enquanto na presença de N no meio, estes mutantes apresentam raiz constitutivamente mais curta que a de COL, independente da condição de P.

Por outro lado, os resultados de recrescimento radical das plantas oriundos de condição normal (+P+N) e transferidos para outra com alguma limitação (+P-N e -P-N) e vice-versa, variaram em função da condição de meio inicial e final. A transferência de ambiente +P+N para outra com ou sem suprimento de P, porém com ausência de N (+P-N e -P-N), não permitiu

restabelecimento do fenótipo radical de COL nos mutantes *p23* e *p37*. Isso poderia ser explicado considerando que a resposta tenha um componente relacionado ao *status* de N na planta, não se limitando apenas ao conteúdo local externo, como reportado para P. Assim, a passagem anterior por meio +N teria efeito no crescimento posterior da raiz primária em meio -N, devido ao N acumulado na planta.

Entretanto, um aspecto interessante nesta condição é que os mutantes apresentaram emissão de maior número de raízes laterais e, especialmente raízes laterais mais longas relativamente às de COL (Tabela 26). Embora não tenha sido analisado no presente trabalho, especula-se que na primeira etapa de crescimento o meristema da raiz primária tenha sido severamente afetado e inclusive pode ter ocorrido exaustão das reservas em razão da presença de N, que deve ter inibido as divisões celulares junto ao centro quiescente de *p23* e *p37*. Entretanto, após transferência para meio sem N, algum sinal percebido pela raiz foi responsável pela indução desse elevado número de raízes secundárias, cuja atividade mitótica inclusive deve ser bastante intensa, já que estas raízes apresentaram comprimento médio superior a 3x o obtido em COL (Tabela 26). Estudos futuros com estes mutantes e em estratégias de abordagem similares devem prever análise da atividade mitótica, por exemplo, através do uso de genes marcadores com *Cyc::B1::GUS* como adotado em alguns estudos aqui apresentados.

Por fim, para reforçar ainda mais a ocorrência de interação P x N em *p23* e *p37*, além da já conhecida em *pdr1*, foram obtidos os resultados da transferência de plantas de ambiente +P-N para as três condições de P, porém com suprimento de N. Neste estudo, houve restabelecimento completo

do fenótipo radical de COL nos mutantes *p23* e *p37* e parcialmente em *pdr1*. Esta constatação ocorreu tanto através do comprimento quanto pelo número de raízes laterais, sobretudo na condição com suprimento de P (Tabela 29).

Estes dados de transferência de plantas de ambiente limitante em N para outro com suprimento de N, independente da condição de P, resultaram em performance semelhante àquela obtida por SVISTOONOFF *et al.* (2007) para P. Estes autores propuseram que apenas o contato da ponta da raiz primária com meio de cultura sem suprimento de P já é suficiente para reprogramar a arquitetura radical de *arabidopsis*, sendo portanto, desnecessário período maior de estresse por limitação nutricional para que a planta inicie o processo de superação da limitação nutricional.

Os dados dos experimentos de transferência de plantas entre meios de cultura obtidos em COL, *p23* e *p37* vão ao mesmo caminho, pois a experiência prévia com ambiente deficiente em N, seja com ou sem deficiência por P, resultou em reprogramação de toda arquitetura radical. Como demonstrado, nesta condição o desenvolvimento radical foi restabelecido, especialmente pela indução de novas raízes, as quais permitiram melhor exploração do ambiente, já que seu comprimento foi bastante superior ao verificado na condição inicial de crescimento.

Outro aspecto importante a ser considerado durante a caracterização de mutantes é a eventual influência de reguladores de crescimento no desenvolvimento de plantas, tema abordado e conhecido por longo tempo. No presente estudo esta etapa foi importante porque a mutação foi causada através de mutagênese química (método EMS), no qual a mutação ocorre de forma aleatória no genoma da planta. Desta forma, é possível que o gene

mutado possa relacionar-se a defeitos em algum componente relacionado à síntese de hormônios. Além disso, diversos grupos de pesquisa encontraram relação entre alterações na regulação hormonal e o desenvolvimento radical de *arabidopsis* em ambiente sem suprimento de P.

De modo geral, alterações na morfologia e desenvolvimento radical durante a deficiência por P são proporcionais às concentrações de auxinas, citocininas, etileno e giberelinas (CASSON & LINDSEY, 2003). Entre as respostas típicas de plantas à falta de P está alteração da relação da massa de raízes pela da parte aérea (BORCH *et al.*, 1999; HERMANS *et al.*, 2006), a qual é fortemente influenciada pelo balanço hormonal na planta. Essa resposta resulta da alocação de maior quantidade de fotoassimilados junto às raízes (HERMANS *et al.*, 2006), atribuída à necessidade da planta expandir este para conseguir aumentar o volume de solo explorado e, assim, potencialmente incrementar a absorção de P. Com essa estratégia, maior emissão de raízes laterais por exemplo, pode haver desenvolvimento de raízes novas em sítios com maior concentração de P, favorecendo a absorção de P e, inclusive eventual acúmulo na planta, para uso em momento futuro de deficiência de P.

Para investigar se parte do fenótipo radical dos mutantes em condição de limitação de P é causada por falhas na síntese de hormônios, lançou-se mão de estudos com níveis crescentes de auxinas e citocininas no meio de cultura, os quais segundo outros autores são os dois hormônios freqüentemente relacionados com resposta à limitação por P.

Os hormônios foram aplicados em condição de suprimento adequado e deficiente de P (+P, -P/+RNA e -P) e ainda, no caso de citocininas, para

condição com e sem presença de N (+N e -N) no meio de cultura. Com estas condições de meio de cultura, adotadas nos estudos previamente apresentados e discutidos, é possível isolar o efeito de cada nível hormonal testado, concluindo-se quanto à sua contribuição ou não para o menor desenvolvimento verificado nos mutantes em resposta à deficiência de P. Esta estratégia tem possibilitado a investigação da capacidade de mutantes de resgatar o fenótipo radical ou ainda simular fenótipos de plantas deficientes em P, evidenciando a forma como os hormônios podem afetar e modular o rearranjo da arquitetura radical em resposta a deficiência de P.

