

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

GUILHERME WEBER

**ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE A RESPOSTA ADAPTATIVA À DEFICIÊNCIA DE
FOSFATO E OS NÍVEIS DE BRASSINOSTERÓIDE EM RAÍZES DE ARROZ
(*Oryza sativa* L.)**

Porto Alegre

2023

GUILHERME WEBER

ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE A RESPOSTA ADAPTATIVA À DEFICIÊNCIA DE
FOSFATO E OS NÍVEIS DE BRASSINOSTERÓIDE EM RAÍZES DE ARROZ
(*Oryza sativa* L.)

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido à Universidade Federal do
Rio Grande do Sul como requisito parcial
para obtenção do Grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Márcia
Pinheiro-Margis

Coorientadora: Ma. Nicolle Louise
Ferreira Barros

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Weber, Guilherme
ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE A RESPOSTA ADAPTATIVA À
DEFICIÊNCIA DE FOSFATO E OS NÍVEIS DE BRASSINOSTERÓIDE
EM RAÍZES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) / Guilherme
Weber. -- 2023.

44 f.

Orientadora: Márcia Pinheiro-Margis.

Coorientadora: Nicolle Louise Ferreira Barros.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Curso de Biotecnologia: Biotecnologia
Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Biologia Vegetal. 2. Estresse Abiótico. 3.
Expressão Gênica. 4. Brassinosteróides. 5. Deficiência
de Fosfato. I. Pinheiro-Margis, Márcia, orient. II.
Barros, Nicolle Louise Ferreira, coorient. III.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Guilherme Weber

ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE A RESPOSTA ADAPTATIVA À DEFICIÊNCIA DE FOSFATO E OS NÍVEIS DE BRASSINOSTERÓIDE EM RAÍZES DE ARROZ

(*Oryza sativa* L.)

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Márcia Pinheiro-Margis

Coorientadora: Ma. Nicolle Louise Ferreira Barros

Porto Alegre, 14 de setembro de 2023

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Márcia Pinheiro-Margis

(Orientadora)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Felipe Klein Ricachenevsky

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Yugo Lima-Melo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre me apoiou de infinitas maneiras e me incentivou a seguir na ciência. Em especial ao meu irmão, que passou noites e madrugadas comigo conversando sobre filosofia, política, faculdade e passarinhos, obrigado por sempre se fazer presente.

Às minhas orientadoras Márcia e Nicolle, por me integrarem nesse incrível grupo do qual hoje faço parte, pela sabedoria e apoio profissional, emocional e financeiro que me permitiram elaborar esse projeto. Ao Yugo, que me serviu como primeiro acesso ao mundo prático da ciência, por quem tenho imenso respeito e admiração.

Aos colegas de laboratório e da Genética, que se compadeceram com o meu sofrimento nos experimentos e foram companhia de muitos almoços, risadas e conversas nos corredores.

Aos meus colegas de curso, que me acompanharam ao longo de toda essa jornada e compartilharam do mesmo rumo, servindo sempre de apoio e ajudando uns aos outros nos bons e maus momentos.

Aos meus professores, que me armaram com os conhecimentos e capacidade de exercer ciência de qualidade e seguir esse rumo.

RESUMO

O fósforo é um nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, mas sua disponibilidade é frequentemente limitada no solo, resultando em grãos de baixa qualidade e redução nos rendimentos. As fontes naturais de fósforo são limitadas, não-renováveis e representam uma preocupação crescente para a segurança alimentar global. O uso de mutantes tem sido uma estratégia promissora para o entendimento de características moleculares e para a melhoria da produtividade das culturas, principalmente em condições de estresse ambiental. Estudos em *Arabidopsis thaliana* indicam que a sinalização de brassinosteróides é antagônica à resposta ao estresse por privação de fósforo. Em arroz essa relação ainda não foi determinada. A planta de arroz *d2-1* possui uma mutação no gene *D2*, que compromete a biossíntese de fitormônios brassinosteróides. Assim, buscamos compreender a relação entre esse fitormônio e os mecanismos moleculares de resposta ao fósforo em arroz. Para isso, plantas tipo-selvagem (T65) e *d2-1* com 10 dias de idade foram submetidas a condições ótimas e de estresse por escassez de fósforo em um sistema hidropônico. O RNA total foi extraído das raízes de plantas após 15 dias de tratamento e *primers* específicos foram usados para determinar os níveis de expressão de alguns genes chave relacionados à deficiência de fósforo e sinalização de brassinosteróides. Ademais, alterações na arquitetura radicular do mutante e na expressão dos genes chave foram observadas durante o desenvolvimento dessas plantas sob privação de fósforo. Esses resultados fornecem evidências sobre como os níveis de brassinosteróides nas raízes de arroz afetam a resposta molecular e fenotípica da planta às condições de deficiência de fósforo.

Palavras-chave: Estresse abiótico; Deficiência de fósforo; Brassinosteróides; Arquitetura do sistema radicular; Expressão gênica diferencial.

ABSTRACT

Phosphate is an essential nutrient for plant growth and development, but its availability is often limited in soil, resulting in reduced crop yields and poor-quality grains. The natural phosphate sources are limited, non-renewable and present a rising concern for global food security. The use of mutants has been a promising strategy for understanding molecular traits and for the improvement of crop yields, particularly in conditions of environmental stress. Studies in *Arabidopsis thaliana* indicate that brassinosteroid signaling is antagonistic to phosphate deprivation stress response. This relation is yet to be determined in rice. Considering this, *d2-1* rice plants possess a mutation in the *D2* gene, which compromises the biosynthesis of brassinosteroid phytohormones. Thus, we seek to understand the relation between this phytohormone and the molecular mechanisms of phosphate response in rice. To that end, 10-day-old wild-type (T65) and *d2-1* plants were submitted to optimal and phosphate-stress conditions in a hydroponics system. The total RNA was extracted from the roots after 15 days of treatment, and specific *primers* were used to measure the expression levels of key genes related to phosphate deficiency and brassinosteroid signaling. Moreover, changes in the root architecture of the mutant and in the expression levels of these genes were noted during the development of these plants under phosphate deprivation. These results provide evidence into how the expression levels of brassinosteroids in rice roots affect the plant's molecular and phenotypical response to phosphate-starvation conditions.

Key-words: Abiotic stress; Phosphate deficiency; Brassinosteroids; Root system architecture; Differential gene expression.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos <i>primers</i> utilizados para RT-qPCR.....	27
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de sinalização local de fosfato.....	14
Figura 2. Via de sinalização sistêmica de fosfato.....	15
Figura 3. Via de sinalização de brassinosteróides.....	18
Figura 4. Via de biossíntese de brassinosteróides.....	20
Figura 5. Comprimento das raízes nas condições +Pi e -Pi após 20 dias.....	29
Figura 6. Quantificação de características fenotípicas de T65 e <i>d2-1</i>	31
Figura 7. Massa seca das plantas após o tratamento.....	33
Figura 8. Parâmetros fotossintéticos de T65 e <i>d2-1</i> nas condições +Pi e -Pi.....	34
Figura 9. Expressão relativa dos genes alvo das vias de sinalização de fosfato e de brassinosteróides.....	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	RELEVÂNCIA ECONÔMICA E CIENTÍFICA DE ARROZ (<i>Oryza sativa</i> L.)... 11	11
1.2	A DINÂMICA DO MACRONUTRIENTE FÓSFORO EM CÉLULAS VEGETAIS.....	12
1.2.1	Fosfato, um nutriente em risco.....	12
1.2.2	Mecanismos de sinalização das variações dos níveis de Pi.....	13
1.3	ARQUITETURA RADICULAR DE MONOCOTILEDÔNEAS.....	15
1.4	BRASSINOSTERÓIDES.....	17
1.5	O MUTANTE <i>d2-1</i> COMO UMA ESTRATÉGIA DE PESQUISA.....	19
2	JUSTIFICATIVA.....	21
3	OBJETIVOS.....	22
3.1	OBJETIVO GERAL.....	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1	MATERIAL VEGETAL, CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E TRATAMENTOS.....	23
4.2	MENSURAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.....	24
4.3	MENSURAÇÃO DE PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS.....	24
4.4	EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL.....	25
4.5	SÍNTESE DE cDNA.....	26
4.6	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS POR RT-qPCR.....	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA.....	28
5.1.1	Parâmetros morfológicos.....	28
5.1.2	Massa seca.....	32
5.1.3	Dados de fotossíntese.....	33
5.2	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	35
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	39
	REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 RELEVÂNCIA ECONÔMICA E CIENTÍFICA DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

A produção de arroz (*Oryza sativa*) no Brasil para a safra de 2022 totalizou 10,65 milhões de toneladas, com uma previsão de mais de 10 milhões de toneladas para a safra de 2023 (IBGE, 2023). A maior concentração na produção do arroz nacional se encontra na região Sul, sendo o estado do Rio Grande do Sul responsável por aproximadamente 70% da produção total no país. Nesta temporada de 2023, houve uma redução de aproximadamente 8,4% na produção gaúcha do grão, principalmente devido à diminuição de 10,4% na área de cultivo de arroz. Apesar disso, o desenvolvimento de tecnologias de produção e os esforços de Pesquisa e Extensão no estado tem permitido um aumento no rendimento médio das lavouras gaúchas (IBGE, 2023), o que tem ajudado a manter os níveis de produção nos últimos anos. Na escala global, o arroz é cultivado em 113 países (FAOSTAT, 2023), totalizando 165 milhões de hectares de área de cultivo e 509 milhões de toneladas de arroz processado produzidos na safra de 2022 (USDA, 2023), sendo o Brasil o décimo maior produtor, com um volume de 7,6 milhões de toneladas de arroz processado. Sendo responsável por aproximadamente 21% do consumo calórico e 20% do consumo proteico em países em desenvolvimento, o cultivo de arroz é uma das principais atividades agrícolas, servindo como fonte de renda para milhões de famílias no mundo, principalmente na Ásia e na África (HOSSAIN & NARCISO, 2004; FITZGERALD, 2009).

Grande parte do conhecimento que possuímos acerca de hereditariedade, desenvolvimento, fisiologia e os processos celulares e moleculares de organismos é derivado do estudo de um seletivo número de organismos modelos (MÜLLER & GROSSNIKLAUS, 2010). O arroz, além da importância econômica, é utilizado como organismo modelo e apresenta destaque em estudos genômicos de gramíneas e cereais (monocotiledôneas). O genoma de *O. sativa* é comparativamente pequeno, sendo um organismo diplóide, com 12 cromossomos no genoma haplóide ($2n = 24$) e totalizando 430 megapares de base (Mbp) (HIROCHIKA *et al.*, 2014). O genoma de arroz é o menor entre os cereais cultivados e 3,5 vezes o tamanho do genoma de *Arabidopsis thaliana* (ARUMUNGANATHAN & EARLE, 1991). Desde o sequenciamento completo do genoma de arroz (GOFF *et al.*, 2002; DELSENY,

2003), este permanece em evidência tanto para pesquisa básica quanto aplicada devido à relativa facilidade de transformação das plantas utilizando métodos com *Agrobacterium tumefaciens*, técnica que permite realizar alterações no genoma e estabelecer funções gênicas e respostas fenotípicas (SASAKI & BURR, 2000), e pelo fato de haver diversos bancos de sequências gênicas de arroz disponíveis para uso público (FAO, 2014).

Diversos cultivares ou genótipos de arroz podem ser utilizados para estudos, dependendo das características de cada linhagem, como a tolerância aos estresses bióticos e abióticos e do interesse da pesquisa. Taichung 65 (T65) é uma variedade de arroz cultivada no sudeste asiático e também um dos cultivares mais utilizados para o estudo genético e melhoramento de arroz (YARA *et al.*, 2001). Esse genótipo possui uma variedade de marcadores fenotípicos e diversas linhagens de mutantes foram desenvolvidas e descritas com um *background* em T65 (HONG *et al.*, 1996; FUJISAWA *et al.*, 1999; HONG *et al.*, 2003), permitindo o acesso de pesquisadores a plantas com características diversas.

1.2 A DINÂMICA DO MACRONUTRIENTE FÓSFORO EM CÉLULAS VEGETAIS

1.2.1 Fosfato, um nutriente em risco

O fósforo (P) é um dos macronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento de plantas. É comum a aplicação desse elemento na prática agrícola, a fim de garantir a máxima produtividade (JOHNSTON *et al.*, 2000). O fósforo é um macronutriente insubstituível e compõe moléculas orgânicas essenciais como DNA, RNA e os fosfolipídios das membranas celulares. Também é componente fundamental do ciclo energético das células, no qual o P representa 18% da massa de moléculas de ATP (trifosfato de adenosina), além de estar envolvido com a síntese de proteínas (ELSER, 2012). Diversos estudos também associam a taxa de crescimento de plantas (fator agrônomo desejável) com as concentrações internas de fósforo (MATZEK & VITOUSEK, 2009; REES & RAVEN, 2021).

