

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

EXPRESSÃO GÊNICA EM MUTANTES DE *Arabidopsis thaliana*
RESPONSIVOS À DEFICIÊNCIA DE FÓSFORO SOB DIFERENTES
DISPONIBILIDADES DE FÓSFORO E NITROGÊNIO

Cibele Tesser da Costa
Bióloga/UPF

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase Melhoramento e Biotecnologia Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2011

CIBELE TESSER DA COSTA
Bióloga - UPF

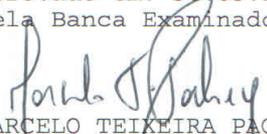
DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM FITOTECNIA

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

Aprovado em: 30.03.2011
Pela Banca Examinadora


MARCELO TEIXEIRA PACHECO
Responsável - PPG Fitotecnia
Carla Andréa Delatorre
Orientadora - PPG Fitotecnia

Homologado em: 30.05.2011
Por


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


CHRISTIAN BREDEMEIER
PPG Fitotecnia


ARTHUR GERMANO FETT NETO
PPG Biologia Celular e Molecular/UFRGS


MÉRCIO LUIZ STRIEDER
EMBRAPA Trigo
Passo Fundo/RS


PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de
Agronomia

*“Viver!
E não ter a vergonha
De ser feliz
Cantar e cantar e cantar
A beleza de ser
Um eterno aprendiz...”*

Gonzaguinha

Aos meus pais, Volmar e Teresinha (in memoriam). Muito obrigada por serem meu alicerce, pelo incentivo incansável e por me ensinarem que o estudo é o maior bem que pode existir.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida, apesar de muitas vezes eu o ter esquecido na correria do dia-a-dia.

À Carla Andréa Delatorre, pela orientação e pelos inúmeros ensinamentos durante estes dois anos.

Ao meu pai, Volmar, a conquista deste sonho não seria possível sem o seu incentivo, apoio e palavras de encorajamento nos momentos mais difíceis. Obrigada por ser o melhor pai que alguém poderia ter, por ter me dado forças, mesmo quando as suas estavam esgotadas.

À Ana Paula, mais do que minha “madrastinha”, uma grande amiga e ao Aluísio, meu mano do coração, sem vocês ao lado do pai, eu não me sentiria tão segura.

Às amigas Janaine, Marília, Nathalia, Ana Dege, Daiane, Aline, Christine, Renata, pela constante motivação, vocês dão brilho à vida e a deixam mais colorida.

A grandes pessoas que fazem parte de minha família, sempre me apoiaram nesta decisão e são fundamentais em minha vida, meu mano Anderson, Roseli, Bruna, Laura, Luisa, Lovaine, Ênio, Jader, Leandra, Valdomiro, Guto, Igor. Sem esquecer a nossa estrela, Tia Odile, que sempre me aconselhou com palavras de sabedoria.

À Letícia, por ter sido mais do que uma colega de apartamento, uma amiga com quem dividi grande parte dos momentos desde o início do mestrado.

Aos amigos e colegas Adriana, Thanise, Taiguer, Augusto e Carolina Tessele, por terem me socorrido nos momentos mais críticos, pelo companheirismo e pelos tantos momentos alegres compartilhados.

Às gurias, Ana Paula, Carolina Cover, Kelly e Noryam, pelas jantas, almoços, histórias contadas e risadas bem dadas.

Ao Fábio, meu anjo no laboratório, que acabou se tornando um grande amigo, sempre disponível, pela dedicação, paciência e ajuda, sem você eu teria ficado perdida em grande parte das etapas deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação Adriano, Ana Carolina, Clever, Daniel, Daniele, Darlan, Felipe (Costela), Felipe (Zambo), Ismael, Ives, Juliano, Márcio, Michael, Norberto e Vladirene. Obrigada pelo companheirismo, pelo aprendizado e crescimento conjuntos nestes dois anos. Em especial ao Anderson, pois aprendemos juntos a desvendar “os mistérios do *Real Time*”.

Aos professores da UFRGS, pelos tantos ensinamentos, com certeza meu crescimento não seria possível sem a participação de cada um. Em especial ao Marcelo Pacheco e ao Federizzi, com quem o convívio foi mais intenso.

Às funcionárias Maria Alice, Karina e Marisa, sempre pacientes para ajudar a solucionar nossos problemas.

A todos que de alguma forma contribuíram para a concretização desta etapa tão importante em minha vida.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

EXPRESSÃO GÊNICA EM MUTANTES DE *Arabidopsis thaliana* RESPONSIVOS À DEFICIÊNCIA DE FÓSFORO SOB DIFERENTES DISPONIBILIDADES DE FÓSFORO E NITROGÊNIO

Autora: Cibele Tesser da Costa¹
Orientadora: Carla Andréa Delatorre

RESUMO

O fósforo (P) e o nitrogênio (N) são nutrientes geralmente limitantes ao crescimento e desenvolvimento vegetal. Respostas aclimatativas à sua limitação referem-se às alterações do desenvolvimento radicular e mobilização, transporte, assimilação e metabolismo destes nutrientes. Para que este processo seja desencadeado, é necessária expressão de genes intimamente relacionados com a percepção e transdução do sinal de deficiência de P e N. Os genes envolvidos neste processo ainda são pouco conhecidos. Neste estudo objetivou-se averiguar o papel dos genes mutados nas rotas de aclimação à limitação de Pi e assimilação de N através da identificação das modificações em nível de expressão gênica nos mutantes *p9*, *p23* e *p37*, bem como através da avaliação da resposta dos mutantes *p9* e *p37* ao etileno. Os três mutantes são complementares e ineficientes em utilizar organofosfatos como fonte de P e *p23* e *p37* são resgatados quando o N é retirado do meio. Há interação P-N em relação à expressão de genes das rotas de aclimação à limitação de P (*AtACP5* e *AtPT2*), de assimilação de N (*NRT1.1*, *NIA1* e *NIA2*) e na modulação das raízes laterais (*ARF8*). Os mutantes têm alteração na expressão dos genes que codificam transportadores de N e P de alta afinidade, assimilação de N, especialmente *NIA2*, e no caso de *p9* e *p23*, ainda, *ARF8*. Na ausência de Pi e/ou N, houve rápida exaustão do centro quiescente nas raízes primárias em *p23* e *p37*, assim, os genes mutados devem fazer parte de uma rota que medie as respostas do crescimento radicular em função da disponibilidade de Pi e N. Os mutantes *p9* e *p37* apresentam deficiência na sinalização ao etileno, sendo possível que *p9* possua alteração na homeostase hormonal, e que modificação nos níveis de auxinas e citocininas afetem a síntese de etileno.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (115p.) Março, 2011.

GENE EXPRESSION IN PHOSPHORUS- DEFICIENCY MUTANTS OF *Arabidopsis thaliana* UNDER DIFFERENT PHOSPHORUS AND NITROGEN AVAILABILITY

Author: Cibele Tesser da Costa²

Adviser: Carla Andréa Delatorre

ABSTRACT

Phosphorus (P) and nitrogen (N) are nutrients highly required by plants, and limit plant growth and development. The main acclimation responses to P and N starvation include changes in root development, mobilization, transport, assimilation and metabolism of these nutrients. For properly acclimation, the expression of genes closely related to the perception and signal transduction of P and N deficiencies must work accurately. Which genes are involved in this process is still unclear, therefore, this study aimed to identify changes at the expression level in the *p9*, *p23* and *p37* mutants in an attempt to identify the role of the mutated genes in the acclimation pathway to Pi starvation. Furthermore, we aimed to verify the P-N interaction and the response of the mutants *p9* and *p37* to ethylene. The three mutants are inefficient in using organophosphates as the only source of P, and *p9* and *p23* recover the COL phenotype in the absence of N. Interaction between P and N was observed in the expression of genes involved in P-deficiency acclimation, namely *AtACP5* and *AtPT2*, as well as in the N assimilation, *NRT1.1*, *NIA1* and *NIA2*, and *ARF8*, involved in lateral root modulation. It was observed that the mutated gene in *p9*, *p23* and *p37* affects genes that encode high affinity N transporters, genes involved in N assimilation, especially *NIA2*. And *p9* and *p23* also has the regulatory circuit that acts on the modulation of lateral roots affected. A rapid depletion of QC in primary roots of *p23* and *p37* was observed in the absence of Pi and/or N. It suggests that the mutated genes are involved in a pathway mediating the root growth in response to Pi and N availability. The mutants, *p9* and *p37*, have some kind of deficiency in ethylene signaling. It is also possible that *p9* is affected in its hormonal homeostasis, and changes in auxin and cytokinin levels affect the ethylene synthesis.

² Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (115p.) March, 2011.

SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO 1
1.1	Hipóteses 4
1.2	Objetivo principal 5
1.3	Objetivos específicos..... 5
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 6
2.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> 6
2.2	Nutrientes essenciais e o desenvolvimento das plantas..... 7
2.3	Fósforo..... 10
2.4	Nitrogênio 17
2.5	Fósforo e nitrogênio: uma possível interação? 21
2.6	Etileno e as mudanças radiculares 23
2.7	Os mutantes <i>p9</i> , <i>p23</i> e <i>p37</i> 24
3	MATERIAL E MÉTODOS 26
3.1	Material vegetal e local de estudo 26
3.2	Condições de crescimento 26
3.3	Composição dos meios de cultura..... 28
3.4	Análises de expressão gênica..... 29
3.5	Visualização da expressão gênica 36
3.6	Efeito do etileno no alongamento radicular 38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 40
4.1	Análises de expressão de genes envolvidos na assimilação de N e na aclimação à limitação de fosfato 40
4.2	Manutenção do centro quiescente 65
4.3	Atividade de fosfatase ácida em <i>p37</i> 83
4.4	Expressão do transportador de Pi AtPT2 em <i>p37</i> 87
4.5	Efeito do etileno no alongamento radicular sob contrastes de P e N..... 89
5	CONCLUSÕES 104
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 106

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1 Iniciadores para genes envolvidos na assimilação de N e na aclimatação à limitação de fosfato, <i>locus</i> , sequências <i>forward</i> e <i>reverse</i> e temperatura de pareamento	34
2 Comprimento da raiz primária (mm) em função da interação tripla de genótipos de arabis, fontes de Pi e etileno aos oito dias após a germinação na presença ou na ausência de N	92

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1	Iniciador actina utilizado como controle endógeno 33
2	Condições de amplificação utilizadas nas reações de PCR Tempo Real, volume final da reação, modo de corrida e estágio para coleta dos dados 36
3	Expressão relativa do gene <i>NAR2.1</i> sob diferentes disponibilidades de Pi, DNA e N em relação à actina, nos mutantes <i>p9</i> , <i>p23</i> , <i>p37</i> e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas 43
4	Expressão relativa do gene <i>NRT2.1</i> sob diferentes disponibilidades de Pi, DNA e N em relação à actina, nos mutantes <i>p9</i> , <i>p23</i> , <i>p37</i> e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas 46
5	Expressão relativa do gene <i>NRT2.2</i> sob diferentes disponibilidades de Pi, DNA e N em relação à actina, nos mutantes <i>p9</i> , <i>p23</i> , <i>p37</i> e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas 47
6	Expressão relativa do gene <i>NRT1.1</i> sob diferentes disponibilidades de Pi, DNA e N em relação à actina, nos mutantes <i>p9</i> , <i>p23</i> , <i>p37</i> e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas 49
7	Expressão relativa do gene <i>NIA1</i> sob diferentes disponibilidades de Pi, DNA e N em relação à actina, nos mutantes <i>p9</i> , <i>p23</i> , <i>p37</i> e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas 52
8	Expressão relativa do gene <i>NIA2</i> sob diferentes disponibilidades de Pi, DNA e N em relação à actina, nos mutantes <i>p9</i> , <i>p23</i> , <i>p37</i> e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas 55

	Página
9	Expressão relativa do gene <i>ARF8</i> sob diferentes disponibilidades de Pi, DNA e N em relação à actina, nos mutantes <i>p9</i> , <i>p23</i> , <i>p37</i> e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas 57
10	Expressão relativa do gene <i>PLDε</i> sob diferentes disponibilidades de Pi, DNA e N em relação à actina, nos mutantes <i>p9</i> , <i>p23</i> , <i>p37</i> e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas 59
11	Expressão relativa do gene <i>AtPT2</i> sob diferentes disponibilidades de Pi e DNA em relação à actina, nos mutantes <i>p9</i> , <i>p23</i> , <i>p37</i> e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas. 62
12	Expressão relativa do gene <i>ACP5</i> sob diferentes disponibilidades de Pi, DNA e N em relação à actina, nos mutantes <i>p9</i> , <i>p23</i> , <i>p37</i> e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas 64
13	Expressão de <i>QC25::GUS</i> nas raízes primárias de <i>p23</i> e COL crescidas sob suficiência de N e diferentes disponibilidades de P durante 11 dias..... 67
14	Expressão de <i>QC25::GUS</i> nas raízes primárias de <i>p23</i> e COL crescidas sob deficiência de N e diferentes condições de P durante 11 dias..... 70
15	Expressão de <i>QC25::GUS</i> nas raízes secundárias de <i>p23</i> e COL crescidas sob suficiência de N e diferentes condições de P durante 11 dias..... 74
16	Expressão de <i>QC25::GUS</i> nas raízes secundárias de <i>p23</i> e COL crescidas sob deficiência de N e diferentes condições de P durante 11 dias..... 76
17	Expressão de <i>QC184::GUS</i> nas raízes primárias de <i>p37</i> e COL crescidas sob diferentes disponibilidades de Pi e N durante 11 dias..... 79
18	Expressão de <i>AtACP5::GUS</i> nas raízes primárias de <i>p37</i> e COL crescidas sob diferentes disponibilidades de Pi e N durante 11 dias.. 85
19	Expressão de <i>AtPT2::GUS</i> nas raízes primárias de <i>p37</i> e COL crescidas sob diferentes disponibilidades de Pi e N durante 11 dias.. 88

1 INTRODUÇÃO

Os nutrientes são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas e devem ser constantemente adquiridos do solo. O crescimento e a proliferação radiculares e algumas respostas funcionais específicas que são determinadas pelo estado nutricional da planta dependem da disponibilidade de nutrientes no solo, uma vez que as reservas nutricionais das sementes, na maioria das espécies, não são suficientes para sustentar o crescimento normal por mais do que alguns dias.

O nitrogênio (N) é um dos elementos mais abundantes na Terra, mas um dos mais críticos para o crescimento vegetal, devido à sua baixa disponibilidade no solo e à sua forma predominante, o nitrato, ser altamente solúvel, de fácil lixiviação ou desnitrificação. O fósforo (P) é o segundo elemento crítico para o desenvolvimento vegetal, pois sua forma assimilável, o ortofosfato (Pi), é geralmente pouco disponível no solo. Sua baixa disponibilidade se deve à afinidade com cátions como o Ca^{+2} , Mg^{+2} e Al^{+3} e à rápida conversão em formas orgânicas, que não são passíveis de assimilação pela planta. Assim, N e P são os macronutrientes mais limitantes no solo em todo o mundo, inclusive em solos brasileiros. Em contrapartida, estes nutrientes são requeridos para o desenvolvimento das plantas, sendo fundamentais no seu metabolismo.

O P faz parte de diversos componentes das células vegetais, como os açúcares-fosfato, intermediários da fotossíntese e respiração, dos fosfolipídios presentes nas membranas celulares e de nucleotídeos armazenadores de energia, como adenosina trifosfato (ATP), além de fazer parte da composição de ácidos nucleicos. O P também é responsável pela fosforilação, que pode causar a (in)ativação de proteínas, como também regular rotas de transdução de sinais. A quantidade de P nas plantas varia entre 0,05% e 0,30% do total de seu peso seco.

O N compõe a estrutura de um grande número de moléculas importantes para as células, como os aminoácidos, as proteínas estruturais e enzimáticas, os ácidos nucleicos (DNA, RNA) e clorofilas. O próprio processo fotossintético é severamente afetado pela deficiência de N, pois depende de proteínas como a Rubisco, proteínas dos fotossistemas, complexos antenas e de grande quantidade de clorofilas.

Os nutrientes são encontrados geralmente nas camadas mais superficiais do solo, sendo que a distribuição dos elementos não é homogênea, podendo variar espacial e temporalmente. Essa variação é devida ao tipo de solo, aplicação de fertilizantes, atividade microbiológica e rotação/sistema de culturas, entre outros fatores. Por causa da sua importância, diversos mecanismos evoluíram nas plantas para a captura eficiente de nutrientes, principalmente em relação às alterações na arquitetura do sistema radicular. Através dessas alterações, as plantas aumentam a superfície de absorção radicular em contato com o solo, permitindo explorar maior volume de solo e obter maior sucesso na busca pelo nutriente.

Em sistemas agrícolas intensivos, P e N são anualmente repostos no solo através de fertilizantes, os quais podem corresponder à boa parte dos custos de produção. Estes nutrientes são obtidos a partir de rochas de fósforo e combustíveis fósseis, respectivamente, os quais são recursos limitados e não renováveis. Outrossim, P e N podem causar eutrofização de recursos hídricos por excesso de uso desses fertilizantes, sobretudo quando mal empregados.

A demanda por plantas cultivadas com características genéticas que otimizem a superação da deficiência de P, bem como a sua captura e utilização, é crescente. Assim sendo, a disponibilidade de genótipos que apresentem essas características e, conseqüentemente, permitam a redução do uso de fertilizantes fosfatados, contribuirá para a redução de custos, menor contaminação do ambiente e economia dos recursos naturais disponíveis.

Apesar de não apresentar importância econômica, *Arabidopsis thaliana* é utilizada como modelo em biologia vegetal. As vantagens do uso desta espécie incluem o genoma seqüenciado, o ciclo de vida curto, a grande produção de sementes por planta, o pequeno espaço necessário para o seu cultivo, a facilidade para transformação genética e o grande número de linhagens mutantes disponíveis. Mutantes de *arabidopsis* têm sido utilizados para elucidar os mecanismos envolvidos na assimilação de P e N do solo. Utilizando esta espécie, CHEN *et al.* (2000) identificaram 22 linhagens mutantes insensíveis a fosfatos orgânicos. Trabalhos posteriores com três mutantes derivados deste *screening* (*p9*, *p23* e *p37*) foram desenvolvidos por Delatorre (2002), Pinto (2005), Delatorre (2009) e Strieder

(2009), que caracterizaram respostas dos mesmos à deficiência de Pi. Delatorre (2002) e Strieder (2009) verificaram a interação deste elemento com outros nutrientes. A identificação de genes envolvidos com a resposta das plantas à deficiência de P em *Arabidopsis* pode permitir a detecção de ortólogos em espécies cultivadas e a extensão das informações obtidas às espécies de interesse agrônomo.

Como demonstrado, conhecimentos acerca da percepção, sinalização e regulação das respostas à deficiência de P ainda são limitados. Assim, a pesquisa envolvendo genes da rota de aclimação à limitação de fosfato parece ser o caminho para a compreensão e manipulação do processo. Além disso, interações entre nutrientes têm sido observadas e, em relação à interação P-N, existem poucos dados publicados. Considera-se que estudos moleculares e fisiológicos com mutantes de *Arabidopsis* ajudarão a elucidar as respostas das plantas às condições limitantes de P e N.

1.1 Hipóteses

1. Os genes de *Arabidopsis thaliana*, mutados em *p9*, *p23* e *p37*, estão envolvidos na rota de aclimação à limitação de fosfato;
2. O mecanismo de *cross-talk* entre P e N, encontra-se alterado nos mutantes *p9*, *p23* e *p37*;
3. Nos três mutantes há alteração na expressão de genes das rotas de percepção, sinalização e regulação da nutrição por P e, possivelmente, a N.

1.2 Objetivo principal

Aumentar os conhecimentos acerca da fisiologia e biologia molecular de mutantes de *Arabidopsis thaliana* no que diz respeito à percepção e resposta à limitação de Pi e à interação P-N.

1.3 Objetivos específicos

1. Identificar modificações na expressão de genes envolvidos na obtenção de P nos mutantes *p9*, *p23* e *p37*, buscando conhecer o papel dos genes mutados na rota de aclimatação à limitação de Pi;
2. Verificar a expressão de genes envolvidos na obtenção e assimilação de P e N dos mutantes em relação à interação P-N, em busca de um melhor entendimento sobre a ação dos genes mutados no processo de sinalização e a sua interação com outros sinais regulatórios em plantas vasculares;
3. Analisar a atividade do centro quiescente do meristema apical radicular das plantas quando submetidas à deficiência de P e N;
4. Verificar a resposta dos mutantes *p9* e *p37* ao etileno em termos de alongamento radicular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana é uma planta silvestre da família Brassicaceae, considerada uma erva daninha, ao contrário de espécies da mesma família, como a couve-flor, o brócolis e o repolho, que têm importância econômica. Acredita-se que *arabidopsis* seja nativa da Europa. Entretanto, não se conhece o seu exato local de origem. A planta de *arabidopsis* caracteriza-se por apresentar porte pequeno, ser de fácil manuseio, com altura variando de 30 a 40 centímetros. As flores geralmente são de auto-fecundação, mas cruzamentos podem ser realizados artificialmente com a obtenção de sementes viáveis (Meyerowitz, 1987). Após a fertilização, o ovário alonga e produz um fruto chamado siliqua. O desenvolvimento e tempo para floração variam de acordo com nutrição, temperatura, comprimento do dia e características genéticas. Se a planta for mantida produzindo flores por meses, pode-se obter até 10.000 sementes de uma única planta. Sob condições ótimas de crescimento, os ecótipos Columbia e Landsberg completam o ciclo em torno de seis semanas (Meyerowitz, 1987). Devido a essas características, *arabidopsis* é considerada uma planta modelo em estudos de biologia vegetal.

Soma-se a isso o fato de esta espécie ter o menor genoma conhecido entre as plantas superiores (114,5 Mb/125 Mb total), dividido entre seus cinco cromossomos no seu conjunto haplóide, o qual foi sequenciado em 2000. Há também um grande número de linhagens mutantes, bem como recursos genéticos disponíveis para a comunidade científica (*The Arabidopsis Information Resource*, 2010).

Arabidopsis é uma espécie que apresenta facilidade para ser mutagenizada, através de mutagênicos químicos, radiação ou inserção de T-DNA. Atualmente, a disponibilidade de mutantes para diversas características tem facilitado a identificação de genes e o entendimento de rotas metabólicas. Geralmente, genes de outras plantas superiores apresentam homologia suficiente com *arabidopsis*, tornando possível a identificação de ortólogos nas plantas cultivadas (Gepstein & Horwitz, 1995).

2.2 Nutrientes essenciais e o desenvolvimento das plantas

O crescimento e desenvolvimento da maioria das plantas superiores são dependentes de alguns elementos químicos, chamados de nutrientes essenciais. É considerado essencial o elemento: (i) sem o qual a planta não consegue completar as fases vegetativa ou reprodutiva do seu ciclo de vida; (ii) a sua deficiência pode ser prevenida ou corrigida somente através da aplicação do elemento em questão e (iii) o elemento está envolvido diretamente com a nutrição da planta, independentemente de seus possíveis efeitos na correção de algumas condições microbiológicas ou químicas desfavoráveis do solo ou de outros meios de cultura (Arnon & Stout, 1939). Os nutrientes minerais são adquiridos principalmente na forma de íons

inorgânicos do solo e sua obtenção é alcançada pelo sistema radicular das plantas. Os nutrientes essenciais são classificados em macronutrientes e micronutrientes, de acordo com a sua concentração na planta. São considerados macronutrientes: nitrogênio, potássio, cálcio, magnésio, fósforo e enxofre; e micronutrientes: cloro, ferro, boro, manganês, sódio, zinco, cobre, níquel e molibdênio. Outros elementos essenciais são hidrogênio, carbono e oxigênio, que não são considerados nutrientes minerais pelo fato de serem obtidos principalmente da água e do dióxido de carbono (CO₂).

Todos os macronutrientes integram compostos orgânicos importantes na planta, como aminoácidos e proteínas (N e S), ácidos nucleicos (N e P), fosfolipídios (P) e clorofila (N e Mg), com exceção do K e do Ca, que não são metabolizados, mas mantêm-se na forma iônica durante o crescimento e desenvolvimento vegetal (Amtmann & Blatt, 2008). Além disso, acredita-se que o transporte de nitrato, fosfato e sulfato seja regulado primeiramente ao nível de transcrição, enquanto o transporte de K⁺ e Ca⁺² seriam regulados principalmente ao nível de proteína (Amtmann & Blatt, 2008). Os elementos P e Mg possuem funções adicionais na conservação e conversão de energia (Amtmann & Blatt, 2008), e alguns elementos têm papel na regulação enzimática, como, por exemplo, P e Ca.

A disponibilidade dos nutrientes é percebida pelas plantas e leva a alterações na fisiologia e morfologia destas. De acordo com Schachtman & Shin (2007), as raízes são o primeiro local a perceber deficiências nutricionais, cujas respostas variam no tempo e com o grau de deficiência nutricional encontrada. Ainda segundo os autores, os primeiros sinais acontecem em menos de seis horas e ocorrem sob redução das

concentrações externas. Os sinais mais tardios, que podem levar dias ou semanas, são gerados quando as concentrações internas chegam a níveis críticos. A regulação das proteínas transportadoras de íons é fundamental para ajustar os parâmetros envolvidos com o desenvolvimento das plantas e para aclimação às mudanças nutricionais no ambiente (Amtmann & Blatt, 2008), mas é apenas um dos muitos processos afetados pela alteração na disponibilidade de nutrientes.

Para manter a homeostase de N, P ou S na planta, uma captura eficiente pelas raízes é fundamental, mesmo em condições desfavoráveis ao crescimento (Gojon *et al.*, 2009). Respostas aclimatativas às mudanças temporais e espaciais da disponibilidade de nutrientes no solo e de acordo com as necessidades da planta acontecem de duas maneiras: (i) regulação de sistemas de transporte na membrana radicular para aumentar a eficiência de captura; e (ii) modulação da arquitetura radicular para aumentar o volume de solo explorado pela planta (Gojon *et al.*, 2009).

As alterações radiculares são fortemente influenciadas pela atividade meristemática durante a limitação nutricional, em cujo processo o centro quiescente (CQ) exerce papel importante. As células do CQ se localizam no ápice radicular e fazem parte de uma região que apresenta baixa taxa de mitose, além de serem distintas histologicamente das células vizinhas (Doerner, 1998). O CQ serve como reservatório de células para garantir a regeneração e persistência do meristema do ápice radicular, pois possuem capacidade de auto-renovação e estão sempre jovens. Em *arabidopsis*, o CQ é composto por quatro a sete células, circundadas por células meristemáticas (Nawy *et al.*, 2005). Alguns fatores de transcrição têm função

crucial na manutenção do centro quiescente, como *SCARECROW (SCR)* e *SHORTROOT (SHR)* (Sabatini *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2007). *PLETHORA1 (PLT1)* e *PLT2* codificam fatores de transcrição do tipo AP2, são induzidos por auxinas e estão envolvidos com a manutenção do meristema, agindo paralelamente com *SHR* e *SCR* (Aida *et al.*, 2004). A expressão de *SCR* parece ser dependente do gene *PDR2* (Ticconi *et al.*, 2009), agindo indiretamente na manutenção do CQ. Verificar a manutenção do CQ em mutantes com alterações na resposta à limitação de P e que apresentam interação com N é importante para entender a participação dos genes mutados nas alterações radiculares em função das deficiências nutricionais.

2.3 Fósforo

O P está envolvido em muitos processos fundamentais na vida da planta, fazendo parte de diversos componentes das células vegetais, como os açúcares-fosfato, intermediários da fotossíntese e respiração e dos fosfolipídios, presentes nas membranas das células. Além disso, P é o único ânion capaz de fazer ligações diester, o que lhe permite compor nucleotídeos armazenadores de energia, bem como fazer parte da composição de ácidos nucleicos. O P também tem função importante na regulação da atividade celular, através da fosforilação de enzimas, podendo causar sua ativação ou inativação. Através da fosforilação, ainda é possível regular rotas de transdução de sinais, em função das condições ambientais ou de desenvolvimento da planta.

A forma pela qual o P é absorvido pelas plantas é o ortofosfato, principalmente H_2PO_4 e HPO_4 , designado como Pi (P inorgânico).

Entretanto, no solo, o P é diluído e pouco móvel, pois ocorre como componente integral de sais de cálcio, ferro e alumínio, ou na forma de moléculas orgânicas (Fang *et al.*, 2009). Os níveis de Pi no solo são regulados principalmente pelas suas interações com superfícies orgânicas e inorgânicas do solo e a sua concentração fica geralmente entre 2 e 10 μM , muito menor do que a concentração de Pi nos tecidos vegetais, que varia de 5 a 20 mM (Raghothama, 1999).

A baixa disponibilidade de P no solo compromete o rendimento das culturas em cerca de 30 a 40% das áreas agricultáveis no mundo (von Uexküll & Mutert, 1995). Nesse sentido, como a quantidade de Pi acessível no solo é muitas vezes menor do que o necessário para o bom desenvolvimento da planta, torna-se necessária a aplicação de fertilizantes fosfatados. O uso de fertilizantes onera custos de produção, além disso, a fonte de P, rochas fosfatadas, é um recurso limitado e não-renovável (Cordell *et al.*, 2009). O acúmulo de P, no caso de erosão e consequente carregamento do P para os rios, pode causar eutrofização, que compromete a qualidade da água (Bennett *et al.*, 2001). Segundo dados da Associação Internacional das Indústrias de Fertilizantes (*International Fertilizer Industry Association- IFA*, 2011), o consumo de fertilizantes fosfatados, incluindo rocha fosfatada, ácido fosfórico, fosfato trissódico, diamônio fosfato e monoamônio fosfato, chegou a 107.586.000 toneladas de P_2O_5 no mundo em 2009, sendo que o consumo em 1999 foi de 94.111.000 toneladas de P_2O_5 .