Os resultados obtidos nos estudos com presença de auxinas no meio de cultura em condição limitante de P demonstram que em COL e *p9* há incremento expressivo no CRP entre o tratamento controle (sem auxinas) e o com menor nível de auxinas (10^{-10} M). Sob níveis baixos de auxinas no meio (10^{-10} e 10^{-9} M) o CRP de *p9* foi de 65 e 77% daquele de COL, enquanto na ausência de auxinas o CRP foi de apenas 32% do obtido em COL. Além disso, o CRP de *p9* em 10^{-10} M equivale-se ao CRP de COL no controle. Nestas mesmas condições de P, *p23* e *p37* apresentaram desenvolvimento radical constante em todos os níveis de auxinas.

Em relação aos estudos com citocininas, na condição +P+N, a relação entre o CRP dos níveis extremos de citocininas foi superior à 26x em COL e de 29x em *p9*, enquanto em *p23* e *p37* essa relação é de apenas cerca de 9x. Por sua vez em condição de suprimento de P, porém ausência de N, COL e *p9* tiveram melhor desenvolvimento radical no menor nível com presença de citocininas (10^{-8} M), enquanto em *p23* e *p37* isso ocorreu no controle. Nos demais níveis de citocininas, conforme esperado, para todos os genótipos

verificou-se redução gradual no CRP com aumento nos níveis de citocininas (Tabela 32). Estes dados corroboram os de LOPEZ-BÚCIO *et al.* (2002), que verificaram que o fornecimento de citocininas em plantas inibe a formação de raízes laterais. Essa resposta, inibição do desenvolvimento radical, ocorre em condições com e sem limitação por P, portanto sendo típica do efeito hormonal e independente do grau de deficiência ou de suficiência nutricional por P.

Nos experimentos onde se adotou níveis crescentes de citocininas em meio com suprimento de P via ácidos nucleicos (RNA) (Tabela 33) os resultados foram similares aos da condição de suficiência de P (+P), independente da condição de N (Tabela 32). O meio -P/+RNA-N causou severa inibição no CRP em COL e *p9*, sendo o fenótipo radical parcialmente resgatado pela adição de baixos níveis de citocininas (10^{-8} e 10^{-7} M), porém somente na condição sem suprimento de N. Por outro lado, estes mesmos efeitos de citocininas não foram verificados em *p23* e *p37* (Tabela 33). Esses dados voltam a sugerir que o menor desenvolvimento radical de *p9* que ocorre sob ausência de P e de N relaciona-se a defeitos na produção de citocininas, enquanto em *p23* e *p37* há evidências da síntese normal deste hormônio, independente da condição de N. Porém, não se descarta alterações na sensibilidade a este hormônio, especialmente em *p23*.

Conjuntamente, os resultados obtidos em *p9* sugerem que seu fenótipo radical distinto de COL em condição limitante de P esteja relacionado a deficiências parciais na síntese e/ou percepção de auxinas e ainda de citocininas, porém esta última apenas na ausência de N. Como esperado, sob deficiência de P, *p9* conseguiu melhorar seu desenvolvimento radical quando

se adicionou baixos níveis destes dois hormônios, permitindo restabelecer parcialmente o fenótipo radical de COL neste mutante. Neste sentido, sugere-se que o fenótipo de raiz curta de *p9* em meio -P é também parcialmente causado por defeitos na síntese de auxinas e citocininas, embora estudos mais conclusivos sejam requeridos. Ou seja, além do fenótipo radical de *p9* em meio com deficiência de P ser governado pela interação P x Fe como previamente reportado, o desenvolvimento radical de *p9* também é influenciado por defeitos na síntese e/ou percepção de auxinas e de citocininas. Neste sentido, os dados de *p9* corroboram outros estudos de que as auxinas e citocininas são modulares importantes da arquitetura radical em resposta à limitação por P.

Em estudos posteriores com os mutantes *p9*, *p23* e *p37* também devem ser previstos experimentos para avaliar a atividade de divisão celular junto aos meristemas de raízes primárias e de laterais, assim como a atividade das células do CQ. Estes estudos são suportados por observações de SCHIEFELBEIN (2000), que verificou que auxinas controlam a densidade de pêlos radicais e a alongação das células da ponta da raiz. Com isso, especula-se que as auxinas atuariam também nas células do CQ na região meristemática radicular, uma vez que seu fluxo é descendente. Segundo KEIFFER *et al.* (2009) e WOLTERS & JÜRGENS (2009), esse transporte de auxinas se dá especialmente pelas proteínas PIN, as quais se localizam nas membranas celulares e permitem o fluxo intercelular. O ácido indol acético (AIA) forma naturalmente predominante de auxina na planta, se move através dos tecidos vasculares centrais até o nicho das células tronco vegetais - centro quiescente, junto ao meristema radical, a qual é considerada a região

da planta onde ocorre a maior concentração de auxinas e, portanto, a de maior resposta a este hormônio (KEIFFER *et al.*, 2009; WOLTERS & JÜRGENS, 2009).

A partir do CQ, as auxinas são redistribuídas lateralmente pelo envoltório da raiz e via epiderme, cujo fluxo passa a ser ascendente. Ainda na ponta da raiz, o gradiente de concentração próximo-distal de auxinas é acompanhado por um gradiente na atividade de PLETHORA (PLT) (WOLTERS & JÜRGENS, 2009). As proteínas resultantes dos quatro genes de PLT promovem a iniciação das células tronco, ajudam a manter na região distal o estado das células, ajudam na divisão celular e retardam a diferenciação celular na região proximal (GALINHA *et al.*, 2007). Além disso, as proteínas PLT são requeridas para expressar múltiplos transportadores de auxinas PIN, indicando que parte de suas respostas envolvem um *feedback* positivo, promovendo o gradiente de auxinas na ponta da raiz e, desta forma, sua expressão (PLT) (KEIFFER *et al.*, 2009; WOLTERS & JÜRGENS, 2009).