O fosfato inorgânico (Pi), a principal forma como o fósforo é absorvido por organismos biológicos, possui baixa mobilidade no solo (HINSINGER, 2001) e deve ser aplicado como fertilizante. Entretanto, menos de 25% do conteúdo de fósforo

aplicado é utilizado pelas plantas, tornando o Pi um dos nutrientes menos disponíveis na maioria dos solos (LAMBERS & PLAXTON, 2015). O Pi que não é absorvido, além de representar um custo elevado à agricultura, é causador de poluição ambiental (STUTTER *et al.*, 2012). Aproximadamente 60% do consumo total de fósforo em práticas agrícolas vem da extração de rochas de fosfato, uma fonte não-renovável e com esgotamento estimado dentro dos próximos 100 anos (COOPER *et al.*, 2011; HERRERA-ESTRELLA & LÓPEZ-ARREDONDO, 2016). Assim, o futuro da segurança alimentar e o melhor aproveitamento do fosfato por parte das culturas comerciais são interdependentes (FAGERIA *et al.*, 2008). Deste modo, é vital o entendimento dos mecanismos de captação de fósforo pelas raízes das plantas e das alterações nos níveis fisiológico, genético e molecular, a fim de facilitar a aplicação de medidas para minimizar a escassez desse nutriente a curto e longo prazo.

1.2.2 Mecanismos de sinalização das variações dos níveis de Pi

Em resposta a condições de baixo Pi no solo, problemática comumente encontrada em áreas acidificadas, múltiplas alterações bioquímicas, morfológicas, fisiológicas e moleculares são induzidas em plantas (MOLLIER & PELLERIN, 1999). A absorção, transporte e remobilização de Pi é regulada por mecanismos moleculares complexos mediante transportadores de Pi e outros genes a jusante induzidos pela deficiência de Pi (WU *et al.*, 2013), podendo as respostas serem divididas em dois grupos: resposta local e resposta sistêmica, revisadas em Gonçalves *et al.* (2020). Os sinais que são produzidos e funcionam em resposta aos estímulos locais são regulatórios e permanecem na célula onde são produzidos ou se movem para células vizinhas através do simplasto ou do apoplasto para produzir respostas em regiões específicas. Essa via local abrange genes relacionados à percepção de baixas concentrações externas de Pi e à remodelagem da arquitetura radicular, como *Low Phosphate Root 1* (OsLPR1) e *LPR1 homolog 3* (OsLPR3), que estão ligados à via de ajuste da atividade meristemática da raiz em deficiência de fosfato (CAO *et al.*, 2016; DING *et al.*, 2018; AI *et al.*, 2023).

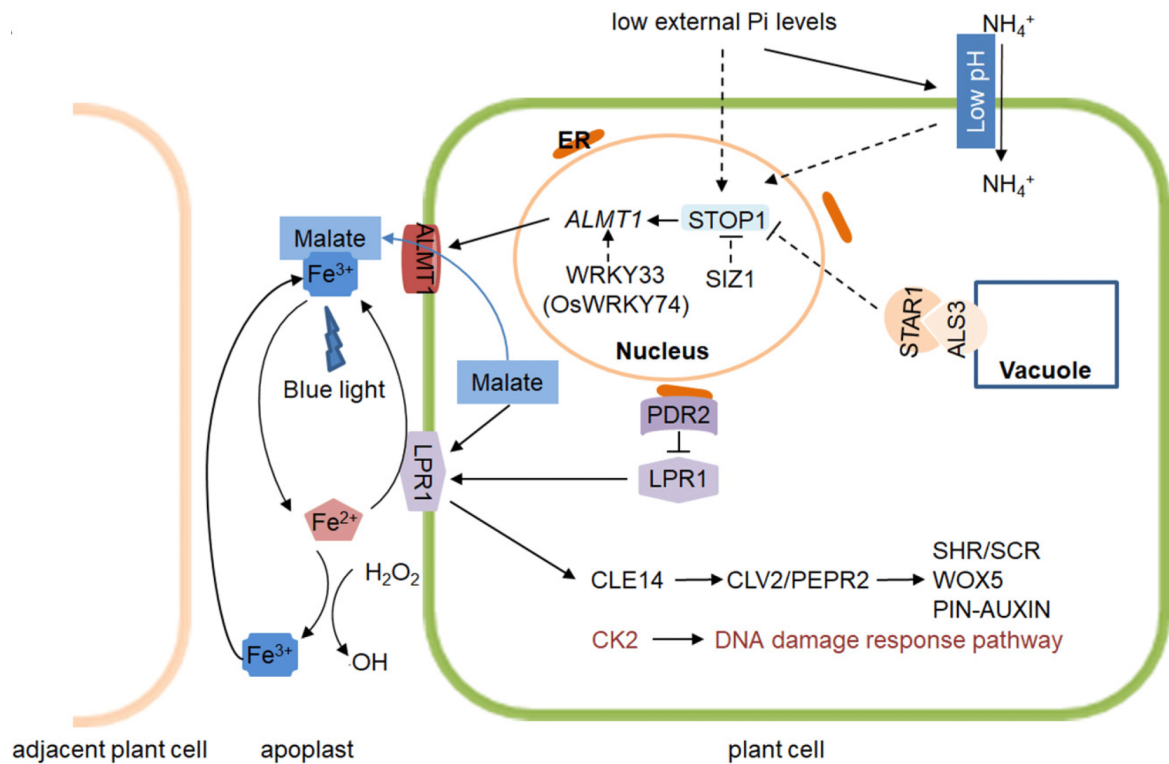


Figura 1. Via de sinalização local de fósforo. Principais componentes da via de sinalização local de fósforo em resposta a sinais de baixos níveis de Pi, destacando o papel das proteínas LPR1. Fonte: elaborado por Ren *et al.* (2023).

Por outro lado, a via sistêmica é composta de sinais regulatórios que executam suas funções a longas distâncias celulares, sendo movidos através do sistema vascular das plantas. A via sistêmica é vital para a manutenção dos níveis de Pi entre os tecidos da planta e inclui genes como os membros da família *Phosphate Transporter 1* (OsPHT1), responsáveis por regular a captação e remobilização de Pi (PASZKOWSKI *et al.*, 2002; LIN *et al.*, 2014; JIA *et al.*, 2017). Diversas das moléculas consideradas como sinalizadores sistêmicos incluem fitormônios, fotossintatos e pequenos RNAs (sRNAs) (LIN *et al.*, 2014).

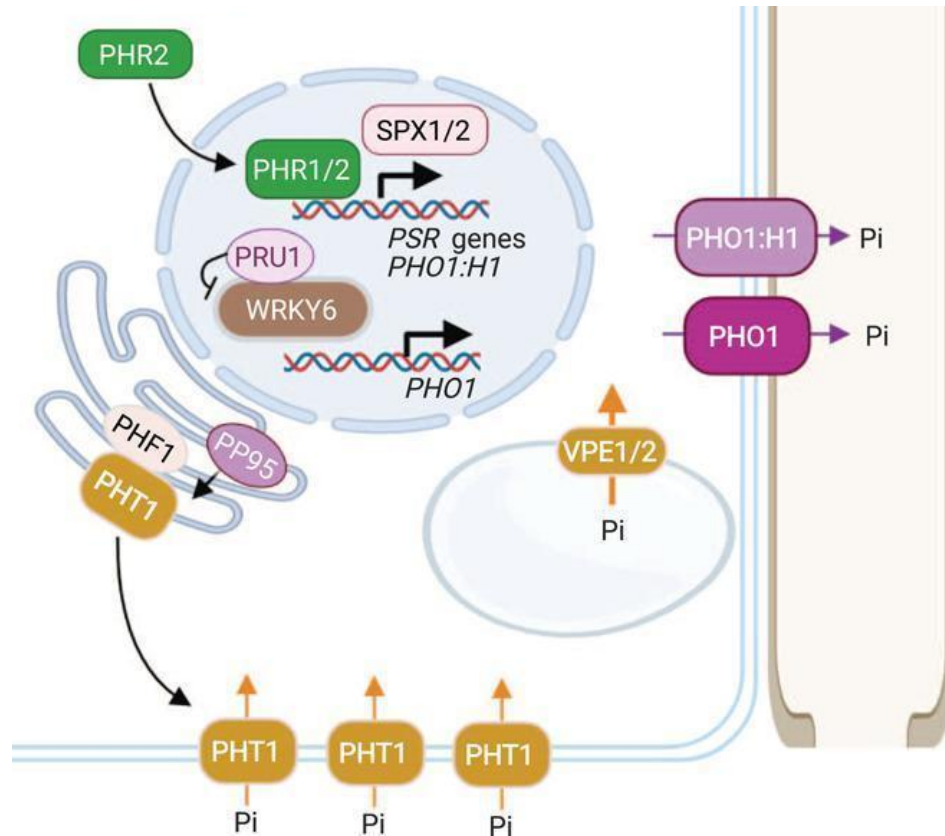


Figura 2. Via de sinalização sistêmica de fósforo. Principais componentes da via de sinalização sistêmica de fósforo com ênfase nas proteínas PHT1, responsáveis pela captação de Pi extracelular. Fonte: elaborado por Wang *et al.* (2020).

Em tecidos vivos, ambas as vias são integradas de maneira conjunta, de modo a adequar os processos celulares em resposta aos diferentes estímulos internos e externos (HOU *et al.*, 2005; TURNBULL & LOPEZ-COBOLLO, 2013). A distribuição de fósforo inorgânico no solo é irregular e tende a se concentrar em camadas superficiais (TIECHER *et al.*, 2012), portanto, a capacidade da planta de absorver o nutriente está diretamente correlacionada com a capacidade do sistema radicular de explorar o solo. Deste modo, um dos principais mecanismos adotados por plantas que se encontram em situações de deficiência nutritiva é a alteração da arquitetura radicular, a fim de aumentar a área de superfície das raízes e aumentar a eficiência de absorção de fósforo (PÉRET *et al.*, 2014; GU *et al.*, 2015).

1.3 ARQUITETURA RADICULAR DE MONOCOTILEDÔNEAS

Por serem organismos sésseis, as plantas são ainda mais suscetíveis aos estresses bióticos, como pestes e doenças, e abióticos, como alterações no pH do

solo, disponibilidade de nutrientes e condições climáticas (DAS, 2019). As raízes não só fornecem sustentação à parte aérea (porção fora do solo), mas também permitem a aquisição de água e nutrientes necessários para o crescimento da planta, assim como o monitoramento das condições do solo quanto a disponibilidade hídrica, conteúdo nutricional e presença de elementos tóxicos (MENG *et al.*, 2019). A fim de garantir a resposta ótima às alterações nas condições ambientais, os sistemas radiculares são continuamente redesenhados por meio da iniciação e crescimento de novas raízes, facilitando a adaptação da planta a diferentes estresses (GOWDA *et al.*, 2011).

A arquitetura do sistema radicular se refere à organização espacial das raízes em uma configuração tridimensional no meio de enraizamento, sendo uma característica complexa com cinco principais componentes: número de ramificações, topologia (padrão de ramificação), comprimento, diâmetro e ângulo das raízes (FITTER, 1991; JUNG & MCCOUCH, 2013). As raízes de arroz, assim como de outras monocotiledôneas, são formadas inicialmente pela raiz primária (PR), seguida de raízes adventícias ou raízes da coroa (CRs) que emergem dos nós do coleóptilo e das raízes laterais (LRs) que surgem a partir das raízes primárias e adventícias, formando um sistema radicular fibroso (COUDERT *et al.*, 2010).

A modulação das características fenotípicas das raízes é controlada pela interação entre vias genéticas complexas (fatores intrínsecos) em resposta à percepção de sinais ambientais (fatores extrínsecos) (MALAMY & RYAN, 2001). Dentre os fatores extrínsecos, o fósforo atua como um sinalizador local, percebido pelo ápice radicular e fornecendo informações para o desenvolvimento da raiz (TICCONI *et al.*, 2009; ABEL, 2017). O contato do ápice radicular com baixas concentrações de fósforo inibe o crescimento da raiz primária e estimula o crescimento de raízes laterais e pêlos radiculares em *A. thaliana* (SVISTOONOFF *et al.*, 2007). Dentre os fatores de sinalização intrínsecos, os hormônios (como auxinas, giberelinas e brassinosteróides), bem como seus fatores de transcrição (TFs), componentes sinalizadores e receptores, se destacam como os principais componentes. Muitos dos componentes envolvidos na percepção ambiental e vias de resposta (extrínsecos) são compartilhados ou regulados em conjunto com componentes intrínsecos, também sendo mediados pela regulação hormonal da planta a fim de causar uma resposta de crescimento como consequência dos sinais externos (JUNG & MCCOUCH, 2013).