Quando há deficiência de P no solo, as plantas apresentam algumas respostas características, como o crescimento definhado em plantas jovens

e coloração verde-escuro das folhas, que podem ser mal-formadas e possuir pequenas manchas necróticas. Além disso, pode causar a morte das folhas mais velhas e a formação de talos delgados, bem como atrasar a maturação da planta.

As plantas, ao longo da evolução, desenvolveram diversos mecanismos fisiológicos e bioquímicos para melhorar a captura e uso do P do ambiente. De acordo com Raghothama (1999), as modificações incluem respostas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares. Morfológicamente há aumento na razão raiz/parte aérea, mudanças na morfologia e arquitetura das raízes, aumento na proliferação e alongação de pêlos radiculares, formação de raízes proteóides e aumento da associação com fungos micorrízicos.

Fisiologicamente, há maior captura de Pi através de maior produção de transportadores, redução do efluxo de Pi, aumento na eficiência de uso de Pi, mobilização de Pi do vacúolo para o citoplasma, aumento na translocação de Pi dentro da planta, maior retenção de Pi nas raízes, secreção de ácidos orgânicos, prótons e quelantes, secreção de fosfatases e DNases, alterações na respiração, no metabolismo de carbono, na fotossíntese e na fixação de N. As alterações bioquímicas incluem ativação de enzimas, aumento na produção de fosfatases, DNases e ácidos orgânicos, acúmulo de antocianinas, mudanças na fosforilação de proteínas e ativação de rotas glicolíticas secundárias, além da utilização de rotas alternativas que requeiram menos Pi. Em nível molecular, acontece a ativação de genes envolvidos com a codificação de DNases, fosfatases,

transportadores de Pi, Ca-ATPase, proteínas de armazenamento, β -glucosidase e PEPCase, entre outros.

As principais alterações para aumentar a eficiência de captura de P acontecem nas raízes, que são a principal fonte de todos os elementos necessários para o desenvolvimento das plantas. O crescimento e desenvolvimento radicular apresentam grande plasticidade, sendo que, em solos com baixa disponibilidade de Pi, uma das estratégias para melhorar a eficiência na aquisição de P é o aumento da área superficial radicular em contato com o solo (Kochian *et al.*, 2004). Assim, é possível explorar maior volume de solo e alcançar maior sucesso na busca pelo elemento. Isso é importante, uma vez que o P apresenta relativa imobilidade no solo, as concentrações mais altas geralmente são encontradas na superfície e há pouco movimento do P para as camadas mais profundas (Vance *et al.*, 2003). Em condições de baixas concentrações de Pi no solo, há redução do crescimento da raiz primária e aumento na densidade e alongamento das raízes laterais, afim de maximizar a exploração superficial (Williamson *et al.*, 2001).

Sob condições de deficiência de P, a captura líquida de Pi nas raízes é aumentada. Para tanto, há aumento na expressão de transportadores de Pi, levando a maior influxo de Pi e redução do efluxo de Pi (Kochian *et al.*, 2004). Os transportadores de Pi podem ser divididos em duas categorias, aqueles que atuam em baixas concentrações de Pi (μM), chamados de transportadores de alta afinidade, e os que atuam em altas concentrações de Pi (mM), chamados transportadores de baixa afinidade. Os transportadores de alta afinidade são proteínas associadas à membrana

plasmática das células radiculares e translocam o Pi do meio externo com concentrações em μM para o citoplasma. Por outro lado, ainda não há clareza sobre a natureza e função dos transportadores de baixa afinidade (Raghothama, 1999). A maior parte do Pi é transportado na forma de H_2PO_4 e, possivelmente, o co-transporte, gerador de energia, é realizado com o cátion H^+ , pois há acidificação do citoplasma (Schachtman *et al.*, 1998). A família de transportadores Pht1 está envolvida com o transporte do tipo simporte, no qual íons H_2PO_4 e prótons são movidos do meio externo para o meio interno da célula através dos transportadores localizados na membrana (Smith *et al.*, 2003). Para manter o gradiente eletroquímico e energizar o processo, bombas de prótons H^+/ATPase bombeiam prótons para o meio externo.

Durante a deficiência de Pi, há ativação de determinados genes. Alguns têm funções específicas na aquisição e utilização do Pi, enquanto outros relacionam-se à regulação da rota de resposta à deficiência de Pi (Raghothama, 1999). Nesse sentido, Misson *et al.* (2005) analisaram variações nos transcritos de 22.810 genes e observaram indução de 612 genes e repressão de 254 genes responsivos à Pi. Estes genes estão envolvidos em rotas metabólicas, transporte de íons, transdução de sinais, e regulação transcricional, entre outros processos relacionados com o crescimento e desenvolvimento da planta.

A idéia de existência de sensores que percebam o *status* de Pi no meio externo é baseada em descobertas de sistemas de percepção e sinalização em organismos unicelulares (Fang *et al.*, 2009). Entretanto, nas plantas superiores, o mecanismo de percepção de Pi ainda é pouco

conhecido. Diversos estudos com mutantes têm permitido melhor entendimento sobre as rotas de sinalização de Pi (Osmont *et al.*, 2007).

Aliando-se a utilização de mutantes com análises de expressão gênica, busca-se maior compreensão acerca dos genes envolvidos no processo de sinalização e na rota de aclimatação à deficiência de P. Através dessa estratégia, Doerner (2008) verificou o papel central de *PHO2* na homeostase de Pi. *PHO2* codifica uma enzima conjugadora de ubiquitina E2 e o mutante de arabidopsis *pho2* apresenta acúmulo excessivo de Pi na parte aérea.

Diversos micro RNAs também parecem estar envolvidos com a homeostase de nutrientes minerais (Doerner, 2008) e com a regulação dos transportadores de Pi (Fang *et al.*, 2009). É possível que o *miR399* se ligue à região 5' UTR do RNA mensageiro de *PHO2*, modulando sua expressão. Neste caso, *miR399* funciona como sinal de que a homeostase foi alcançada na parte aérea através do controle dos níveis de *PHO2* nas raízes (Doerner, 2008). Genes expressos em baixa concentração de Pi nas raízes e parte aérea, chamados *IPS* (*Induced by Pi Starvation* – Induzidos por deficiência de Pi), também parecem estar envolvidos nessa rota regulatória *PHO2-miR399*. Há evidências que sugerem a ligação de um desses genes, *At4*, com um miRNA, e sua relação com a redistribuição de Pi. O mRNA de *AtIPS1/At4* parece ligar-se ao *miR399*, seqüestrando-o e bloqueando o silenciamento de *PHO2*. Dessa forma, *PHO2*, *miR399* e *AtIPS1/At4* devem formar um novo circuito envolvido com a sinalização da deficiência de Pi.

Um dos principais componentes da sinalização de Pi é o fator de transcrição *PHR1* (*phosphate starvation response 1*), que contém um

domínio de ligação MYB ao DNA (Rubio *et al.*, 2001). Os resultados indicam que *PHR1* age como regulador transcricional na sinalização de Pi e afeta um conjunto de respostas moleculares à deficiência de Pi. No entanto, outras respostas a Pi são reguladas por este fator de transcrição.

Mutantes de *Arabidopsis thaliana* têm sido utilizados em estudos que buscam identificar os mecanismos de resposta à limitação de P. Nesse contexto, Chen *et al.* (2000) analisaram 50.000 plântulas M2 (mutagenadas de segunda geração), e identificaram 22 linhagens mutantes que tiveram o crescimento restringido em meio contendo DNA como única fonte de P, mas que se recuperaram quando foram colocadas em meio contendo Pi solúvel. O mutante *pdr2* (*phosphate deficiency response 2*), obtido neste *screening*, tem resposta de hipersensibilidade nos meristemas das raízes em situações de baixa disponibilidade de Pi causando diferenciação do meristema apical radicular (Ticconi *et al.*, 2004). Recentemente, (Ticconi *et al.*, 2009) demonstraram que *PDR2* codifica uma ATPase tipo P₅ que age no retículo endoplasmático (RE). Além disso, os autores evidenciaram que uma oxidase codificada por *LPR1* (*low phosphate root 1*) é direcionada para o RE e que *PDR2* e *LPR1* agem juntas em uma rota do RE que ajusta a atividade meristemática à disponibilidade de Pi externo.

PDR2 responde a um sinal de limitação local de Pi e não à sua deficiência interna, pois os efeitos são observados apenas nas raízes em contato com baixo Pi. Além disso, o efeito se deve à sinalização e não à falta de Pi *per se*, pois os efeitos da mutação não foram percebidos quando fosfito ou fosfonato (Phi), um análogo ao fosfato, foi adicionado (Ticconi *et al.*, 2004). Phi afeta as respostas moleculares e morfológicas à deficiência

de fosfato apesar de não ser utilizado nas reações em que Pi é requerido (Ticconi *et al.*, 2001).

2.4 Nitrogênio

O N é o elemento requerido em maior quantidade pelas plantas, fazendo parte da composição de vários constituintes celulares, como os aminoácidos e ácidos nucleicos. Embora o N seja um dos elementos mais abundantes na Terra, a sua baixa disponibilidade no solo faz com que seja um dos principais nutrientes que limita o crescimento das plantas (Graham & Vance, 2000). O N é adquirido pelas plantas de duas principais fontes: do solo, através de adubação e reciclagem, e da atmosfera, através da fixação simbiótica de N₂. Sob deficiência de N, a maioria das plantas apresenta clorose e, caso a deficiência se torne severa, as folhas mais velhas senescem e caem. Geralmente, o N disponível para as plantas está na forma inorgânica no solo, como nitrato (NO₃⁻), nitrito (NO₂⁻) ou amônio (NH₄⁺), mas também pode ser adquirido da uréia, aminoácidos e peptídeos. Diferentes transportadores já foram identificados para o transporte de N orgânico ou inorgânico do solo para as raízes (Miller & Cramer, 2004).

O problema da disponibilidade de N envolve algumas questões, como o uso excessivo na agricultura intensiva, o custo do gás natural, a redução dos combustíveis fósseis e, portanto, não renováveis, necessários para produção de fertilizantes nitrogenados e a falta de fontes prontas de N para a agricultura extensiva (Vance, 2001). Miller & Cramer (2004) relatam que tanto o uso excessivo como aplicação de pouco N podem ser prejudiciais para o produtor. O uso elevado de fertilizantes nitrogenados tem muitas

conseqüências ambientais, além dos custos ecológicos e econômicos de sua produção. Entretanto, se usado em pouca quantidade, as conseqüências podem ser mais drásticas, pois ocorre limitação no rendimento da cultura. Dessa forma, é preciso que haja um balanço, ou seja, que o uso de N seja realizado de forma racional, sem prejuízo ao ambiente nem para ao rendimento da cultura.

A assimilação do N desencadeia várias reações bioquímicas na planta, através do envolvimento de uma série de enzimas assimilatórias (Miller & Cramer, 2004). Primeiro, o NO_3^- é reduzido a NO_2^- pela enzima nitrato redutase, e após, é reduzido a NH_4^+ , pela nitrito redutase. O amônio é incorporado a esqueletos de C para produzir aminoácidos através do ciclo GS/GOGAT (glutamina sintetase – GS e glutamato sintase – GOGAT). A regulação da assimilação de N pode acontecer tanto em nível de transcrição, tradução ou pós-tradução das proteínas envolvidas. Neste contexto, *NIA1* e *NIA2* são diretamente requeridos para a assimilação de N pela planta, pois codificam duas isoformas da enzima nitrato redutase, sendo ativados por nitrato (Wang *et al.*, 2009).

A assimilação de N ocorre principalmente nas raízes, sendo que o crescimento radicular das plantas pode ser influenciado por características genéticas, *status* de nutrientes na planta e pelo ambiente encontrado no solo (Leyser & Fitter, 1998). Zhang & Forde (1998) testaram o efeito de suprimento de NO_3^- , aplicado de forma localizada, no desenvolvimento do sistema radicular, e observaram que, quando as plantas são crescidas em meio com alta concentração de nitrato, a produção de raízes laterais é inibida. Entretanto, quando as plantas são crescidas em meio com pouco

nitrate e são expostas à concentração local, há estímulo do crescimento das raízes secundárias nos locais de tratamento. Dessa forma, o nitrate ativa uma rota sinalizatória que estimula localmente o alongamento das raízes laterais. Este mecanismo, responsável pela colonização preferencial das raízes por locais ricos em N no solo, parece envolver dois genes: *ANR1*, codificando um fator de transcrição MADS-Box, e *NRT1.1*, codificando um transportador de nitrate.

O gene *ANR1* foi o primeiro a ser identificado como parte da rota de sinalização da resposta das plantas ao nitrate suprido localmente. Quando *ANR1* foi inativado em linhagens de *Arabidopsis*, o alongamento das raízes laterais foi menos responsivo ao tratamento local de nitrate (Zhang & Forde, 1998). Mutantes para o transportador de nitrate de dupla afinidade *NRT1.1* apresentaram menor colonização de camadas ricas em nitrate, mostrando que *NRT1.1* promove a proliferação das raízes laterais, indicando uma função na rota de sinalização à limitação de N independente de *ANR1* (Remans *et al.*, 2006a).

Além disso, o transportador de nitrate de alta afinidade *NRT2.1* parece ter função regulatória no processo de iniciação das raízes laterais, que é independente da função de transportador de nitrate (Remans *et al.*, 2006b). Em concentrações de alta sacarose e baixo nitrate, a iniciação das raízes laterais foi menor na planta silvestre do que na mutante *nrt2.1* em relação ao controle (alta sacarose e alto nitrate) (Little *et al.*, 2005). A partir disso, os autores sugerem que *NRT2.1* possa agir como sensor de nitrate ou sinal de transdução, uma vez que o fenótipo encontrado para o mutante é diferente do esperado, pois a mutação reduz a taxa de captura de nitrate

(Forde & Walch-Liu, 2009). Em contrapartida, Remans *et al.* (2006b) observaram redução no número de primórdios de raízes laterais em *nrt2.1* sob baixo nitrato, havendo controvérsias a respeito da atuação do gene em resposta à disponibilidade de N. As respostas divergentes observadas nestes dois ensaios não são bem entendidas, mas podem relacionar-se à diferenças nas condições experimentais e/ou composição dos meios de cultura. Apesar disso, NRT2.1 parece ter dupla função, como transportador e sinalizador, ligando a disponibilidade de açúcar e de NO_3^- com o desenvolvimento das raízes laterais (Gojon *et al.*, 2011).

Um circuito regulatório proposto por Gifford *et al.* (2008) para o desenvolvimento de raízes laterais envolve um microRNA (*miRNA 167*) e um dos seus alvos, o fator responsivo à auxina 8 (*ARF8*). Ambos são expressos no periciclo e ápice das raízes laterais e devem agir no início da raiz lateral e na subsequente emergência. Nesse circuito, *ARF8* parece agir como repressor do desenvolvimento das raízes laterais, pois quando *miRNA 167* é reprimido por altas concentrações de nitrato, há indução de *ARF8* e redução no desenvolvimento das raízes laterais.

O gene *PLDε* codifica uma fosfolipase, que produz ácido fosfatídico e conforme demonstrado por Hong *et al.* (2009), o processo de sinalização deste lipídio está envolvido com a percepção do *status* nutricional na membrana, com o aumento do crescimento da planta e acúmulo de biomassa. O silenciamento de *PLDε* reduziu o crescimento radicular e acúmulo de biomassa em arabidopsis, enquanto a superexpressão levou a aumento no crescimento radicular e acúmulo de biomassa. Outro gene que parece ter uma função na resposta a estresse por nutrientes é o *SOC1*, que

codifica um fator de transcrição MADS box e integra diversos sinais de florescimento. Gan *et al.* (2005) verificaram que *SOC1* é expresso na deficiência de N, induzido pela falta e reprimido pelo ressuprimento de P e S, evidenciando que o gene pode fazer parte de uma resposta geral ao estresse nutricional ou de uma rota de resposta comum a esses três nutrientes.

As plantas têm a capacidade de perceber o *status* de nutrientes no solo e adaptar sua morfologia às mudanças, através da modificação na expressão de genes, atividade de enzimas e conteúdo metabólico. Uma possível estratégia das plantas superiores para aquisição e uso eficiente de N se dá através de um circuito de regulação de citocininas (Sakakibara *et al.*, 2006). A síntese de citocininas é induzida por nitrato e a sinalização mediada por citocininas está relacionada com o desenvolvimento, síntese de proteínas, aquisição de macronutrientes e outras atividades metabólicas. As citocininas translocadas pelo floema podem reprimir alguns transportadores de nutrientes como o nitrato, amônio, sulfato e fosfato, regulando sua aquisição e distribuição. Uma das atribuições das citocininas é agir como mensageiro que comunica se o suprimento de N é adequado para induzir os sistemas de captura de outros macronutrientes (Sakakibara *et al.*, 2006). Dessa forma, as citocininas podem exercer papel chave na sinalização relacionada ao uso de nutrientes, especialmente N.

2.5 Fósforo e nitrogênio: uma possível interação?

A necessidade de avanços científicos que possibilitem a redução de gastos com fertilizantes fosfatados e nitrogenados é evidente. Disponibilizar

germoplasma com maior capacidade de aquisição e uso de N e P e que permita o uso eficiente da aplicação de fertilizantes é fundamental para a sustentabilidade do sistema agrícola. O sucesso quanto à geração de plantas mais eficientes na utilização de N e P do solo depende, consideravelmente, do entendimento dos mecanismos em plantas que aumentem a aquisição desses elementos (Vance, 2001). Nesse sentido, análises de expressão gênica em mutantes com alterações nas respostas à limitação de P e N são fundamentais para elucidar a participação de genes nas cascatas de transdução de sinais envolvidas com a aclimação das plantas às deficiências destes nutrientes.

Interações nutricionais durante a absorção e mudanças na expressão de genes durante a privação individual dos nutrientes minerais têm sido documentadas (Wang *et al.*, 2002; Maathuis *et al.*, 2003; Misson *et al.*, 2005). Interações de rotas de sinalização de resposta à deficiência de nutrientes foram sugeridas por Wang *et al.* (2002). Nesse sentido, genes associados com a nutrição de P, K e Fe, como fatores de transcrição, MAP quinases e proteínas 14-3-3, foram identificados e induzidos pelas três deficiências. Além disso, os autores observaram que transportadores específicos para um nutriente foram induzidos na ausência de outros. Maathuis *et al.* (2003) verificaram que NaCl levou à regulação transcricional de canais de K⁺. Assim, os autores sugerem que alterações na homeostase de um nutriente leve a rápidas modificações no transporte de outro(s) nutriente(s), provavelmente para manter o *status* nutricional na planta.

Neste contexto, análises de mutantes submetidos a diversas concentrações de diferentes nutrientes têm indicado que há algumas

interações nutricionais. Um exemplo é o mutante *pdr1*, cujo fenótipo sugere interação entre P e N (Delatorre, 2002). Este mutante tem redução no crescimento da raiz primária quando exposto a concentrações de nitrato superiores a $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$, assim como quando P é oferecido apenas na forma de organofosfato (Delatorre, 2002). Tais experimentos parecem evidenciar que os níveis de P afetam a absorção e uso de N e vice-versa. Entretanto, o conhecimento referente à sobreposição das rotas ainda é limitado e insuficiente para o entendimento desta interação.

2.6 Etileno e as mudanças radiculares

As alterações induzidas no sistema radicular em função da deficiência de P, como o desenvolvimento e arquitetura das raízes laterais e formação de pêlos radiculares, são influenciadas pelo balanço interno de auxina, etileno e citocininas (Vance *et al.*, 2003). O etileno influencia muitos processos de desenvolvimento ao longo do ciclo de vida da planta, como o amadurecimento de frutos, estímulo da germinação de sementes, ajustes no crescimento da planta em função das condições do solo, a taxa e a extensão do crescimento foliar e senescência das folhas, além de mediar respostas às mudanças no ambiente (Bleeker, 2001).

Na rota biossintética do etileno, o aminoácido metionina é convertido a S-adenosilmetionina (SAM) que é, por sua vez, convertida a ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) e, finalmente, a etileno. A conversão de SAM a ACC é realizada pela enzima ACC sintase e de ACC a etileno é catalisada pela ACC oxidase. A percepção do etileno pode ser bloqueada por íons de prata ou sua síntese pode ser interrompida pelo

Aminoetoxivinilglicina (AVG), que inibe a ACC sintase (Casson & Lindsey, 2003) ou por íons cobalto.

A influência do etileno no centro quiescente de raízes de *arabidopsis* foi determinada por Ortega-Martínez *et al.* (2007). Os dados encontrados pelos autores sugerem que o etileno promove divisões celulares no centro quiescente, indicando que apenas a auxina não seria suficiente para exercer tal função. Em condições de baixo P, o etileno deve atuar como mediador das mudanças adaptativas que ocorrem nas raízes (Ma *et al.*, 2003). Os autores analisaram o perfil espacial da taxa relativa de alongamento na zona de crescimento radicular em condições de P suficiente e baixo P e na presença ou ausência de inibidores de etileno. Nestes estudos, os autores verificaram que em condição de P suficiente, o etileno limitou o alongamento das raízes, mas sob limitação de P, o etileno manteve o alongamento radicular.

2.7 Os mutantes *p9*, *p23* e *p37*

Estudos utilizando os mutantes *p9*, *p23* e *p37* foram conduzidos por Pinto (2005), buscando ampliar o conhecimento acerca da rota de sinalização à limitação de Pi. Os mutantes possuem apenas um gene mutado, que é responsável pelo fenótipo em meio contendo organofosfatos como fonte de Pi, sendo estes genes complementares entre si (Pinto, 2005). A autora verificou também que em *p9* a mutação provavelmente causa alterações na sensibilidade às concentrações de Pi, podendo relacionar-se aos sensores de raiz ou à interação da transdução de sinais entre o sensor local de Pi e o *status* da planta. Em *p37*, o gene mutado pode relacionar-se

com o controle do alongamento e das divisões das células radiculares (Pinto, 2005).

Strieder (2009) procurou caracterizar respostas morfo-fisiológicas de *p9*, *p23* e *p37* a suprimentos contrastantes de P e às interações nutricionais de P com outros nutrientes. O autor observou que há redução no desenvolvimento radicular dos três mutantes quando ácidos nucleicos são adicionados ao meio de cultura, e esse efeito é mais acentuado em *p9*. O fenótipo radicular de *p9* em meio com deficiência de P é governado pela interação P x Fe e é influenciado por defeitos na síntese e/ou percepção de auxinas e de citocininas. O fenótipo radicular em *p23* e *p37* é resgatado pela supressão de N, independente da condição de P. Além disso, estes dois mutantes são incapazes de perceber a presença de organofosfatos como única fonte de P e se mostraram pouco sensíveis e pouco responsivos às auxinas ou citocininas em meio de cultura (Strieder, 2009). Em *p23* a divisão celular é reduzida drasticamente pela limitação de Pi, observada através da construção *CycB1::GUS*, enquanto em *p9* a atividade meristemática é mantida por mais tempo. O autor sugere que estudos sejam realizados a fim de verificar se há defeito na síntese de etileno nos mutantes, uma vez que *p23* e *p37* parecem apresentar rápida exaustão do centro quiescente sob condições de deficiência de P.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e local de estudo

A espécie utilizada foi *Arabidopsis thaliana*. Os mutantes analisados foram *p9*, *p23* e *p37*, desenvolvidos via mutação química com uso de EMS (etil-metanosulfonato) e selecionados por Delatorre (2009). Os três mutantes foram obtidos a partir do ecótipo Columbia (COL), sendo este usado como controle comparativo. Outras linhagens contendo transgenes de interesse foram utilizadas em cruzamentos com *p37* para observação *in situ* da expressão gênica e da viabilidade do centro quiescente. Na ocasião dos cruzamentos, os mutantes foram utilizados como receptores de pólen. Para análise do centro quiescente em *p23*, utilizou-se a linhagem *p23xQC25::GUS*.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia e de Fisiologia Vegetal do Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.2 Condições de crescimento

As plantas crescidas em substrato ou em meio de cultura foram mantidas em câmara de crescimento com condições ambientais controladas.

A temperatura foi mantida em 21°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), com intensidade luminosa de 22 a 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz, seguido de 8 horas de escuro.

Para multiplicação de sementes e avanço de gerações das plantas oriundas dos cruzamentos dos mutantes com as linhagens transgênicas, as sementes foram dispostas em copos plásticos contendo mistura de fibra de coco e substrato de turfa (1:1). Para quebra de dormência e uniformização da germinação, colocou-se, após a sementeira, as sementes a 4°C por 48 horas. Foi feita irrigação sempre que necessário, sendo que solução nutritiva foi aplicada a cada quatro dias. A composição da solução nutritiva utilizada foi a seguinte: 5 μM de Fe-EDTA, 0,5 mM de KNO_3 , 0,2 mM de MgSO_4 , 0,2 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,25 mM de KH_2PO_4 , 7 μM de H_3BO_3 , 1,4 μM de MnSO_4 , 0,1 μM de ZnSO_4 , 0,02 μM de Na_2MoO_4 , 0,001 μM de CoCl_2 e 0,05 μM de CuSO_4 .

No caso dos ensaios em meio de cultura, foram utilizadas placas de petri circulares, de vidro, para condição de 2,5 mM de KH_2PO_4 (+Pi) e descartáveis para ausência de fosfato inorgânico (-Pi) (J.Prolab). As sementes foram dispostas individualmente em duas linhas, uma na parte superior e outra no centro da placa, sendo as placas vedadas com *Parafilm*. As placas foram dispostas verticalmente em câmara de crescimento para proporcionar o crescimento vertical das raízes.

A fim de evitar a contaminação do meio de cultura com fungos e bactérias, as sementes foram desinfestadas com solução 30% alvejante (solução comercial contendo hipoclorito de sódio 2,5%), acrescido de surfactante Tween 20 (polioxietileno sorbitano monolaureato) por 8 minutos,

seguido de cinco lavagens com água Milli-Q estéril. Após embebição, as sementes tiveram a dormência aliviada pela exposição por 48 horas a 4°C e exposição à luz.

3.3 Composição dos meios de cultura

O meio de cultura padrão foi o meio Murashige & Skoog (MP - baseado em Somerville & Ogren, 1982), com 0,5% de sacarose e 0,8% de ágar "*Micropropagation Agar-Type I, Caisson Laboratories*". Não foi necessário proceder à lavagem do ágar para remoção de fósforo, uma vez que análises da composição do mesmo indicaram conteúdo de fósforo total de 0,0159 mg/g, estando dentro do limite aceitável, sem causar interferência no meio -Pi. Esta análise é necessária, pois, segundo Jain *et al.* (2009), há efeito dos níveis de P em diferentes tipos de ágar no crescimento de plantas sob condição de deficiência de Pi.

A composição do meio MP, para o tratamento +P e +N (meio completo de crescimento), foi a seguinte: 50 µM de Fe-EDTA, 5 mM de KNO₃, 2 mM de MgSO₄, 2 mM de Ca(NO₃)₂, 10 µM de NaCl, 2,5 mM de KH₂PO₄, 70 µM de H₃BO₃, 14 µM de MnSO₄, 1 µM de ZnSO₄, 0,2 µM de Na₂MoO₄, 0,01 µM de CoCl₂ e 0,5 µM de CuSO₄. Como agente tamponante de pH, adicionou-se MES [2-(N22 morfolino ácido etanosulfônico)] à 2,5 mM, em pH 5,5. Além disso, adicionaram-se vitaminas aos meios de cultura, sendo 100mg/L de mioinositol, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 0,5 mg/L de piridoxina e 0,1 mg/L de tiamina. Estas foram esterilizadas via microfiltração (0,20 µm, TPP) e adicionadas ao meio após autoclavagem.

Para o tratamento -P (meio de crescimento deficiente em P), o KH_2PO_4 não foi adicionado. No caso do tratamento -N (meio de crescimento deficiente em N), o KNO_3 foi substituído por 5 mM de KCl e o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ foi substituído por 2 mM de CaSO_4 . Em meio com organofosfatos, -P/+DNA/-N, o Pi e o N foram substituídos por 0,6 mg/ml de DNA purificado de torula, que fornece aproximadamente 1,8 mM de P total na forma de P orgânico e 6,4 mM de N total na forma de amônia e nitrato. Dessa forma, simulou-se a deficiência de P inorgânico e N e, ao mesmo tempo, o fornecimento de P e N orgânicos, que podem ser utilizados pela planta (COL) no caso de deficiência. No tratamento +P/+DNA, 0,6 mg/ml de DNA de torula purificado foram adicionados ao meio com alto teor de P (+P). A fim de remover contaminantes do organofosfato comercial e possíveis resíduos de Pi, utilizou-se protocolo descrito em Strieder (2009).