Além das auxinas, o etileno, normalmente considerado hormônio de resposta a estresses, também é importante na regulação da atividade celular no CQ, por auxiliar na regulação da atividade do meristema radical, definindo qual tipo de célula deve ser formada em resposta à limitação nutricional (ORTEGA-MARTÍNEZ *et al.*, 2007). Além do envolvimento na regulação no CQ, o etileno também tem efeito na extensão das raízes primárias, possivelmente via alongação celular, e na emissão e expansão de raízes laterais (BORCH *et al.*, 1999).

Em razão da relação existente entre deficiência por P e reorganização do CQ, especula-se que o etileno atue nesta reorganização, a exemplo do que

possivelmente ocorre com auxinas, já que há estímulo para síntese de etileno, cujos níveis são maiores em raízes sob deficiência de P. Apesar destas evidências, ainda não há dados consistentes sobre a concentração de auxinas nas raízes com limitação de P, aspecto que segundo WERNER & SCHMÜLLING (2009) é relevante para elucidar melhor o papel destas na alteração da arquitetura radical, típica de condição limitante em P.

No presente estudo não foram realizadas avaliações relacionadas ao efeito do etileno na arquitetura radical dos mutantes em condição limitante de P. Entretanto, estudos seqüenciais possivelmente devem prever estas análises, pois há evidências de que pelo menos em *p23* e *p37* há exaustão rápida do CQ durante a limitação por P, a qual pode ser modulada por defeitos na síntese deste hormônio.

Por outro lado, não está claro como etileno auxilia na modulação do crescimento das raízes laterais, mas há evidências de que sua importância esteja relacionada a auxinas, que estimulam sua síntese, ou seja, ambos atuariam em conjunto na morfologia de raízes laterais (CASSON & LINDSEY, 2003), cujo mecanismo de ação precisa ser melhor elucidado.

As expressivas alterações na arquitetura radical em resposta à deficiência de P, em termos hormonais, são principalmente reguladas pelas auxinas LOPEZ-BÚCIO *et al.* (2002), AL-GHAZI *et al.* (2003) e JAIN *et al.* (2007). Ainda segundo LOPEZ-BÚCIO *et al.* (2002) e JAIN *et al.* (2007) em termos de emissão de raízes laterais, plantas sob deficiência de P são mais responsivas à presença de auxinas no meio de cultura relativamente àquelas plantas com suprimento adequado de P. Apesar destas evidências da importância de auxinas como estratégia para superar a limitação por P, no

presente estudo apenas se constatou resgate parcial de um dos mutantes, *p9* quando se incrementou os níveis de auxinas em meio sem suprimento de P.

Outra resposta importante de *arabidopsis* a auxinas refere-se ao estímulo à emissão de raízes laterais. Estudos conduzidos por LOPEZ-BÚCIO *et al.* (2002), AL-GHAZI *et al.* (2003) e JAIN *et al.* (2007) demonstram que o suprimento de auxinas em meio de cultura contendo P estimula o desenvolvimento de raízes laterais de forma similar ao observado em plantas deficientes em P, sugerindo que as auxinas são importantes reguladores da morfologia da raiz durante as respostas à deficiência por P.

Considerando estas evidências do papel de auxinas no rearranjo da arquitetura radical de *arabidopsis*, os dados do presente estudo para *p23* e *p37*, mutantes que demonstram apresentar descontrole na emissão de raízes laterais, sobretudo quando transferidos para ambiente com limitação de P ou N, não suportam que seu genótipo radical em ambiente -P seja parcialmente causado por defeitos na síntese de auxinas. Isso se justifica pelo fato de que ao suprir auxinas no meio de cultura destes dois mutantes não foi verificado incremento na emissão de raízes laterais. Assim, o maior número de raízes laterais verificado em ambiente sem suprimento de P e/ou N relativamente à COL não é reflexo de defeitos na síntese de auxinas, como poderia ser especulado.

Apesar de todas estas evidências do efeito de citocininas e auxinas no desenvolvimento radical sob condição limitante de P, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que *p23* e *p37* são mutantes pouco sensíveis e pouco responsivos à presença de auxinas ou citocininas no meio de cultura, independente da condição de suprimento de P ou de N. Os comportamentos

de *p23* e *p37* em resposta, especialmente a citocininas não eram esperados, uma vez que ambos foram caracterizados nesta tese como mutantes da interação P x N. Por conta desta interação, esperava-se que houvesse efeito de P x citocininas x suprimento de N, o que não ocorre.

Nestes dois mutantes, não foi possível verificar resgate do fenótipo de COL, independente do nível de auxinas, citocininas e do suprimento de P, reforçando a não relação de suas mutações com deficiências na síntese de auxinas e citocininas. Com isso, a resposta constitutiva de *p23* e *p37* apresentarem menor desenvolvimento radical em relação ao de COL, independente da condição de suprimento de P, não se relaciona com defeitos na síntese destes dois hormônios. Assim, conclui-se que a mutação de cada um destes dois mutantes não afeta a rota de síntese de auxinas ou citocininas em resposta à limitação por P.

Entretanto vale lembrar que LOPEZ-BÚCIO *et al.* (2005) demonstraram que o menor desenvolvimento da raiz primária em condição limitante de P, a exemplo do que também ocorre em *p23* e *p37*, é independente do transporte apolar de auxinas. Além disso, estes autores verificaram que a maior emissão de raízes laterais, também amplamente caracterizada no presente trabalho para estes dois mutantes, é mediada por processo dependente da síntese de auxinas. Apesar destes resultados de LOPEZ-BÚCIO *et al.* (2005) ainda assim se sugere que a mutação de *p23* e *p37* seja independente da regulação hormonal por auxinas, uma vez que não se verificou resgate de fenótipo de COL nestes mutantes.

Apesar dos dados obtidos para *p23* e *p37* em resposta à citocininas, é importante considerar que em condição limitante de P, os níveis de citocininas

diminuem nas raízes (KUIPER *et al.*, 1988), cujos níveis podem atuar como inibidores do desenvolvimento radical. Desta forma, citocininas podem ser repressoras da expansão do sistema radical induzido por P (MARTIN *et al.*, 2000). Além disso, a aplicação de níveis externos de citocininas, no meio de cultura, causa repressão da indução de diversos genes relacionados à resposta à limitação por P (MARTIN *et al.*, 2000). Com isso, há descompasso entre a ativação do sistema de resgate à P e a necessidade da planta absorver P, como poderia ser sugerido para *p23* e *p37* que possuem elevada emissão de raízes laterais em condição limitante de P.