1.4 BRASSINOSTERÓIDES

Brassinosteróides (BRs) são uma classe de hormônio polihidroxilado encontrado em plantas e são importantes promotores do crescimento vegetal. Os BRs são considerados uma classe essencial de fitormônios, são capazes de interagir com as vias de sinalização de outros hormônios vegetais como auxina, citocinina, giberelina, jasmonato, etileno e ácido salicílico. BRs regulam diversos processos fisiológicos, de desenvolvimento e de crescimento vegetal como: germinação de sementes, expansão e divisão celular, senescência foliar, reprodução, diferenciação vascular, reprodução, fotomorfogênese e desenvolvimento radicular, além da resposta aos estresses bióticos e abióticos (SAINI *et al.*, 2015; MENDES *et al.*, 2015; AHMAD *et al.*, 2018). A biossíntese, transporte e degradação de BRs são componentes integrais da homeostase desse fitormônio e a manutenção dos níveis endógenos deles é crucial para diversas funções celulares em plantas (TANAKA *et al.*, 2005). Em raízes, esses fitormônios podem tanto promover quanto inibir o crescimento, dependendo da intensidade do sinal (FRIDMAN & SAVALDI-GOLDSTEIN, 2013).

A via de sinalização de BRs em arroz tem início em proteínas de membrana chamadas *Brassinosteroid Insensitive 1* (BRI1) e BRI1-like. A ligação de BRs ao receptor e a subsequente interação com *BRI1-Associated receptor kinase 1* (BAK1), outra proteína de membrana, desencadeia uma cascata de fosforilação. Em altos níveis de BR, essa cascata de sinalização incluindo outros intermediários, resulta na inibição da proteína *BR-Insensitive 2* (BIN2), que por sua vez é uma inativadora dos fatores de transcrição *Brassinazole Resistant 1* (BZR1) e *Brassinazole Resistant 2* (BZR2), os quais são reguladores positivos da via de sinalização de BRs (CLOUSE, 2011). Em baixos níveis de BRs, BIN2 não é inibida e fosforila os fatores de transcrição *BRI1-EMS-Supressor 1* (BES1/BZR2) e BZR1, impedindo o deslocamento desses TFs e a ligação com o DNA (YIN *et al.*, 2002; BAI *et al.*, 2007; KIM & WANG, 2010; SAINI *et al.*, 2015).

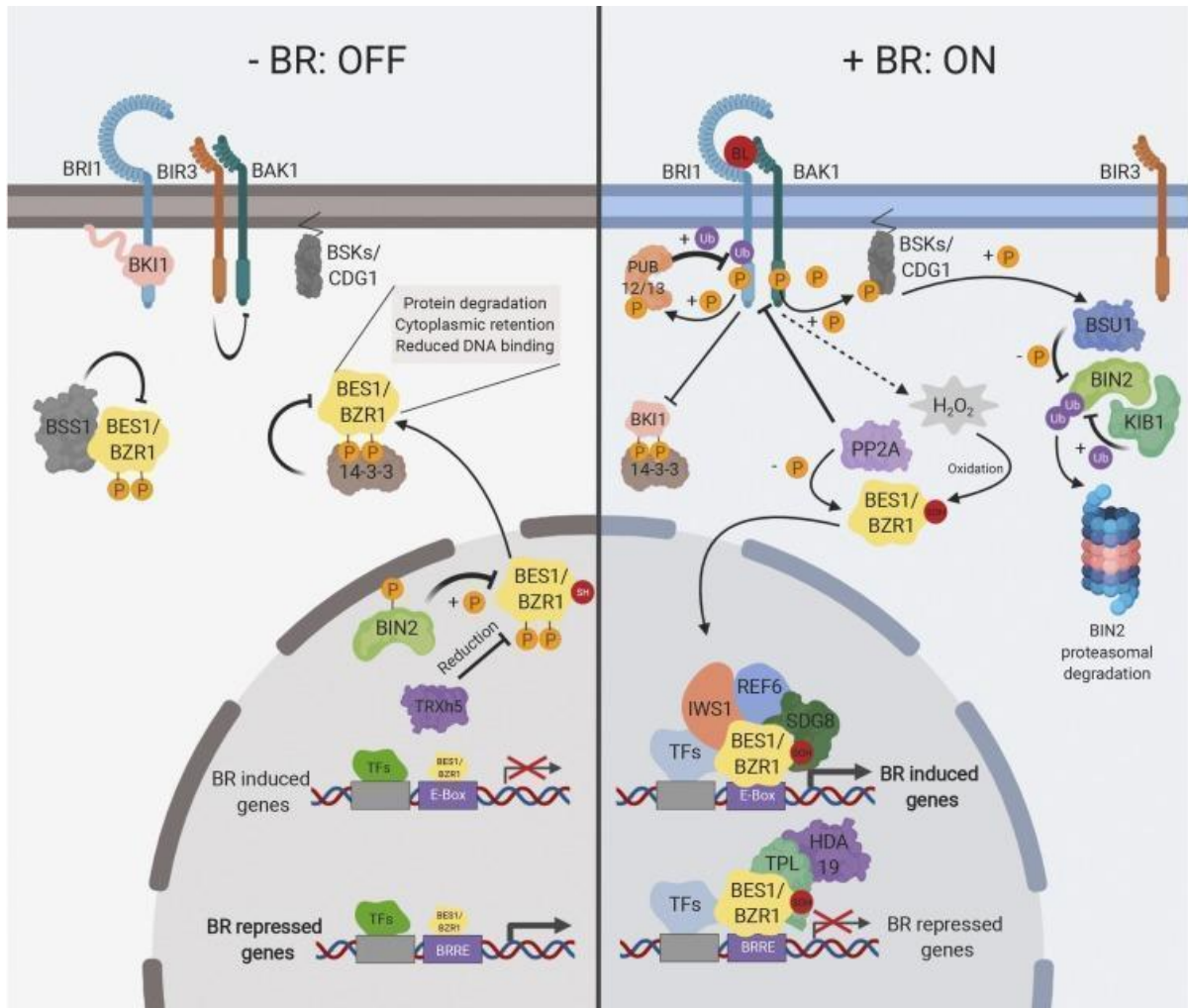


Figura 3. Via de sinalização de brassinosteróides. A imagem esquerda mostra a sinalização em baixas concentrações de BRs, no qual a proteína BIN2 impede a ação dos TFs BES1/BZR2 e BZR1. A imagem direita mostra a sinalização em níveis basais de BRs, no qual a proteína BIN2 ubiquitinada e BES1/BZR2 e BZR1 estão localizados no núcleo, permitindo a indução/repressão de genes regulados por BRs.

Fonte: elaborado por Nolan *et al.* (2020).

Poucos estudos relatam a relação entre brassinosteróides e as vias de resposta à deficiência de fósforo (ZOU *et al.*, 2020; DEMIRER *et al.*, 2022). Entretanto, estudos em *A. thaliana*, apesar de ainda relativamente escassos, demonstraram que a deficiência de fósforo reduz a expressão de genes de biossíntese de brassinosteróides e que plantas de *A. thaliana* expressando constitutivamente *BZR2* e *BZR1* são insensíveis às condições de privação de Pi (SINGH *et al.*, 2014). Nesse sentido, esses mutantes apresentam meristema radicular, morfologia celular e densidade de raízes laterais (LRs) indistinguíveis, tanto em tratamentos com a presença quanto a ausência do nutriente fósforo.

1.5 O MUTANTE *d2-1* COMO UMA ESTRATÉGIA DE PESQUISA

A caracterização funcional de genótipos é determinante para a compreensão das adaptações fenotípicas em resposta aos fatores ambientais e também para o desenvolvimento de cultivares de interesse agrícola (JENA e MACKILL, 2008). Nesse sentido, o uso de linhagens de mutantes tem se tornado uma estratégia recorrente e bem-sucedida em estudos que buscam descrever a função de genes e estabelecer relações genótipo-fenótipo (LO *et al.*, 2016; VIANA *et al.*, 2019).

A linhagem *ebisu dwarf (d2-1)* em arroz, construída no *background* T65, possui uma mutação no gene *D2*, comprometendo a via de biossíntese de brassinosteróides (HONG *et al.*, 2003). Essa linhagem possui diversas características fenotípicas distintas de plantas tipo-selvagem (WT), tais como: nanismo acentuado, já que as plantas mutantes apresentam tamanho 30% menor em comparação às WT; folhas eretas, com pouco afastamento em relação ao eixo vertical da lâmina foliar; grãos levemente menores; e biossíntese de um terço dos níveis de castasterona (um BR bioativo) em relação às plantas WT.

O gene *D2* (CYP90D2) é uma C-3 desidrogenase responsável pela catálise de uma etapa da oxidação na via tardia da síntese de brassinosteróides. A mutação causa o comprometimento da reação de conversão de 6-Dioxoteasterona (6-DeoxoTE) a 3-Dihidro-6-Dioxoteasterona (6-Deoxo3DT) e consequentemente afeta os níveis de Teasterona (TE) a 3-Dihidroteasterona (3DT). Desse modo, ocorre o impedimento da síntese de brassinolídeos (BL), principal grupo de BRs ativos, o que resulta em baixos níveis dessa molécula, mas sem comprometimento direto da sinalização de BRs (HONG *et al.*, 2003; DA SILVA *et al.*, 2021).

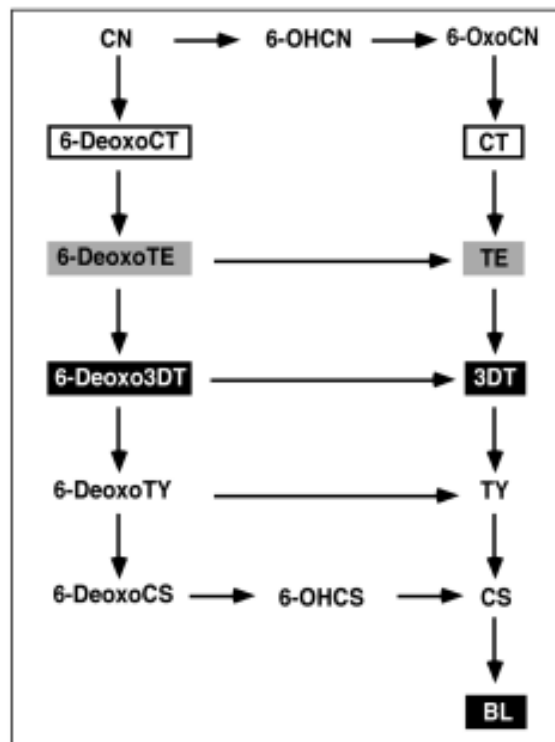


Figura 4. Via de biossíntese de brassinosteróides. As etapas da via comprometidas pela mutação no gene *D2* estão destacadas em cinza. Os produtos intermediários com seus níveis diretamente afetados e o componente bioativo ao final da via estão destacados em preto. Fonte: Elaborado por Hong *et al.* (2003).

Os dados publicados até o momento indicam que a sinalização do fitormônio é antagonista à resposta ao estresse por deficiência de fósforo em *A. thaliana* (SINGH *et al.*, 2014) e em folhas de *O. sativa* (ZOU *et al.*, 2020). A resposta ao estresse aparenta ser incrementada quanto mais reprimida for a sinalização de BRs ou os níveis deles. Desse modo, é esperado que plantas insensíveis ou com as vias de biossíntese de BRs comprometidas possuam uma melhor resposta-adaptativa à ausência de fósforo. O presente trabalho busca utilizar a linhagem *d2-1* a fim de caracterizar a relação entre os níveis de brassinosteróides e a resposta à deficiência de fósforo em raízes de plantas de arroz.

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a crescente demanda mundial pela produção de alimentos e que o cultivo de arroz (*O. sativa*) é altamente dependente de fertilizantes fosfatados (YE *et al.*, 2019), é desejável um aumento na eficiência do uso do fósforo (Pi) pela planta, já que esse é um recurso finito e não-renovável. Muitas das mudanças que ocorrem em plantas em resposta à deficiência de Pi, sejam elas bioquímicas, morfológicas ou fisiológicas, estão associadas à regulação da expressão gênica. Muitos dos genes que apresentam expressão diferencial em resposta ao estresse estão diretamente envolvidos com o aumento da disponibilidade e absorção de Pi pelas raízes (EMBRAPA, 2001). Estudos em *A. thaliana* já apontam relação entre brassinosteróides e a resposta à deficiência de fósforo (SINGH *et al.*, 2014), mas os trabalhos que buscam explorar essa relação em plantas de arroz são escassos.