3.4 Análises de expressão gênica

Os mutantes cresceram em condições assépticas sobre meio de cultura contendo diferentes disponibilidades de Pi e de N (presença ou ausência), sendo os tratamentos: +Pi/+DNA/+N, +Pi/+DNA/-N, +Pi/-DNA/-N; +Pi/-DNA/+N, -Pi/-DNA/-N, -Pi/+DNA/-N, -Pi/+DNA/+N, -Pi/-DNA/+N. Após crescimento por 10 dias, o sistema radicular foi separado da parte aérea através de corte com lâmina. O isolamento de RNA da raiz seguiu a metodologia descrita por Glazebrook et al. (1998) com modificações, a saber:

A fim de evitar a degradação do RNA com RNAses, ribonucleases que degradam o RNA, os plásticos e vidrarias foram autoclavados. Da

mesma forma, os reagentes foram preparados com água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato), um forte inibidor de RNAses. Os almofarizes, cadinhos, pistilos e pinças foram esterilizados em estufa a 180°C por 8 horas.

Todas as etapas foram feitas tomando-se o cuidado de manter o material no gelo. Utilizaram-se aproximadamente 150 plantas maceradas em nitrogênio líquido, adicionando-se 400 µl de tampão (100mM de Tris-HCl - pH 9,0, 200mM de NaCl, 15mM de EDTA e SDS 0,5%) com 2,3 µl de mercaptoetanol; 400 µl de fenol e 80 µl de clorofórmio/alcool isoamílico (24:1). O tampão tem por finalidade quebrar as membranas das células, liberando os componentes celulares. O uso do mercaptoetanol evita a oxidação do material, enquanto fenol e clorofórmio causam inativação de nucleases e desnaturação de proteínas. A mistura foi homogeneizada em vórtex por 2 minutos e acrescentaram-se 28 µl de acetato de sódio 3M (pH 5,2). Agitou-se em vórtex novamente por 1 minuto e incubou-se em gelo por 15 minutos. A fim de remover restos celulares e precipitar proteínas desnaturadas, o material foi centrifugado a 14.000g por 11 minutos a 4°C e após, a fase aquosa transferida para um novo tubo, acrescentando-se 400 µl de fenol e 80 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Agitou-se em vórtex por 2 minutos e centrifugou-se a 14.000g por 5 minutos a 4°C, sendo a fase aquosa (superior) transferida novamente para novo tubo. Para recuperar os ácidos nucleicos, acrescentou-se 500 µl de isopropanol gelado. As amostras foram mantidas no freezer (-20°C) por 1 hora e após, centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µl de etanol 70% ao precipitado. As amostras foram centrifugadas a 10.000

g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado, deixando-o secar em temperatura ambiente.

Para solubilizar o RNA, acrescentou-se 82,5 µl de água Milli-Q, incubando por 10 minutos em temperatura ambiente. Para remoção de material sólido, centrifugou-se a 10.300 rpm por 5 minutos a 4°C, transferindo o sobrenadante para novo tubo. O fracionamento do DNA e RNA por precipitação seletiva foi realizada com 37,5 µl de cloreto de lítio 8M (concentração final 2,5M), agitando e deixando precipitar ao longo da noite a 4°C. O material foi centrifugado a 12.200 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado, pois este continha DNA. Adicionou-se ao precipitado 500 µl de etanol 70 %, centrifugou-se novamente a 10.300 rpm por 5 minutos a 4°C e o precipitado foi seco em temperatura ambiente. Por fim, o RNA foi ressuspensionado em 50 µl de água Milli-Q e incubado em temperatura ambiente por 10 minutos. A quantificação foi feita em espectrofotômetro “Genesys 2™ Thermo Spectronic” no comprimento de onda de 260 nm e a qualidade confirmada em gel de agarose 0,8%. O armazenamento foi feito em freezer sob temperatura de -20°C.

O RNA foi tratado com a enzima “DNAse I (Roche®)” para remoção de DNA genômico contaminante. O tratamento foi realizado no gelo, adicionando-se 3µg da amostra de RNA, 3µl de tampão de reação DNaseI 10X e 0,3µl de DNase I (10U/µl), sendo o volume completado para 30µl com água DEPC em tubos de 0.5 ml livres de RNase. Os tubos foram incubados por 15 min a temperatura ambiente. A inativação da DNase I foi feita através da adição de 1µl de EDTA 25 mM à mistura e aquecimento por 10 min a 65°C.

A partir do RNA, foi produzido o cDNA, utilizando a transcriptase reversa “SuperScript™III (Invitrogen ®)” e os iniciadores polidT. Para tanto, utilizou-se 0,6µg de RNA tratado com DNase I, 1,5µl de polidT Mix (10µM), 1µl de dNTPs Mix (10mM) e o volume completado para 13µl com água destilada estéril. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e incubada no gelo por aproximadamente 1 minuto. Para coletar o conteúdo do tubo, foi feita uma rápida centrifugação no material e adicionado 4µl de 5X First-Strand Buffer; 1µl de 0,1M DTT e 0,4µl de SuperScript III RT (200un/µl). A mistura foi homogeneizada via pipetagem e incubada a 50°C por 60 min. A reação foi inativada, aquecendo a mistura a 70°C por 15 min. Para uso nas amplificações, as amostras de cDNA foram diluídas na proporção 1:100 (cDNA:água destilada estéril).

A análise de expressão gênica foi realizada pelo método de PCR Tempo Real. Para tanto, utilizou-se o equipamento “7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems®”, sendo as reações realizadas em placas de 96 poços “PCR-96-A-BC, Axygen®” com selador “MicroAmp™ Optical Adhesive Film, Applied Biosystems®”. As reações foram realizadas com volume final de 20µl por poço, sendo 10µl do Mix e 10µl do cDNA. Fizeram parte do Mix: Tampão de PCR 1X; cloreto de magnésio (MgCl₂) 3mM; dNTPs 0,25mM (10µM de cada nucleotídeo); iniciador *forward* 0,2µM, iniciador *reverse* 0,2µM, ROX 0,005X; SYBER Green 0,0001X (diluição realizada no momento da utilização a partir de solução estoque 100X em DMSO); Taq Platinum® Invitrogen 0,05U e água destilada e autoclavada para completar o volume.

Para ser utilizado como controle endógeno das reações de PCR Tempo Real, testaram-se três genes constitutivos, Actina, 28S e EF1: Actina (*Locus: At3g18780*): 5' GACCTTGCTGGACGTGACCTTAC 3'; 5'GTAGTCAACAGCAACAAAGGAGAGC 3'; 28S (*Genbank: AY049041*): 5' CTGATCTTCTGTGAAGGGT 3'; 5' TGATAGAACTCGTAATGGGC 3'; EF1 (*Locus: At1g07920; At1g07930; At1g07940*): 5' GTCGATTCTGGAAAGTCGACC 3'; 5' AATGTCAATGGTGATACCACGC 3'.

Realizadas as análises iniciais, optou-se pelo gene da actina, que apresentou curva de amplificação adequada (Figura 1A) e curva de dissociação com pico único (Figura 1B). Também foram testados iniciadores para os genes 28S e E1F, porém estes exibiram picos na curva de dissociação fora do padrão adequado.

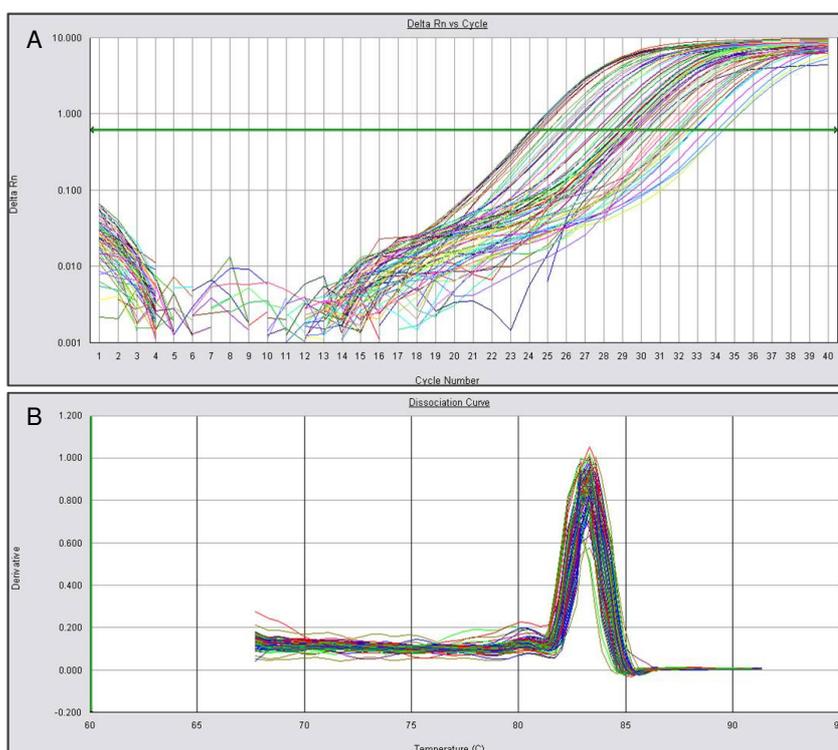


FIGURA 1. Iniciador actina utilizado como controle endógeno. A) Curva de amplificação; B) Curva de dissociação.

Os genes que tiveram sua expressão avaliada foram selecionados por estarem envolvidos no processo de assimilação de N e na aclimação à limitação de fósforo (Tabela 1).

TABELA 1. Iniciadores para genes envolvidos na assimilação de N e na aclimação à limitação de fósforo, *locus*, sequências *forward* e *reverse* e temperatura de pareamento.

Primer	Locus	Sequência 5'-3'		Temperaturas de pareamento
		Forward	Reverse	
Nitrogênio				
NAR2.1	At5g50200	GGCCATGAAGTTGCCTATG	TCTTGGCCTTCCTCTTCTCA	60°C
NIA 1	At1g37130	TACGTCGTTGAAATCGCAA	GCTGCAACGCAAATGAAT	60 °C
NIA 2	At1g77760	TTTGGTACGTAGTGAATCAGC	AACCGCAAATGAATCATCG	60 °C
NRT1.1	At1g12110	GCACATTGGCATTAGGCTTT	CTCAATCCCCACCTCAGCTA	60 °C
NRT2.1	At1g08090	AACAAGGGCTAACGTGGATG	CTGCTTCTCCTGCTCATTCC	60 °C
NRT2.2	At1g08100	CGGAGCACTATTATGTTGGC	GGTTGCGTTCCTTTGT	60 °C
ANR1	At2g14210	TTGGCAAAGAGAGTTGCAAG	TCTCCCACTAGTTTCCTGTGGC	61 °C
SOC1	At2g45660	GCAGCTCAAGCAAAGGAGAA	TTGACCAAATTCGCTTTCATG	60 °C
PLDε	AT1G55180	TATCTTGAACCGGGATGGTGAGA	TAGGGTTTAGTGCCCATCCTGCAA	65 °C
ARF8	At5g37020	AGATGTTTGTCTATCGAAGGGTGTG	CCATGGGTCATCACCAGGAGAAG	60 °C
Fósforo				
AtIPS1	At1g12820	TAAGGAAAGCGTTTTAAGATATGG	TTCACTATAAAGAGAATCGGAAGC	60°C
AtPAP2	At1g66390	CATCAAGTTCTTTGAGAGC	TTGGACCGGTGTTGTAGGAG	62°C
AtPT2	At2g38940	TGGGATTCTTCACTGATGCTTACG	CGAAAATACCACCAGCCATGATTC	61°C
AtPHO81-like	At2g45130	GTGGAATCTATTTTCGTCGGTT	CGCACATCTCTCGTATCCC	61°C
AtPHO2	At2g33770	TTTTACACAAGCCACCAAAGC	TCACGAGCATGTCCAACAA	60°C
At	At2g34202	AATACTCCTATGGCAGATCGCATTGG	TCCTTTGGCAGAGAAGCATTTTACTTG	61°C
miR399d				
At4	At5g03545	AATATGGCCATCCCCTAAAGAAAC	TAAACCGGAAACAAAGTAAACACG	60°C
ACP5	At3g17790	CTTTAGTATCTCCATGATGTCC	CGTTGATGCAGAGTTGGTAGAG	60°C
Ph1;7	At3G54700	GGGGGATTTTTGCCATCAT	TGTTGTTGCTGCTGCTGCTG	61°C
RNS1	At2g02990	TGGCCTAACTACAAAGATGGAAC	CAGACCGGTCAACACAAAGATAGA	60°C

Os iniciadores foram sintetizados com base em artigos científicos que utilizaram os mesmos e, previamente ao uso nos mutantes, estes *primers* foram testados nos ecótipos Columbia e Landsberg para avaliar se havia amplificação. As reações foram visualizadas em gel de agarose 3%.

Posteriormente, foram utilizados diretamente para análise via PCR Tempo Real. Avaliaram-se três réplicas de cada amostra, contendo aproximadamente 150 plantas cada.

As condições de amplificação utilizadas iniciaram com ciclo de 2 min a 50°C. Após, um ciclo inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos começando com a desnaturação a 95°C por 15 segundos, seguida da temperatura de pareamento (específica para cada *primer*), que variou de 60 a 65°C, por 20 segundos. Para extensão final, utilizou-se um ciclo a 72°C por 15 segundos e para a leitura de fluorescência 60°C por 1 minuto. Para finalizar, adicionou-se uma etapa de dissociação (Figura 2).

A análise dos dados da amplificação obtida através do PCR Tempo Real foi realizada através da quantificação relativa. Este método permite verificar as mudanças na expressão do gene alvo em relação a um grupo de referência (Livak & Schmittgen, 2001), neste caso o tratamento +Pi/+DNA/+N. Para tal, utilizaram-se os valores de Ct's (*threshold cycle*), que representam o ciclo da PCR no qual o sinal fluorescente é maior do que o nível de detecção mínimo, ou seja, ciclo no qual cada curva atravessa o limiar de detecção. O *threshold* (limiar de detecção) foi ajustado manualmente para cada placa, em posição adequada da fase exponencial. Para cada tréplica, foram calculados a média e o desvio padrão, sendo que aquelas que apresentaram valores de desvio padrão acima de 0,5 foram excluídas da análise.

Os valores de eficiência da PCR foram obtidos através do *software* livre LinRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003). Este *software* analisa a curva exponencial de amplificação de cada amostra individual através de uma

análise de regressão linear. Valores de eficiência entre 1,8 e 2,0 foram utilizados, com mais do que quatro pontos na curva e $R > 0,99$ foram aceitos. Os demais foram descartados.

A expressão relativa do gene foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, (Livak & Schmittgen, 2001). Quando o valor é substituído em $2^{-\Delta\Delta C_t}$, é possível verificar a dimensão da variação.

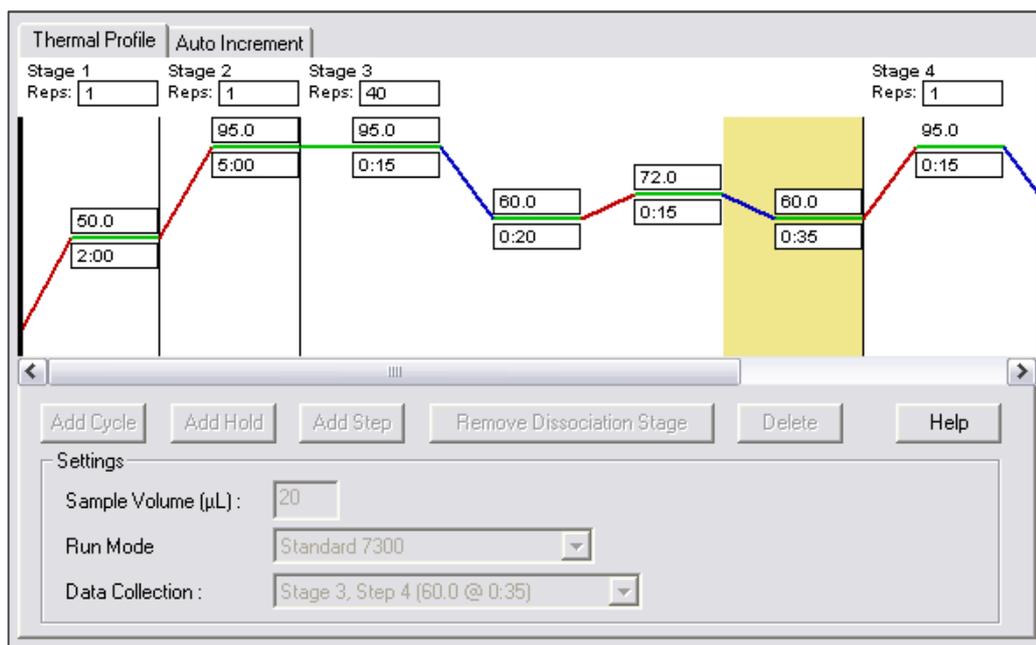


FIGURA 2. Condições de amplificação utilizadas nas reações de PCR Tempo Real, volume final da reação, modo de corrida e estágio para coleta dos dados.

3.5 Visualização da expressão gênica

Alguns genes responsivos a Pi tiveram seu promotor ligado à enzima glucuronidase, sendo utilizados para verificar se há diferenças nos mutantes no local e na magnitude de expressão *in situ*. Neste estudo, fez-se análise do centro quiescente em *p23*, utilizando-se sementes da população F3 obtidas por Strieder (2009) do cruzamento entre *p23* e *QC25::GUS*. A visualização da atividade de GUS em *QC25::GUS* permite verificar a

manutenção do meristema, indicando que há manutenção das células iniciais estruturais em estado pouco diferenciado. Sementes F3 derivadas do cruzamento entre *p23* e *QC25::GUS* foram desinfestadas e germinadas em meio com diferentes disponibilidades de Pi e N, quais sejam: +Pi/+DNA/+N, +Pi/+DNA/-N, +Pi/-DNA/-N; +Pi/-DNA/+N, -Pi/-DNA/-N, -Pi/+DNA/-N, -Pi/+DNA/+N, -Pi/-DNA/+N, por 7, 9 e 11 dias. Análises semelhantes já haviam sido feitas por Strieder (2009) nos mutantes *p9* e *p37*, exceto sob deficiência de N.

Linhagens transgênicas foram adotadas em cruzamentos com *p37*, cujas construções que permitem visualizar a atividade gênica diretamente no tecido, sendo elas: *CycB1::GUS*, *AtACP5::GUS*, *QC184::GUS*, *ATPT1::GUS* e *ATPT2::GUS*. A F1 foi testada para verificar eficiência do cruzamento e a F2 selecionada, buscando identificar sementes homozigotas para a mutação de interesse e presença do transgene. Estas deram origem às sementes F3.

Sementes F3 derivadas do cruzamento entre *p37* e *QC184::GUS* e *ATPT2::GUS* foram desinfestadas e germinadas em meio com diferentes disponibilidades de Pi e N (+Pi/+N; +Pi /-N, -Pi/-N e -Pi/+N). Através destas linhagens, objetivou-se verificar principalmente o comportamento de *p37* em resposta à deficiência de Pi e N aos 5 e 11 dias após a germinação. Devido à demora na obtenção das sementes F3, não foram realizadas análises em +DNA e -DNA.

Para visualização da atividade de GUS, as plantas foram fixadas em acetona 80% e incubadas em gelo por, pelo menos, 20 minutos (Vitha *et al.*, 1995). Após, o material vegetal foi retirado da acetona e lavado em três ciclos sucessivos de 10 minutos com solução tampão citrato 2X (pH 7,0)

contendo citrato de sódio 0,1M e ácido clorídrico 0,2N, no gelo. Terminada a lavagem, adicionou-se a solução com X-Gluc (1 mg de X-Gluc em 0,1 ml de metanol; 1 ml de tampão 2X; 400 µl de ferrocianeto de K 5 mM; 400 µl de ferricianeto de K 5 mM; 10 µl de Triton X-100 10% e 50 µl de água milliQ autoclavada). Incubou-se os materiais no escuro a 37°C por aproximadamente 8 horas ou até que a coloração azul fosse observada (sem deixar ultrapassar 24 horas). Após o período de reação, os materiais foram lavados com água milliQ e incubados em álcool 70% por uma hora, até que a clorofila fosse removida, e transferidos para água novamente. Colocou-se então o material em glicerol 50% por uma hora e, após, transferiu-se para glicerol 100%. Lâminas foram montadas com lamínula e as raízes fotografadas nos aumentos de 100 e 400 X em microscópio ótico.

Para cada tratamento, pelo menos dez raízes foram analisadas e, sempre que possível, capturou-se imagens da raiz principal e das secundárias. As imagens apresentadas na descrição dos resultados representam o padrão médio observado nas dez raízes analisadas.

3.6 Efeito do etileno no alongamento radicular

Foram realizadas análises do desenvolvimento radicular dos mutantes *p9*, *p23*, *p37* e em COL sob diferentes disponibilidades de P e N em condições de fornecimento de etileno externo, bem como na presença de inibidor de etileno em meio de cultura. Para diferentes disponibilidades de P e N, utilizaram-se meios de cultura da seguinte forma: +Pi/+DNA/+N, +Pi/+DNA/-N, +Pi/-DNA/-N; +Pi/-DNA/+N, -Pi/-DNA/-N, -Pi/+DNA/-N, -Pi/+DNA/+N, -Pi/-DNA/+N. Para fornecimento e inibição de etileno, utilizou-

se “Ethrel” (Bayer Cropscience®) como fonte e tiosulfato de prata como inibidor da síntese do hormônio. O Ethrel® utilizado no experimento é composto por 240 g/L de 2-chloroethylphosphonic acid (EETFOM) e 865 g/L de ingredientes inertes. Para fornecer etileno externo, adicionou-se 50 μM de EETFOM ao meio de cultura. O tiosulfato de prata foi adicionado a 10 μM , a partir da mistura de tiosulfato de sódio e nitrato de prata na proporção 2:1, respectivamente. Tanto o Ethrel como o tiosulfato de prata foram adicionados na superfície dos meios de cultura já solidificados, com auxílio de uma alça de Drigalski, para obter espalhamento uniforme.

As placas foram mantidas em câmara de crescimento por 8 dias após a germinação. As imagens foram capturadas com câmera digital e as medições das raízes realizadas com auxílio do programa computacional *Image J* (*Image Processing and Analysis in Java*, disponível em: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Após obtenção das fotos, as plantas foram congeladas em nitrogênio líquido para futuras análises. A comparação das médias foi realizada através do teste t ajustado, utilizando o pacote estatístico SAS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises de expressão de genes envolvidos na assimilação de N e na aclimatação à limitação de fosfato

A escolha dos genes foi baseada na sua relação com os processos de aclimatação à limitação de Pi e assimilação de N na planta, visando aumentar os conhecimentos acerca da percepção, sinalização, transporte e/ou regulação das respostas à deficiência destes nutrientes em *p9*, *p23*, *p37*. Além disso, objetivou-se verificar a expressão gênica dos mutantes em relação à interação P-N, em busca de melhor entendimento da ação dos genes mutados no processo de sinalização e sua interação com outros sinais regulatórios.

Os resultados obtidos através do cálculo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ refletem a variação da expressão. A expressão de 20 genes foi verificada, sendo dez genes envolvidos no processo de assimilação de N e dez relacionados com a aclimatação à limitação de fosfato. Dentre estes, 10 genes apresentaram ampliações nos padrões de confiabilidade que permitem ter sua expressão avaliada. Os padrões utilizados foram as curvas de dissociação com pico único e valores de eficiência da PCR entre 1,8 e 2,0.

Os iniciadores que apresentaram os padrões de confiabilidade desejáveis foram: NAR2.1, NIA1, NIA 2, NRT1.1, NRT2.1, NRT2.2, ARF8, AtPT2, ACP5 e PLDε. No caso de ANR1, AtPAP2, AtPHO81, AtPHO2, e Pht1;7 não houve amplificação. O iniciador SOC1 apresentou valores de eficiência muito baixos e AtIPS1 e RNS1, dois picos de dissociação. O problema encontrado para At4 e AtmiR399 foi expressão muito baixa, levando a valores de eficiência entre 1,4 e 1,6.

No que diz respeito à assimilação de N, foram avaliados transportadores de nitrato de alta e de baixa afinidade, enzimas envolvidas com redução do NO_3^- a NO_2^- e um gene que codifica uma fosfolipase, além de um fator responsivo às auxinas. Os transportadores de alta afinidade (HATS = *high-affinity transport system*) são responsáveis pela translocação de nitrato do meio externo para o citoplasma quando este é encontrado em baixas concentrações (μM) (Forde, 2000). Em condições de limitação de N, a indução do HATS e crescimento das raízes laterais são importantes adaptações do sistema radicular para prover melhor captura de N. Os genes *NRT2* são expressos nas raízes e induzidos pela deficiência de N, o que leva a crer que sejam os responsáveis pelo estímulo de HATS sob condições de limitação de N (Remans *et al.*, 2006; Little *et al.*, 2005).

Nesse sentido, o gene *AtNAR2.1* (*AtNRT3.1*) faz parte do sistema de transporte de alta afinidade induzido (iHATS = *inducible high-affinity transport system*), que requer expressão do mesmo e de *AtNRT2.1* (codifica transportador de alta afinidade) para o influxo de nitrato, e provavelmente, envolve uma interação entre ambos (Okamoto *et al.*, 2006; Orsel *et al.*, 2006; Yong *et al.*, 2010). Mutações em *AtNAR2.1* conduzem às mesmas

mudanças radiculares observadas com *AtNRT2.1*. Além disso, mutantes *nar2.1* têm problemas com o iHATS de nitrato, assim como *nrt2.1* que tem o crescimento severamente afetado sob baixo nitrato (Orsel *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2006). Dessa forma, parece que a proteína NAR2.1 é necessária para expressão correta ou para a função de transporte de NRT2.1 (Gojon *et al.*, 2011). Além disso, Yong *et al.* (2010) verificaram que há formação de um complexo NAR2.1/NRT2.1, provavelmente um tetrâmero, constituído de duas subunidades de cada proteína na membrana plasmática, que deve formar o transportador de nitrato ativo.

A sequência NAR2.1 amplificou em todos os mutantes, exceto sob -Pi/-DNA/-N em *p9* e COL (Figura 3). Em COL, a expressão deste gene foi similar entre a condição de suficiência de N e Pi (+Pi/-DNA/+N), onde há disponibilidade de cerca de 9 mM de nitrato, e quando o nitrato foi removido. A adição de DNA causou redução da expressão do gene (+Pi/+DNA/+N e +Pi/-DNA/+N, +Pi/+DNA/-N e Pi/-DNA/-N). E a expressão foi similar entre +Pi/+DNA/+N, +Pi/+DNA/-N e -Pi/+DNA/+N, ou seja, o gene foi pouco afetado pela retirada de Pi ou N, quando mantido o DNA (Figura 3). Por outro lado, houve repressão quando todas as formas de P foram removidas (-Pi/-DNA/+N). Houve indução em -Pi/+DNA/-N. A redução da expressão na presença de DNA sugere que as plantas estavam conseguindo retirar uma grande quantidade de N deste ácido nucleico, ou que este ou algum subproduto, de alguma forma, sinalizava para a planta a suficiência de N. Resultado similar foi obtido com os mutantes, com exceção de *p23*, que apresentou expressão reduzida em +Pi/-DNA/+N.

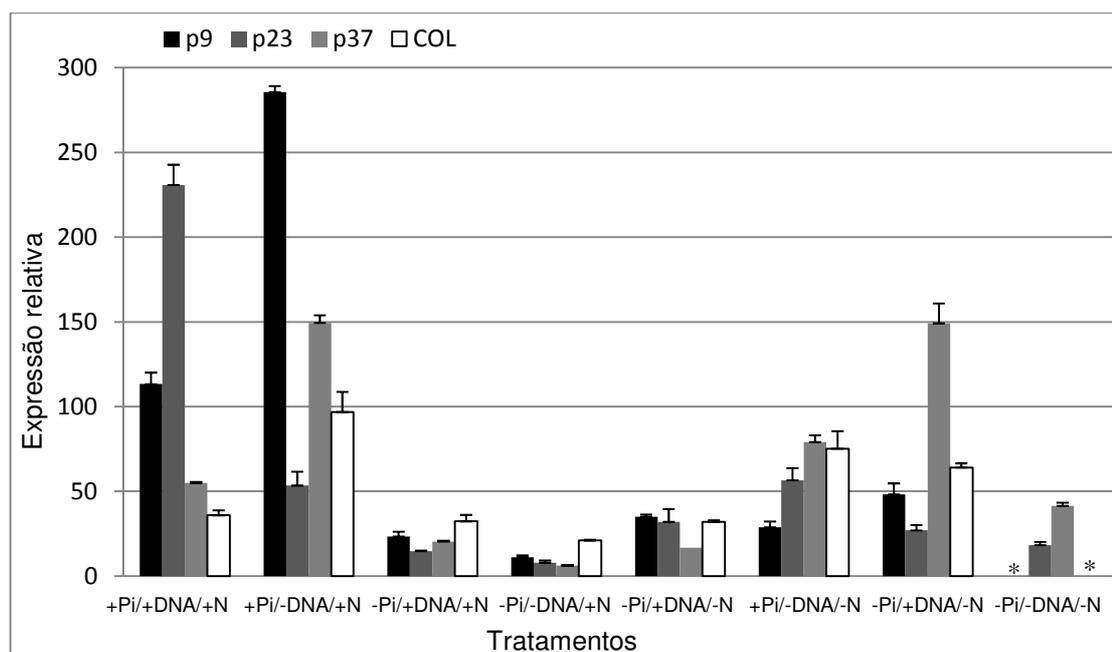


FIGURA 3. Expressão relativa do gene *NAR2.1* sob diferentes disponibilidades de Pi, DNA e N em relação à actina, nos mutantes *p9*, *p23*, *p37* e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas. (*) Pico de dissociação fora do padrão.