Por fim ainda deve-se considerar dois aspectos. O primeiro relaciona-se ao antagonismo entre auxinas e citocininas em termos de função no desenvolvimento da planta. Exemplo clássico deste efeito ocorre na ponta da raiz, onde altas concentrações de auxinas promovem a manutenção do centro quiescente e proliferação celular, enquanto altos níveis de citocininas promovem a diferenciação celular. Outro aspecto é o estudo de SÉQUÉLA *et al.* (2008), os quais evidenciaram que citocininas ajudam na regulação da absorção de Fe do meio. Este mecanismo regulatório ainda não está completamente elucidado, porém especula-se que o efeito das citocininas ocorra com intuito de adequar suprimento de Fe de acordo com a necessidade da planta, entretanto, sem causar toxidez à planta ou acúmulo excessivo nos compartimentos celulares.

Outra etapa importante no estudo de mutantes é estabelecer a função do gene mutado e de que forma seus produtos afetam processos regulatórios ou estruturais na planta. Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, ainda não se conhece bem a regulação genética em torno das modificações na

arquitetura radical em ambiente com deficiência de P. Para diversas etapas regulatórias e estruturais relacionadas a respostas à limitação por nutrientes têm sido isolados e caracterizados mutantes em *arabidopsis*. Entretanto, nenhum mutante foi até o momento isolado especificamente relacionado à regulação de respostas genéticas à falta de P.

Para entender melhor a resposta contrastante no desenvolvimento radical de *arabidopsis* em ambiente com e sem suprimento de P, REYMOND *et al.* (2006), fizeram o mapeamento de QTL (*quantitative trait loci*). Para tal, adotaram linhagens recombinantes entre os ecótipos Bay-0 e Shahdara, cujos resultados para *LPR1* foram posteriormente confirmados através do uso de linhagens isogênicas pela segregação da geração F6 do cruzamento de Bay-0 x Shahdara, as quais diferem apenas no alelo da região LPR1. Segundo estes autores, com suprimento normal de P ambos os acessos possuem CRP similar, enquanto sob limitação de P, o desenvolvimento radical de BAY-0 é de cerca de 50 %, enquanto o de Shahdara menos de 15 % do verificado nas condições normais de P. Como reportado, resultados similares foram obtidos para *p9*, *p23* e *p37*, relativamente à COL quando crescidos em condições +P e -P.

Neste estudo, REYMOND *et al.* (2006) identificaram três QTLs com grande influência na resposta de *arabidopsis* em apresentar menor desenvolvimento radical em condições limitantes de P. Segundo estes autores, *LPR1* é o de maior importância, pois é responsável por mais de 52 % da variação no desenvolvimento radical sob limitação de P. Além deste, *LPR2* é responsável por 13 %, enquanto *LPR3* cerca de 8 % do fenótipo radical sob deficiência de P, os quais se localizam nos cromossomos 3 e 4,

respectivamente. Com isso, mais de 70 % do menor desenvolvimento radical sob limitação de P é atribuída ao efeito destes três QTLs. Além disso, é importante ressaltar que, *LPR1* e *LPR2* não se co-localizam com o QTL do comprimento da raiz primária em ambiente com suprimento normal de P, sugerindo que estes dois QTLs são específicos do desenvolvimento radical sob limitação de P (REYMOND *et al.*, 2006). Por outro lado, os autores verificaram ainda que *LPR3* se co-localiza com QTL, afetando o CRP em condição suficiente de P, sugerindo que este QTL (*LPR3*) está envolvido com o CRP de *arabidopsis* independente da condição de P.

Este estudo conduzido por REYMOND *et al.* (2006) pode ser importante na interpretação de dados da continuação do mapeamento das mutações em *p9* e *p23* e mesmo ajudar no direcionamento desta etapa, uma vez que *LPR1* se localiza na mesma região do cromossomo 1 onde se mapeou a mutação de *p9* e *p23*. *LPR1* se localiza em região próxima de 8 Mb no braço superior do cromossomo 1, enquanto os dados obtidos sugerem que *p9* e *p23* se localizam próximo a 12 Mb, portanto a menos de 4 Mb deste importante marcador de resposta à limitação por P. É importante ressaltar que estes dados para *p9* e *p23* precisam ser refinados, através do uso de maior número de *primers* e incremento na população de cada mutante.

Para chegar mais próximo à localização do gene mutado em ambos os mutantes e verificar se as mutações *p9* e *p23* estão ainda mais próximas de *LPR1*, em estudos seqüenciais com estes mutantes deve-se lançar mão de duas estratégias. Num primeiro momento, sugere-se projetar novos *primers* para as duas regiões previamente mapeadas, o que deverá permitir reduzir os

valores das taxas de recombinação, especialmente em *p23*, permitindo refinamento da informação corrente.

Em *p9*, apesar de ter sido obtida taxa de recombinação zero no marcador F23M19 este resultado ainda não permite afirmar a existência de ligação entre este marcador e o gene mutado. Esta fundamentação se baseia no fato de que em regiões adjacentes a este marcador e a apenas 1 Mb já é possível verificar taxas de recombinação de 5,0 e 12,5 % nos marcadores T17H7 e F28J9, respectivamente. Por outro lado, em *p23* a suposta região de localização do gene mutado ainda está menos elucidada comparativamente à de *p9*, uma vez que a menor taxa de recombinação obtida foi de 7,8 % no marcador F23M19, enquanto em regiões adjacentes localizadas à cerca de 1 Mb as taxas foram próximas a 8 e 17 %.