Portanto, a ampliação do conhecimento acerca dos mecanismos moleculares do arroz envolvidos na resposta e adaptação aos estresses abióticos, como a deficiência de fósforo, apresenta uma alternativa para programas de melhoramento genético. Ademais, facilita também a compreensão sobre as semelhanças e singularidades das respostas de outras espécies economicamente relevantes frente à mesma condição, já que o arroz é utilizado como planta-modelo para estudos em cereais e monocotiledôneas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o desempenho de plantas deficientes em brassinosteróides frente à deficiência de fosfato e confirmar ou descartar a relação entre esse fitormônio e a resposta ao estresse em arroz, utilizando plantas das linhagens T65 (tipo selvagem) e *d2-1* (mutante de biossíntese de brassinosteróides).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Analisar as características fenotípicas tais quais comprimento radicular, peso seco e parâmetros fotossintéticos de plantas T65 e *d2-1* em condições controle e de privação de fosfato.

3.2.2 Analisar comparativamente, em raízes, os níveis de expressão de genes marcadores de resposta à deficiência de fosfato e da via de sinalização de BRs nos genótipos T65 e *d2-1*, em condições ótimas e de privação de fosfato.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL, CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E TRATAMENTOS

Plantas de arroz das linhagens T65 e *d2-1* (Hong *et al.*, 2003) foram utilizadas para todos os experimentos. As sementes dessas linhagens foram fornecidas pelo professor Dr. Zhi-Yong Wang, do departamento de Biologia Vegetal da Carnegie Institution for Science, Stanford, California, EUA. As sementes de arroz foram desinfestadas em capela de fluxo laminar com hipoclorito de sódio 4% por 30 minutos, álcool 70% por 1 min e lavadas cinco vezes com H₂O destilada autoclavada. Em seguida, foram suspensas em rede de náilon e germinadas em água destilada. As sementes foram mantidas no escuro pelas primeiras 24h e posteriormente em fotoperíodo de 12h/12h a 28°C até completar 10 dias de germinação.

Para os experimentos, 44 plântulas de cada genótipo foram transferidas para solução nutritiva de Yoshida *et al.* (1974), contendo: 2.86 mM NH₄NO₃, 1.03 mM K₂SO₄, 0.997 mM CaCl₂, 1.67 mM MgSO₄, 0.079 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0.009 mM MnCl₂, 0.019 mM H₃BO₃, 0.155 μM CuSO₄, 0.154 μM ZnSO₄, 0.071 mM Ácido Cítrico e 0.036 mM FeCl₃ e contendo 0.323 mM (condição controle) ou 0 mM de NaH₂PO₄ (condição de estresse por deficiência de fosfato). Em ambos os tratamentos, a solução nutritiva era trocada a cada 3 dias e teve o seu pH ajustado para 5,0 com NaOH. As plantas foram mantidas em sala de cultivo por até 45 dias a 28°C e com um fotoperíodo de 12h/12h.

Para a análise da expressão gênica, quinze plantas de cada grupo amostral (T65 +Pi, T65 -Pi, *d2-1* +Pi e *d2-1* -Pi) foram coletadas após 15 dias de tratamento nas soluções de hidroponia, resultando em triplicatas de cinco plantas. As raízes e partes aéreas das plantas de arroz foram coletadas, imediatamente transferidas para nitrogênio líquido e estocadas em ultrafreezer a -80°C até a extração de RNA. Para a mensuração das características fenotípicas, duas plantas de cada grupo amostral foram coletadas após 20 dias de tratamento nas soluções de hidroponia para a mensuração das raízes. Cinco plantas de cada grupo amostral foram coletadas após 45 dias de tratamento em solução hidropônica para mensuração de parâmetros morfofisiológicos e posteriormente secas em estufa a 80 °C por 14 dias para a mensuração da massa seca.

4.2 MENSURAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

As raízes de 2 plantas pertencentes a cada genótipo/tratamento foram dispostas em placa de Petri e fotografadas após 20 dias em solução nutritiva. O número de raízes da coroa e o comprimento médio das raízes da coroa dessas plantas foram mensurados com o auxílio do software ImageJ.

Plantas de ambos genótipos, submetidas a 45 dias de tratamento em hidroponia, foram utilizadas para mensuração manual de parâmetros morfológicos das raízes e da parte aérea: comprimento das raízes, medido da base até a raiz mais longa; diâmetro do sistema radicular, a maior distância horizontal entre raízes do sistema radicular; altura da parte aérea, medido da base até o ponto mais alto; e número de perfilhos, contabilizando o número de estruturas reprodutivas. Após, a parte aérea e as raízes de cada planta foram separadas e secas em estufa por 14 dias a 80 °C e pesadas em balança analítica a fim de estabelecer a massa seca média de cada grupo amostral.

O teste estatístico de análise de variância (ANOVA) com dois fatores e teste de Tukey de múltiplas comparações foi aplicado para avaliação das diferenças entre grupos amostrais, com linha de corte de significância estabelecida para $P \leq 0,05$. Tanto a aplicação dos testes quanto os gráficos foram feitos a partir do software GraphPad Prism 8.3.0.

4.3 MENSURAÇÃO DE PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS

As trocas gasosas e a fluorescência da clorofila *a* foram medidas nas folhas mais jovens totalmente expandidas de plantas de arroz T65 e *d2-1* tratadas ou não com a condição de deficiência de fósforo (-Pi). As medidas foram realizadas após 45 dias de tratamento.

A taxa de assimilação de CO₂ (A), condutância estomática (g_s), concentração interna de CO₂ (C_i) e transpiração (E) foram medidas com um sistema analisador de gases por infravermelho (IRGA) portátil LCpro-SD (ADC Bioscientific). Os parâmetros internos na câmara do IRGA durante as medições de troca gasosa foram: 30 °C, 1000 μmol fótons m⁻².s⁻¹, concentração de CO₂ de 420 ppm, umidade ambiente (~68%). Cada amostra correspondeu ao valor normalizado de quatro folhas de plantas diferentes e são referentes à média das medições realizadas entre

5 e 15 min após a colocação das amostras dentro da câmara de medição, com os parâmetros internos descritos anteriormente. A eficiência do uso da água (WUE) foi calculada como A/E e a eficiência de carboxilação (A/C_i) foi calculada como A/C_i .

A fluorescência da clorofila *a* in vivo foi medida usando um fluorômetro de clorofila OS-30p (Opti-Sciences). Os parâmetros de fluorescência foram medidos pelo método de pulso de saturação (SCHREIBER *et al.*, 1995) em folhas de plantas aclimatadas ao escuro por 30 minutos. A fluorescência máxima (F_m) e mínima (F_o) foram medidas em plantas aclimatadas ao escuro por 30 min e o rendimento quântico máximo do fotossistema II (PSII) (F_v/F_m ; $[F_m - F_o]/F_m$) foi calculado.

O teste T-student foi aplicado para avaliação das diferenças entre grupos amostrais, com linha de corte de significância estabelecida para $P \leq 0,05$. Tanto a aplicação dos testes quanto os gráficos foram feitos a partir do Microsoft Excel.

4.4 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

As amostras de tecido radicular previamente coletadas e congeladas foram pulverizadas em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido. Os tecidos macerados foram homogeneizados com 1 mL de Trizol (Invitrogen) e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente e posteriormente adicionadas de 200 μ L de clorofórmio, homogeneizadas e incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente, a fim de permitir a dissociação dos complexos nucleoprotéicos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos em centrífuga resfriada a 4°C.

Após a centrifugação, as fases clarificadas, contendo o RNA total, foram coletadas e transferidas para novos tubos. A fim de precipitar o RNA, foram adicionados 500 μ L de isopropanol a cada amostra e estas foram incubadas a -20°C por 30 minutos, seguido de centrifugação a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados lavados com 1 mL de etanol 70%, homogeneizadas com vortex e centrifugadas 7750 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras secas em capela. O RNA de cada amostra foi ressuspenso em 20 μ L de água Mili-Q autoclavada, quantificado em Nanodrop e submetido a PCR e eletroforese em gel de agarose para análise da qualidade do RNA.

4.5 SÍNTESE DE cDNA

A fim de purificar as amostras de RNA de possível DNA contaminante, estas foram tratadas com 1 mL de RQ1 RNase-free DNase (Promega) para cada 1 ng de RNA e 1 mL de RQ1 RNase-free 10x Buffer, com volume de água Mili-Q autoclavada para completar 10 μ L de volume total de reação, seguindo protocolo do fabricante. Cada reação foi incubada por 30 minutos a 37°C, após o qual foram adicionados 1 μ L de RQ1 RNase-free DNase Stop Solution e incubadas a 65°C por 10 minutos a fim de finalizar a reação e inativar a DNase. O RNA restante foi novamente quantificado.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando a enzima transcriptase reversa M-MLV RT (Invitrogen), segundo o protocolo do fabricante, com um volume total de 19 μ L por reação. Inicialmente, foi preparado o primeiro mix, contendo 1 μ L de dNTPs 10 mM e 1 μ L de Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 μ g/mL) por reação, aos quais foram adicionados volume de amostra equivalente a 0,5 μ g de RNA e água Mili-Q autoclavada suficiente para volume final de 12 μ L. As amostras foram incubadas a 65°C durante 5 minutos e imediatamente transferidas para o gelo por 5 minutos. Às amostras foram adicionados 6 μ L do segundo mix, contendo 4 μ L de 5X First-Strand Buffer e 2 μ L de DTT 0.1 M por reação, e estas foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 1 μ L de M-MLV RT Invitrogen (200 U) a cada reação. As reações foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 50 minutos e finalizadas pelo aquecimento das amostras a 70°C por 15 minutos. As amostras contendo cDNAs sintetizados foram armazenadas em freezer a -20 °C até as análises de expressão. Uma etapa de PCR e eletroforese em gel de agarose foi realizada para confirmar a qualidade das amostras.

4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES POR RT-qPCR

As análises de RT-qPCR foram realizadas no sistema StepOnePlus™. As reações tinham um passo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 10 segundos a 60°C e 15 segundos a 72°C. As amostras foram mantidas a 60°C por 1 minuto para reanelamento e então aquecidas até 99°C para a aquisição dos dados relativos à curva de desnaturação dos produtos de amplificação.

As reações de RT-qPCR foram feitas com 12,5 µL das amostras de cDNA diluídas com fator 1:50, 2,5 µL de 10X PCR buffer (sem MgCl₂ e DNA-free), 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µL de dNTPs a 10 mM, 0,5 µL de cada par de primers a 10 mM, 3,45 µL de água mQ autoclavada, 4 µL de SYBR-Green 1X e 0,05 µL de *Platinum Taq DNA Polymerase* (5U/µL; Invitrogen). O volume final de cada reação foi de 25 µL. Os *primers* utilizados estão listados na Tabela 1. Como normalizador interno das reações, foi utilizada a sequência gênica de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (OsGAPDH). Todas as reações foram realizadas com três replicatas experimentais e o cálculo foi feito utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). O teste estatístico de análise de variância (ANOVA) com dois fatores e teste de Tukey de múltiplas comparações foi aplicado para avaliação das diferenças entre grupos amostrais, com linha de corte de significância estabelecida para $P \leq 0,05$. Tanto a aplicação dos testes quanto os gráficos foram feitos a partir do software GraphPad Prism 8.3.0.

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados para RT-qPCR.

Sequência alvo	Sequência do <i>primer</i>
GAPDH	F: 5'-TCCAAGACCCTCATCTTTGG-3'
	R: 5'-TCTTTGCTGGGAGCAGAAAT-3'
LPR3	F: 5'-CGTCTATCACTGCCACATCCTG-3'
	R: 5'-TCTCCTCATGCATCAACCACCAC-3'
PHT1-8	F: 5'-AATAGCCAGGCAGGGAAGAAGC-3'
	R: 5'-GCCGCGTCAACAAGAATGACTG-3'
BAK1	F: 5'-TTCTTGCGGCTCAATGGCAATC-3'
	R: 5'-ATATTCCGGCCAGTTCCCTTGG-3'
BRL2	F: 5'-CCGGCGATACAAGAAGTGGTTAGC-3'
	R: 5'-TCATGATCTGCCGATGGTGTGCG-3'

Fonte: elaborado pelo autor

Nota: Os *primers* foram desenhados por Gonçalves (2020) para amplificação do gene normalizador *GAPDH* e dos alvos *LPR3*, *PHT1-8*, *BAK1* e *BRL2*. F e R significam *forward* e *reverse*, respectivamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

5.1.1 Parâmetros morfológicos

Plantas de *O. sativa* tipo-selvagem (T65) e deficientes na biossíntese de brassinosteróides (*d2-1*) foram submetidas às diferentes condições em hidroponia conforme descrito no item 4.1, com a presença ou ausência do nutriente fosfato (Pi). Avaliamos o comprimento e o número de raízes da coroa de duas plantas de arroz para cada tratamento/genótipo após o crescimento em solução nutritiva por 20 dias (Figura 5).