Quando o Pi foi retirado (-Pi/-DNA/+N), foi observada redução da expressão em todos os genótipos estudados. Contudo, a redução da expressão foi maior nos mutantes do que em COL. O mutante *p9* apresentou menor expressão em todos os tratamentos em relação à +Pi/+DNA/+N, exceto em +Pi/-DNA/+N, onde foi induzido superior a COL (Figura 3). *p9* tem desenvolvimento radicular reduzido na presença de ácido nucléico de forma mais acentuada do que acontece em *p23* e *p37*, ao contrário de COL, que tem crescimento radicular afetado positivamente por organofosfatos na ausência de Pi (Strieder, 2009).

A maior expressão de *NAR2.1* na ausência de DNA em *p9* sugere que a presença de DNA no meio pode reprimir a sua indução quando as plantas estão sob deficiência de N. A expressão de *NAR2.1* em *p23*, por sua vez, foi menor do que COL em todos os tratamentos à exceção de

+Pi/+DNA/+N, onde mostrou-se cerca de 4X mais induzido, chamando atenção pela pouca variação entre os diferentes tratamentos, o que ressalta o comportamento diferenciado deste mutante em relação à disponibilidade de N. Strieder (2009) observou que *p9*, *p37* e, principalmente, *p23*, têm desenvolvimento radicular reduzido na presença de nitrato como fonte de N e sob suficiência de P e que o fenótipo radicular de COL é resgatado em *p23* e *p37* quando N é retirado do meio. Assim, especula-se que a presença de N na forma de NO_3^- ou na forma orgânica (DNA), regule erroneamente a parada de crescimento da raiz principal em *p23*.

A expressão observada em *p37* acompanhou o padrão de COL, porém em +Pi/-DNA/+N e -Pi/+DNA/-N, o gene *NAR2.1* foi mais expresso no mutante do que em COL. Por outro lado, em +Pi/+DNA/-N, -Pi/+DNA/+N e -Pi/-DNA/+N, o gene *NAR2.1* foi menos expresso em *p37* do que em COL, havendo diminuição da expressão em relação a +Pi/+DNA/+N (Figura 3). Pode-se observar também que os três mutantes analisados e COL, em menor magnitude, exibiram redução na expressão de *NAR2.1* sob deficiência de Pi (exceto sob -Pi/+DNA/-N), ou seja, P pode afetar a indução deste gene.

O transportador de nitrato *NRT2.1* é o principal componente do iHATS nas raízes (Orsel *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007), depende da atuação de *NAR2.1*, e é induzido pela presença de nitrato, mas severamente reprimido por altas concentrações de N (Girin *et al.*, 2010; Zhuo *et al.*, 1999). O nitrato provavelmente possui efeito de sinalização dupla, na regulação dos HATS, uma vez que, dentro de minutos ou horas após o contato com NO_3^- , há indução da expressão de *NRT2.1* e da atividade dos HATS (Gojon *et al.*,

2011). Entretanto, após longa exposição ao NO_3^- , há repressão da expressão de *NRT2.1*, e da atividade dos HATS, através de um mecanismo de sinalização que envolve outro transportador de nitrato, o *NRT1.1*.

O padrão de expressão relativa observado para o gene *NRT2.1* foi muito semelhante ao de *NAR2.1*, como já havia sido observado por Okamoto (2006) e Krouk (2006). Novamente a adição de DNA reduziu a expressão do gene em comparação a +Pi/-DNA/+N em todos os genótipos, à exceção de *p23*, no qual houve um aumento de cerca de 6x (Figura 4). Além disso, *p37* apresentou maior expressão de *NRT2.1* do que COL no tratamento +Pi/-DNA/-N, enquanto que o gene *NAR2.1* apresentou semelhança na expressão entre o mutante e COL neste tratamento.

Interessante notar que a expressão de *NRT2.1* foi severamente reduzida na total ausência de P (-Pi/-DNA/+N) em todos os genótipos, mas especialmente nos mutantes.

Os genes *NRT2.1* e *NRT2.2* possuem função chave na regulação da captura de alta afinidade de NO_3^- e estão envolvidos com adaptações da planta às mudanças de disponibilidade de N no ambiente (Cerezo *et al.*, 2001). A análise de mutantes simples e duplos para os genes *NRT2.1* e *NRT2.2* permitiu a Li *et al.* (2007) verificarem que a participação de *NRT2.2* na atividade HATS é menor do que a de *NRT2.1*, que é responsável por 72% da atividade. A importância de *NRT2.2* é maior no caso de perda do *NRT2.1*. Assim, a sua contribuição aumenta e resulta numa compensação parcial (Li *et al.*, 2007).

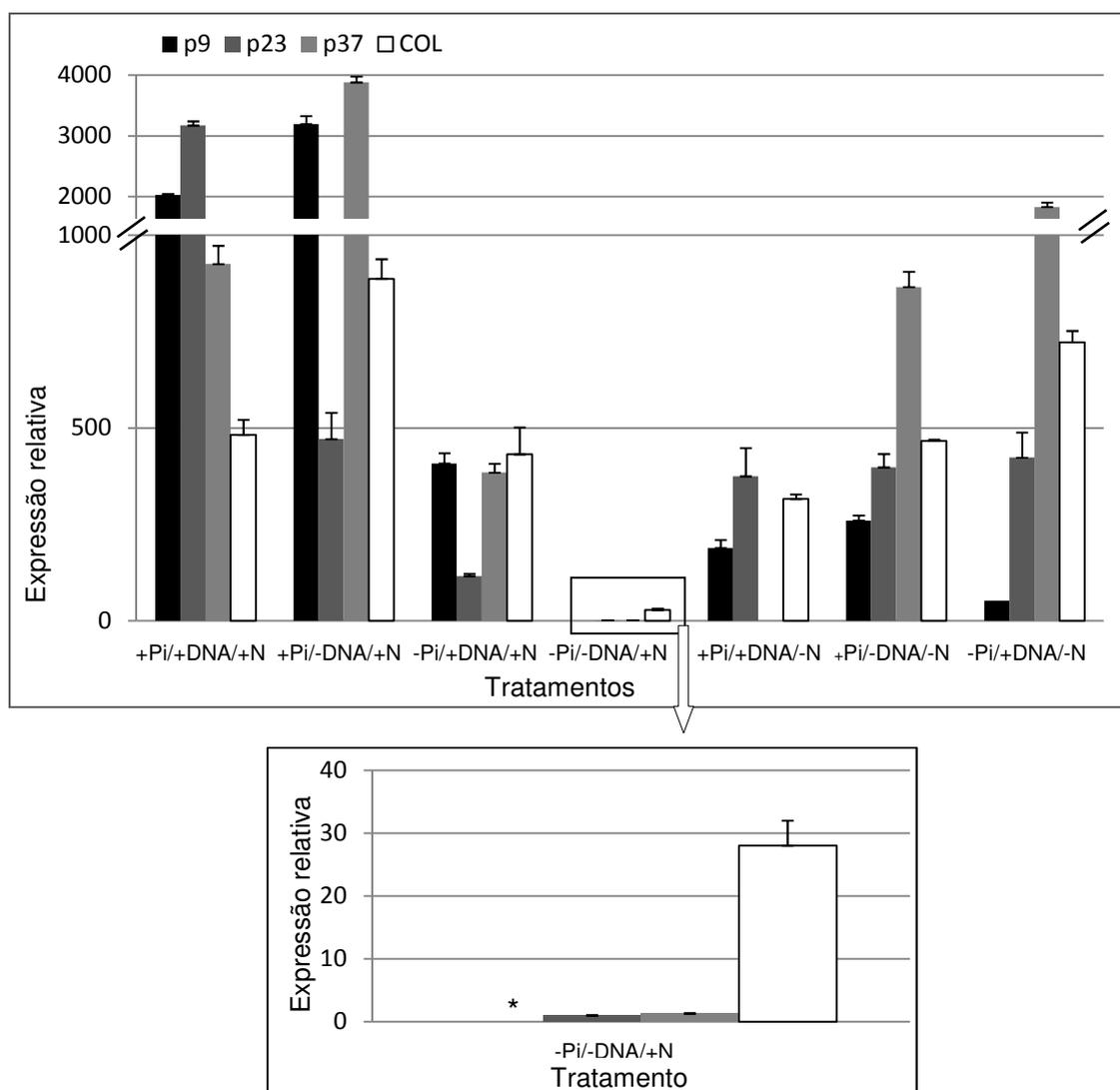


FIGURA 4. Expressão relativa do gene *NRT2.1* sob diferentes disponibilidades de Pi, DNA e N em relação à actina, nos mutantes *p9*, *p23*, *p37* e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas. Ênfase no tratamento -Pi/-DNA/+N (*) Pico de dissociação fora do padrão.

O gene *NRT2.2* exibiu expressão relativamente baixa se comparada a *NRT2.1* (Figura 4 e 5). A adição de DNA causou redução da expressão em COL e *p37* em relação a +Pi/-DNA+N, porém, induziu nos outros dois mutantes, especialmente *p23*. Interessante que tanto *p23* quanto *p37* tem seu fenótipo resgatado com a remoção de N do meio, no entanto, a expressão dos genes relacionados à captação de nitrato parece diferir entre estes. A remoção de P na forma inorgânica não teve efeito sobre COL, mas

reduziu a praticamente zero a expressão nos mutantes. Quando nitrato também foi removido, houve indução em COL, *p23* e *p37* em relação à ausência de apenas Pi.

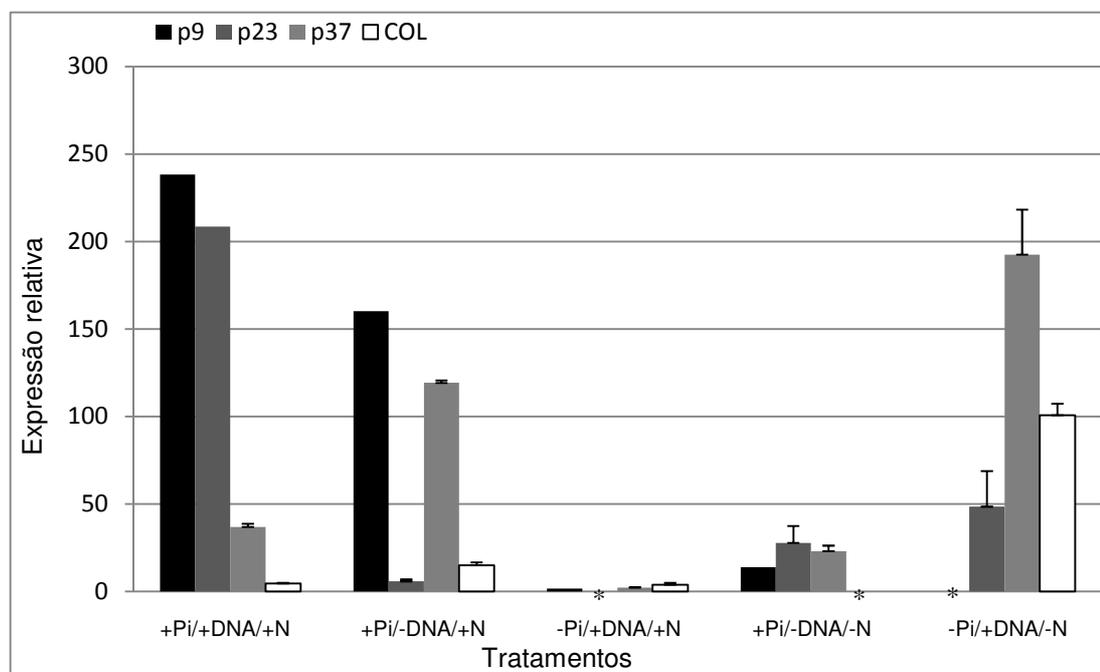


FIGURA 5. Expressão relativa do gene *NRT2.2* sob diferentes disponibilidades de Pi, DNA e N em relação à actina, nos mutantes *p9*, *p23*, *p37* e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas. (*) Não houve amplificação.

O transportador de nitrato *NRT1.1* foi primeiramente descrito como transportador de baixa afinidade (LATS – *low affinity transport system*), mas também está envolvido no HATS. A expressão do gene *NRT1.1* é induzida por NO_3^- , mas sob condições de baixo nitrato, a quinase CIPK23 pode fosforilar a treonina T101, permitindo que *NRT1.1* funcione como transportador de nitrato de alta afinidade (Liu *et al.*, 1999; Ho *et al.*, 2009). Além disso, *NRT1.1* funciona como sensor responsável pela resposta

primária ao NO_3^- , que monitora os níveis no ambiente externo e ativa a expressão de genes relacionados a este íon (Ho *et al.*, 2009).

Quanto à expressão relativa de *NRT1.1*, aconteceu variação considerável entre mutantes (Figura 6). Cabe ressaltar que houve indução do gene em todas as condições de forma superior a +Pi/+DNA/+N em COL. Isso indica que a deficiência individual de qualquer um dos nutrientes analisados (Pi e N) leva ao aumento na expressão deste gene, o que pode representar uma resposta da planta na busca por maior assimilação de NO_3^- , tanto na ausência de Pi, como de DNA e de N. A menor indução, entretanto, ocorreu quando apenas DNA foi removido e a maior quando os três foram removidos, em relação à +P/+DNA/+N.

Observa-se que a presença de Pi influenciou a expressão de *NRT1.1*, pois esta foi maior em COL sob -Pi/-DNA/+N do que na condição de completa suficiência de P. Isso sugere que a retirada do P do meio causa aumento na expressão deste gene em COL, como também verificado em *p9* e *p37* (Figura 6). Nesse sentido, sugere-se que os níveis de P afetem a absorção de nitrogênio, através da regulação, pelo menos, do transportador e sensor de nitrato *NRT1.1*. Outros genes regulados por nitrato podem também responder à deficiência de Pi, potássio (K) ou ferro, assim como o nitrato pode induzir transportadores de Pi e K, sugerindo que haja alguns aspectos comuns na regulação da captura destes nutrientes na planta (Wang *et al.*, 2001). Convém lembrar que *p9* é sensível aos níveis de Fe do meio quando Pi é removido (Strieder, 2009).

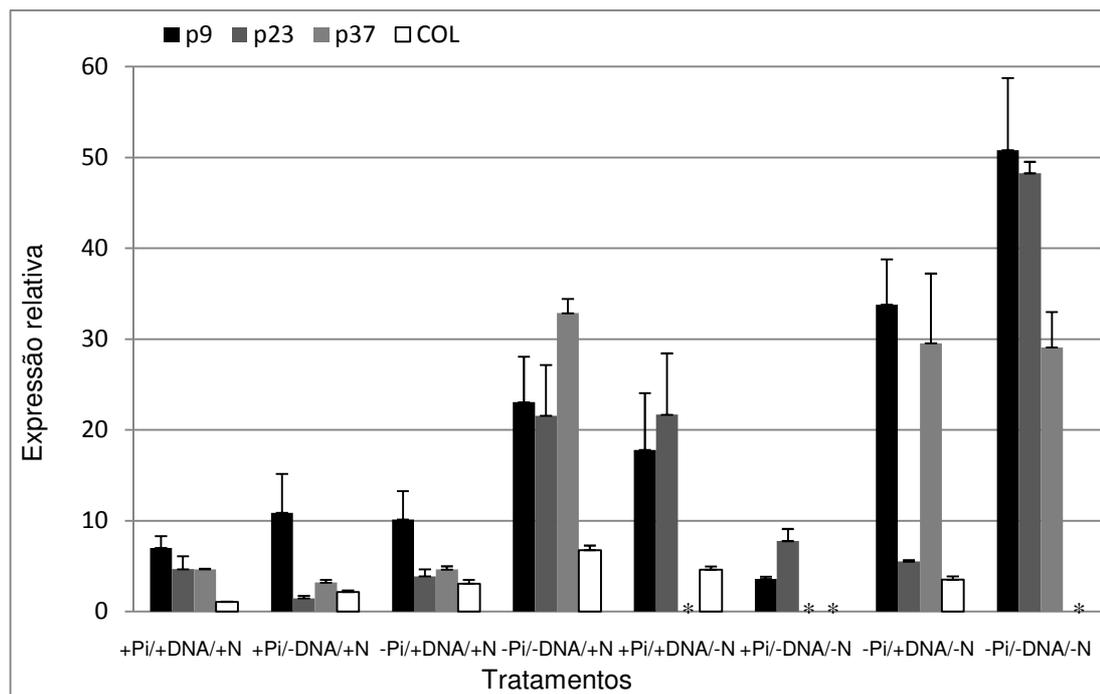


FIGURA 6. Expressão relativa do gene *NRT1.1* sob diferentes disponibilidades de Pi, DNA e N em relação à actina, nos mutantes *p9*, *p23*, *p37* e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas. (*) Dois picos de dissociação.

Nos tratamentos +Pi/-DNA/+N e -Pi/+DNA/+N, *p23* e *p37* tiveram resposta similar a COL, enquanto em +Pi/+DNA/+N, *p23* e *p37* aumentaram sua expressão. O mutante *p9* teve a expressão do gene sempre superior a COL. Na ausência de Pi, N e DNA, os três mutantes apresentaram elevada expressão de *NRT1.1*, especialmente *p9* e *p23*.

Através da análise de expressão dos transportadores de N avaliados, foi possível verificar que *p9* apresentou maior expressão dos genes que codificam para os transportadores do HATS, *NAR2.1* e *NRT2.1* do que COL na presença de nitrato. Houve pequena diferença nos meios com DNA e ausência de Pi ou nitrato e menor expressão na ausência de nitrogênio (-DNA/-N) (Figuras 3 e 4). Estes dados sugerem que o menor crescimento da raiz primária em meio com organofosfatos relativamente ao controle positivo,

não está relacionado com a não indução destes genes. Em relação a *NRT2.2*, o padrão de expressão observado em *p9* foi diferente de COL, novamente, com expressão muito superior a COL nas condições de suficiência (Figura 5). Além disso, *NRT1.1* apresentou superior expressão que COL em todas as condições comparadas (Figura 6), o que sugere que o gene mutado interfere *upstream* a esses genes, e que a mutação em *p9* possivelmente esteja relacionada com a percepção do N, uma vez que *NRT1.1* age também como sensor local de N.

Quanto ao mutante *p23*, este sempre apresentou expressão relativa inferior à COL nos tratamentos analisados, exceto sob +PI/+DNA/+N, para os três genes do sistema de transporte de alta afinidade, *NAR2.1*, *NRT2.1* e *NRT2.2*. Isso sugere que *p23* tenha falha na indução do HATS e que essa resposta possa influenciar o transporte de N, de forma que o mutante não consiga utilizar o N disponível, seja na forma de NO_3^- ou de DNA como fontes de N, ou que a quantidade de N absorvido tenha efeito maior sobre a regulação dos transportadores, ou seja, que a mutação cause hipersensibilidade ao N. Já em relação a *NRT1.1*, que funciona como sensor de NO_3^- e está envolvido com o transporte de baixa e de alta afinidade, *p23* exibiu maior expressão na ausência de nitrato ou P (Figura 6). Em relação a COL similar expressão foi observada na presença de nitrato e fosfato (sem DNA) ou na presença de DNA quando Pi ou Pi e nitrato foram omitidos. Nas demais condições, a expressão no mutante foi sempre superior a COL. Isso indica que o gene mutado também afeta a percepção da limitação externa de N. Talvez a mutação gere erroneamente o sinal de que os níveis internos de N estão elevados e cause inibição do transporte de alta afinidade.

Observando-se a expressão dos genes em *p37*, é possível verificar que houve semelhança na indução entre o mutante e COL para *NAR2.1* e *NRT2.1*. Apesar dos valores serem diferentes, o comportamento foi similar. Pode-se deduzir que o gene mutado em *p37* não está relacionado com o transporte de alta afinidade. Na ausência de nitrato e Pi houve considerável aumento da expressão em relação a COL, talvez indicando um efeito sinérgico. O gene *NRT1.1* foi induzido na ausência de N ou P (-Pi/-DNA), ou seja, é possível que o gene mutado em *p37* também afete a percepção de N.

Além dos transportadores de nitrato, também foram avaliados genes relacionados à assimilação de nitrogênio. Em questão de minutos, o nitrato induz a expressão de milhares de genes, incluindo transportadores (NRTs) e enzimas envolvidas na assimilação de nitrato (Wang *et al.*, 2004). Os genes *NIA1* e *NIA2* são ativados por nitrato e codificam duas isoformas da enzima nitrato redutase, que são necessárias para a assimilação de nitrogênio pela planta, atuando na redução do nitrato a nitrito (Wang *et al.*, 2009). Mutantes duplos de *arabidopsis* para estes genes são incapazes de utilizar o NO_3^- como única fonte de N e não apresentam atividade da nitrato redutase (Wang *et al.*, 2004).

Os níveis de expressão de *NIA1* foram bastante variáveis de acordo com os diferentes tratamentos aplicados. Em COL, a remoção de DNA ou de Pi praticamente não alterou a expressão, enquanto a remoção de dois componentes (-DNA/-N, -Pi/-N ou -Pi/-DNA) causou indução de *NIA1* (Figura 7). É sabido que os níveis de açúcar na planta afetam a expressão de *NIA1*. Logo, é possível que a remoção de dois componentes tenha alterado a

homeostase bioquímica, gerando alterações na disponibilidade de açúcar e por conseqüência, afetado a expressão deste gene.

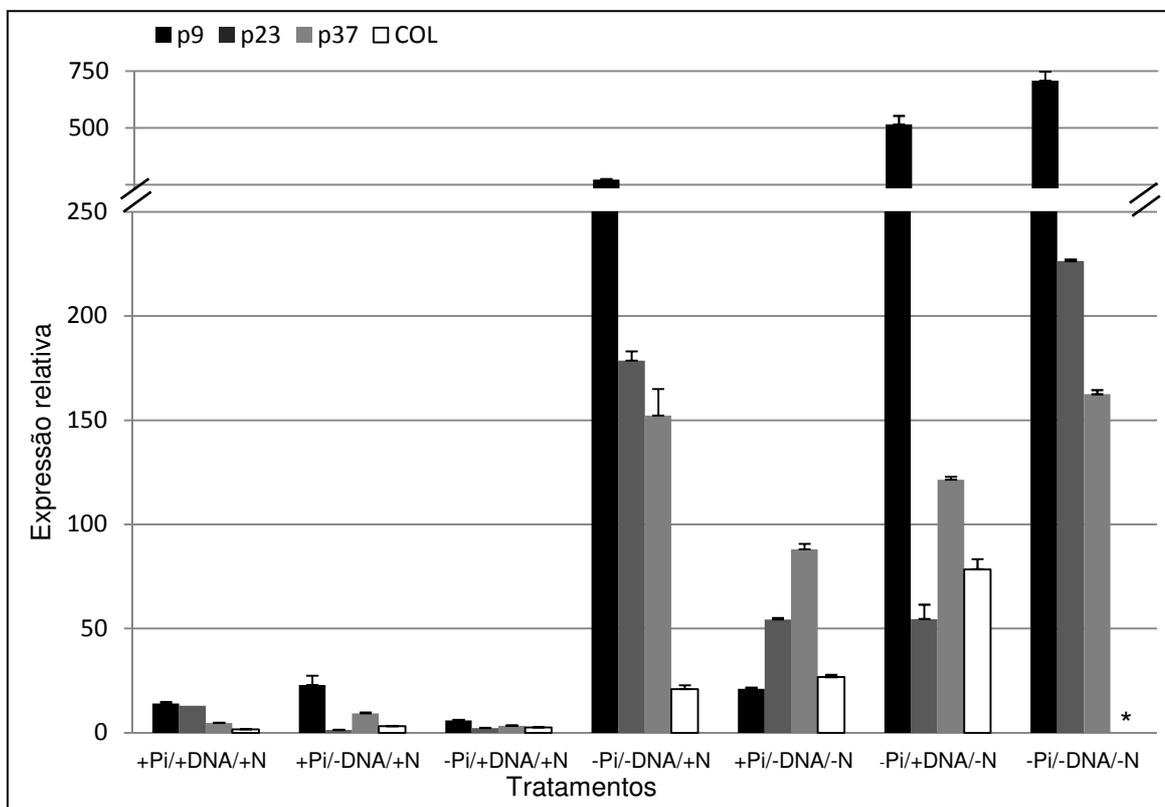


FIGURA 7. Expressão relativa do gene *NIA1* sob diferentes disponibilidade de Pi, DNA e N em relação à actina, nos mutantes *p9*, *p23*, *p37* e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas. (*) Não houve amplificação.

Em *p9*, a remoção de N teve muito menor efeito na expressão de *NIA1* que a remoção de Pi (Figura 7). A expressão foi acentuadamente superior no mutante nos casos de -Pi/+DNA/-N e -Pi/-DNA/+N, aumento de 53,3 e 72,42 vezes, respectivamente. O comportamento de *NIA1* em *p9* chama atenção quando fosfato é removido do meio e leva a crer que este mutante tem maior dificuldade em atingir níveis satisfatórios de N orgânico na planta, mantendo a indução de *NIA1* por mais tempo em relação à COL

nestas condições. Salienta-se novamente que a ausência de Pi no meio torna o Fe mais disponível em relação às condições com suficiência de Pi, e o mutante é sensível a Fe. Strieder (2009) observou que *p9* apresenta crescimento radicular inferior em meio -Pi/-N em relação aos outros mutantes e COL, que apresentam tamanhos radiculares similares. Neste tratamento (-Pi/-DNA/-N), *p9* exibiu expressão de *NIA1* 50,2 vezes superior à +Pi/+DNA/+N. No entanto, a expressão deste gene não relaciona-se a redução do crescimento da raiz observado no meio +Pi/+DNA/+N, este mutante é o mais sensível dos três à presença de ácidos nucleicos, segundo Strieder (2009).

O padrão observado em *p23* foi semelhante quanto à expressão de *NIA1* em todos os tratamentos, comparando-se com COL, exceto na ausência de Pi e DNA, quando a expressão no mutante foi 8,5 vezes maior. Outro aspecto que chama atenção é a menor expressão em relação à COL na ausência de Pi e N, expressão 0,7 vezes menor no mutante sob condições de -Pi/+DNA/-N (Figura 7). Sob deficiência total de nutrientes, a expressão em *p23* foi menor em relação à *p9* e maior à *p37*. O gene parece ser induzido de forma muito mais abundante na total ausência de P.

O padrão do gene *NIA1* em *p37* mostrou maior expressão em relação à COL em todos os tratamentos onde pelo menos dois fatores haviam sido removidos, sendo que sob -Pi/-DNA/+N, *p37* apresentou valores 7,3 vezes maiores do que COL, sugerindo que a redução dos níveis de P ou N tenham similar efeito.

Os genes *NIA* são reprimidos por amônio, por NO_2^- , derivado da redução de NO_3^- ou por produtos do metabolismo de NO_3^- , como NH_4^+ e

aminoácidos, compondo um mecanismo que coordena a absorção e assimilação de nitrato pela planta (Loqué *et al.*, 2003). Dessa forma, é possível que nos tratamentos com muito N disponível (+DNA/+N), aos 10 dias já houvesse produção suficiente de produtos do metabolismo de N, como glutamina e glutamato, o que causaria a repressão de *NIA*.

O DNA teve pouco efeito na expressão de *NIA1* na presença de Pi e N, como pode ser observado em +Pi/-DNA/+N. Entretanto, no caso do fornecimento de DNA como única fonte de P e N (-Pi/+DNA/-N), pode ser que a quantidade de N gerada pela degradação do DNA seja suficiente para induzir a expressão de *NIA1* em COL ou a presença de menor quantidade de glutamina e/ou glutamato não seja suficiente para reprimir o gene. À medida que a concentração de N disponível no meio é aumentada, há diminuição proporcional na expressão de *NIA1* e *NRT1.1*, indicativo de que a repressão destes genes é dependente da redução de nitrato (Loqué, 2003). No caso da disponibilização apenas de N (-Pi/-DNA/+N), pode ser que a quantidade de N fornecida seja suficiente para ativar a expressão de *NIA1* e a produção de metabólitos tenha causado apenas parcialmente a repressão do gene.

Dentre os dois genes analisados que codificam para isoformas de nitrato redutase, *NIA2* é o principal para a maioria das atividades catalíticas da planta (Wilkinson & Crawford, 1991) e exerce também a principal função na repressão exercida pela redução de NO_3^- (Lóque, 2003). O gene *NIA2* apresentou maior nível de expressão no tratamento com suficiência de Pi e ausência de DNA e N em COL, sendo 3,2 vezes superior a *p9*, 2,2 vezes a *p23* e 1,3 a *p37* (Figura 8). *p9* apresentou, de modo geral, sempre maior

expressão que COL. *p23* apresentou valor de expressão superior a COL quando Pi e DNA estavam presentes ou quando ambos eram omitidos. Na condição de -Pi/+DNA/-N, houve incremento de 1,5 vezes em *p37* e em -Pi/-DNA/+N, de 8 e 4 vezes em *p9*, *p23* e *p37*, respectivamente, em relação à COL.