Com base nestes dados, em ambos os mutantes, visualiza-se que a projeção de novos marcadores entre os marcadores adjacentes àquele que resultou nas menores taxas de recombinação (F23M19) deverá contribuir para chegar mais próximo ao gene mutado e confirmar ainda mais a localização do gene mutado junto ao braço superior do cromossomo 1. Num segundo momento, também deve ser aumentado o número de plantas F2 avaliadas de ambas as populações, as quais já existem, sendo necessária apenas realizar a seleção das homozigotas para a mutação.

As etapas de mapeamento desenvolvidas até o momento para cada um dos mutantes permitiu obtenção de dados importantes quanto à localização do cromossomo onde os genes mutados devem localizar-se. O reduzido número de plantas com fenótipo confirmado na geração F3, quais sejam, 32 em *p9* e 38 em *p23*, foram suficientes para chegar até este momento. Em função da

estratégia de seleção previamente reportada e adotada neste trabalho, as 32 plantas F3 de *p9* x LER correspondem na verdade a uma população de 128, enquanto em *p23* as 38 plantas equivalem a uma população de 152 plantas. Isto ocorre porque apenas foram mantidas $\frac{1}{4}$ das plantas da geração F2, ou seja, somente avançaram para a geração F3 plantas com fenótipo radical do mutante (recessivo).

A adoção desta estratégia foi possível uma vez que de antemão já se conhecia o fenótipo radical dos mutantes e dos ecótipos, sendo portanto, previsto que na F2 a segregação seria 1:2:1. Como os mutantes *p9* e *p23* sempre apresentam CRP menor que o de COL em meio -P e -P/+RNA, haveria muito pouco ganho em quantidade e qualidade de informação caso também se adotasse os indivíduos com fenótipo de COL, de LER ou intermediário aos ecótipos e ao dos mutantes nos meios com limitação de P.

6 CONCLUSÕES

Os mutantes *p23* e *p37* são mutantes de fósforo, apresentam raiz primária constitutivamente curta e não são capazes de perceber a presença de organofosfatos como única fonte de fósforo.

O mutante *p9* reconhece a presença de organofosfatos no meio de cultura e estes prejudicam seu desenvolvimento radical, independente da condição de suprimento de fósforo.

O desenvolvimento radical dos mutantes e de COL é distinto entre o meio comercial $\frac{1}{2}$ MS e o meio obtido a partir da mistura de soluções de sais (MP), sobretudo em condição limitante de fósforo. Por isso, o meio adotado para continuação dos estudos com os mutantes *p9*, *p23* e *p37* foi o meio MP.

A inibição do desenvolvimento radical de arabidopsis pela presença de ferro no meio de cultura é agravada pela deficiência nutricional por fósforo e minimizada pelo suprimento deste.

O fenótipo radical de *p9* em ambiente com limitação de fósforo é causado pela deficiência de fósforo e excesso de ferro nas condições de crescimento. Quando há supressão de ferro do meio ocorre resgate do fenótipo radical de COL em *p9*, independente da condição de fósforo do meio, sugerindo que *p9* seja mutante da interação fósforo x ferro.

Parte do fenótipo radical de *p9* em condição de deficiência de fósforo é causada por defeitos nas rotas de síntese e/ou percepção de auxinas e citocininas.

O fenótipo radical de *p23* e *p37*, constitutivamente mais curto que o de COL, não está relacionado a defeitos na síntese auxinas e citocininas, independente da condição de suprimento de fósforo.

O resgate do fenótipo radical de COL em *p23* e *p37* é possível através da remoção de nitrogênio do meio de cultura, sobretudo quando em condição de suficiência de fósforo no meio.

O prolongamento da limitação de fósforo reduz drasticamente a divisão celular no meristema de *p23* via expressão de *Cyc::B1*) possivelmente devido a defeitos em componentes regulatórios do sistema de resgate a fósforo. Por outro lado, *p9* mantém atividade meristemática por mais tempo quando sob limitação de fósforo, sendo mais eficiente na ativação de rotas alternativas.

Durante a deficiência de fósforo *p23* e *p37* que conseguem manter atividade no centro quiescente (expressão de *QC25*) e a divisão celular (expressão de *Cyc::B1*). Entretanto, em *p9* não há atividade nestes genes, porém o crescimento vegetal nesta condição pode ser obtido via alongamento de células anteriormente geradas.

A mutação dos mutantes *p9* e *p23* localiza-se no braço superior do cromossomo um, próximo ao *primer* F23M19, o qual está ligado à mutação de *p9* e *p23*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, S.; TICCONI, C.A.; DELATORRE, C.A. Phosphate sensing in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.115, p.1-8, 2002.

ABERCROMBIE, J.M. *et al.* Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* plants to As (V) stress. **BioMedical Central Plant Biology**, [s.l.], v.8, n.87, 1-15, 2008.

AIDA, M. The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. **Cell**, Saint Louis, v.119, n.1, p.109-120, 2004.

AL-GHAZI, Y. *et al.* Temporal responses of Arabidopsis root architecture to phosphate starvation: evidence for the involvement of auxin signaling. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.26, p.1053-1066, 2003.

ANGHINONI, I.; BARBER, S.A. Phosphorus influx and growth characteristics of corn roots as influenced by phosphorus supply. **Agronomy Journal**, Madison, v.172, p.655-668, 1980.

BARIOLA, P.A. *et al.* The arabidopsis ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to phosphate limitation. **Plant Journal**, Oxford, v.6, p.673-685, 1994.

BARLOW, P.W. Towards an understanding of the behavior of root meristems. **Journal of Theoretical Biology**, Amsterdam, v.57, p.433-451, 1976.

BATES, T.R.; LYNCH, J.P. Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.19, p.529-538, 1996.

BERUTO, M.; BERUTO, D.; DEBERGH, P. Influence of agar on in vitro cultures. I. Physicochemical properties of agar and agar gelled media. **In Vitro Cellular and Developmental in Biology - Plant**, Heidelberg, v.35, p.86-93, 1999.

BORCH, K. *et al.* Ethylene: a regulator of root architectural responses to soil phosphorus availability. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.22, p.425-431, 1999.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSSEN, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plants Physiologists, 2000. p.855-1015.

BUN-YA, M. *et al.* The *PHO84* gene of *Sacharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, New York, v.11, p.3229-3238, 1991.