A análise do comprimento médio das raízes (Figura 5B) mostra que não há diferença estatística entre os genótipos ou entre os tratamentos. Por outro lado, esse gráfico mostra uma tendência de aumento do comprimento médio das raízes na condição -Pi para ambos os genótipos. A ausência de diferença estatística pode ser proveniente do baixo número amostral, de modo que seria favorável a repetição desses experimentos com um maior número de plantas.

Em relação ao número de raízes da coroa (Figura 5C), tanto T65 quanto *d2-1* demonstraram redução significativa e proporcional na quantidade de raízes. O comprimento e número de raízes laterais e pelos radiculares não foram mensurados devido ao estágio de desenvolvimento da planta, visto que os sistemas radiculares das plantas em condição +Pi apresentaram muitas sobreposições, impedindo a mensuração de maneira confiável a partir do software.

Nota-se que, quando submetidas às condições de -Pi, as raízes de arroz desses dois genótipos apresentam menor número de raízes, com tendência a um comprimento individual maior para cada raiz. Essa observação é contrária à descrição na literatura para *Arabidopsis* e arroz cultivado em solo (SVISTOONOFF *et al.*, 2007; VEJCHASARN *et al.*, 2016). De acordo com revisão feita por Liu (2021), um possível causador desse fenômeno é o fato de o substrato nutritivo ser líquido, já que o fenótipo observado está em concordância com estudos prévios de deficiência de fosfato em 62 cultivares de arroz mantidas em sistemas de hidroponia. Shimizu *et al.* (2014) também descreve a tendência de aumento na taxa de alongamento das

raízes em até 2,1 vezes na condição -Pi em relação às raízes de plantas com a nutrição adequada em sistema de hidroponia.

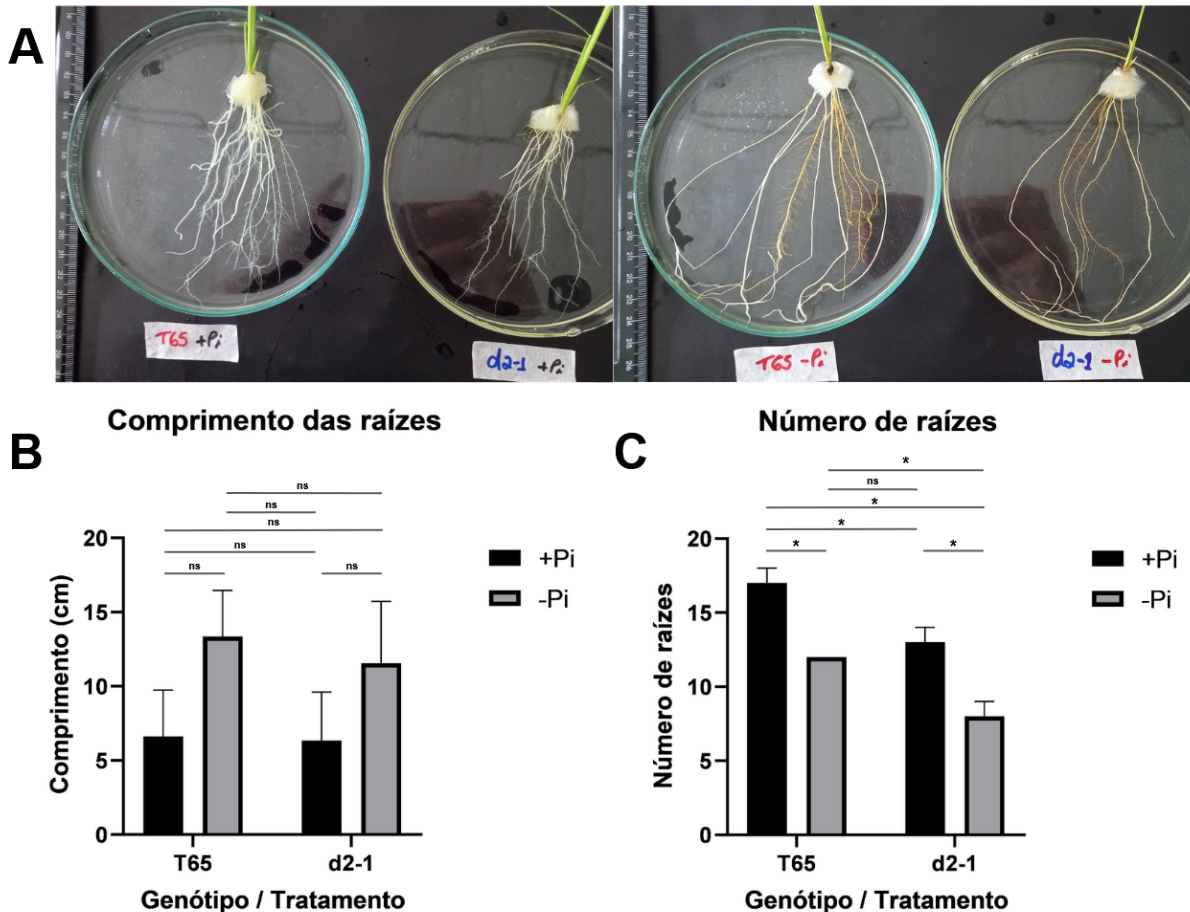


Figura 5. Comprimento das raízes nas condições +Pi e -Pi após 20 dias. A. Raízes de plantas T65 e *d2-1* usadas para a mensuração; B. Gráfico do comprimento médio das raízes da coroa; C. Número de raízes da coroa. Asteriscos (*) indicam diferença significativa entre condições ($P \leq 0,05$); comparações onde não houve diferença estatística estão assinaladas com ns (não significativo). As plantas usadas para a mensuração foram cultivadas por 20 dias em solução nutritiva com e sem fosfato, após 10 dias de germinação em água.

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

A fim de melhor caracterizar o fenótipo das plantas, essas foram submetidas ao cultivo em solução nutritiva por 45 dias (idade mais adequada para medição dos parâmetros fotossintéticos por IRGA). A Figura 6 mostra as diferenças entre os genótipos sob tratamentos controle e deficiência de Pi.

Em relação à altura máxima da parte aérea, *d2-1* apresentou uma altura menor em comparação a T65, com reduções consideráveis nesse parâmetro de ambos genótipos quando expostos ao estresse por fosfato (Figura 6). Na condição +Pi, esse resultado está de acordo com a literatura, já que plantas *d2-1* apresentam

aproximadamente 75% da altura das WT (HONG *et al.*, 2003); na condição -Pi a diferença foi similar, com *d2-1* apresentando aproximadamente 76% da altura de T65.

O número de perfilhos e o diâmetro das raízes observados entre as plantas em condição +Pi também foi maior em T65 em relação a *d2-1* (Figuras 6B e 6C). Contudo, quando submetidas ao estresse, não houve diferença significativa quanto a esses fenótipos, indicando que as plantas atingem um mesmo patamar de desenvolvimento em relação a essas características.

Quando observamos o comprimento máximo das raízes, foi possível notar que *d2-1*, uma planta com parte aérea relativamente menor (Hong *et al.*, 2003), apresentou o mesmo comprimento de raiz que T65 em condições ideais e que, quando submetidas ao estresse, as plantas mutantes apresentaram um comprimento maior que as tipo-selvagem durante o estresse (Figura 6D).

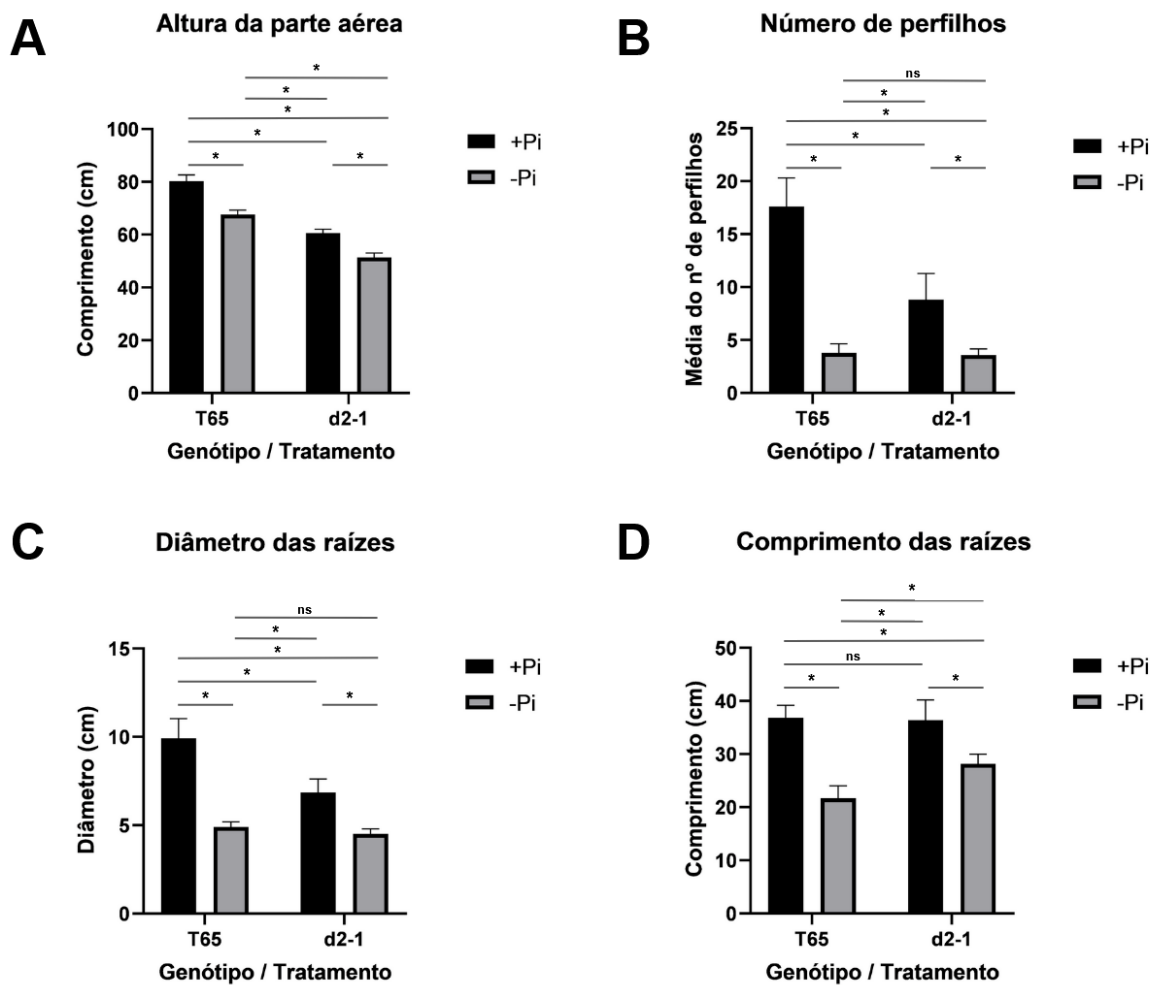


Figura 6. Quantificação de características fenotípicas de T65 e d2-1. A. Altura máxima da parte aérea; B. Número de perfilhos; C. Diâmetro das raízes; D. Comprimento das raízes, medido da base até a raiz mais longa. Asteriscos (*) indicam diferença significativa entre condições ($P \leq 0,05$); comparações onde não houve diferença estatística estão assinaladas com ns (não significativo). As plantas usadas para a mensuração foram cultivadas por 45 dias em solução nutritiva +Pi e -Pi, após 10 dias de germinação em água.

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Os parâmetros morfológicos observados indicam que as plantas deficientes em brassinosteróides não responderam ao estresse em questão com modificações radiculares esperadas. A resposta prevista frente à privação de fósforo consiste no favorecimento de raízes laterais e pelos radiculares (SVISTOONOFF *et al.*, 2007; VEJCHASARN *et al.*, 2016). Os resultados de comprimento e diâmetro das raízes (Figuras 5, 6C e 6D) sugerem que o mutante *d2-1* investe em uma estratégia de alongamento vertical de raízes e não em densidade lateral em termos de volume de raízes e pelos radiculares frente à privação de fósforo. Outra observação notável é de que as plantas de ambos os genótipos submetidas ao estresse por 20 dias apresentaram tendência a possuírem raízes mais longas em comparação à condição

ideal, fenômeno inverso ao observado em plantas mensuradas após 45 dias de tratamento. Por conta disso, há necessidade de análises futuras para mais esclarecimentos.