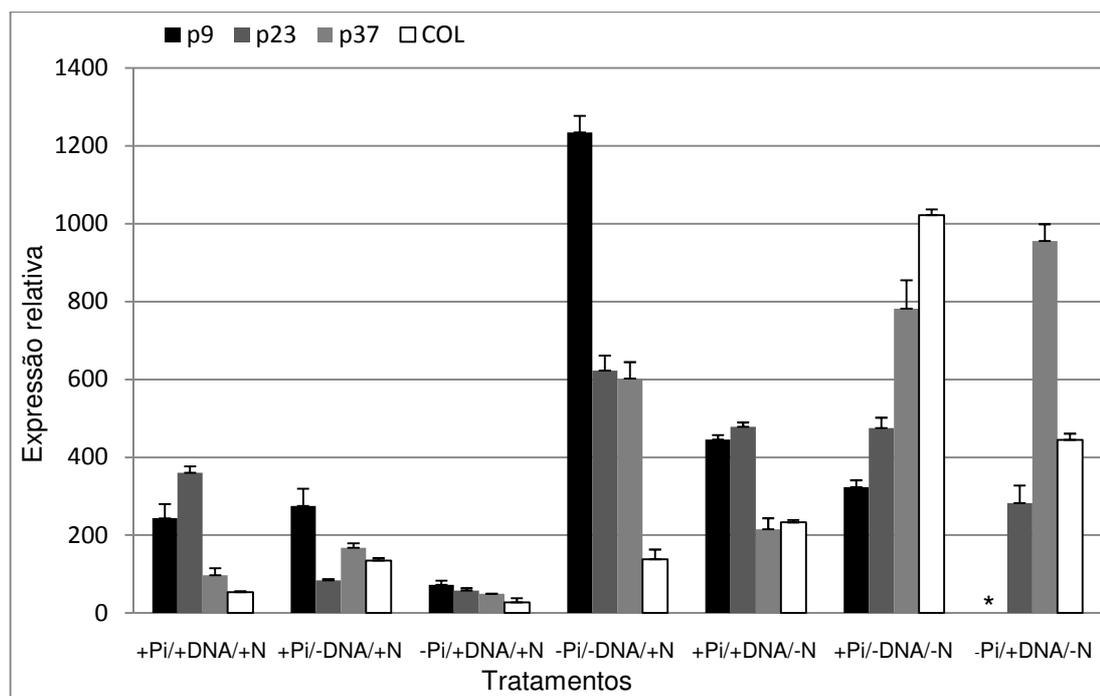


FIGURA 8. Expressão relativa do gene *NIA2* sob diferentes disponibilidades de Pi, DNA e N em relação à actina, nos mutantes *p9*, *p23*, *p37* e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas. (*) Pico de dissociação fora do padrão.

Sabe-se que os níveis de transcritos da nitrato redutase oscilam ao longo do dia, acompanhando o ritmo circadiano. De acordo com Yang *et al.* (2005), em ciclos de dia/noite, os níveis de transcritos aumentam gradualmente durante o período de escuro, alcançam nível máximo no início do período de luz e diminuem gradualmente. No caso do presente estudo, alterações nos níveis de expressão de *NIA1* e *NIA2* não podem ser

atribuídas a estas oscilações, uma vez que as coletas das amostras para extração de RNA foram realizadas no mesmo momento.

Além da participação dos transportadores de nitrato, as adaptações da raiz ao baixo N disponível incluem um sistema radicular bastante ramificado e aumento no número e comprimento de pêlos que aumentam a superfície radicular e permitem maior exploração do solo (Miller & Cramer, 2004). O nitrato pode ter efeito estimulatório localizado ou efeito inibitório sistêmico no crescimento das raízes laterais. Em estudo com tabaco, Scheible *et al.* (1997) verificaram que o acúmulo de NO_3^- na parte aérea é responsável pela geração de um sinal que leva à inibição da formação das raízes laterais. Por outro lado, um circuito regulatório relacionado com o acúmulo de N nas raízes e que inibe o desenvolvimento das raízes laterais foi proposto por Gifford *et al.* (2008). Nesse circuito, *ARF8* (*auxin response factor 8*) parece agir como repressor das raízes laterais iniciadas, sendo sua expressão induzida quando o microRNA 167 é reprimido por altas concentrações de N.

No presente estudo, observou-se padrão de expressão relativa de *ARF8* semelhante entre os diferentes tratamentos em COL (Figura 9). O gene foi menos expresso em todos os tratamentos analisados em relação à +Pi/+DNA/+N nos mutantes *p9* e *p23*. A expressão em *p9* e *p37* foi maior em relação à COL sob -Pi/-DNA/+N. Isso pode indicar que estes mutantes respondem de forma diferenciada quando o nitrogênio é fornecido somente na forma de NO_3^- e sem a presença de Pi, levando à indução de *ARF8* e redução do número de raízes laterais. Relativamente à COL, Strieder (2009)

observou que *p37* desenvolve menor quantidade de raízes laterais aos 4 e 7 dias após transferência de meio com suficiência de P para -P/+N.

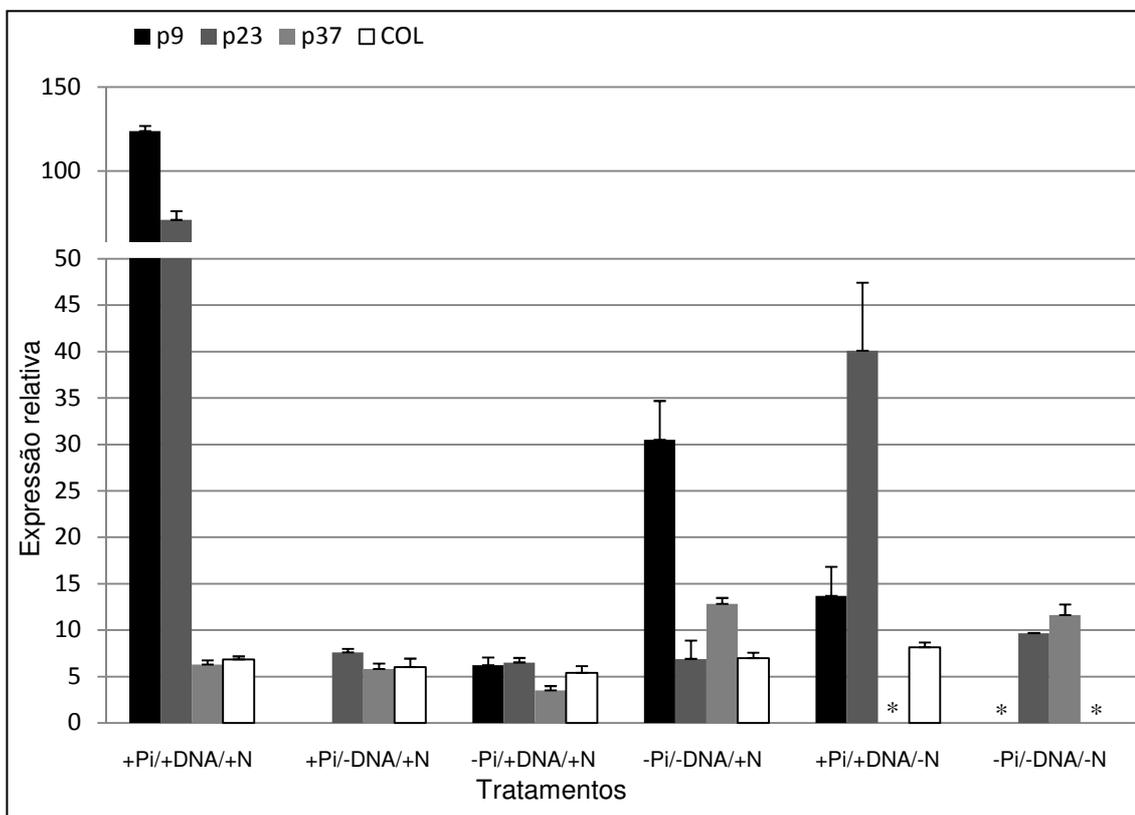


FIGURA 9. Expressão relativa do gene *ARF8* sob diferentes disponibilidades de Pi, DNA e N em relação à actina, nos mutantes *p9*, *p23*, *p37* e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas. (*) Não houve amplificação.

Pode-se observar no padrão de expressão em -Pi/+DNA/+N que o Pi influencia a expressão deste gene em *p9* e *p23*. No caso de *p9*, os valores foram superiores à COL nas condições de -Pi/-DNA/+N e +Pi/+DNA/+N (Figura 9), indicando que este gene deve sofrer alguma influência do gene mutado. O mutante *p23* exibiu maior expressão do gene em +Pi/+DNA/+N e sob suprimento de P e ausência de N. Deve-se considerar que Gifford *et al.* (2008) utilizaram duas horas de indução com NO_3^- para analisar a

indução/repressão do gene *ARF8* e do *miR167*, enquanto que, no presente estudo, as plantas cresceram continuamente durante dez dias em meio com ou sem as fontes de P e N. Dessa forma, aos dez dias após a emergência, quando foram coletadas as raízes para extração do RNA, é possível observar a expressão dos genes apenas em longo prazo e talvez já tivesse sido alcançada estabilidade na expressão de *ARF8*, como pode ser observado em COL na Figura 9.

Ainda se conhece muito pouco a respeito da participação da fosfolipase D (PLD) nas respostas à disponibilidade de N no solo. Um novo gene identificado por Hong *et al.* (2009), o qual codifica a PLD ϵ , parece estar envolvido com o estímulo do crescimento radicular e acúmulo de biomassa, através do intermédio do ácido fosfatídico, um lipídio que funciona como mensageiro. Dessa forma, os autores postularam que a sinalização lipídica poderia servir como conexão entre a percepção do *status* de N pelos sensores NRT e as mudanças na arquitetura radicular. Sob condições de deficiência de N, a ação de PLD ϵ foi promover a alongação da raiz primária e dos pêlos radiculares, enquanto sob N suficiente, esse efeito não foi observado, apenas a promoção do crescimento de raízes laterais e produção de biomassa (Hong *et al.*, 2009). O nível de expressão gênica de PLD ϵ observado pelos autores não foi diferente em baixo N ou alto N. Porém, quando as plantas foram crescidas 5 dias em alto N e transferidas para baixo N, aconteceu aumento de duas vezes na sua expressão. Esses resultados sugerem que PLD ϵ esteja envolvido com a sinalização de N na planta (Hong *et al.* 2009; Chapman & Miller, 2011).

No caso deste gene, além de não haver amplificação em algumas amostras, observaram-se temperaturas de dissociação diferentes (Figura 10), o que pode ser indicativo da ocorrência de *splicing* alternativo nestas. Isso aconteceu com *p9* em +Pi/+DNA/+N e com *p23* em +Pi/-DNA/-N.

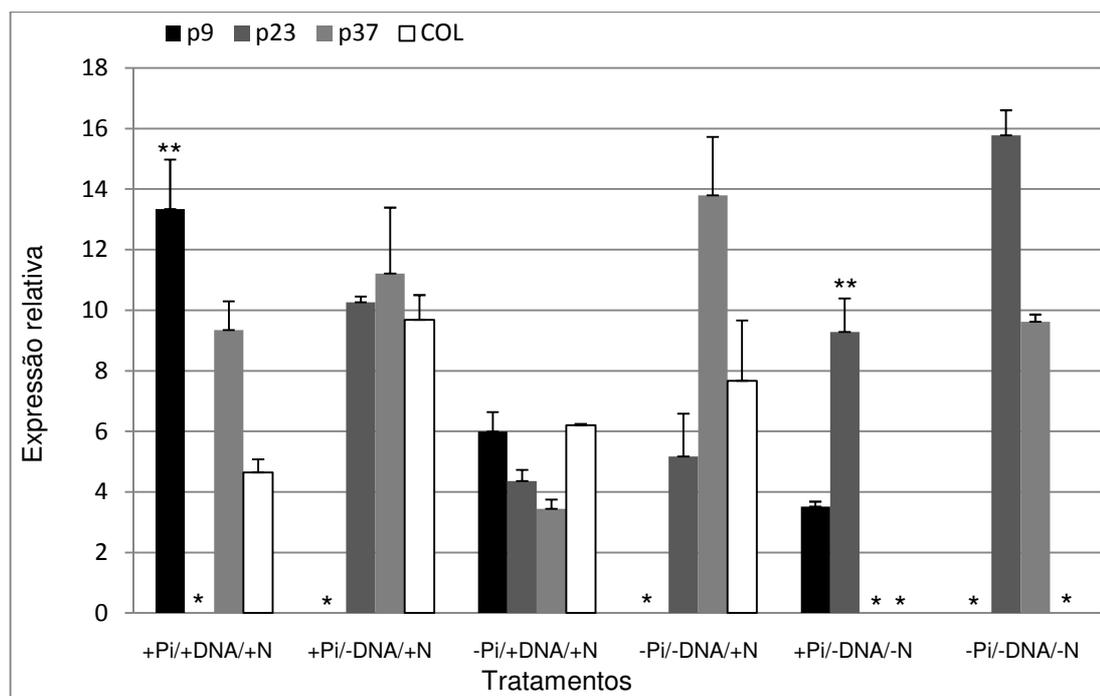


FIGURA 10. Expressão relativa do gene *PLDε* sob diferentes disponibilidades de Pi, DNA e N em relação à actina, nos mutantes *p9*, *p23*, *p37* e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas. (*) Não houve amplificação, (**) temperatura de dissociação fora do padrão.

O perfil de expressão observado em COL condiz com os resultados obtidos por Hong *et al.* (2009), uma vez que a diferença nos níveis de expressão entre tratamentos é pequena (Figura 10).

Em *p9*, houve poucas amplificações e uma delas apresentou pico de dissociação em temperatura diferente das outras amostras. Entretanto, pode-se observar que, na deficiência de DNA e N, a expressão foi menor do que na presença de ambos, o que poderia indicar em *p9* uma menor

habilidade no alongamento da raiz primária e dos pêlos radiculares sob deficiência de N. No mutante *p23*, quando se remove Pi há menor expressão do gene, porém, na ausência total de N e P (-Pi/-DNA/-N), a expressão de *PLDε* em *p23* foi 3,6 vezes maior que a observada em -Pi/+DNA/+N. Isso sugere que *p23* tenha maior habilidade no alongamento da raiz primária e dos pêlos radiculares sob deficiência de N.

No caso de *p37*, houve maior expressão do gene na maioria dos tratamentos analisados em relação à COL, sendo menor sob -Pi/+DNA/+N e similar em +Pi/-DNA/+N. Isso denota que *PLDε* pode exercer um papel importante na modulação radicular neste mutante. Com a presença apenas de N, a expressão foi bastante superior ao observado nos outros genótipos.

Após verificar a expressão dos genes relacionados com a assimilação de N (*NIA1* e *NIA2*) e com a repressão de raízes laterais (*ARF8*), pode-se concluir que todos os mutantes têm a expressão relativa alterada em relação aos genes NIA, especialmente em condições de limitação de P. Dessa forma, os genes mutados parecem afetar tanto o transporte, quanto a assimilação de N. No caso de *p9* e *p23*, ainda, o circuito regulatório que age na modulação das raízes laterais mostrou-se alterado via *ARF8*.

Quanto à aclimatação à limitação de Pi, foram analisados dois genes que codificam um transportador de Pi e uma fosfatase ácida. O transportador de fosfato AtPT2 (também denominado Atpht1;4 ou PHT4) é induzido nas raízes por deficiência de Pi e é capaz de recuperar o fenótipo de tipo silvestre no mutante *pho84* de levedura, no qual não há transporte de fosfato de alta afinidade (Muchhal *et al.*, 1996). A eficiência na absorção de Pi sob deficiência deste elemento é severamente melhorada quando a proteína

AtPT2 se faz presente na planta. Além disso, é provável que este transportador esteja envolvido com a remobilização de Pi dentro da planta (Misson *et al.*, 2004). De acordo com Shin *et al.* (2004), os transportadores Pht1;1 e AtPT2 (Pht1;4) exercem papel central na aquisição de Pi do ambiente externo.

No caso deste gene, a expressão foi avaliada em condições de elevado N. De acordo com o esperado, *AtPT2* exibiu maior expressão em condições de total deficiência de P, tanto orgânico como inorgânico (Figura 11). Em condição de suficiência de Pi e DNA, *p37* e COL apresentaram valores de amplificação semelhantes aos obtidos sob -Pi/+DNA, enquanto em *p9* e *p23*, não houve amplificação do gene em +Pi/+DNA/+N. Sob dupla deficiência de P (-Pi/-DNA), COL aumentou a expressão do gene 8,5 vezes, enquanto *p23*, *p37* e exibiram aumentos de 1,9 e 2,7 vezes, respectivamente, em relação ao tratamento -Pi/+DNA/+N (Figura 11). Os resultados indicam que os três mutantes têm menor capacidade de induzir a transcrição de *AtPT2* sob deficiência de P relativamente a COL.

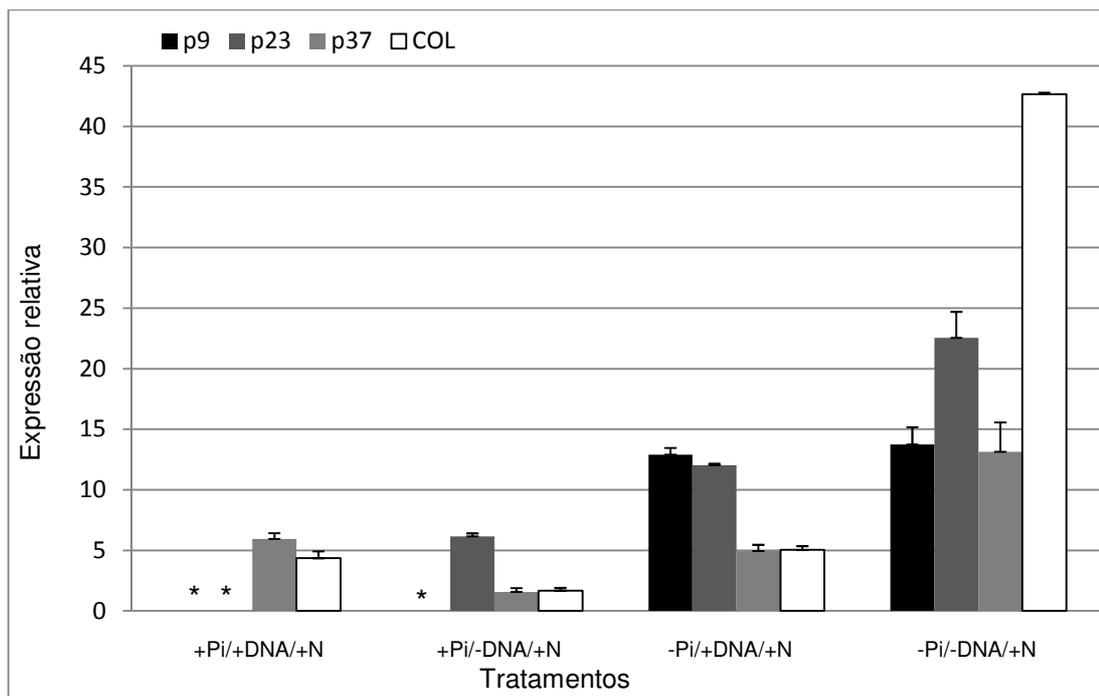


FIGURA 11. Expressão relativa do gene *AtPT2* sob diferentes disponibilidades de Pi e DNA em relação à actina, nos mutantes *p9*, *p23*, *p37* e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas. (*) Não houve amplificação.

Sob condição de baixo P, há indução da atividade de fosfatases, que catalisam a hidrólise do Pi e agem na liberação, transporte e reciclagem do Pi (Duff *et al.*, 1994, Tran *et al.*, 2010). O gene *ACP5* é induzido durante a deficiência de Pi e controlado transcricionalmente (del Pozo *et al.*, 1999). Além disso, também há acúmulo de transcritos de *ACP5* sob estresse oxidativo ou salino e a enzima *ACP5* funciona tanto como fosfatase ácida, como tem função de peroxidase, sugerindo ainda ação na detoxificação de espécies reativas de oxigênio (del Pozo *et al.*, 1999; Veljanovski *et al.*, 2006; Hurley *et al.*, 2010). Segundo del Pozo *et al.* (1999), o acúmulo de transcritos de *ACP5* inicia dois dias após a retirada de Pi do meio e aumenta continuamente pelo menos até os dez dias de deficiência. Quando o Pi é fornecido novamente às plantas, os níveis de

transcritos do gene são reduzidos consideravelmente ao longo do tempo, com redução drástica logo após uma hora ao fornecimento de Pi (Müller *et al.*, 2004). O mutante *pdr1* apresenta raiz primária curta em -Pi/+DNA/+N (Delatorre, 2009), assim como *p9*, *p23* e *p37*, indicando menor habilidade em hidrolisar ácidos nucleicos para adquirir Pi e apresenta menor expressão deste gene sob deficiência de Pi.

Dentre os tratamentos analisados, a expressão de *ACP5* mostrou ser maior sob total limitação de P (-Pi/-DNA), na presença de N (Figura 12). Neste tratamento, em COL, a expressão foi 11,8 vezes maiores em relação à completa suficiência de P e N, corroborando com o padrão de expressão observado por del Pozo *et al.* (1999). Nesse mesmo tratamento, *p9* e *p37* obtiveram expressão relativa maior do que sob +Pi/+DNA/+N, mas menores do que COL.

Os níveis de expressão no mutante *p23* foram superiores à COL sob +Pi/-DNA/+N e -Pi/+DNA/+N. Analisando *AtACP5::GUS*, Strieder (2009) observou aumento na expressão em *p23* a partir dos três dias após a transferência para -Pi, com padrão semelhante em -Pi/+DNA, máxima expressão 6 dias após a transferência e redução a partir daí. Assim, *p23* parece ter a expressão deste gene incrementada em resposta à limitação de P antes dos outros mutantes. O mutante *p9* apresentou padrão semelhante à COL, alcançando um máximo aos seis dias e com menor expressão em -Pi/+DNA (Strieder, 2009).

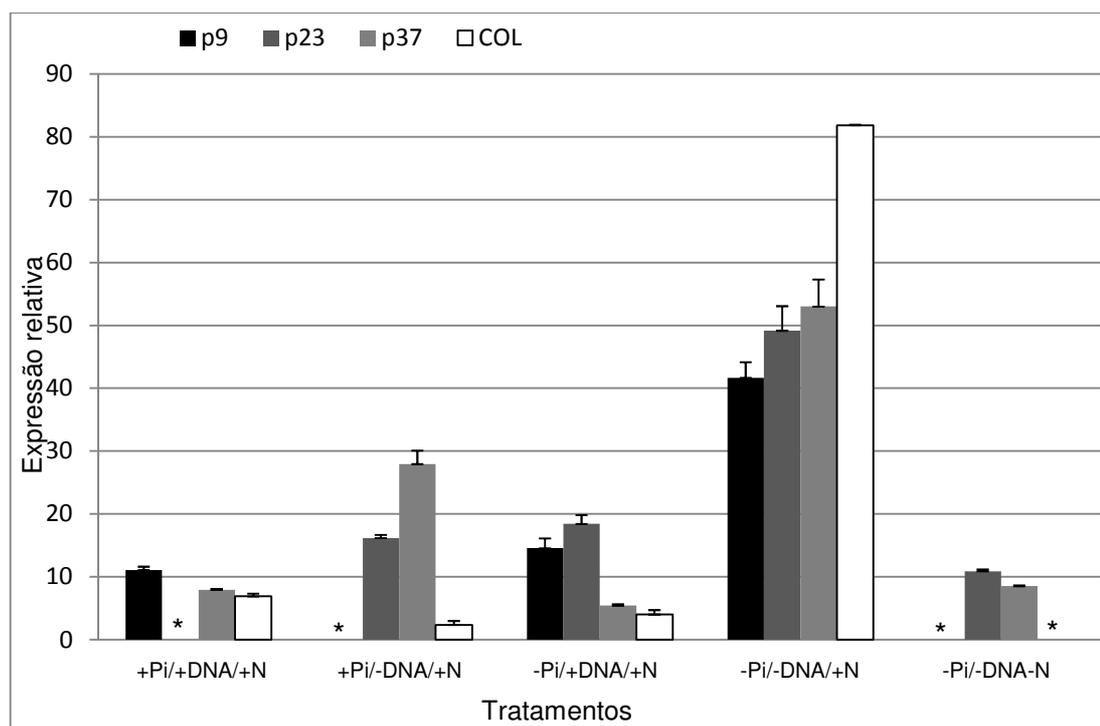


FIGURA 12. Expressão relativa do gene *ACP5* sob diferentes disponibilidades de Pi, DNA e N em relação à actina, nos mutantes *p9*, *p23*, *p37* e em COL. A barra de erros representa o desvio padrão entre as três replicatas. (*) Não houve amplificação.

Na ausência de P orgânico e suprimento de Pi e N, *ACP5* foi 11,9 vezes mais expresso em *p37* e 6,9 vezes mais expresso em *p23* em relação à COL, enquanto em *p9* não houve amplificação do gene. Isso sugere que em *p37* a presença de ácidos orgânicos possa suprimir a expressão do gene. Na limitação isolada de Pi, *p9* exibiu aumento (1,3 vezes) em relação à suficiência completa, enquanto que os demais genótipos apresentaram expressão reduzida.

4.2 Manutenção do centro quiescente

A análise do centro quiescente (CQ) dos mutantes *p23* e *p37* foi realizada como complemento aos resultados encontrados por Pinto (2005) e Strieder (2009), que avaliaram a cinética de expressão de *CycB1::GUS* nestes mutantes em resposta à deficiência de P. A construção *CycB1::GUS* permite verificar células em divisão celular, na fase de transição G₂/M (Cólon-Carmona *et al.*, 1999), demonstrando o efeito da disponibilidade de P sobre a divisão celular. A ausência de P no meio causa redução da divisão celular no meristema da raiz principal de *p23*, de tal forma que, após 6 dias, a divisão celular cessa completamente (Strieder, 2009). Ainda segundo o autor, a presença de P orgânico (DNA) também causa redução da divisão celular neste mutante, porém, de forma menos significativa. Da mesma forma, Pinto (2005) observou redução da divisão celular na raiz principal em *p37* em relação à COL em meio com deficiência de P. Considerando estes resultados prévios, no presente estudo buscou-se verificar se a redução na divisão celular relaciona-se com alterações na manutenção do centro quiescente.

A avaliação do centro quiescente foi realizada utilizando o transgene *QC25::GUS* em *p23* e *QC184::GUS* em *p37* (Sabatine *et al.*, 2003). A expressão *in situ*, através do gene repórter *GUS*, permite visualizar espacialmente células com atividade no centro quiescente durante o desenvolvimento das raízes. Além da análise de expressão sob diferentes disponibilidades de P, utilizaram-se também tratamentos com presença ou ausência de N, visando verificar se há interação na resposta a estes nutrientes.

As análises foram realizadas em COL e *p23* sob diferentes disponibilidades de P e N, aos 7, 9 e 11 dias após a emergência na raiz principal e nas raízes laterais, sendo que estas últimas diferiram de COL principalmente em meio -Pi/+DNA/-N. Quanto às raízes primárias, os resultados mostram que, com suficiência de P e N, houve expressão similar do gene tanto em COL como em *p23* nos três períodos analisados, indicando atividade normal do CQ (Figuras 13A e 13B).

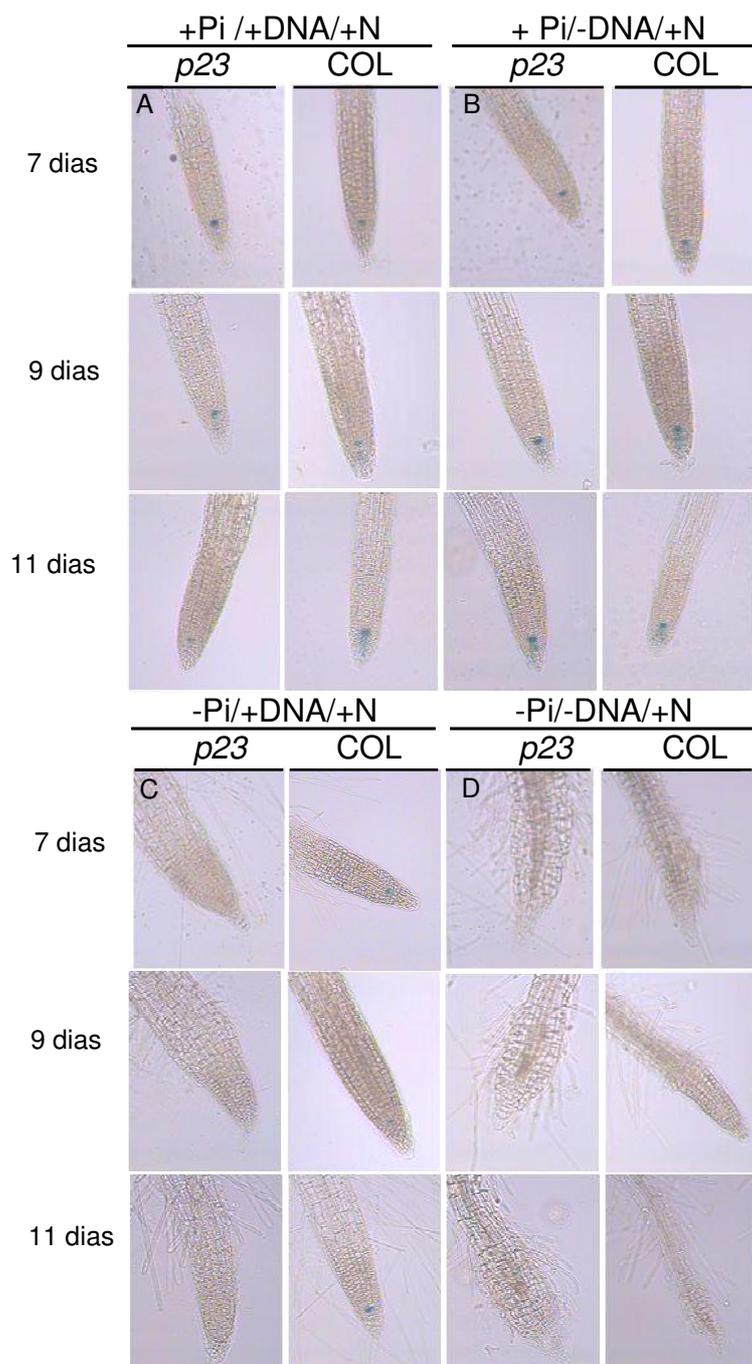


FIGURA 13. Expressão de *QC25::GUS* nas raízes primárias de *p23* e COL crescidas sob suficiência de N e diferentes disponibilidades de P durante 11 dias.