CAO, Y.; CLASS, A.D.M.; CRAWFORD, N.M. Ammonium inhibition of *Arabidopsis* root growth can be reversed by potassium and by auxin resistance mutations *aux7*, *axr7*, and *axr2*. **Plant Physiology**, Rockville, v.102, p.983-989, 1993.

CASAGRANDE, E.C. *et al.* Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.13, n.2, p.168-184, 2001.

CASSON, S.A.; LINDSEY, K. Genes and signalling in root development. **New Phytologist**, New York, v.158, p.11-38, 2003.

CELENZA, J.L.; GRISAFI, P.L.; FINK, G.R. A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. **Genes and Development**, New York, v.9, p.2131-2142, 1995.

CHEN, D.L. *et al.* Conditional identification of phosphate-starvation-response mutants in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Heidelberg, v.211, p.13-22, 2000.

CHEVALIER, F. *et al.* Effects of phosphate availability on the root system architecture: large scale analysis of the natural variation between *Arabidopsis* accessions. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.26, p.1839-1850, 2003.

COLÓN-CARMONA, A. *et al.* Spatio-temporal analysis of mitotic activity with labile cyclin-GUS fusion protein. **Plant Journal**, Oxford, v.20, p.503-508, 1999.

CUI, H. *et al.* An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. **Science**, Washington, v.316, n.5823, p.421-425, 2007.

DARAM, P. *et al.* *Pht2;1* encodes a low-affinity phosphate transporter from *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v.11, p.2153-2166, 1999.

DELATORRE, C.A. *et al.* *Arabidopsis pdr2* reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. **The Plant Journal**, Oxford, v.37, p.801-814, 2004.

DELATORRE, C.A. **Phosphate deficiency response: searching for the signaling pathway.** Kohn : LAP Lambert Academic Publishing. 2009. 152p..

DELATORRE, C.A.; SILVA, A.A. da. *Arabidopsis thaliana*: Uma pequena planta, um grande papel. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v.31, n.2, p.58-67, 2008.

DELATORRE, C.A.; TICCONI, C.A.; ABEL, S. Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v.127, p.963-972, 2001.

DEL POZO, J.C. *et al.* A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilizing/oxidative stress conditions. **Plant Journal**, Oxford, v.19, p.579-589, 1999.

DI LAURENZIO, L. *et al.* The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. **Cell**, Saint Louis, v.86, n.3, p.423-433, 1996.

DREW, M.C.; SAKER, L.R. Uptake a long distance transport of phosphate, potassium and chloride in relation to internal ion concentrations in barley: evidence of non-allosteric regulation. **Planta**, Heidelberg, v.60, p.500-507, 1984.

DUFF, S.M.G.; SARATH, G.; PLAXTON, W.C. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.90, p.791-800, 1994.

EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.19, p.1349, 1991.

EPSTEIN, E.; HAGEN, C. A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. **Plant Physiology**, Rockville, v.27, p.457-474, 1952.

EPSTEIN, E.; RAINS, D.W.; ELZAM, O.E. Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.49, p.684-692, 1963.

FERGUSON, I.B.; CLARKSON, D.T. Ion transport and endothermal suberization in roots of *Zea mays*. **New Phytologist**, New York, v.75, p.69-79, 1975.

FLÜGGE, U.I. Phosphate translocators in plastids. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biological**, Palo Alto, v.50, p.27-45, 1999.

FORDE, B.G.; CLARKSON, D.T. Nitrate and ammonium nutrition of plants: physiological and molecular perspectives. **Advances in Botanical Research**, Paris, v.30, p.1-90, 1999.

FRANCO-ZORRILLA, J.M. *et al.* Interaction between phosphate starvation, sugar, and cytokinin signaling in arabidopsis and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3. **Plant Physiology**, Rockville, v.138, p.847-857, 2005.

FRANCO-ZORRILLA, J.M. *et al.* Mutations at CRE1 impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in Arabidopsis. **Plant Journal**, Oxford, v.32, p.353-360, 2002.

FURIHATA, T.; SUZUKI, M.; SAKURAI, H. Kinetic characterization of two phosphate uptake systems with different affinities in suspension-cultured *Catharanthus roseus* protoplasts. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v.33, p.1151-1157, 1992.

GAHOONIA T.S.; NIELSEN, N.E. Barley genotypes with long root hairs sustain high rain yields in low-P field. **Plant Soil**, Dordrecht, v.262, p.472-476, 2004.

GAHOONIA T.S.; NIELSEN, N.E. Direct evidence of participation of root hairs in phosphorus (^{32}P) uptake from soil. **Plant Soil**, Dordrecht, v.198, p.147-152, 1998.

GALINHA, C. *et al.* Plethora proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. **Nature**, New York, v.449, p.1053-1057, 2007.

HAMMOND, J.P. *et al.* Changes in gene expression in Arabidopsis shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.132, p.578–596, 2003.

HELARIUTTA Y. *et al.* The short-root gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. **Cell**, Saint Louis, v.101, p.555-567, 2000.

HERMANS, C. *et al.* How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? **Trends in Plant Science**, London, v.11, p.610-617, 2006.

HOLFORD, L.C.R. Soil phosphorus: its measurement and, its uptake by plants. **Australian Journal of Soil Research**, Victoria, v.35, p.227-239, 1997.

HUANG, C. *et al.* Zinc deficiency up-regulates expression of high-affinity phosphate transporter genes in both phosphate-sufficient and -deficient barley roots. **Plant Physiology**, Rockville, v.124, p.415-422, 2000.

JAIN, A. *et al.* Differential effects of sucrose and auxin on localized phosphate deficiency-induced modulation of different traits of root system architecture in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v.144, p.232-247, 2007.

JAIN, A. *et al.* Variations in the composition of gelling agents affect morphophysiological and molecular responses to deficiencies of phosphate and other nutrients. **Plant Physiology**, Rockville, v.150, p.1033-1049, 2009.

JONES, D.L. Organic acids in the rhizosphere: a critical review. **Plant Soil**, Dordrecht, v.205, p.25-44, 1998.