Em relação aos parâmetros da parte aérea das plantas, as Figuras 6A e 6B mostram que *d2-1* é naturalmente diminuto comparado a T65. Por outro lado, quando expostos à condição -Pi, o número de perfilhos e o diâmetro das raízes foram equiparáveis entre os genótipos, indicando que *d2-1* respondeu de modo similar a T65 frente ao estresse, apesar da desvantagem inicial. Assim, é possível afirmar que *d2-1* sofre um impacto negativo proporcionalmente menor em relação ao exibido por T65 considerando esses fatores.

De maneira geral, a deficiência de brassinosteróides aparenta direcionar a planta a um fenótipo de alongamento radicular, em detrimento do crescimento da parte aérea, quando estas plantas estão em privação de fosfato. O mutante se mostrou capaz de responder de maneira similar a T65 em relação aos outros parâmetros morfológicos medidos, apresentando alterações negativas proporcionalmente menores do que as observadas em T65 em deficiência de fosfato. É relevante mencionar que cultivares de arroz apresentam diferenças nas respostas aos diferentes estresses e as peculiaridades observadas neste caso podem estar relacionadas, em particular, ao cultivar T65.

5.1.2 Massa seca

Após a realização das mensurações acima, as mesmas plantas foram mantidas em estufa por 14 d e pesadas em balança analítica. A Figura 7 mostra uma clara diferença quanto a massa seca das plantas sob condição ótima, com o mutante apresentando aproximadamente metade (~45%) da massa das plantas T65 tanto da parte aérea quanto das raízes. Em ambos os genótipos, as reduções quanto a massa seca foram agudas quando as plantas foram submetidas ao estresse. Entretanto, a redução na massa das plantas T65 foi de ~77% tanto nas raízes quanto na parte aérea, enquanto as plantas *d2-1* sofreram uma redução de ~61% quando submetidas ao estresse, ou seja, apresentaram menor perda de massa em comparação às plantas WT.

Em concordância com as mensurações morfológicas, esses resultados mostram que ambos os genótipos apresentam uma biomassa similar entre si quando

expostos à deficiência de fósforo. Da mesma maneira, a redução proporcionalmente menor observada no mutante é um indicativo de que esta mutação auxilia na adaptação da planta às condições de -Pi, permitindo que *d2-1* se equipare a T65 quando sob estresse, ainda que tenha apresentado menor crescimento e desenvolvimento sob condição ótima.

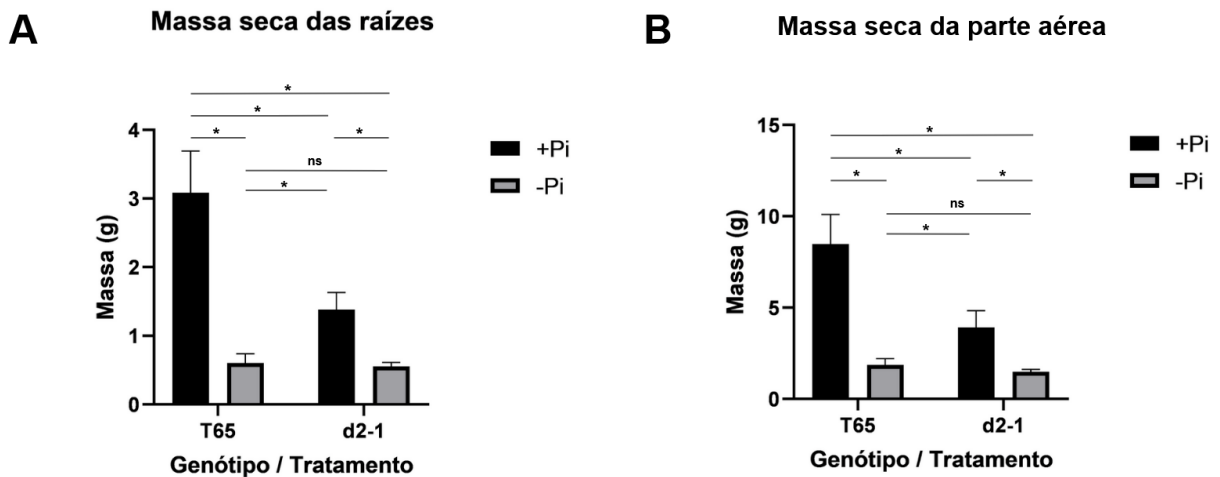


Figura 7. Massa seca das plantas após o tratamento. A. Massa seca das raízes; B. Massa seca da parte aérea. Asteriscos (*) indicam diferença significativa entre condições ($P \leq 0,05$); comparações onde não houve diferença estatística estão assinaladas com ns (não significativo). As plantas usadas para a mensuração foram cultivadas por 45 dias em solução nutritiva +Pi e -Pi, após 10 dias de germinação em água.

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

5.1.3 Dados de fotossíntese

Os parâmetros fotossintéticos das plantas com 45 dias foram medidos a fim de melhor estabelecer as respostas fisiológicas de ambos os genótipos (Figura 8). Não houve diferenças nos parâmetros de fluorescência da clorofila, tanto na fluorescência máxima (F_m), quanto no rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) entre genótipos e tratamentos.

As plantas T65 apresentaram uma maior concentração interna de CO_2 quando submetidas ao estresse por fósforo (Figura 8C), de modo que a menor assimilação de CO_2 nessas plantas (Figura 8D) não foi causada por qualquer forma de restrição do influxo de CO_2 no mesófilo ou por fechamento estomático (Figura 8F). A Figura 8E mostra que, para ambos os genótipos, a deficiência de fósforo aumentou as taxas de transpiração das plantas. A variação na taxa de transpiração

é um das respostas comuns e serve como indicativo de estresses em plantas (RASHED, 2016).

As plantas tipo-selvagem também apresentaram uma menor eficiência no uso de água quando submetidas à condição -Pi (Figura 8G), em consequência da maior taxa de assimilação de CO₂ e transpiração. Esse efeito não foi observado nas plantas *d2-1*. Não houve diferença na eficiência de carboxilação e na temperatura das folhas entre os tratamentos e genótipos (Figuras 8H e 8I).

De modo geral, os resultados sugerem que *d2-1* tem uma leve tendência a sofrer menos efeitos negativos durante o tratamento de deficiência de fosfato, considerando os parâmetros mencionados.

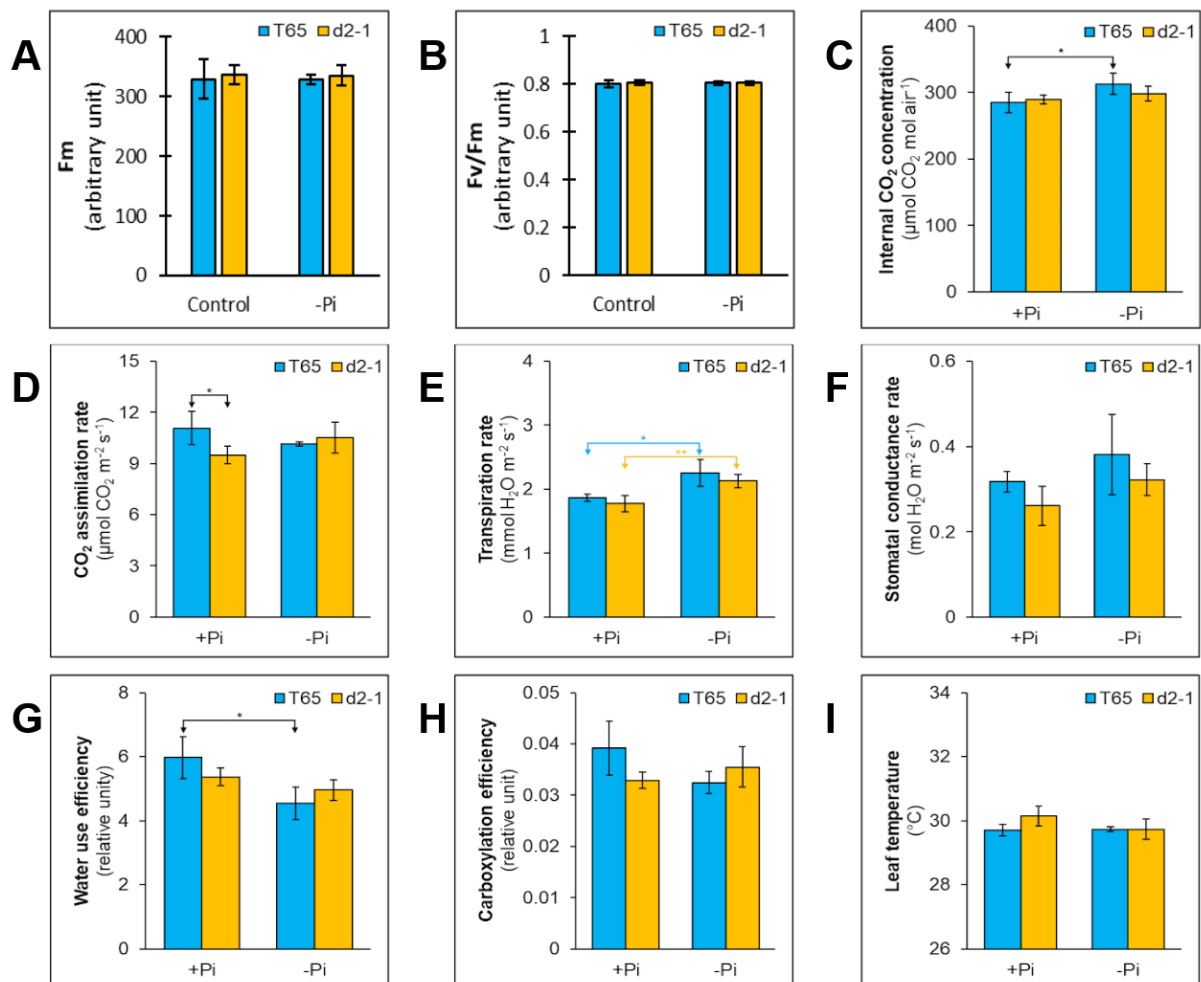


Figura 8. Parâmetros fotossintéticos de T65 e *d2-1* nas condições +Pi e -Pi. A. Fluorescência máxima da clorofila; B. Rendimento quântico máximo do PSII; C. Concentração interna de CO₂; D. Taxa de assimilação de CO₂; E. Taxa de transpiração; F. Condutância estomatal; G. Eficiência no uso de água; H. Eficiência de carboxilação; I. Temperatura das folhas. Asteriscos (*) indicam diferença significativa entre condições (P ≤ 0,05). As plantas usadas para a mensuração foram crescidas por 45 dias em soluções nutritivas +Pi e -Pi, após 10 dias de germinação em água. Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Em relação à caracterização fenotípica do mutante em condições ideais (+Pi), não há diferenças significativas suficientes na maioria dos parâmetros fotossintéticos mensurados para justificar as diferenças observadas entre T65 e *d2-1*. As menores concentrações de fitormônios brassinosteróides, associados à menor taxa de assimilação de carbono por área foliar são fatores que podem estar associados à menor estatura das plantas *d2-1*, visto que a assimilação de carbono está diretamente relacionada ao crescimento.

5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Os cDNAs das plantas submetidas ao experimento de hidroponia por 15 dias foram usados para as reações de RT-qPCR e os resultados são apresentados na Figura 9. Dentre os genes da via de sinalização de fosfato, os níveis de expressão de *LPR3* (LOC_Os01g03630) foram baixos e similares para os dois genótipos no tratamento +Pi. Houve aumento significativo na expressão desse gene em ambos os genótipos quando essas plantas foram submetidas ao tratamento -Pi, mas de maneira menos intensa no mutante (Figura 9A). O padrão de expressão de *PHT1-8* (LOC_Os10g30790) foi similar ao de *LPR3*. Entretanto, não houve diferença significativa entre os níveis de expressão desse gene no mutante em ambas as condições ou entre os tratamentos -Pi para os dois genótipos (Figura 9B).

Para os genes da via de sinalização de BRs, os níveis de *BRI1-like 2* (BRL2) (LOC_Os06g47700) foram baixos em T65 em condição +Pi e altos em condição -Pi. Por outro lado, o mutante apresentou altos níveis de expressão em +Pi e baixos níveis em -Pi (Figura 9C). O gene *BAK1* (LOC_Os01g59440), de maneira similar, apresentou baixa expressão em T65 em +Pi e uma alta expressão na condição de -Pi. O mutante apresentou altos níveis de expressão de *BAK1* na condição +Pi e redução significativa de expressão em -Pi (Figura 9D).