Sob condições de deficiência de P inorgânico, o mutante *p23* apresentou diferença no padrão de expressão em relação à COL. No meio com ausência de P inorgânico e disponibilidade de fósforo orgânico

(-Pi/+DNA/+N), observou-se atividade do centro quiescente em COL nos três períodos avaliados. Porém, não houve expressão do gene em *p23*, sugerindo que a manutenção do CQ foi afetada (Figura 13C). Na ausência total de P, a partir do sétimo dia não há atividade no centro quiescente na raiz principal em COL e em *p23* (Figura 1D). Os dados confirmam os resultados de Pinto (2005) e Strieder (2009), os quais verificaram que *p23* responde de forma alterada ao suprimento de P via ácidos nucleicos, agindo como se houvesse ausência total de P, apresentando fenótipo de raiz primária curta.

O sistema radicular sinaliza a deficiência local de P, a divisão celular é reduzida, a área de divisão celular diferencia-se e as células do CQ perdem suas características. Estas modificações alteram, possivelmente, a homeostase hormonal, induzindo a formação de raízes laterais. A redução da região de divisão celular e, principalmente, da região de alongamento celular da raiz pode ser observada (apesar de não ter sido objetivo principal) na Figura 13. COL apresentou pêlos radiculares, indicadores da diferenciação que ocorre depois de concluído o alongamento celular, mais próximos da área meristemática apenas na ausência completa de P. Em *p23*, foi possível observar a aproximação destas áreas quando o P foi fornecido na forma orgânica. Observou-se também perda do padrão regular das células da raiz, estas se apresentando mais irregulares e disformes. Vanstraelen *et al.* (2009) observaram fenótipo similar no mutante *ccs52a2*, cujo gene pode afetar a taxa de divisão celular no meristema e, por consequência, a manutenção do CQ.

O fenótipo radicular do mutante *p23* em condição de +Pi/+DNA/+N e +Pi/-DNA/+N difere daquele observado em COL. O comprimento da raiz primária é drasticamente menor em *p23* do que em COL em ambos tratamentos (Pinto, 2005; Strieder, 2009). O maior comprimento de raiz primária deste mutante ocorreu em meio +Pi/-DNA, sugerindo que o DNA ou os produtos de sua quebra tem efeito negativo sobre o crescimento da raiz. Porém, as análises do gene repórter não demonstraram haver diferença na expressão do mesmo no centro quiescente em *p23* nos meios +Pi/+DNA/+N e +Pi/-DNA/+N, indicando que a presença de DNA no meio não causou diferenciação do CQ. O menor tamanho das raízes deste mutante sob elevada disponibilidade de P não pode ser explicado pelo mesmo mecanismo, uma vez que o meristema é mantido funcional. Portanto, o gene mutado é necessário para o desenvolvimento normal da raiz também em outras condições, além da limitação de P.

No tratamento sem N no meio, o padrão de expressão em resposta ao P foi diferente daquele encontrado na suficiência de N. COL e o mutante apresentaram coloração no centro quiescente nos três períodos testados na condição de +Pi/+DNA/-N, indício de expressão do gene (Figura 14A).

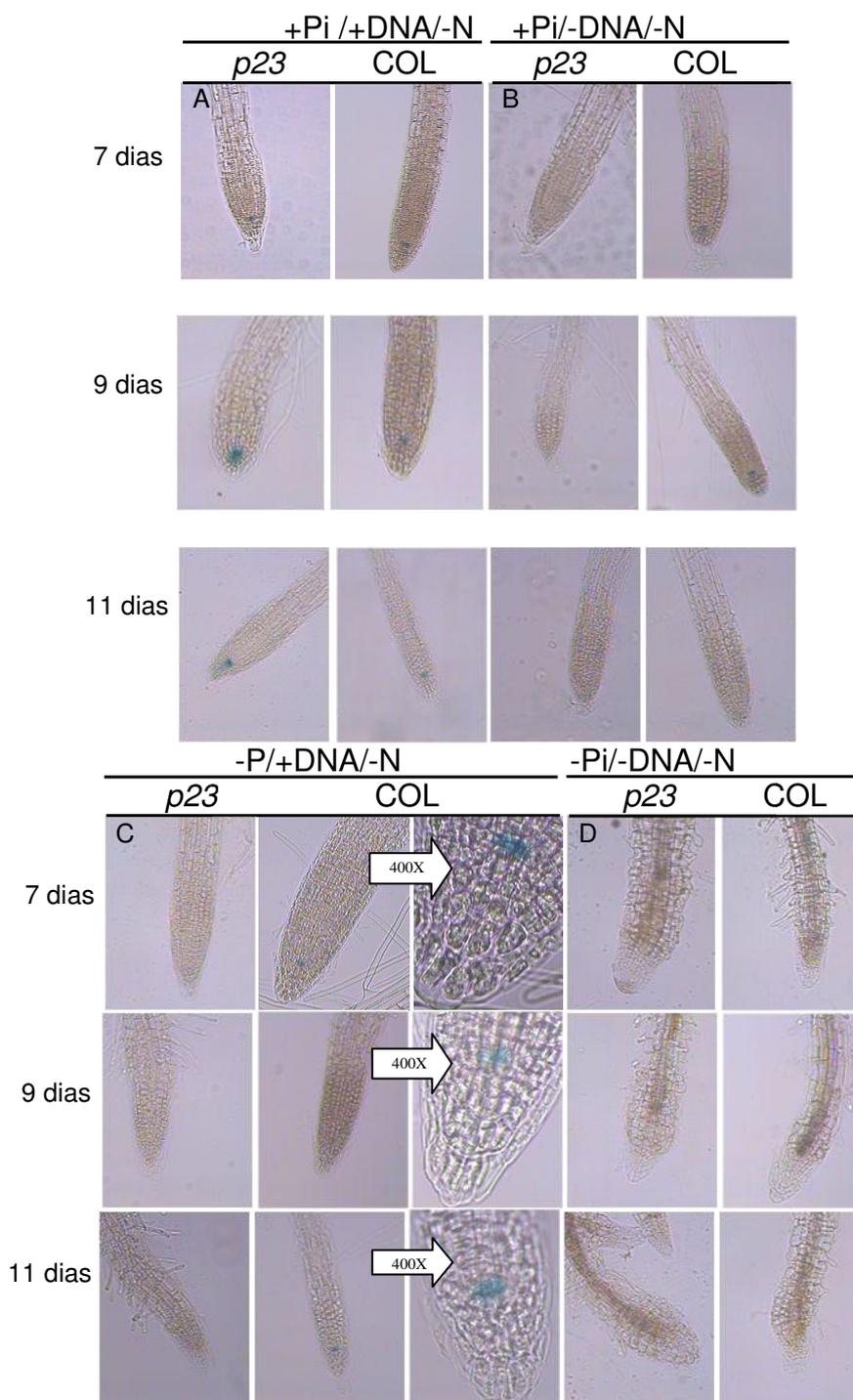


FIGURA 14. Expressão de *QC25::GUS* nas raízes primárias de *p23* e COL crescidas sob deficiência de N e diferentes condições de P durante 11 dias.

Interessante mencionar que, quando o DNA foi removido, COL apresentou alterações no padrão de expressão ao longo do tempo. Aos 7 dias, todas as raízes primárias estavam com o centro quiescente ativo; aos 9

dias, observou-se algumas raízes sem coloração e aos 11 dias ocorreu exaustão do centro quiescente em COL (Figura 14B). Em *p23*, a resposta foi mais rápida e não foi verificada expressão do gene marcador do centro quiescente na raiz primária, nos três períodos avaliados (Figura 14B), sugerindo que a adição de DNA é necessária para manutenção do CQ na ausência de N inorgânico. Estes dados sugerem que a presença de DNA aliviou parcialmente os efeitos da limitação de N sobre o centro quiescente em ambos os genótipos, uma vez que cerca de 6,4mM de N total pode ser fornecido pelo DNA, se clivado. Em COL, espera-se secreção de enzimas que possam degradar o DNA. Porém, no caso de *p23*, análises em gel da atividade de ribonucleases e fosfatases ácidas em resposta à limitação de P mostraram atividade reduzida em comparação a COL (Delatorre, 2009). A resposta à limitação de N não foi avaliada.

Na deficiência mútua de N e P inorgânico, observou-se funcionamento alterado do centro quiescente em *p23*, mesmo na presença de P orgânico (DNA). No caso de COL, as raízes apresentaram redução da expressão do gene *QC25*, como pode ser verificado no aumento de 400x (Figura 14C). No tratamento com ausência total de N e de P, tanto inorgânico como orgânico, verificou-se funcionamento alterado do centro quiescente em *p23* e COL (Figura 14D).

Estudos anteriores com *p23* demonstraram que o comprimento da raiz primária é afetado positivamente pela ausência de N. O fenótipo de COL é resgatado em *p23* quando N é retirado do meio de cultura com Pi. Nestas condições, o comprimento da raiz primária de *p23* não difere do comprimento de COL, ao contrário do que é visto em +Pi/+N, onde o

mutante apresenta fenótipo de raiz curta (Strieder, 2009). Este fenótipo, observado em *p23*, é muito semelhante ao relatado em *pdr1*, no qual há resgate do fenótipo em meio +Pi/-N (Delatorre, 2009). O efeito da limitação de N sobre o centro quiescente não explica o resgate do fenótipo, o qual foi observado aos sete dias após a germinação. Se a hipótese de que *p23* é incapaz de induzir o sistema de resgate à limitação de P e é hiperresponsivo a N é verdadeira, esperar-se-ia que a exaustão do CQ ocorresse mais tardiamente que em COL sob limitação de N, a não ser que a sinalização a N siga rotas diversas, uma afetando o alongamento celular e outra a viabilidade do CQ, o que reduziria a possibilidade levantada.

A análise de expressão do gene marcador do centro quiescente mostrou que há atividade no centro quiescente da raiz primária em *p23* no meio sem N, com suficiência de Pi e complemento de DNA (Figura 14A). A atividade do centro quiescente pode indicar que *p23* consegue perceber a presença de P ou N, quando Pi e DNA são adicionados concomitantemente ao meio de cultura. Porém, quando somente Pi é disponibilizado, não há atividade do centro quiescente nas raízes primárias de *p23*, indicando uma possível interação de Pi e DNA que permita a manutenção da expressão mesmo em condição de deficiência de N ou ainda, o DNA possa fornecer algum N para as plantas. Em meio com deficiência de Pi, mas com presença de DNA (Figura 14C), COL apresentou expressão no centro quiescente, enquanto *p23* demonstrou descontrole completo de atividade, enfatizando a idéia de que este mutante não consegue perceber o DNA como fonte alternativa de P.

Além das raízes primárias, também foram avaliadas as raízes secundárias das plantas sob diferentes concentrações de P e N. Na presença de P e N, as raízes secundárias de *p23* e COL apresentaram atividade no centro quiescente nos três períodos analisados, independente da forma de P disponível (P_i ou DNA) (Figura 15A e 15B). Observou-se diferença entre *p23* e COL na cinética de expressão no centro quiescente apenas sob completa ausência de P. Neste caso, *p23* apresentou atividade do centro quiescente completamente alterada em 50% das raízes secundárias analisadas aos 11 dias (Figura 15D), sendo que todas as terciárias ainda possuíam o centro quiescente corado.

A diferença de resposta entre raízes laterais pode estar relacionada ao tempo de desenvolvimento destas. Delatorre (2009) observou efeito similar em relação à divisão celular no mutante *pdr2*, onde a redução da taxa de divisão celular só iniciava após três dias da emissão da raiz. Isso sugere que a sinalização local da limitação de P possui um “lag”, o qual pode ser devido ao fornecimento de P pela planta durante o desenvolvimento inicial da raiz ou há necessidade de um dado tempo para expressão do possível sensor local de P.

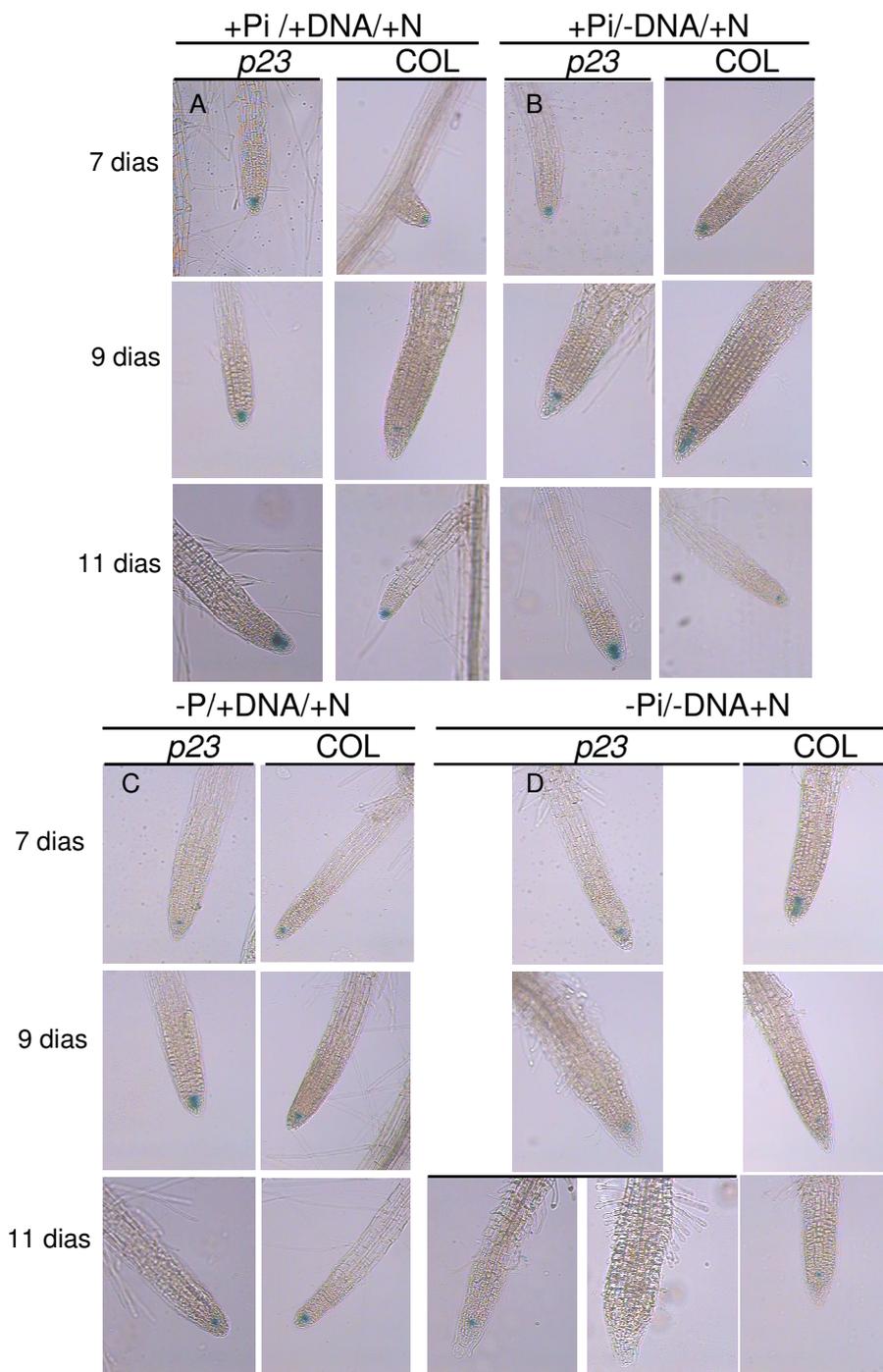


FIGURA 15. Expressão de *QC25::GUS* nas raízes secundárias de *p23* e COL crescidas sob suficiência de N e diferentes condições de P durante 11 dias

A análise de expressão na suficiência de N e diferentes disponibilidades de P indica que há atividade no centro quiescente das raízes laterais em todas as condições, exceto aos 11 dias na condição de -P/-DNA em *p23*, quando foi observada parada na atividade do centro

quiescente em algumas raízes secundárias (Figura 15D). Isso condiz com o esperado, uma vez que a baixa disponibilidade de P no solo causa parada no crescimento da raiz primária, enquanto há maior crescimento radicular lateral, bem como maior número de raízes laterais (Williamson *et al.*, 2001). Dessa forma, esse controle se encontraria extremado em *p23*. É esperado que, com o passar do tempo, as raízes laterais também comecem a responder ao ambiente local, conforme observado por Delatorre (2009) em *ptr2*. No entanto, como as raízes secundárias não surgem ao mesmo tempo, observa-se um gradiente e subsequente produção de raízes terciárias, e assim sucessivamente.

Na ausência de N e presença de Pi, o padrão de expressão observado nas raízes laterais foi o mesmo para *p23* e COL aos 7, 9 e 11 dias, independente da adição de DNA, com expressão no centro quiescente (Figura 16A e 16B). Quando o P foi fornecido na forma orgânica (DNA) ou completamente omitido, *p23* apresentou proporções semelhantes de raízes secundárias com ou sem expressão no centro quiescente, aos 7, 9 e 11 dias (Figura 16C e 16D).

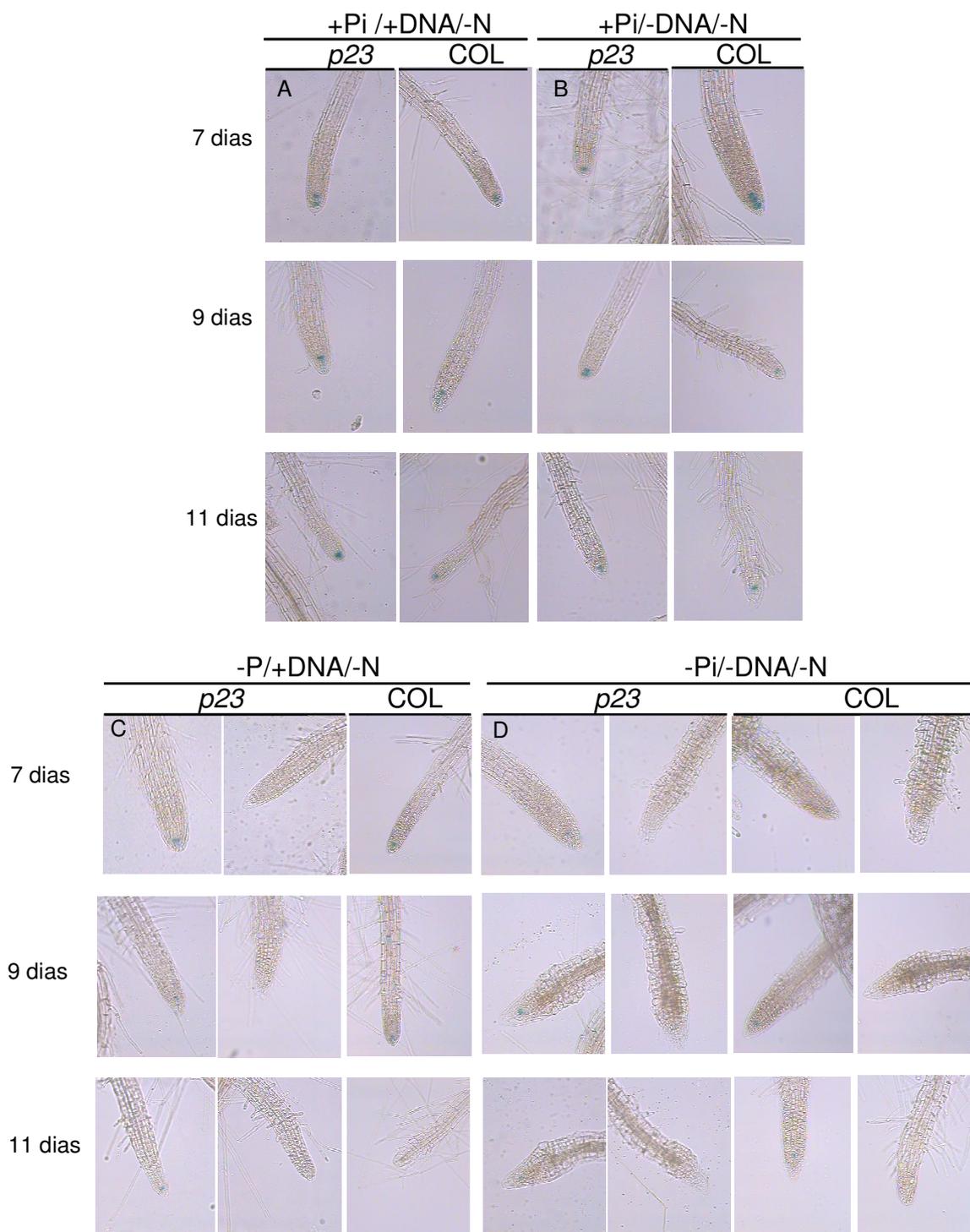


FIGURA 16. Expressão de *QC25::GUS* nas raízes secundárias de *p23* e COL crescidas sob deficiência de N e diferentes condições de P durante 11 dias.

Por outro lado, COL apresentou diferenças na expressão ao longo do tempo nos tratamentos -Pi/+DNA/-N e -Pi/-DNA/-N. Em -Pi/+DNA/-N, aos 7

dias, observou-se coloração do centro quiescente na maioria das raízes secundárias de COL. Aos 9 dias, as raízes secundárias mais velhas apresentaram centro quiescente marcado, enquanto a maioria das raízes mais novas não exibiam marcação e, aos 11 dias, 57% das raízes secundárias mostraram descontrole do centro quiescente, enquanto 43% apresentaram expressão do gene (Figura 16C). Isso ressalta a idéia de que *p23* tem menor habilidade em hidrolisar o DNA e, por isso, a atividade no CQ parou em parte das raízes secundárias analisadas logo aos 7 dias após a germinação, enquanto em COL essa resposta foi gradual, de acordo com o tempo de exposição à deficiência de Pi e N. A ausência de atividade no CQ das raízes secundárias mais novas em COL discorda do padrão observado na raiz principal, sugerindo que o processo desencadeado pela limitação de N seja diverso do induzido por limitação de P.

O meristema apical radicular é composto por um conjunto de células-tronco que permite o crescimento contínuo da raiz, e o CQ faz parte desse conjunto, mantendo a identidade meristemática das células que o circundam (Osmont *et al.*, 2007). A atividade meristemática pode ser modulada no período pós-embrionário por sinais ambientais e o P, em baixa disponibilidade, é um dos principais nutrientes que modulam a arquitetura radicular (López-Bucio *et al.*, 2002), assim como o N. Em resposta ao baixo P, há alteração na proliferação e diferenciação celular acelerada no meristema radicular, que pode ser devida ao efeito direto ou indireto da falta de P na atividade e/ou manutenção do CQ (Sánchez-Calderón *et al.*, 2005). De acordo com os autores, o CQ pode agir como sensor dos sinais ambientais que afetam a manutenção do meristema, regulando a expressão

de genes através de um complexo mecanismo de sinalização que module a atividade proliferativa e a diferenciação das células meristemáticas. Nesse sentido, as deficiências de P e/ou N podem servir como sinais para o CQ, levando a mudanças na expressão dos genes, diferenciação do CQ e consequente eliminação do meristema.

As mudanças na arquitetura radicular em função da deficiência de N diferem daquelas encontradas na deficiência de P. Quando o nitrato é aplicado uniformemente no meio de cultura, o crescimento lateral é inibido, enquanto que a aplicação local do nutriente em meio com deficiência de N gera maior crescimento de raízes laterais no local de tratamento (Zhang & Forde, 1998).

Analisando o comprimento e número de raízes laterais 7 dias após a transferência de plantas de meio +Pi/+N para meio com +Pi ou -Pi na ausência de N, Strieder (2009) verificou que *p23* desenvolveu menos raízes laterais do que COL em condição de +P/-N, mas, na ausência de ambos nutrientes, o mutante desenvolveu mais raízes laterais do que COL. Além disso, o autor observou que *p23* apresentou maior comprimento médio das raízes laterais, tanto em meio +P/-N como em -P/-N. A visualização da expressão no centro quiescente indicou que há viabilidade na presença de P, mesmo sem N no meio, tanto em *p23* como em COL.

Analisou-se também a manutenção do centro quiescente na raiz principal de COL e *p37* em diferentes disponibilidades de Pi e N, aos 5 e 11 dias após a emergência através do gene *QC184::GUS* (Figura 17). Observou-se que a expressão no centro quiescente foi mantida em ambos os genótipos aos 5 e 11 dias na condição de +Pi/+N.

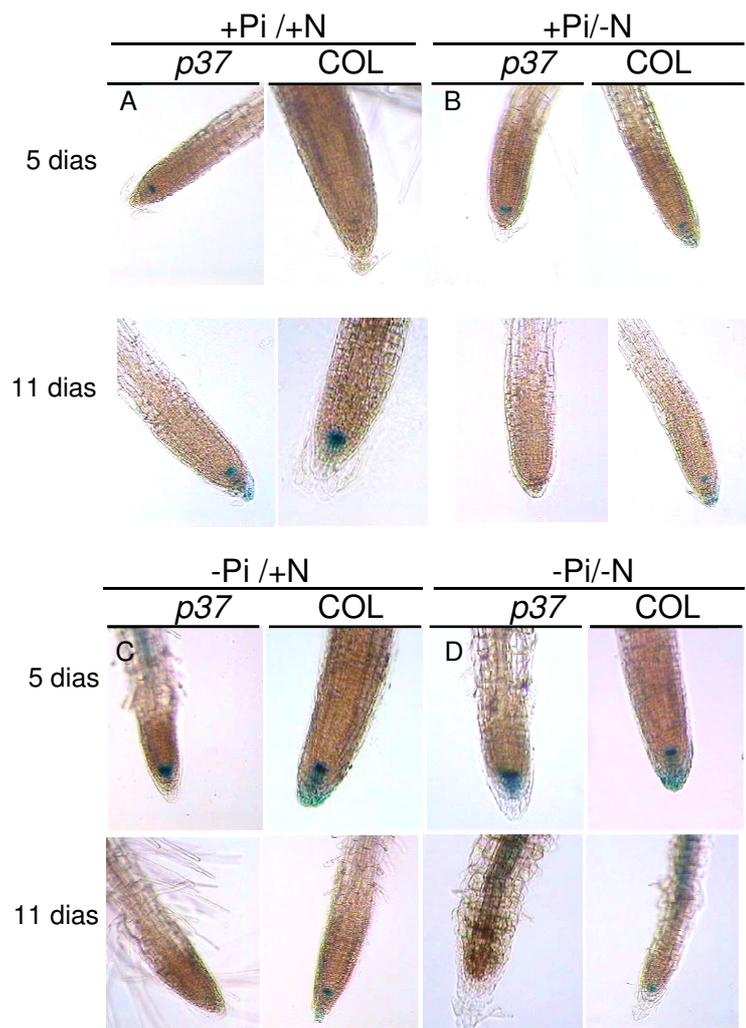


FIGURA 17. Expressão de *QC184::GUS* nas raízes primárias de *p37* e COL crescidas diferentes disponibilidades de Pi e N durante 11 dias.

Quando o N foi retirado do meio, não houve diferença entre o mutante e COL aos 5 dias. Aos 11 dias, *p37* apresentou severa alteração do centro quiescente, diferente de COL. Esse mesmo padrão foi observado quando se manteve o N, mas o Pi foi retirado do meio, e na ausência de ambos os nutrientes, sem diferença aos 5 dias após a germinação entre os dois genótipos. Aos 11 dias, houve exaustão do CQ em *p37* e manutenção em COL nos tratamentos +Pi/-N, -Pi/+N e -Pi/-N. Isso sugere que a manutenção do CQ foi afetada pela deficiência de um ou de ambos os nutrientes aos 11 dias após a germinação no mutante, uma possibilidade é a redução da

expressão do gene *ccs52a2*. Quando este gene é afetado, a expressão de *QC184* se torna difusa e reduzida. Além disso, a zona de diferenciação da raiz se aproxima da região meristemática e as células tornam-se irregulares (Vanstraelen *et al.*, 2009), similares ao observado em *p37*.

Interessante que os genes marcadores do CQ comportaram-se de forma diferenciada, uma vez que *QC25* mostrou-se mais sensível à limitação de N que *QC184*. Isto salienta a necessidade de utilizar mais de um marcador celular.