JUNGK, A. Root hairs and acquisition of plant nutrients from soil. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v.164, p.121-129, 2001.

KARTHIKEYAN, A.S. *et al.* Phosphate starvation responses are mediated by sugar signaling in *Arabidopsis*. **Planta**, Heidelberg, v.225, n.4, p.907-918, 2007.

KIEFFER, M.; NEVE, J.; KEPINSKI, S. Defining auxin response contexts in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.13, p.1-9, 2009.

KUIPER, D.; SCHUIT, J.; KUIPER, P.J.C. Effect of internal and external cytokinin concentrations on root growth and shoot to root ratio of *Plantago major* ssp. *pleiosperma* at different nutrient concentrations. **Plant Soil**, Dordrecht, v.111, p.231-236, 1988.

LI, H.; YANG, X.; LUO, A. Ameliorating effect of potassium on iron toxicity in hybrid rice. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.24, p.1849-1860, 2001.

LOPEZ-BÚCIO, J. *et al.* An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. **Plant Physiology**, Rockville, v.137, p.681-691, 2005.

LOPEZ-BÚCIO, J. *et al.* Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. **Plant Physiology**, Rockville, v.129, p.244-256, 2002.

MARSCHNER, H. Functional of mineral nutrients: macronutrients. In: MINERAL Nutrition of Higher Plants. London: Academic Press, 1995. p.229-312.

MARTÍN, A.C. *et al.* Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, Oxford, v.2, p.559-567, 2000.

MAYNARD, D.N.; BARKER, A.V. Studies on the tolerance of plants to ammonium nutrition. **Journal of American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v.9, n.4, p.235-239, 1969.

MISSON, J. *et al.* A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. **Proceedings National Academic Science of the United States of America**, Washington, v.102, p.11934-11939, 2005.

MÜLLER, R. *et al.* Gene expression during recovery from phosphate starvation in roots and shoots of *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, p.1-11, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.

NAWY, T. *et al.* Transcriptional profile of the *Arabidopsis* root quiescent center. **The Plant Cell**, Rockville, v.17, p.1908-1925, 2005.

NOWAK, J.; ASIEDU, S.K. Gelling agent and light effects on in vitro tuberization of potato cultivars. **American Potato Journal**, Orono, v.69, p.461-470, 1992.

ORTEGA-MARTÍNEZ, O. *et al.* Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root. **Science**, Washington, v.317, n. 5837, p.507-510, 2007.

PÉREZ-TORRES, C.A. *et al.* Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. **The Plant Cell**, Rockville, v.20, p.3258-3272, 2008.

PINTO, K.G. **Caracterização de mutantes condicionais de *Arabidopsis thaliana* L. em organofosfatos.** 2005. 81f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

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

RAHIMI, G.; ROBINSON, J.S.; NORTCLIFF, S. The evaluation of erosion and sedimentation processes on the potential losses of phosphorus. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PHOSPHORUS DYNAMICS IN SOIL-PLANT CONTINUUM, 3., Uberlândia, 2006. **Proceedings...** [Uberlândia], 2006. p.201-202.

RAUSCH, C.; BUCHER, M. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. **Planta**, Heidelberg, v.216, p.23-37, 2002.

REYMOND, M. *et al.* Identification of QTL controlling root growth response to phosphate starvation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.29, p.115-125, 2006.

ROBINSON, D. Root proliferation, nitrate inflow and their carbon costs during nitrogen capture by competing plants in patchy soil. **Plant Soil**, Dordrecht, v.232, p.41-50, 2001.

SABATINI, S. Scarecrow is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. **Genes & Development**, New York, v.17, p.354-358, 2003.

SAKAKIBARA, H. Nitrate-specific and cytokinin-mediated nitrogen signaling pathways in plants. **Journal of Plant Research**, New York, v.116, p.253-25, 2003.

SAKANO, K. Proton/phosphate stoichiometry in uptake of inorganic phosphate by cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. **Plant Physiology**, Rockville, v.93, p.797-801, 1990.

SÁNCHEZ-CALDERÓN, L. *et al.* Characterization of *low phosphorus insensitive* mutants reveals a crosstalk between low phosphorus-induced determinate root development and the activation of genes involved in the adaptation of *Arabidopsis* to phosphorus deficiency. **Plant Physiology**, Rockville, v.140, p.879-889, 2006.

SÁNCHEZ-CALDERÓN, L. *et al.* Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v.46, p.174-184, 2005.

SCHACHTMAN, D.P.; REID, R.J.; ALING, S.M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. **Plant Physiology**, Rockville, v.116, p.447-453, 1998.

SCHIEFELBEIN, J.W. Constructing a plant cell: The genetic control of root hair development. **Plant Physiology**, Rockville, v.124, p.1525-1531, 2000.

SCHOLTEN, H.J.; PIERIK, R.L.M. Agar as a gelling agent: chemical and physical analysis. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.17, p.230-235, 1998.

SCHOUMANS, O.F. Environmental risk assessment of phosphorus applications on agricultural land. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PHOSPHORUS DYNAMICS IN SOIL-PLANT CONTINUUM, 3., [Uberlândia], 2006. **Proceedings...** [Uberlândia], 2006. p.195-196.

SÉQUÉLA, M. *et al.* Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in *Arabidopsis* through a growth-dependent pathway. **Plant Journal**, Oxford, v. 55, p. 289–300, 2008.

SHIMIZU, A. *et al.* Phosphorus deficiency-induced root elongation and its QTL in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.109, p.1361-1368, 2004.

SHIN, H. *et al.* Loss of *At4* function impacts phosphate distribution between the roots and the shoots during phosphate starvation. **Plant Journal**, Oxford, v.45, p.712–726, 2006.

SOMERVILLE, C.R.; OGREN, W. Isolation of photorespiration mutants in *Arabidopsis thaliana*. In: METHODS in chloroplast biology. Amsterdam : Elsevier Biomedical Press, 1982. p.129-138.

SVISTOONOFF S. *et al.* Root tip contact with low phosphate media reprograms plant root architecture. **Nature Genetics**, New York, v.39, p.792-796, 2007.