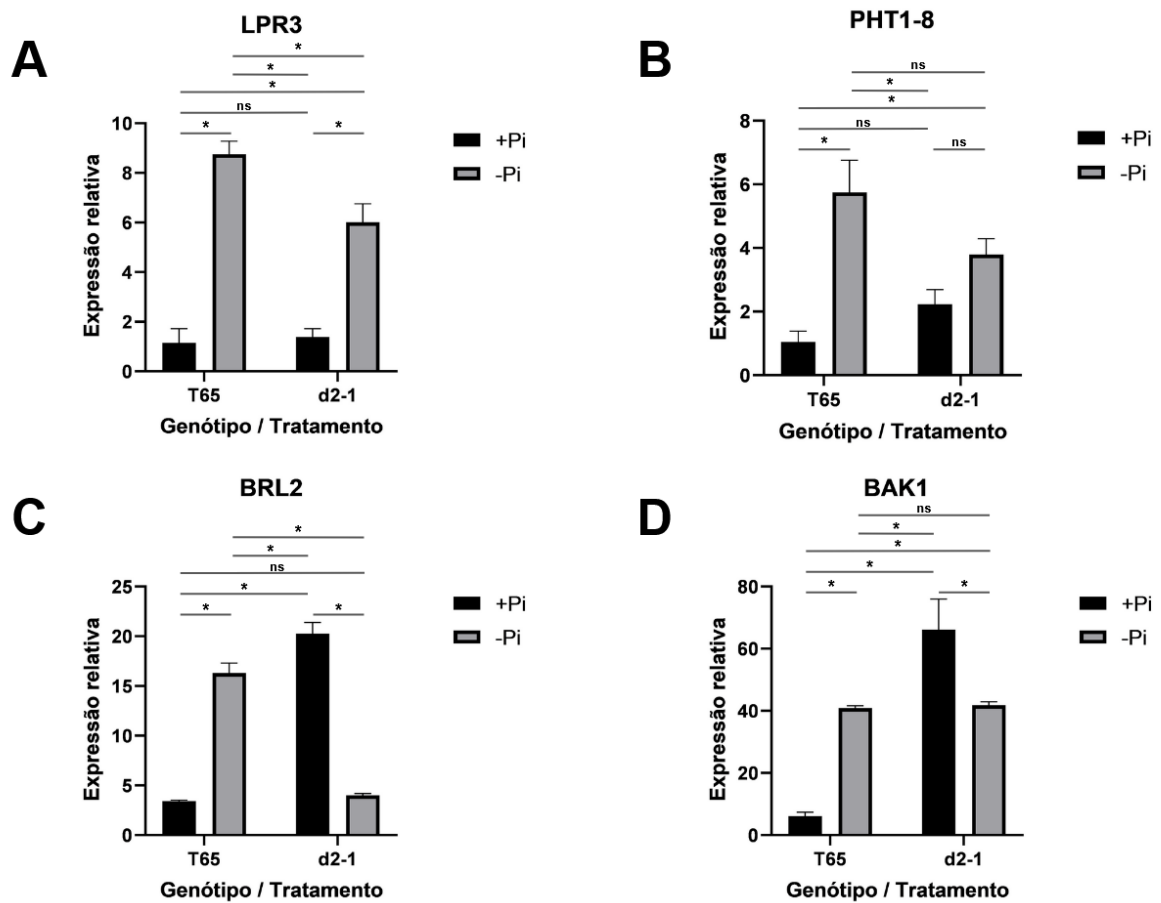


Figura 9. Expressão relativa dos genes alvo das vias de sinalização de fosfato e de brassinosteróides. Os gráficos mostram os níveis de expressão relativa dos genes-alvo das vias de sinalização de fosfato (A e B) e das vias de sinalização de brassinosteróides (C e D) em raízes de arroz para os genótipos T65 e *d2-1* nas condições +Pi e -Pi. A expressão foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ para o *threshold* de 200 e foram normalizados com a expressão de *GAPDH*. Asteriscos (*) indicam diferença significativa entre condições ($P < 0,05$); comparações onde não houve diferença estatística estão assinaladas com *ns* (não significativo).
Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Analisando os níveis de expressão de *LPR3*, os resultados estão de acordo com a literatura (Al *et al.*, 2023) para os dois genótipos, já que esse é um gene de resposta ao estresse de Pi. Por outro lado, a hipótese proposta por esse trabalho, com base nos dados até então publicados (SINGH *et al.*, 2014; ZOU *et al.*, 2020; GONÇALVES, 2020) sugeria que o mutante *d2-1* apresentaria uma resposta incrementada à deficiência de fosfato quanto menores os níveis/sinalização de BRs. Os dados para esse gene indicam uma resposta contrária, já que *d2-1* apresentou menores níveis de expressão de *LPR3* em comparação à T65 durante a privação de fosfato. Desta maneira, é possível que as menores alterações fenotípicas no mutante frente à privação de fosfato (ZOU *et al.*, 2020) sejam resultado de uma

resposta inadequada quanto à expressão de genes de captação e sinalização de fosfato.

Os níveis de expressão de *PHT1-8* apresentaram o mesmo padrão de expressão que *LPR3* em T65, com baixa expressão em +Pi e alta expressão em -Pi, em concordância com Jia *et al.* (2017). Apesar da falta de diferenças estatísticas entre os genótipos em cada tratamento, esses dados indicam que *d2-1* apresenta em ambas as condições um nível de expressão desse gene, relacionado à captação e migração de fosfato das raízes à parte aérea, que está entre os níveis apresentados pela planta tipo-selvagem em condição ótima ou de estresse. A semelhança entre os níveis de expressão no mutante frente aos dois tratamentos é um indicativo de que *PHT1-8*, ou outro membro da família PHT1, pode estar relacionado à insensibilidade fenotípica do mutante frente ao estresse. Entretanto, as análises feitas representam somente um recorte temporal no desenvolvimento dessas plantas, com alguns genes da via de sinalização de fosfato, de modo que análises mais robustas se fazem necessárias para uma conclusão definitiva.

Em relação aos genes da via de sinalização de BRs, *BAK1* é uma proteína quinase de membrana que atua em conjunto com *BRI1*, um receptor transmembrana de BRs, e *BRL2* é um homólogo de *BRI1* (WANG *et al.*, 2001,; LI, 2003; GONÇALVES, 2020). Ambos os genes estão associados às primeiras etapas da via de sinalização de BRs. Quando comparamos os níveis de expressão entre tratamentos, foi observado que nas plantas T65 há um aumento tanto de *BRL2* quanto de *BAK1* durante o estresse por deficiência de Pi. Por outro lado, o mutante apresenta uma expressão inversa da observada em T65, com altos níveis de ambos os genes na condição controle e exibindo uma redução significativa durante o estresse. Apesar da redução na expressão de *BAK1* durante o estresse no mutante, os níveis foram similares aos encontrados em T65 -Pi, possivelmente indicando a necessidade de um nível específico dessa proteína na resposta à privação de fosfato. A inversão na sinalização de BRs pode ser um dos fatores que levam à redução na expressão de genes de resposta a fosfato, associando as duas vias de sinalização.

A sinalização de BRs, incluindo a primeira interação de BRs com *BRI1* na membrana, é altamente dependente de cascatas de fosforilação (WANG *et al.*, 2008). Desse modo, é possível que os altos níveis de expressão desses receptores observados em *d2-1* em condições +Pi sejam resultado de uma compensação dos

baixos níveis endógenos de BRs por meio de sinalização mais robusta, quando fosfato está amplamente disponível. A regulação alterada dos genes de sinalização de BR na privação de fosfato em *d2-1* merece investigação futura em maiores detalhes, visto que é a primeira vez que isso é observado.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os mecanismos de tolerância de espécies vegetais à deficiência de fósforo (-Pi) têm sido alvo de pesquisas nas últimas décadas. Recentemente, indícios de que os brassinosteróides, uma classe de fitormônios, podem fazer parte desse mecanismo abriram uma nova via de estudos. O presente trabalho teve como objetivo compreender melhor a possível interação entre esses dois fatores e gerar conhecimento acerca desse tema, até então pouco explorado.

Trabalhos prévios resultaram na hipótese de que os brassinosteróides e a sinalização à deficiência de fosfato estavam relacionados e de modo antagônico. Portanto, por meio do uso de um mutante deficiente na síntese de brassinosteróides (*d2-1*), investigamos a expressão de genes-chave das vias de sinalização de deficiência de fosfato e de brassinosteróides.

Baseado nos dados de expressão gênica, os resultados obtidos para os genes mensurados não suportam a hipótese inicial, já que a condição -Pi durante o desenvolvimento dos mutantes não levou a uma sinalização otimizada das vias de resposta à fosfato. Por outro lado, esses dados indicam que parece haver correlação entre estas duas vias de sinalização e a aparente insensibilidade do mutante à -Pi, ainda que não diretamente explicadas pela expressão dos genes analisados.

Ademais, apesar do fenótipo de nanismo ainda ser evidente na fase reprodutiva de *d2-1* cultivadas em condições ideais, os resultados obtidos apontam uma redução nas diferenças fenotípicas ao longo do desenvolvimento de *d2-1* em comparação com as plantas tipo-selvagem (T65) durante o estresse por deficiência de fosfato.

Deste modo, os próximos passos, de maneira a complementar esse trabalho incluem: analisar os níveis de expressão gênica com plantas em diferentes estágios de desenvolvimento, principalmente mais próximos do início do tratamento ($t < 5$ dias), a fim de definir a possibilidade das vias de resposta imediata serem maiores contribuintes para os fenótipos observados; fenotipar os mutantes ao longo do crescimento, de maneira a melhor estabelecer o progresso do desenvolvimento do mutante e usar mais critérios fenotípicos do que os utilizados no presente trabalho; e, por fim, realizar uma análise do transcriptoma (RNAseq) de T65 e *d2-1* em ambos tratamentos, podendo estabelecer outros componentes genéticos

relevantes e de maior significância para estabelecer a relação entre brassinosteróides e a resposta a estresses por deficiência de fosfato.

REFERÊNCIAS

- ABEL, S. Phosphate scouting by root tips. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 39, p. 168–177, out. 2017.
- AI, H. et al. Mutation of OsLPR3 Enhances Tolerance to Phosphate Starvation in Rice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2437–2437, 26 jan. 2023.
- ARENHART, R. A.. **Análise funcional dos genes ASR - Abscísic acid, Stress and Ripening - de arroz (*Oryza sativa* L.) em resposta ao estresse por alumínio**. 2008. 94 f. - UFRGS, Porto Alegre, 2008. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/15471>
- ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 9, n. 4, p. 415–415, nov. 1991.
- BAI, M.-Y. et al. Functions of OsBZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 34, p. 13839–13844, 21 ago. 2007.
- BENKOVÁ, Eva. Plant hormones in interactions with the environment. **Plant Molecular Biology**, [s. l.], v. 91, n. 6, p. 597–597, 2016.
- CAO, Y. et al. Identification and expression analysis of OsLPR family revealed the potential roles of OsLPR3 and 5 in maintaining phosphate homeostasis in rice. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, 3 out. 2016.
- CHEN, J. et al. The Rice CK2 Kinase Regulates Trafficking of Phosphate Transporters in Response to Phosphate Levels. **The Plant Cell**, v. 27, n. 3, p. 711–723, 27 fev. 2015.
- CLOUSE, Steven D. Brassinosteroid Signal Transduction: From Receptor Kinase Activation to Transcriptional Networks Regulating Plant Development. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 1219–1230, 2011.
- COOPER, J. et al. The future distribution and production of global phosphate rock reserves. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 57, n. p. 78–86, p. 78–86, dez. 2011.
- COUDERT, Y. et al. Genetic control of root development in rice, the model cereal. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 4, p. 219–226, abr. 2010.
- DAS, Priyanka *et al.* A unique bZIP transcription factor imparting multiple stress tolerance in Rice. **Rice**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 58, 2019.
- DELSENY, M. Towards an accurate sequence of the rice genome. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 2, p. 101–105, abr. 2003.
- DEMIRER, G. S. et al. The Phosphate Deprivation Response is Mediated by an Interaction between Brassinosteroid Signaling and Zinc in Tomato. **bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)**, 22 set. 2022.
- DING, Y. et al. Iron and callose homeostatic regulation in rice roots under low phosphorus. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 1, dez. 2018.
- ELSER, J. J. Phosphorus: a limiting nutrient for humanity? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 833–838, dez. 2012.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Transportadores de fosfato e outros mecanismos adaptativos de plantas cultivadas em solos deficientes em fósforo**. 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1138497/transportadores-de-fosfato-e-ou-tros-mecanismos-adaptativos-de-plantas-cultivadas-em-solos-deficientes-em-fosforo>. Acesso em: 17 jul. 2023.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C.; LI, Y. C. The Role of Nutrient Efficient Plants in Improving Crop Yields in the Twenty First Century. **Journal of Plant Nutrition**, v. 31, n. 6, p. 1121–1157, 30 maio 2008.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture**. Roma, 2014. Disponível em <<https://www.fao.org/3/i3704e/i3704e.pdf>>. Acesso em 8 de Agosto de 2023.