Ao analisar a expressão de *cycB1::GUS* na raiz principal de *p37*, Pinto (2005) observou que, aos 5 dias após a germinação em condições de deficiência de Pi, houve redução de 47% no número de células em fase G₂/M em relação ao meio com Pi e de 24% em relação a COL em -Pi. Considerando os dados de cinética de expressão de *QC184*, sugere-se que a redução da atividade no CQ neste mutante foi mais lenta que a redução nas divisões celulares sob deficiência de Pi. Entretanto, aos 11 dias após a germinação, houve exaustão completa do CQ em *p37* nos três tratamentos com deficiência nutricional. Esse perfil de expressão indica que as deficiências de P e de N servem como sinal ao centro quiescente, levando à sua diferenciação e rápida eliminação do meristema.

Na presença de ácidos nucleicos, o crescimento da raiz primária é reduzido em *p37*, sendo o fenótipo de COL parcialmente recuperado com disponibilidade de Pi e ausência de DNA/RNA (Pinto, 2005; Delatorre, 2009; Strieder, 2009). Assim como verificado em *p23*, o mutante *p37* apresenta menor crescimento da raiz primária na presença de N e o fenótipo de COL é recuperado quando este nutriente é omitido (Strieder, 2009). Todavia, a

cinética de expressão do CQ em -Pi/-N verificada no mutante, mostra que aos 11 dias há exaustão na expressão do gene. Dessa forma, é provável que aos 11 dias haja redução ou até mesmo a parada do crescimento da raiz primária sob -Pi/-N, uma vez que o CQ pode regular a expressão de genes que modulam a atividade proliferativa e a diferenciação das células meristemáticas (Sánchez-Calderón *et al.*, 2005). Analisando o CQ, observa-se que sob disponibilidade de Pi o CQ é mantido, ou seja, o menor crescimento radicular não tem relação direta com a atividade do CQ em *p37*. A redução no crescimento radicular mesmo na presença de Pi e ausência de DNA se deve principalmente ao menor alongamento celular no mutante em comparação com COL (Pinto, 2005).

A manutenção do centro quiescente está diretamente relacionada com a ação de alguns fatores de transcrição, como *SCARECROW (SCR)* (Sabatini *et al.*, 2003) e *SHORTROOT (SHR)* (Cui *et al.*, 2007). A atividade de *SCR* no CQ é requerida para que as células-tronco vizinhas sejam mantidas de forma não autônoma em um nicho definido (Sabatini *et al.*, 2003). O fator de transcrição *SHR*, por sua vez, é essencial para a especificação da endoderme, sendo expresso no cilindro central e a proteína se move do tecido vascular central para as células vizinhas, onde interage com *SCR*. Dessa forma, *SCR* seqüestra *SHR* para o núcleo e o complexo *SHR-SCR* ativa a transcrição de *SCR* e a especificação da endoderme, enquanto *SHR* tem o seu movimento restringido (Cui *et al.*, 2007). Uma hipótese levantada pelos autores é que o complexo *SHR-SCR* controle algumas funções de *SHR*, dentre elas, a especificação do CQ e a manutenção das células-tronco. Outros genes que estão envolvidos com a

manutenção do meristema e agem em paralelo com *SHR* e *SCR* são *PLETHORA1 (PLT1)* e *PLT2*, que codificam fatores de transcrição do tipo AP2 e são induzidos por auxina (Aida *et al.*, 2004). A distribuição do mRNA de *PLT* associa-se ao ponto máximo de auxinas, verificado por Sabatini *et al.* (1999) nas células-tronco e no centro quiescente do meristema radicular. A indução da transcrição dos genes *PLT* é dependente de auxinas e dos fatores responsivos a auxinas (Aida *et al.*, 2004) .

Outrossim, Ticconi *et al.* (2009) revelaram que *PDR2* é necessário para a devida expressão de *SCR*. Supõe-se que *PDR2* seja necessário para a divisão celular em resposta a baixo Pi durante a adaptação radicular à limitação localizada de Pi (Delatorre, 2009). Além disso, a expressão de *PDR2* e *LPR1* se sobrepõem nas células-tronco e no meristema distal da raiz, sugerindo que a ATPase tipo P₅, codificada por *PDR2*, e as enzimas LPR atuem em conjunto em uma rota do retículo endoplasmático que ajusta a atividade meristemática ao Pi externo. Nesse sentido, a ATPase tipo P₅ restringe a saída de *LPR*, regulando negativamente a sua biogênese ou atividade ou, ainda, removendo os produtos gerados pelas oxidases LPR (Ticconi *et al.*, 2009).

A atividade hormonal também é importante para a manutenção e organização do centro quiescente. Genes repórter fusionados a promotores regulados por auxina foram visualizados com expressão máxima na posição do centro quiescente e da columela das raízes. Isso sugere que a posição de ambos é definida pela elevada expressão do gene, como *DR5*, um promotor sintético formado por sete repetições em *tandem* do elemento

TGTCTC, responsivo a auxinas e um promotor mínimo CaMV 35S com o gene repórter *GUS* (Sabatini *et al.*, 1999).

A cinética de expressão de *QC25::GUS* é reduzida em *p23* na condição de -Pi/+DNA, compatível com o menor crescimento da raiz primária (Figuras 13C e 14C). Em *p37* foi observada exaustão mais rápida do CQ em relação a COL sob deficiência de Pi e/ou N (Figura 17). Assim, uma hipótese para função dos genes mutados em *p23* e *p37* é de que estes estejam relacionados à modulação da atividade de algum dos fatores de transcrição/genes citados acima. Uma possível relação do gene mutado com a síntese de auxinas e/ou citocininas foi descartada por Strieder (2009), já que não observou resgate de fenótipo nos testes realizados com estes reguladores de crescimento em *p23* e *p37*.

4.3 Atividade de fosfatase ácida em *p37*

A fim de avaliar a atividade de fosfatases ácidas em *p37*, utilizou-se a construção *AtACP5::GUS*. As sementes foram germinadas em meios com diferentes disponibilidades de Pi e N e as plântulas analisadas aos 5 e 11 dias após a germinação. Esta análise já havia sido realizada por Strieder (2009) em *p9* e *p23* na ausência de Pi ou presença de RNA, ambos com suprimento de N. O gene *AtACP5* codifica uma fosfatase ácida que é induzida durante a deficiência de P (del Pozo *et al.*, 1999). A atividade das fosfatases está relacionada com hidrólise do Pi, agindo na liberação, transporte e reciclagem do Pi (Duff *et al.*, 1994, Tran *et al.*, 2010). Quando o Pi é fornecido às plantas, há forte redução nos níveis de transcritos do

gene (Müller *et al.*, 2004), ou seja, a sua indução representa uma das respostas adaptativas à deficiência de P no ambiente.

Com o suprimento de Pi e N, observa-se que não houve expressão do gene no mutante, conforme o esperado (Figura 18). Em COL, porém, aos 5 dias após a germinação houve uma discreta expressão nestas condições. Quando apenas o N foi retirado do meio, não foi verificada expressão de *AtACP5* no mutante nem em COL nos dois períodos avaliados, indicando que a ausência de N não causa indução na expressão deste gene. Na ausência de Pi e presença de N, a cinética de expressão observada foi a mais acentuada. Neste caso, aos 5 dias, *p37* teve maior expressão do gene na região do cilindro central da raiz, enquanto em COL houve concentração próximo à columela e ao CQ. Aos 11 dias, a expressão no mutante e em COL foi semelhante. Esse padrão de expressão de *AtACP5* em *p37* é muito parecido com o observado por Strieder (2009) em *p23*. Na condição de -Pi/-N, o observado foi surpreendente, pois não houve expressão do gene, indicando ausência de atividade desta fosfatase.

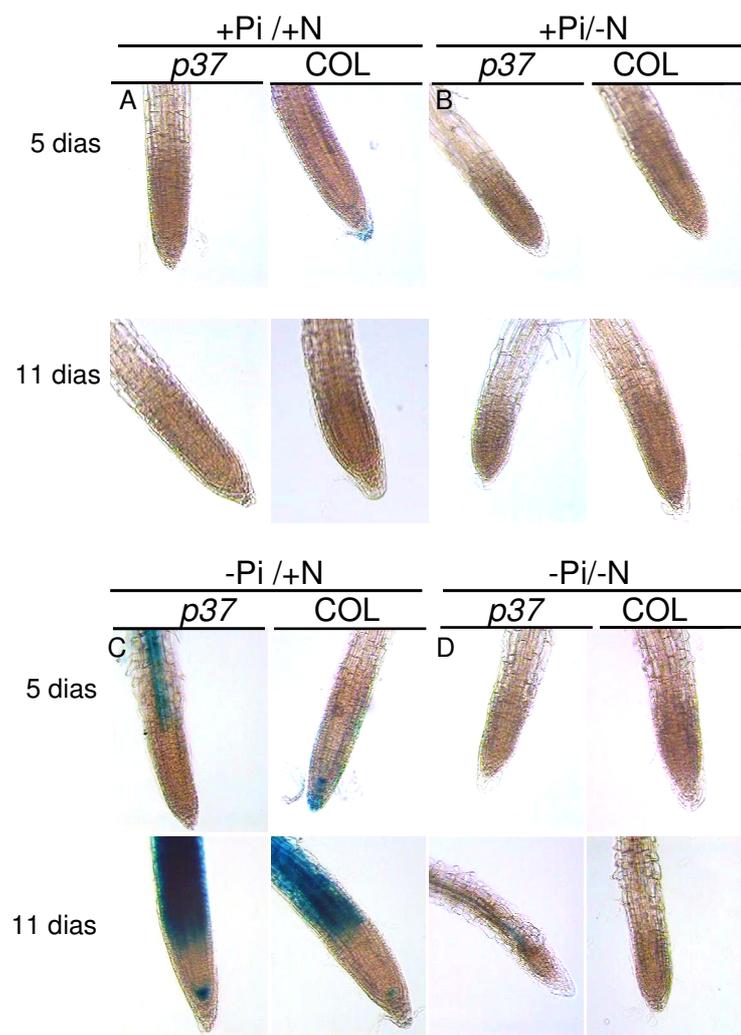


FIGURA 18. Expressão de *AtACP5::GUS* nas raízes primárias de *p37* e COL crescidas sob diferentes disponibilidades de Pi e de N durante 11 dias.

AtACP5 atua na remobilização interna de P em condições de deficiência deste nutriente no meio (del Pozo *et al.*, 1999). Strieder (2009) sugere que a atividade de fosfatases somente será efetiva na superação da limitação por P se a indução dos genes que codificam para fosfatases e nucleases ocorrer antes da severa redução na divisão celular do meristema radicular. Dessa forma, seria possível que a planta mantivesse suas funções até que o P fosse disponibilizado pela ação das fosfatases. As divisões celulares no meristema apical em *p37* aos 5 dias apresentam redução de

47% em meio -Pi/+N em relação à +Pi/+N (Pinto, 2005) e a exaustão do centro quiescente foi observada aos 11 dias, quando há maior atividade de *AtACP5* (Figura 18). Como pode ser observado na Figura 18C, a expressão de *ACP5* ainda estava fraca aos 5 dias, se comparada com a expressão aos 11 dias após a germinação. É provável que a ação das fosfatases tenha ocorrido tardiamente, não sendo possível disponibilizar P suficiente para que ocorresse a manutenção do centro quiescente e a recuperação nas divisões celulares no meristema radicular, a exemplo do que foi visto por Strieder (2009) em *p23*. Dessa forma, é provável que, aos 11 dias, a raiz primária já tivesse cessado as divisões celulares, o que é compatível com o fenótipo de raiz curta. Em termos de atividade, ressalta-se que em gel não foi observado incremento na atividade geral de fosfatases ácidas em *p23* sob limitação de P por 7 dias, enquanto houve incremento em COL (Delatorre, 2009).

Quando as plantas foram expostas à +Pi/-N, não se observou expressão de *AtACP5*. Este resultado corrobora com a observação feita por del Pozo *et al.* (1999), que não visualizou expressão do gene em plantas submetidas à deficiência de N por 7 dias através de *northern blot*. Os autores verificaram ainda, que o acúmulo de RNA de *AtACP5* reduziu em relação ao controle, com suficiência de P e N, enquanto que a ausência de P levou à forte expressão deste gene nas plantas. Outrossim, a não expressão de *AtACP5* em meio com deficiência de Pi e de N em *p37* e em COL (Figura 18D), revela que a indução deste gene é dependente da presença de N no meio.

4.4 Expressão do transportador de Pi AtPT2 em p37

Para verificar a indução do transportador de Pi AtPT2 em *p37*, foi utilizado o transgene *AtPT2::GUS*. A indução do transportador de fosfato de alta afinidade AtPT2 (*Atpht1;4* ou PHT4) acontece nas raízes por deficiência de Pi (Muchhal *et al.*, 1996) e tem papel central na aquisição de Pi do ambiente externo (Shin *et al.*, 2004). Mutantes de arábido *pht1;4* apresentaram redução de 40% na absorção de Pi sob deficiência deste nutriente (Misson *et al.*, 2004), indicando a importância deste gene nas adaptações à limitação por Pi. Em arábido, *AtPT2* é induzido por limitação de Pi, mas reprimido por alto Pi (Muchhal *et al.*, 1996). Além disso, é provável que este transportador esteja envolvido com a remobilização de Pi dentro da planta (Misson *et al.*, 2004). Os resultados verificados com a expressão da construção *AtPT2::GUS* em diferentes disponibilidades de Pi e N condizem com o que foi observado na análise de expressão gênica através do PCR em tempo real (Figura 11).

Nos meios com suficiência de Pi, não foi observada diferença importante na expressão em meio com presença ou ausência de N nos dois períodos avaliados em *p37* e COL (Figuras 19A e 19B). Nestas condições poucas células apresentaram coloração, de acordo com o esperado, uma vez que a indução de *AtPT2* ocorre devido à deficiência de P no meio.

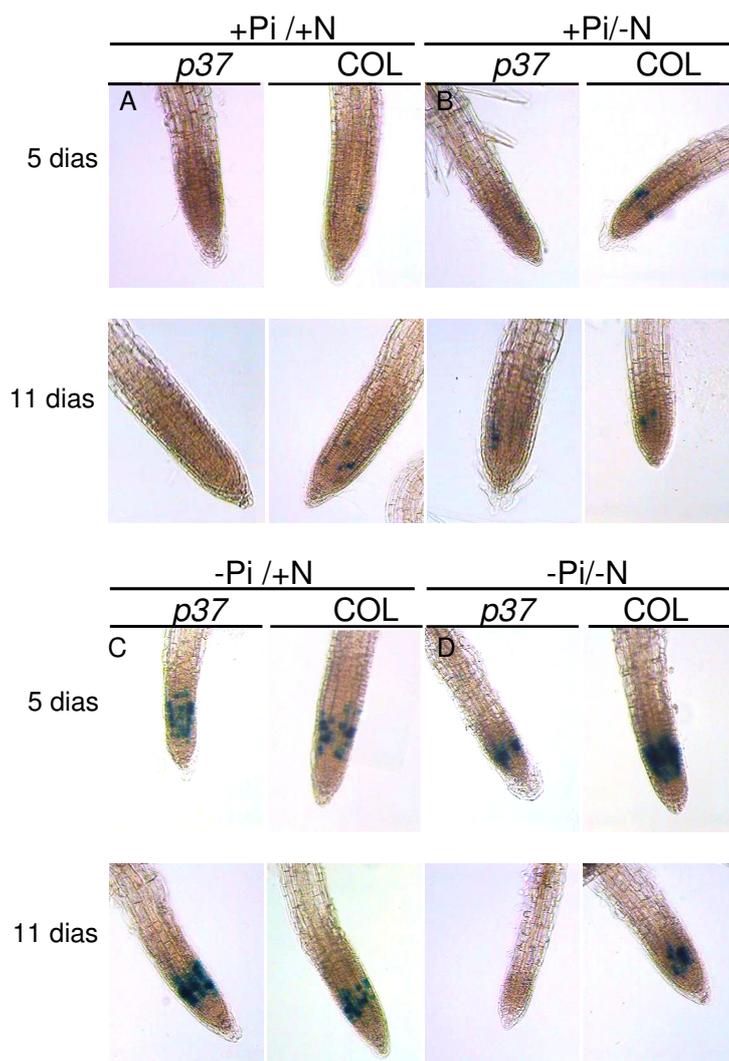


FIGURA 19. Expressão de *AtPT2::GUS* nas raízes primárias de *p37* e COL crescidas sob diferentes disponibilidades de Pi e de N durante 11 dias.

Sob condições de -Pi/+N, a expressão aos 5 e 11 dias após a germinação foi muito parecida entre o mutante e COL no que diz respeito à quantidade de células expressando o gene. As maiores diferenças entre mutante e COL ocorreram sob deficiência simultânea de Pi e N. Neste caso, aos 5 dias após a germinação já se observou menor expressão em *p37*, enquanto em COL houve forte indução do gene. Aos 11 dias, essa diferença se torna ainda mais importante, pois *p37* não apresentou expressão de

AtPT2. Isso sugere que a presença de N é necessária para que haja a indução do transportador de Pi em *p37*.

Com isso, a mutação em *p37* atenua a expressão de *AtPT2* sob deficiência de Pi e N simultaneamente, indicando que o gene mutado está envolvido na interação P – N. Transportadores de Pi podem ter sua expressão modulada pela presença de N, como observado por Wang *et al.* (2001) em raízes de tomate. Os autores verificaram que o gene *LePT2* de tomate, similar ao *AtPT1* de arábida (Liu *et al.*, 1998), foi induzido nas raízes de tomate por N, sendo sua expressão mantida alta por 96 horas após a retirada do N do meio, com uma pequena redução ao longo do tempo.

Os genes *AtPT1* e *AtPT2* pertencem a duas pequenas e distintas famílias e ambos codificam transportadores de alta afinidade induzidos pela deficiência de Pi (Muchhal *et al.*, 1996). Apesar de ter havido uma pequena redução na expressão de *LePT1* em tomate após 96 horas da remoção de N (Wang *et al.*, 2001), é possível que, após 11 dias, a expressão deste fosse severamente reduzida. Sugere-se que o comportamento de *AtPT2::GUS* observado em meio -Pi/-N seja semelhante ao observado com *LePT1*. Sugere-se ainda que esta resposta seja extremada no mutante, já que não houve expressão de *AtPT2::GUS* em meio -Pi/-N.

4.5 Efeito do etileno no alongamento radicular sob contrastes de P e N

O etileno é um fitormônio gasoso, que pode modular diversos processos internos na planta, bem como seu crescimento em função das

mudanças ambientais e respostas a diversos estresses (Bleeker, 2001; Benavente & Alonso, 2006; Zhu & Guo, 2008). O etileno está relacionado ainda com a proliferação de raízes laterais, alongamento radicular e determinação do destino celular durante a formação de pêlos radiculares, processos que também são alterados por algumas deficiências nutricionais (Rubio *et al.*, 2009). Isso não significa, porém, que tais respostas compartilhem necessariamente as mesmas rotas de sinalização. A quantidade de etileno na planta determina quais são as respostas adaptativas. Nesse sentido, Pierik *et al.* (2006) propuseram um modelo no qual altos níveis de etileno causariam redução no crescimento das plantas, enquanto baixos níveis promoveriam estímulo deste. A inibição do alongamento radicular pelo etileno depende de níveis do hormônio e da espécie, sendo que baixos níveis favorecem seu alongamento (Jackson, 1985). A quantidade exata de etileno necessária para estimular ou inibir o crescimento das plantas resulta da integração das condições ambientais, sinais internos da planta e, ainda, características específicas da espécie relacionadas à pressão de seleção em seu ambiente de origem (Pierik *et al.*, 2006).

Em altas concentrações o etileno inibe o alongamento das raízes, mas estimula a expansão radial, levando à melhora da resistência mecânica, como observado em raízes expostas a solos com elevada resistência por Clark *et al.* (2003). Além disso, este fitormônio também pode determinar o balanço entre a proliferação e a parada na divisão das células tronco das raízes e promover divisões celulares no centro quiescente (Ortega-Martínez *et al.*, 2007).

Buscou-se avaliar se os mutantes *p9* e *p37* apresentavam resposta diferente ao etileno em termos de crescimento da raiz principal quando comparados a COL. Para tanto, mensurou-se o comprimento da raiz principal de COL e dos mutantes *p9* e *p37* aos 8 dias após a germinação sob diferentes disponibilidades de P, N e etileno. O etefom (ácido 2-cloroetilfosfônico), que faz parte da composição do Ethrel®, foi utilizado para fornecer etileno às plantas. O etefom é estável em pH 3,5, porém, quando entra em contato com meio de cultura ou com tecido vegetal que possuam pH mais elevado, ocorre liberação de etileno. Os resultados mostram que o etefom, precursor de etileno, diminuiu o alongamento radicular em COL, independente da disponibilidade de P e de N (Tabela 2).

Por outro lado, o bloqueio da síntese de etileno pode ser causado através do uso de aminovinilglicina (AVG), que atua na inibição da ACC sintase ou, ainda, pode-se bloquear a percepção do etileno através de íons de prata, que provavelmente se ligam aos receptores de etileno na planta (Casson & Lindsey, 2003). Estes receptores são ligados à membrana e são compostos por uma pequena família, que compreende os receptores ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 e EIN4 (Zhu & Guo, 2008).

TABELA 2. Comprimento da raiz primária (mm) em função da interação tripla de genótipos de arábido, fontes de Pi e etileno aos oito dias após a germinação na presença ou na ausência de N.

Tratamentos Fósforo Etileno		Genótipos					
		Com N			Sem N		
		COL	p9	p37	COL	p9	p37
+Pi/-DNA	Controle	30,9	NS 24,9	# 15,0	12,6	NS 13,3	NS 10,0
+Pi/-DNA	Etefom	10,7 *	NS 6,8 *	NS 7,6 *	8,2*	NS 7,6*	NS 7,9*
+Pi/-DNA	Tioossulfato	39,9 *	# 15,7 *	# 23,8 *	33,6*	# 15,7*	# 21,9*
-Pi/+DNA	Controle	27,6	# 8,9	# 6,6	20,3	# 5,3	# 6,2
-Pi/+DNA	Etefom	6,4 *	NS 7,5 NS	NS 3,6 *	6,5*	NS 4,9NS	NS 3,8*
-Pi/+DNA	Tioossulfato	28,1 NS	# 14,3 *	# 6,5 NS	19,9NS	# 7,1NS	# 8,4NS
+Pi/+DNA	Controle	23,5	# 18,1	# 7,4	12,8	# 7,1	NS 8,9
+Pi/+DNA	Etefom	8,5 *	NS 9,0 *	NS 5,7 NS	5,0*	NS 5,6NS	NS 4,2*
+Pi/+DNA	Tioossulfato	35,8 *	# 18,9 NS	# 9,7 *	26,0*	# 11,9*	# 12,1*
-Pi/-DNA	Controle	10,5	NS 7,1	NS 6,8	5,2	NS 2,9	NS 4,6
-Pi/-DNA	Etefom	6,0 *	NS 7,0 NS	NS 6,3 NS	4,9NS	NS 4,1NS	NS 2,8NS
-Pi/-DNA	Tioossulfato	13,9 *	NS 13,6 *	NS 8,0 NS	8,2*	NS 7,9*	NS 6,4NS

* Significativo a 5% de probabilidade, comparação dos tratamentos dentro de cada genótipo em relação ao controle (coluna).

Significativo a 5% de probabilidade, comparação dos genótipos em relação a COL (linha) .

NS: Não significativo a 5% de probabilidade.

No presente estudo, observou-se que a inibição da percepção do etileno via tiosulfato de prata ocasionou maior crescimento da raiz primária em COL, exceto quando o Pi foi substituído por DNA, tanto na presença como na ausência de N (Tabela 2). Este efeito do tiosulfato de prata no alongamento radicular já havia sido observado por Zhao & Hasenstein (2009), com maior alongamento da raiz primária e menor crescimento de pêlos radiculares, indício de que o etileno inibe o alongamento radicular e aumenta o crescimento dos pêlos. Entretanto, em -Pi/+DNA, somente *p9*, em meio com N, diferiu do controle. É possível que, na ausência de Pi e presença de DNA, haja menor produção de etileno em *p37* e COL e, por isso, o crescimento da raiz primária não se altera com tiosulfato de prata. Já em *p9*, a produção de etileno deve ser maior na ausência de Pi e presença de DNA, pois com adição de etefom, não há diferença em relação ao controle tanto em +N com em -N, enquanto que o tiosulfato de prata causa maior alongamento radicular. Mesmo na ausência de N, a raiz primária de *p9* apresentou crescimento de raiz 36% maior em meio com tiosulfato de prata em relação ao controle (Tabela 2).

O mutante *p9* apresentou comportamento diferenciado em relação à COL. Quando foi disponibilizado Pi e N, houve redução no crescimento da raiz primária na presença de etileno externo, o que já era esperado. Porém, nestas mesmas condições, quando se adicionou tiosulfato de prata, *p9* também apresentou redução do crescimento da raiz primária (Tabela 2).

Entretanto, ao se retirar o N do meio, o mutante apresentou aumento de 19% no alongamento radicular em +Pi com tiosulfato de prata em relação ao controle, enquanto em COL o alongamento foi 166%. A redução

do crescimento da raiz primária em +Pi/-DNA/+N com tiosulfato de prata sugere bloqueio na percepção do tiosulfato de prata em *p9* quando Pi e N estão juntos, uma vez que, quando se retira o N, ocorre reversão da percepção. É possível que em *p9* a redução da raiz seja devido ao etileno na ausência de N, mas não na presença de N.

Quando Pi, DNA e etefom foram adicionados ao meio de cultura, *p9* comportou-se de maneira semelhante à COL. Entretanto, quando foi aplicado tiosulfato de prata, não houve maior crescimento da raiz primária. Por outro lado, na ausência de N, observou-se o contrário, diferença não significativa com etefom e maior crescimento com tiosulfato de prata (Tabela2). Quando Pi e DNA foram retirados do meio de cultura, o crescimento da raiz primária não diferiu com etileno externo, mas aumentou com o bloqueio da sua percepção, independente da presença de N.

Os dados indicam que *p9* tem maior sensibilidade ou maior produção de etileno na ausência de Pi em relação a COL, pois não há diferença no tratamento controle e etefom, independente da condição de N. Além disso, na presença de etefom, foi observada redução no alongamento radicular, o que indica que em +Pi há menor produção ou menor sensibilidade ao etileno pela planta (Tabela 2). Deve-se lembrar que, nessas condições de disponibilidade de P, Pinto (2005) e Strieder (2009) observaram que *p9* recupera o fenótipo de COL, com crescimento da raiz primária semelhante ao de COL e maior do que na presença de RNA como fonte de P. Interessante que, na presença de P e de N, o efeito positivo do tiosulfato de prata não é observado, mas é restabelecido se o N é removido. Isso sugere que a presença de P neste mutante afeta a sinalização de etileno e que a

remoção de N reduz o alongamento da raiz, provavelmente induzindo a síntese deste hormônio, efeito removido pela aplicação dos íons prata.

O comportamento de *p37* foi semelhante ao de COL em relação aos tratamentos com etefom e tiosulfato de prata na presença de Pi ou de DNA (Tabela 2). Apenas quando Pi e DNA foram fornecidos em conjunto com N, o comprimento da raiz primária não diferiu do controle na presença de etefom. Quando nenhuma forma de P foi incluída no meio, ao contrário do observado em COL, não houve diferença entre tratamentos, ou seja, nessas condições o fornecimento externo de etileno não reduziu o crescimento da raiz primária em *p37*. No tratamento +Pi/+DNA/+N, o tiosulfato de prata aumentou o crescimento da raiz primária, que apesar de diferir, foi de apenas 36% no mutante em relação ao controle, enquanto que, em COL, o aumento foi de 103%, superior ao observado em *p37*.

Quando ambas as fontes de P foram omitidas, não houve diferença entre o mutante tratado com tiosulfato de prata e o controle. Nos tratamentos em que o N foi retirado, o comportamento de *p37* foi similar a COL, exceto na ausência total de P e presença de tiosulfato de prata. Nesse caso, os valores não diferiram, sendo que COL teve crescimento da raiz primária 60% superior ao controle, *p37*, 40% e o maior valor observado foi 175% superior em relação ao controle, em *p9*. Dessa forma, parece que *p9* tem menor produção de etileno do que COL quando Pi e N são suprimidos do meio.

O envolvimento do etileno com a inibição do crescimento da raiz primária e formação de pêlos radiculares tem sido relatado em diversos estudos (López-Bucio *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). As

modificações radiculares, como aumento na densidade e comprimento dos pêlos radiculares causadas pela presença de auxinas e etileno sugerem que as respostas adaptativas aos nutrientes são originadas a partir de sinais hormonais desencadeados por rotas específicas de cada nutriente (López-Bucio *et al.*, 2002).

O comprimento da raiz primária dos mutantes também foi comparado com COL, para verificar se houve recuperação do fenótipo de COL nos mutantes (Tabela 2). Os mutantes comportaram-se da maneira esperada em função da disponibilidade de P, sendo que *p9* recuperou o fenótipo de COL em +Pi/-DNA (no controle), enquanto *p37* apresentou crescimento da raiz primária reduzido, corroborando com o observado por Pinto (2005) e Strieder (2009). Além disso, ambos os mutantes apresentaram significativa redução no crescimento da raiz primária na ausência de Pi ou presença de DNA.