TICCONI, C. *et al.* ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. **Proceedings of National Academic Science of the United States of America**, Washington, v.106, n.33, p.14174–14179, 2009.

ULÉN, B. *et al.* Phosphorus and nitrogen turnover and risk of waterborne phosphorus emissions in crop rotations on a clay soil in southwest Sweden. **Soil Use and Management**, Wallingford, v.21, p.221-230, 2005.

ULLRICH-EBERIUS, C.I. *et al.* Relationship between energy-dependent phosphate uptake and the electrical membrane potential in *Lemna gibba*. **Plant Physiology**, Rockville, v.67, p.797-801, 1981.

ULLRICH-EBERIUS, C.I. *et al.* Phosphate uptake in *Lemna gibba* G1: energetics and kinetics. **Planta**, Heidelberg, v.161, p.46-52, 1984.

VANCE, C.P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D.L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, New York, v.157, p.423-447, 2003.

WAGNER, B.M.; BECK, E. Cytokinins in the perennial herb *Urtica dioica* L. as influenced by its nitrogen status. **Planta**, Heidelberg, v.190, p.511-518, 1993.

WALCH-LIU *et al.* Nitrogen Regulation of Root Branching. **Annals of Botany**, Oxford, v.97, p.875-881, 2006.

WANG, R.; XING, X.; CRAWFORD, N. Nitrite acts as a transcriptome signal at micromolar concentrations in arabidopsis roots. **Plant Physiology**, Rockville, v.145, p.1735-1745, 2007.

WALKER, D.A.; SIVAK, N. Photosynthesis and phosphate: a cellular affair? **Trends in Biochemical Science**, Oxford, v.11, 176-179, 1986.

WANG, R. *et al.* Genomic analysis of a nutrient response in Arabidopsis reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. **Plant Cell**, Rockville, v.12, p.1491-1509, 2000.

WOLTERS, H.; JÜRGENS, G. Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. **Nature Reviews - Genetics**, New York, v.10, p.305-317, 2009.

WANG, Y.H.; GARVIN, D.F.; KOCHIAN, L.V. Rapid induction of regulatory and transporter genes in response to phosphorus, potassium, and iron deficiencies in tomato roots. Evidence for cross talk and root/rhizosphere-mediated signals. **Plant Physiology**, Rockville, v.130, p.1361-1370, 2002.

WATT, M.; EVANS, J.R. Proteoid roots: Physiology and development. **Plant Physiology**, Rockville, v.121, p.317-323, 1999.

WARD, J.T. *et al.* The effect of iron on the primary root elongation of Arabidopsis during phosphate deficiency. **Plant Physiology**, Rockville, v.147, p.1181-1191, 2008.

WERNER, T.; SCHMULLING, T. Cytokinin action in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.12, p.527-538, 2009.

WILLIAMSON, L.C. *et al.* Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v.126, p.875-890, 2001.

WU, P. *et al.* Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.132, p.1260-1271, 2003.

ZHANG, H. *et al.* Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. **Proceedings of National Academic Sciences of the United States of America**, Washington, v.96, p.6529-6534, 1999.

8 VITA

Mércio Luiz Strieder, filho de Hilário e Maria Dolores Strieder, nasceu em 03 de fevereiro de 1978 em Itapiranga-SC. Realizou seus estudos de ensino básico no colégio Estadual Padre Balduino Rambo, em Tunápolis-SC. Criado no meio rural, no município de Tunápolis-SC, desde sua infância sempre demonstrou interesse pela atividade agropecuária. Assim, aos 14 anos, iniciou seus estudos nessa área no Colégio Agrícola São José, em Itapiranga-SC, onde concluiu o curso de Técnico em Agropecuária no ano de 1996.

Após três anos de atividades profissionais junto à Granja Strieder, de propriedade da família, em Tunápolis-SC, em 1999 ingressou na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) onde, no ano de 2004, graduou-se Engenheiro Agrônomo. Durante o curso de graduação, desenvolveu atividades como estudante de iniciação científica, sendo bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), junto ao Departamento de Plantas de Lavoura. Essas atividades de pesquisa foram desenvolvidas durante o período de julho de 1999 a fevereiro de 2004.

Logo após o término do curso de Agronomia, iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia na UFRGS, na área de concentração Fisiologia e Manejo de Plantas Cultivadas, dando continuidade a diversos trabalhos com a cultura do milho, com a qual já vinha trabalhando. Durante

o curso de mestrado, assim como no período de iniciação científica, as atividades foram desenvolvidas sob orientação do Professor Paulo Regis Ferreira da Silva.

Após a conclusão do mestrado em fevereiro de 2006, iniciou o curso de Doutorado em Fitotecnia, na mesma universidade e área de concentração. Entretanto, em busca de superar desafios e deficiências em outras áreas do conhecimento, desta vez esteve sob a orientação da Professora Carla Andréa Delatorre, sendo seu primeiro orientado de doutorado, com a qual conduziu estudos de “conhecimento básico” com uma espécie vegetal modelo, *Arabidopsis thaliana*, cujas atividades foram desenvolvidas em sua totalidade em condições controladas de laboratório e câmara de crescimento.

Durante a realização dos cursos de mestrado e doutorado foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq). Ainda durante os estudos de doutoramento, obteve a concessão de bolsa de estudos pelo programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (SWE) através do CNPq. Assim, teve a oportunidade de realizar, entre janeiro e dezembro de 2008, parte de seu doutorado junto à *University of California at Davis* (UCDavis), sob supervisão do Professor Ph.D. Steffen Abel, na cidade de Davis, na Califórnia, Estados Unidos da América.

Logo após retornar do doutorado sanduíche junto à UCDavis-EUA e mesmo sem ainda ter concluído o doutorado junto à UFRGS, aceitou convite da empresa multinacional Syngenta Seeds LTDA. Assumiu a regional desta em Guarapuava-PR, onde atua como Engenheiro Agrônomo de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos. Nesta região, executa trabalhos de campo relacionados a híbridos experimentais de milho e variedades experimentais de soja, além do desenvolvimento de estudos relacionados à integração da área de sementes com a de agroquímicos, duas das áreas de atuação da Syngenta.