FAOSTAT - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION. **Crops and livestock products**. 2023. Disponível em <<https://www.fao.org/faostat/en/>>. Acesso em 8 de Agosto de 2023.

FITTER, A. H. The ecological significance of root system architecture: an economic approach. p. 229–243, 27 fev. 1991.

FITZGERALD, M. A.; MCCOUCH, S. R.; HALL, R. D. Not just a grain of rice: the quest for quality. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 3, p. 133–139, mar. 2009.

FRIDMAN, Yulia; SAVALDI-GOLDSTEIN, Sigal. Brassinosteroids in growth control: How, when and where. **Plant Science**, [s. l.], v. 209, p. 24–31, 2013.

FUJISAWA, Y. et al. Suppression of the heterotrimeric G protein causes abnormal morphology, including dwarfism, in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 13, p. 7575–7580, 22 jun. 1999.

GOFF, S. A. A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). **Science**, v. 296, n. 5565, p. 92–100, 5 abr. 2002.

GONÇALVES, B. X. **Controle das respostas à privação de fosfato por genes OsASR em arroz e isolamento de bactérias promotoras de crescimento vegetal**. 2020. UFRGS, Porto Alegre, 2020.

GONÇALVES, B. X. *et al.* Phosphate starvation responses in crop roots: from well-known players to novel candidates. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 178, p. 104162, 2020.

GOWDA, V. R. P. et al. Root biology and genetic improvement for drought avoidance in rice. **Field Crops Research**, v. 122, n. 1, p. 1–13, abr. 2011.

GU, M. et al. Complex Regulation of Plant Phosphate Transporters and the Gap between Molecular Mechanisms and Practical Application: What Is Missing? **Molecular Plant**, v. 9, n. 3, p. 396–416, mar. 2016.

HERRERA-ESTRELLA, Luis; LÓPEZ-ARREDONDO, Damar. Phosphorus: The Underrated Element for Feeding the World. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 461–463, 2016.

HINSINGER, Philippe. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: A review. **Plant and Soil**, [s. l.], v. 237, n. 2, p. 173–195, 2001.

HIROCHIKA, H. et al. Rice Mutant Resources for Gene Discovery. **Plant Molecular Biology**, v. 54, n. 3, p. 325–334, 1 fev. 2004.

HONG, S.-K. et al. How is embryo size genetically regulated in rice? **Development**, v. 122, n. 7, p. 2051–2058, 1 jul. 1996.

HONG, Z. *et al.* A Rice Brassinosteroid-Deficient Mutant, *ebisu dwarf* (*d2*), Is Caused by a Loss of Function of a New Member of Cytochrome P450. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 2900–2910, 2003.

HOSSAIN, M.; NARCISO, J. **LONG-TERM PROSPECTS FOR THE GLOBAL RICE ECONOMY**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.hubrural.org/IMG/pdf/hossain.pdf>>. Acesso em: 14 jul. 2023.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estatística da Produção Agrícola**: Junho de 2023. Rio de Janeiro, 2023. Disponível em <<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=72415>>. Acesso em 13 de Julho de 2023.

JENA, K. K.; MACKILL, D. J. Molecular Markers and Their Use in Marker-Assisted Selection in Rice. **Crop Science**, v. 48, n. 4, p. 1266–1276, jul. 2008.

JIA, H. et al. OsPht1;8, a phosphate transporter, is involved in auxin and phosphate starvation response in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 18, p. 5057–5068, 23 set. 2017.

JOHNSTON, A. E.; TRUST, Lawes; FELLOW, Senior. Efficient use of nutrients in agricultural production systems. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, [s. l.], v. 31, n. 11–14, p. 1599–1620, 2000.

JUNG, J. K. H.; MCCOUCH, S. Getting to the roots of it: Genetic and hormonal control of root architecture. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, 18 jun. 2013.

KIM, T.-W.; WANG, Z.-Y. Brassinosteroid Signal Transduction from Receptor Kinases to Transcription Factors. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 681–704, 2 jun. 2010.

LAMBERS, Hans; PLAXTON, William C. Phosphorus: Back to the Roots. **Annual Plant Reviews Volume 48**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2015. p. 1–22. *E-book*. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118958841.ch1>. Acesso em: 9 dez. 2022.

LI, J. Brassinosteroids signal through two receptor-like kinases. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 5, p. 494–499, out. 2003.

LIN, W.-Y. et al. Long-distance call from phosphate: systemic regulation of phosphate starvation responses. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 7, p. 1817–1827, 24 dez. 2013.

LIU, D. Root developmental responses to phosphorus nutrition. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 63, n. 6, p. 1065–1090, 14 abr. 2021.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LO, S.-F. et al. Genetic resources offer efficient tools for rice functional genomics research. **Plant Cell and Environment**, v. 39, n. 5, p. 998–1013, 24 nov. 2015.

MALAMY, J. E.; RYAN, K. S. Environmental regulation of lateral root initiation in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 127, n. 3, p. 899–909, 2001.

MATZEK, V.; VITOUSEK, P. M. N : P stoichiometry and protein : RNA ratios in vascular plants: an evaluation of the growth-rate hypothesis. **Ecology Letters**, v. 12, n. 8, p. 765–771, 1 ago. 2009.

MENDES, R. M. de S. et al. **Princípios de Fisiologia Vegetal**. Fortaleza - Ceará: [s. n.], 2015.

MENG, F. et al. Molecular Mechanisms of Root Development in Rice. **Rice**, v. 12, n. 1, 10 jan. 2019.

MOLLIER, A.; PELLERIN, S. Maize root system growth and development as influenced by phosphorus deficiency. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 50, n. 333, p. 487–497, 1999.

MÜLLER, B.; GROSSNIKLAUS, U. Model organisms — A historical perspective. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 11, p. 2054–2063, 10 out. 2010.

NOLAN, T. M. et al. Brassinosteroids: Multidimensional Regulators of Plant Growth, Development, and Stress Responses. **The Plant Cell**, v. 32, n. 2, p. 295–318, 1 fev. 2020.

PASZKOWSKI, U. et al. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 20, p. 13324–13329, 23 set. 2002.

PÉRET, B. et al. Root Architecture Responses: In Search of Phosphate. **Plant Physiology**, v. 166, n. 4, p. 1713–1723, 23 out. 2014.

RASHED, M. R. U. Substrate Effects on Plant Transpiration Rate under Several Vapour Pressure Deficit (VPD) Levels. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 7, n. 8, 2016.

REES, T. A. V.; RAVEN, J. A. The maximum growth rate hypothesis is correct for eukaryotic photosynthetic organisms, but not cyanobacteria. **New Phytologist**, v. 230, n. 2, p. 601-611, 15 jan. 2021.

REN, M. et al. Phenotypes and Molecular Mechanisms Underlying the Root Response to Phosphate Deprivation in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5107–5107, 7 mar. 2023.

SAINI, S.; SHARMA, I.; PATI, P. K. Crosstalk of brassinosteroids with other phytohormones under various abiotic stresses. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 6, 2018.

SASAKI, T.; BURR, B. International Rice Genome Sequencing Project: the effort to completely sequence the rice genome. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, n. 2, p. 138–142, abr. 2000.

SCHREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. Chlorophyll Fluorescence as a Noninvasive Indicator for Rapid Assessment of *In Vivo* Photosynthesis. **Ecophysiology of Photosynthesis**, v. 100, p. 49–70, 1995.

SECCO, D. et al. Spatio-Temporal Transcript Profiling of Rice Roots and Shoots in Response to Phosphate Starvation and Recovery. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 25, n. 11, p. 4285–4304, 2013.

SILVA, J. B. DA; ESPÍNDOLA, J. S.; ESPÍNDOLA, T. K. A. Brassinosteróides: caracterização e influência sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas. **Revista Campo Digital**, v. 16, 19 out. 2021.

SINGH, A. P. et al. Activity of the Brassinosteroid Transcription Factors BRASSINAZOLE RESISTANT1 and BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1-ETHYL METHANESULFONATE-SUPPRESSOR1/BRASSINAZOLE RESISTANT2 Blocks Developmental Reprogramming in Response to Low Phosphate Availability. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 166, n. 2, p. 678–688, 2014.

STUTTER, M. I. et al. Recovering Phosphorus from Soil: A Root Solution?. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 1977–1978, 2012.

SVISTOONOFF, S. et al. Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. **Nature Genetics**, v. 39, n. 6, p. 792–796, 1 jun. 2007.

TANAKA, K. et al. Brassinosteroid Homeostasis in Arabidopsis Is Ensured by Feedback Expressions of Multiple Genes Involved in Its Metabolism. **Plant Physiology**, v. 138, n. 2, p. 1117–1125, 20 maio 2005.

TICCONI, C. A. et al. ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 33, p. 14174–14179, 18 ago. 2009.

TIECHER, T. et al. Forms of inorganic phosphorus in soil under different long term soil tillage systems and winter crops. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 1, p. 271–282, 1 fev. 2012.

TURNBULL, C. G. N.; LOPEZ-COBOLLO, R. M. Heavy traffic in the fast lane: long-distance signalling by macromolecules. **New Phytologist**, v. 198, n. 1, p. 33–51, 12 fev. 2013.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Rice Yearbook**: World Supply, Utilization and Trade. 2023. Disponível em <<https://www.ers.usda.gov/data-products/rice-yearbook/>>. Acesso em 26 de Julho de 2023.

VEJCHASARN, P.; LYNCH, J. P.; BROWN, K. M. Genetic Variability in Phosphorus Responses of Rice Root Phenotypes. **Rice**, v. 9, n. 1, 13 jun. 2016.

- VIANA, V. E. et al. Mutagenesis in Rice: The Basis for Breeding a New Super Plant. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 8 nov. 2019.
- WANG, X. et al. Sequential Transphosphorylation of the BRI1/BAK1 Receptor Kinase Complex Impacts Early Events in Brassinosteroid Signaling. **Developmental Cell**, v. 15, n. 2, p. 220–235, ago. 2008.
- WANG, Y.; CHEN, Y.; WU, W. Potassium and phosphorus transport and signaling in plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 34–52, jan. 2021.
- WANG, Z.-Y. et al. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. **Nature**, v. 410, n. 6826, p. 380–383, 15 mar. 2001.
- WU, P. et al. Improvement of phosphorus efficiency in rice on the basis of understanding phosphate signaling and homeostasis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 2, p. 205–212, 1 maio 2013.
- YANG, J. et al. Phosphoproteomic Profiling Reveals the Importance of CK2, MAPKs and CDPKs in Response to Phosphate Starvation in Rice. **Plant and Cell Physiology**, v. 60, n. 12, p. 2785–2796, 19 ago. 2019.
- YANG, X.-C.; HWA, C.-M. Genetic modification of plant architecture and variety improvement in rice. **Heredity**, v. 101, n. 5, p. 396–404, 20 ago. 2008.
- YARA, A. et al. Production of Transgenic Japonica Rice (*Oryza sativa*) Cultivar, Taichung 65, by the Agrobacterium-Mediated Method. **Plant Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 305–310, 2001.
- YE, M. et al. Silencing a Simple Extracellular Leucine-Rich Repeat Gene *Osl-BAK1* Enhances the Resistance of Rice to Brown Planthopper *Nilaparvata lugens*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12182–12182, 10 nov. 2021.
- YE, T. *et al.* Nitrogen, phosphorus, and potassium fertilization affects the flowering time of rice (*Oryza sativa* L.). **Global Ecology and Conservation**, [s. l.], v. 20, p. e00753, 2019.
- YIN, Y. et al. BES1 Accumulates in the Nucleus in Response to Brassinosteroids to Regulate Gene Expression and Promote Stem Elongation. **Cell**, v. 109, n. 2, p. 181–191, abr. 2002.
- YOSHIDA, S.; PARAO, F.T. **Climatic influence on yield and yield components of lowland rice in the tropics**. *Em: Los Baños, Filipinos*. [s. n.], 1974. p. 471–494.
- ZOU, L. et al. The molecular basis of the interaction between Brassinosteroid induced and phosphorous deficiency induced leaf inclination in rice. **Plant Growth Regulation**, v. 91, n. 2, p. 263–276, 27 mar. 2020.