Observou-se que, em todos os tratamentos de P, o suprimento extra de etileno, via etefom, não afetou o comportamento dos mutantes em relação à COL. Houve redução do crescimento da raiz primária em praticamente todos os casos, de acordo com o esperado para a ação do etileno, e não houve diferença entre os mutantes e COL nesta condição, independente da disponibilidade de P. No entanto, a redução do comprimento da raiz causada pelo etileno foi proporcionalmente diferente entre os mutantes em relação ao comprimento das raízes na condição controle. Na presença de Pi, o etileno reduziu o comprimento da raiz primária de COL para 35% do controle, em *p9* para 28% e em *p37* para 50%. Na presença das duas formas de P, o etileno reduziu as raízes de COL novamente para 36% do controle, enquanto *p9* para 49% e *p37* para 77%.

Quando o P é removido, o efeito do etileno é ainda menor nos mutantes, de tal forma que, enquanto em COL o etileno reduziu as raízes para 60% do seu valor inicial, praticamente não houve efeito sobre os mutantes (Tabela 2). Estes dados sugerem que a percepção do fitormônio parece estar normal, pois quando se coloca tiosulfato de prata, há aumento do alongamento radicular. Também é possível que haja maior concentração de etileno nos mutantes e, portanto, a adição de etileno externo não afete o comprimento da raiz.

Por outro lado, com a aplicação de tiosulfato de prata, o crescimento da raiz primária diferiu entre os mutantes e COL em todos os tratamentos de P, exceto sob completa deficiência de P em *p9* (Tabela 2). Nesse caso, não houve diferença entre *p9* e COL, indicando que a inibição da percepção do etileno em -Pi/-DNA provocou a recuperação do fenótipo de COL em *p9*, que apresentou alongamento de 90% em relação a COL.

Recentemente, Lei *et al.* (2011) identificaram outras funções da sinalização por etileno, como a regulação da expressão dos genes *PSI* (*Pi starvation-induced genes*), a indução de fosfatases ácidas e a produção de antocianinas. A partir desta informação, os autores propuseram um modelo para ilustrar como o etileno afeta as adaptações da planta à deficiência de Pi. Nesse modelo, a deficiência de Pi deve induzir a produção ou aumentar a sensibilidade ao etileno, o que leva ao aumento de pêlos radiculares e expressão dos genes *PSI*. A expressão destes genes pode afetar diretamente a assimilação de Pi do solo, a remobilização de Pi interno ou externo, bem como a redistribuição do Pi entre raízes e parte aérea, o que

ajuda as plantas a manterem a homeostase de Pi sob deficiência deste íon (Lei *et al.*, 2011).

O crescimento da raiz primária de *p9* e *p37* foi também comparado com COL sob deficiência de N (Tabela 2). Nos tratamentos com diferentes fornecimentos de P, o tratamento com etefom levou a não diferenciação entre os mutantes e COL. Isso enfatiza o que foi observado anteriormente, ou seja, que provavelmente estes mutantes apresentem algum tipo de deficiência na rota sinalizadora de etileno.

Quanto à presença ou ausência de N com tiosulfato de prata, ambos os mutantes apresentaram diferença relativamente à COL, ou seja, não houve recuperação do fenótipo de COL, exceto sob -Pi/-DNA/-N. Isso acontece apesar da ausência de N recuperar o fenótipo de COL em *p37* no controle, indicando que a remoção do N é capaz de reverter os efeitos da mutação em *p37* apenas sob condições específicas. Assim, parece que nos mutantes as interações entre nutriente e etileno estão mais relacionadas à disponibilidade de P do que de N.

A produção de etileno em função da presença de N foi verificada por Tian *et al.* (2009). Os autores transferiram plântulas de *arabidopsis* com 5 dias, crescidas em 1 mM de N para meio com 10 mM de N e observaram rápida produção de etileno e rápido aumento da expressão dos genes que codificam para ACC sintase e ACC oxidase após a transferência. Posteriormente, apresentaram declínio na sua produção e expressão ao longo do tempo. Além disso, através de um gene repórter para etileno EBS-GUS, os autores verificaram que a produção deste ocorreu predominantemente nas raízes laterais novas, enquanto nas laterais

maduras e na principal mudou muito pouco. Os resultados observados no presente trabalho indicam que houve redução no tamanho da raiz primária com a retirada do N, ao contrário do que se esperaria se houvesse menor produção de etileno. Entretanto, deve-se considerar que a condição de baixo N não foi utilizada. A redução no crescimento da raiz primária pode ser devida à falta deste nutriente para o crescimento e desenvolvimento da planta como um todo.

A interação entre fitormônios e sua influência nas adaptações radiculares em resposta às flutuações de disponibilidade de nutrientes no solo são bem documentadas. Os fitormônios etileno e auxina parecem ter relação e agir juntos no desenvolvimento radicular, uma vez que foram identificados mutantes insensíveis a ambos (Pickett *et al.*, 1990), sugerindo que o etileno possa mediar algumas respostas induzidas por auxinas (Casson & Lindsey, 2003). Além disso, as auxinas induzem a síntese de etileno, como é o caso da ACCsintase, enzima necessária para a síntese de etileno, que é fortemente induzida por auxinas.

Esse mecanismo foi observado por Abel *et al.* (1995), analisando o gene *ACS4*, um dos membros da família gênica que codifica a enzima. Tanto auxinas como etileno podem causar redução no alongamento radicular, sugerindo que sua ação ocorra por mecanismo em comum (Ponce *et al.*, 2005). Uma possibilidade é que este mecanismo seja o transporte de auxinas, pois o etileno pode inibir o transporte polar de auxinas (Swarup *et al.*, 2002). Além disso, mutações em *AUX1*, que codifica um transportador de influxo de auxinas, alteram a sensibilidade do alongamento radicular às auxinas e ao etileno (Pickett *et al.*, 1990), sugerindo a necessidade do

transporte de auxinas para que ocorra inibição do crescimento radicular causada por etileno (Swarup *et al.*, 2002). A redução do transporte de efluxo de auxinas gerada pelo etileno poderia causar acúmulo de auxinas na raiz, levando à inibição do alongamento radicular (Casson & Linsey, 2003).

Além das auxinas, as citocininas também interferem nos níveis de etileno. Elas estão envolvidas em uma série de processos na planta, como as divisões celulares, iniciação da parte aérea e crescimento. A produção de etileno é estimulada por citocininas, ocasionando inibição do alongamento da raiz e do hipocótilo (Cary *et al.*, 1995). Dessa forma, auxinas e citocininas podem induzir a síntese de etileno, provavelmente através da ação em diferentes membros da família gênica ACS (Abel *et al.*, 2005, Zhu & Guo, 2008).

Nesse sentido, os resultados obtidos por Strieder (2009) na análise do envolvimento de auxinas e citocininas no fenótipo radicular de *p9* sugerem que haja deficiências parciais na síntese e/ou percepção de auxinas na ausência de P e N e de citocininas apenas na ausência de N. Dessa forma, parece que há uma alteração hormonal específica em *p9*, que leva ao fenótipo radicular observado neste mutante, que também é modulado pela interação P×Fe. Em *p37*, o mesmo autor não encontrou evidências de síntese ou percepção anormal dos hormônios analisados. Já é documentado que auxinas e citocininas podem modular a produção de etileno na planta. Dessa forma, em *p9* é possível que haja uma interação hormonal na qual ambos os fitormônios regulariam a síntese de etileno.

Enfim, os mutantes *p9*, *p23* e *p37* possuem desenvolvimento radicular menor em relação à COL sob limitação de P. Sob suficiência de Pi

e ausência de ácidos nucleicos, *p9* recupera o fenótipo de COL, mas *p23* e *p37* continuam apresentando redução em relação à COL (Strieder, 2009). Além disso, quando o N é retirado do meio de cultura, o fenótipo radicular de COL é restabelecido em *p23* e *p37*, sugerindo interação P e N (Strieder, 2009). A falta de capacidade em utilizar ácidos nucleicos como fonte de P sugere que os mutantes apresentem uma mutação na cadeia sinalizadora (Delatorre, 2009). As mutações em *p9*, *p23* e *p37* poderiam estar relacionadas com defeitos na percepção a baixos níveis de Pi, nos eventos de transdução de sinal subsequente, na indução dos genes responsivos à limitação de Pi, na secreção de enzimas nucleolíticas ou na absorção de Pi (Delatorre, 2009).

Em *p9*, Pinto (2005) sugere que a mutação seja nos sensores de raiz ou em alguma etapa da interação entre o sensor local de Pi e o *status* da planta. Este mutante apresenta redução no crescimento radicular em meio com DNA, mas recupera fenótipo em -DNA, de forma mais acentuada que os outros mutantes. Essa redução no crescimento radicular se deve principalmente à menor alongamento celular e a deficiência deve ser devida à limitação na degradação de P ou na absorção de P liberado na quebra do DNA.

Delatorre (2009) observou que *p9* apresenta menor atividade de RNS1 e RNS2 e maior atividade de fosfatases ácidas, e Pinto (2009) verificou acúmulo de amido na parte aérea em -P e em -P/+DNA, resposta característica da limitação deste nutriente. O mutante *p9* exibiu ainda interação Pi - Fe, sendo o fenótipo de raiz curta revertido na ausência de Fe, tendo apresentado também defeitos na síntese e/ou percepção de auxinas e

citocininas (Strieder, 2009). Soma-se a isso uma possível falha na rota sinalizadora de etileno e, ainda, em alguma interação hormonal na qual auxinas e citocininas regulem sua síntese. Entretanto, Strieder (2009) observou que a atividade meristemática em *p9* é mantida por mais tempo do que nos outros mutantes, indicativo de que a falha na síntese de etileno não interfere na manutenção do meristema. O gene mutado deve estar relacionado também com a indução de *NRT2.2* e *AtPT2*, pois sua expressão manteve-se pouco alterada. A mutação em *p9* não parece ter relação com a assimilação de N, mas pode estar envolvida com o circuito regulatório que age na modulação da formação das raízes laterais.

O mutante *p23* tem crescimento radicular reduzido independente da condição de Pi, mas a redução é acentuada na presença de ácidos nucleicos (Strieder, 2009). Quando o N é retirado do meio, o fenótipo de raiz curta é resgatado e, neste caso, o comprimento da raiz principal de COL e *p23* são semelhantes (Pinto, 2005; Delatorre, 2009; Strieder, 2009). Ao contrário de *p9* e *p37*, o mutante *p23* não acumula amido, apresentando também redução de RNS1, RNS2 e fosfatases ácidas em -P/+DNA (Delatorre, 2009). Não foram observadas evidências que apontem para defeitos na síntese ou sinalização de auxinas e/ou citocininas em *p23* (Strieder, 2009). Entretanto, deve-se considerar o efeito do etileno neste mutante, pois o etileno pode promover divisões celulares no centro quiescente, já que *p23* apresentou rápida exaustão do CQ em meios com deficiência de Pi ou N.

As análises de expressão gênica através do PCR em Tempo Real permitiram verificar que o gene mutado em *p23* pode relacionar-se com os

genes que codificam para os transportadores de N de alta afinidade, aqueles envolvidos com a assimilação de N, especialmente *NIA2* e com o circuito regulatório que age na modulação das raízes laterais. Além disso, houve menor expressão de *AtPT2* em relação à COL sob deficiência de P, indicando que este mutante tem menor capacidade em induzir este transportador. A expressão de *ACP5* indica que este gene pode ser induzido em *p23* mais tardiamente do que nos outros mutantes e COL, e isso sugere que esse atraso não consiga fazer com que esta fosfatase libere P suficiente para suprimir as necessidades da planta neste mutante.

O fenótipo radical de COL também é resgatado em *p37* na ausência de N e o crescimento radicular é reduzido inclusive sob suficiência de Pi, sendo a redução mais acentuada na presença de RNA, comportamento semelhante ao observado em *p23* (Strieder, 2009) e *pdr1* (Delatorre, 2009). O menor crescimento da raiz primária se deve à redução do alongamento celular e à menor taxa de divisão celular em meio com DNA (Pinto, 2005). Além disso, este mutante não apresenta defeito na síntese ou percepção de auxinas e/ou citocininas (Strieder, 2009), mas há possibilidade de haver defeito na rota sinalizadora de etileno. Esta falha na síntese de etileno pode estar envolvida com a rápida exaustão do CQ observada nas raízes primárias em *p37* na ausência de Pi e/ou N. A atividade de fosfatases não está alterada neste mutante, como pode ser observado na expressão de *ACP5::GUS* (Figura 18). Já em relação à indução de *AtPT2*, esta mostrou ser menor no mutante na ausência simultânea de Pi e N, indicando que a falta de N prejudica a expressão deste gene, que é envolvido com o transporte de Pi em *p37*.

5 CONCLUSÕES

Há interação entre P e N em relação à expressão de genes relacionados com as rotas de aclimatação à limitação de P, como *AtACP5* e *AtPT2*, de assimilação de N, como *NRT1.1*, *NIA1* e *NIA2* e também *ARF8*, envolvido com a modulação das raízes laterais.

Os genes mutados em *p9* e *p23* afetam os genes que codificam para os transportadores de N e P de alta afinidade, a assimilação de N, a produção de fosfatase e o circuito regulatório que age na modulação das raízes laterais, *ARF8*. A presença de N no meio regula erroneamente a parada do crescimento da raiz principal em *p23*.

Em *p37*, a alteração da arquitetura radicular não deve estar relacionada ao gene *ARF8*.

Sob deficiência de Pi e/ou N, há rápida exaustão do CQ nas raízes primárias em *p23* e *p37*. Os genes mutados nestes dois mutantes ajudam a modular as respostas do crescimento radicular em função da disponibilidade de Pi e N.

Os mutantes *p9* e *p37* apresentam alteração na rota sinalizadora de etileno, sendo que, em *p9*, é possível ainda que haja uma alteração na

homeostase hormonal e que modificações nos níveis de auxinas e citocininas afetem a síntese de etileno.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, S. *et al.* *ACS4*, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. Structural characterization, expression in *Escherichia coli*, and expression characteristics in response to auxin. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.270, n.32, p.19093-19099, 1995.

About Arabidopsis. **The Arabidopsis Information Resource**. Disponível em: <<http://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp>>. Acesso em: jan. 2010.

AIDA, M. *et al.* The PLETHORA genes mediate patterning of the arabidopsis root stem cell niche. **Cell Press**, Cambridge, v.119, p.109–120, 2004.

AMTMANN, A.; BLATT, M.R. Regulation of macronutrient transport. **New Phytologist**, Cambridge, v.181, p.35–52, 2008.

ARNON, D.I.; STOUT, P.R. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.14, p.371–375, 1939.

BENAVENTE, L.M.; ALONSO, J.M. Molecular mechanisms of ethylene signaling in *Arabidopsis*. **Molecular Biosystems**, Cambridge, v.2, p.165-173, 2006.

BENNETT, E.M.; CARPENTER, S.R.; CARACO, N.F. Human impact on erodable phosphorus and eutrophication: a global perspective. **BioScience**, Washington, v.51, n.3, p.227-234, 2001.

BLEEKER, A. Ethylene. **Current Biology**, London, v.11, n.23, p.952, 2001.

CARY, A.J.; LIU, W.; HOWELL, S.H. Cytokinin Action Is Coupled to Ethylene in Its Effects on the Inhibition of Root and Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v.107, n.4, p.1075-1082, 1995.

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

CEREZO, M. *et al.* Major Alterations of the Regulation of Root NO₃⁻ Uptake Are Associated with the Mutation of *Nrt2.1* and *Nrt2.2* Genes in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 127, p.262–271, 2001.

CHAPMAN, N; MILLER, T. Nitrate Transporters and Root Architecture. In: GEISLER, M.; VENEMA, K. **Transporters and Pumps in Plant Signaling**. Berlin: Springer-Verlag, 2011. P.165-190.

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

CLARK, L.J.; WHALLEY, W.R.; BARRACLOUGH, P.B. How do roots penetrate strong soil? **Plant and Soil**, Hague, v.255, p.93–104, 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.

CORDELL, D.; DRANGERT, J-O.; WHITE, S. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. **Global Environmental Change**, Guildford, v.19, p.292–305, 2009.

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.

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, **The Plant Journal**, Oxford, v.19, n.5, p.579-589, 1999.

DELATORRE, C.A. **Phosphate-deficiency response: understanding the signaling pathway**. 2002. 196p. Tese (Doutorado), University of California, Davis. 2002.

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

DOERNER, P. Root development: Quiescent center not so mute after all. **Current Biology**, London, v.8, p.42-44, 1998.

DOERNER, P. Phosphate starvation signaling: a threesome controls systemic Pi homeostasis. **Current Opinion in Plant Biology**, Netherlands, v.11, p.536–540, 2008.

DUFF, S.M.G.; SARATH, G.; PLAXTON, W. The role of acid-phosphatases in plant phosphorus metabolism. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.9, n.4, p.791-800, 1994.

FANG, Z. *et al.* Phosphate signaling in Arabidopsis and *Oryza sativa*. **Plant Science**, Limerick, v.176, p.170–180, 2009.

Fertilizer supply statistics. **International Fertilizer Industry Association**. Fev. 2011. Disponível em: <<http://www.fertilizer.org/ifa/Home-Page/STATISTICS/Fertilizer-supply-statistics>>. Acesso em: fev 2011.

FORDE, B.G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation, **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1465, p.219-235, 2000.

FORDE, B.G.; WALCH-LIU, P. Nitrate and glutamate as environmental cues for behavioural responses in plant roots. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.32, n.6, p.682–693, 2009.

GAN, Y. *et al.* Nutritional regulation of ANR1 and other root-expressed MADS-box genes in Arabidopsis thaliana, **Planta**, Berlin, v.222, n.4, p.730-42, 2005.

GEPSTEIN, S.; HORWITZ, B.A. The impact of Arabidopsis research on plant biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v.13, n.3, p.403-414, 1995.

GIFFORD, M.L. *et al.* Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.105, n.2, p.803–808, 2008.

GIRIN, T. *et al.* Identification of Arabidopsis Mutants Impaired in the Systemic Regulation of Root Nitrate Uptake by the Nitrogen Status of the Plant. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.153, p.1250–1260, 2010.

GLAZEBROOK J, *et al.* **Use of Cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) as genetic markers in Arabidopsis thaliana**. In: MARTINEZ-ZAPATER, J; SALINAS, J, *Methods in Molecular Biology*, v.82: Arabidopsis Protocols. Totowa: Human Press, 1998. P.173-182.

GOJON, A.; NACRY, P.; DAVIDIAN, J.C. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, Netherlands, v.12, n.3, p.328–338, 2009.

GOJON, A. *et al.* Nitrate transceptor(s) in plants, **Journal of Experimental Botany**, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21239382>>. Acesso em: jan. 2010.

GRAHAM, P.H.; VANCE, C.P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.65, n.2-3, p.1184-1194, 2000.

HO, C-H. *et al.* CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants. **Cell**, Cambridge, v.138, p.1184–1194, 2009.

HONG, Y.Y. *et al.* Phospholipase D ϵ and phosphatidic acid enhance Arabidopsis nitrogen signaling and growth. **The Plant Journal**, Oxford, v.58, p.376–387, 2009.

HURLEY, B.A. The Dual-Targeted Purple Acid Phosphatase Isozyme AtPAP26 Is Essential for Efficient Acclimation of Arabidopsis to Nutritional Phosphate Deprivation. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.153, p.1112–1122, 2010.

JACKSON, M.B. Ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.36, p.145-174, 1985.

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**, Minneapolis, v.150, p.1033-1049, 2009.

KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O.A.; PIÑEROS, M.A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.55, p.459–93, 2004.

KROUK, G.; TILLARD, P.; GOJON, A. Regulation of the high-affinity NO₃⁻ uptake system by nrt1.1-mediated no₃⁻ demand signaling in arabidopsis. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.142, p.1075–1086, 2006.

LEYSER, O.; FITTER, A. Roots are branching out in patches. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.3, n.6, p.203-204, 1998.

LEI, M. *et al.* Ethylene signalling is involved in regulation of phosphate starvation-induced gene expression and production of acid phosphatases and anthocyanin in *Arabidopsis*. **New Phytologist**, Cambridge, v.189, p.1084-1095, 2011.

LI, W. *et al.* Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 Inducible High-Affinity Nitrate Transporter Gene Cluster. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.143, p.425–433, 2007.

LITTLE, D.Y. *et al.* The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.102, n.102, p.13693–13698, 2005.

LIU, C. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.116, p.91–99, 1998.

LIU, K-H.; HUANG, C-Y.; TSAYA, Y-F. CHL1 Is a Dual-Affinity Nitrate Transporter of Arabidopsis Involved in Multiple Phases of Nitrate Uptake, **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p.865–874, 1999.

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

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

LOQUÉ, D. *et al.* Gene expression of the NO³- Transporter NRT1.1 and the nitrate reductase NIA1 is repressed in arabidopsis roots by NO₂⁻, the product of NO₃⁻ reduction. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.132, p.958–967, 2003.

MAATHUIS, F.J. Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress. **The Plant Journal**, Oxford, v.35, n.6, p.675-92, 2003.

MA, Z. *et al.* Regulation of root elongation under phosphorus stress involves changes in ethylene responsiveness. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.131, p.1381–1390, 2003.

MEYEROWITZ, E.M. *Arabidopsis thaliana*. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 21, p. 93-111, 1987.

MILLER, A.J.; CRAMER, M.D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, Hague, v.274, p.1–36, 2004.

MISSION, J. *et al.* Transcriptional regulation and functional properties of *Arabidopsis* Pht1;4, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate uptake in phosphate deprived plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.55, p.727–741, 2004.

MISSION, J. *et al.* A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.102, n.33, p.11934–11939, 2005.

MUCHHAL, U.S.; PARDO, J.M.; RAGHOTHAMA K.G. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.93, p.10519-10523, 1996.

MÜLLER, R. *et al.* Gene expression during recovery from phosphate starvation in roots and shoots of *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.122, p.233–243, 2004.

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

OKAMOTO, M. *et al.* High-Affinity Nitrate Transport in Roots of Arabidopsis Depends on Expression of the NAR2-Like Gene AtNRT3.1. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.140, p.1036–1046, 2006.

ORSEL, M. *et al.* Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in Arabidopsis Physiology and protein–protein interaction. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.142, p.1304–1317, 2006.

ORSEL, M. *et al.* Disruption of the nitrate transporter genes AtNRT2.1 and AtNRT2.2 restricts growth at low external nitrate concentration. **Planta**, Freiburg, v.219, p.714–72, 2004.

ORTEGA-MARTÍNEZ, O. *et al.* Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root. **Science**, Washington, v.317, p.507-510, 2007.

OSMONT, K.S. *et al.* Hidden Branches: Developments in Root System Architecture. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.58, p.93-113, 2007.

PICKETT, F.B.; WILSON, A.K.; ESTELLE, M. The *aux1* Mutation of Arabidopsis Confers Both Auxin and Ethylene Resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v.94, p.1462-1466, 1990.

PIERIK *et al.* The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. **TRENDS in Plant Science**, Oxford, v.11, n.4, p.176-183, 2006.

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.

PONCE, G. *et al.* Auxin and ethylene interactions control mitotic activity of the quiescent centre, root cap size, and pattern of cap cell differentiation in maize. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.28, p.719–732, 2005.

RAGHOTHAMA, KG. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.50, p.665–693, 1999.

RAMAKERS, C. *et al.* Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Limerick, v.339, p.62-66, 2003.

REMANS, T. *et al.* The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.103, n.50, p.19206–19211, 2006a.

REMANS, T. *et al.* A Central Role for the Nitrate Transporter NRT2.1 in the Integrated Morphological and Physiological Responses of the Root System to Nitrogen Limitation in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v.140, p.909–921, 2006b.

RUBIO, V. *et al.* A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v.15 p.2122–2133, 2001.

RUBIO, V. *et al.* Plant hormones and nutrient signaling. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.69, p.361–373, 2009.

SABATINI S. *et al.* An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the Arabidopsis Root. **Cell**, Cambridge, v.99, p.463–472, 1999.

SABATINI S. *et al.* SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, 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.253–257, 2003.

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.

SCHEIBLE, W-R. *et al.* Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco, **The Plant Journal**, Oxford, v.11, n.4, p.671–691, 1997.

SCHACHTMAN, D.P.; REID, R.J.; AYLING, S.M. Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. **Plant Physiology**, Rockville, v.116, p.447–453, 1998.

SCHACHTMAN, D.P.; SHIN, R. Nutrient Sensing and Signaling: NPKS. **The Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p.47–69, 2007.

SHIN, H. *et al.* Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. **The Plant Journal**, Oxford, v.39, p.629–642, 2004.

SMITH, F.W. *et al.* Phosphate transport in plants. **Plant and Soil**, Hague, v.248, p.71–83, 2003.

SOMERVILLE, C.R.; OGREN, W. **Isolation of photorespiration mutants in *Arabidopsis thaliana***. In: CHUA, N-H, **METHODS in chloroplast biology**. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1982. P.129-138.

STRIEDER, M.L. **Deficiência de fósforo em *Arabidopsis thaliana*: caracterização de mutantes e interações nutricionais**. 2009. 217f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SWARUP, R. *et al.* Auxin cross-talk: integration of signalling pathways to control plant development. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.49, p.411–426, 2002.

TIAN, Q-Y.; SUN, P.; ZHANG, W-H. Ethylene is involved in nitrate-dependent root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, Cambridge, v.184, p.918–931, 2009.

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

TICCONI, C.A. *et al.* *Arabidopsis pdr2* reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, n.6, p. 801–814, 2004.

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.

TRAN, H.T.; HURLEY, B.A.; PLAXTON, W.C. Feeding hungry plants: the role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. **Plant Science**, Davis, v.179, p.14–27, 2010.

VANCE, C.P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources, **Plant Physiology**, Minneapolis, v.127, p.390–397, 2001.

VANCE, C.P., UHDE-STONE, C., ALLAN, D.L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource, **New Phytologist**, Cambridge, v.157, p.423–447, 2003.

VANSTRAELEN, M. *et al.* APC/C^{CCS52A} complexes control meristem maintenance in the *Arabidopsis* root, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.106, n.28, p. 11806-11811, 2009.

VAZQUEZ, F. *et al.* The Nuclear dsDNA Binding Protein HYL1 Is Required for MicroRNA Accumulation and Plant Development, but Not Posttranscriptional Transgene Silencing. **Current Biology**, London, v.14, p.346–351, 2004.

VELJANOVSKI, V. *et al.* Biochemical and Molecular Characterization of AtPAP26, a Vacuolar Purple Acid Phosphatase Up-Regulated in Phosphate-Deprived Arabidopsis Suspension Cells and Seedlings. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.142, p.1282-1293, 2006.

VITHA, S. *et al.* Histochemical GUS Analysis. In: GARTLAND, K.M.A.; DAVEY M.R. **Agrobacterium Protocols**, Totowa: Humana Press, 1995, p.185-193.

VON UEXKÜLL, H.R., MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant Soil**, Hague, v.171, p.1-15, 1995.

WANG, R. *et al.* Genomic Analysis of the Nitrate Response Using a Nitrate Reductase-Null Mutant of Arabidopsis. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.136, p.2512–2522, 2004.

WANG, R. *et al.* A Genetic Screen for Nitrate Regulatory Mutants Captures the Nitrate Transporter Gene NRT1.1. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.151, p.472–478, 2009.

WANG, X. *et al.* The Function of LPR1 is Controlled by an Element in the Promoter and is Independent of SUMO E3 Ligase SIZ1 in Response to Low Pi Stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v.51, n.3, p.380–394, 2010.

WANG, Y.H.; GARVIN, D.F.; KOCHIAN, L.V. Nitrate-Induced Genes in Tomato Roots. Array Analysis Reveals Novel Genes That May Play a Role in Nitrogen Nutrition. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.127, p.345–359, 2001.

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**, Minneapolis, v.130, p.1361-1370, 2002.

WILKINSON, Q.J.; CRAWFORD, N.M. Identification of the *Arabidopsis CHL3* Gene as the Nitrate Reductase Structural Gene *NIA2*. **The Plant Cell**, Rockville, v.3, p.461-471, 1991.

WILLIAMSON, L.C. *et al.* Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.126, p.875-890, 2001.

YANG, Z.; MIDMORE, D.J. A Model for the Circadian Oscillations in Expression and Activity of Nitrate Reductase in Higher Plants. **Annals of Botany**, London, v.96, p.1019–1026, 2005.

YONG, Z.; KOTUR, Z.; GLASS, A.D.M. Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from Arabidopsis roots. **The Plant Journal**, Oxford, v.63, p.739–748, 2010.

ZHANG Y-J. *et al.* Ethylene and phosphorus availability have interacting yet distinct effects on root hair development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.54, n.391, p. 2351-2361, 2003.

ZHANG, H.; FORDE, B. G. An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. **Science**, Washington, v.279, n.5349, p.407-409, 1998.

ZHAO, Y; HASENSTEIN, K.H. Primary Root Growth Regulation: The Role of Auxin and Ethylene Antagonists. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.28, p.309–320, 2009.

ZHU, Z.; GUO, H. Genetic Basis of Ethylene Perception and Signal Transduction in *Arabidopsis*. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v.50, n.7, p.808-815, 2008.

ZHUO D. *et al.* Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (Nrt2;1At) in roots of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v.17, n.5, p.563-568, 1999.