

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

RESPOSTA DO MUTANTE *pdr1* DE *Arabidopsis thaliana* A NITROGÊNIO,  
FÓSFORO E CITOCININA

Taiguer Cerutti  
Engenheiro Agrônomo/UFSM

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

Porto Alegre (RS), Brasil  
Maio de 2012

TAIGUER CERUTTI  
Engenheiro Agrônomo - UFSM

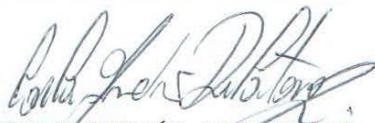
## DISSERTAÇÃO

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

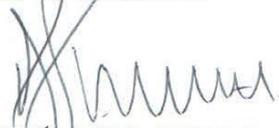
Aprovado em: 03.05.2012  
Pela Banca Examinadora



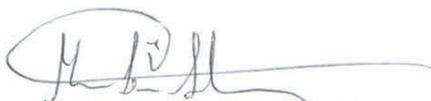
CARLA ANDRÉA DELATORRE  
Orientadora - PPG Fitotecnia



CHRISTIAN BREDEMEIER  
PPG Fitotecnia

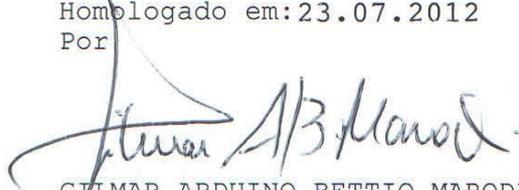


ANDRÉ LUIS THOMAS  
PPG Fitotecnia



MÉRCIO LUIS STRIEDER  
EMBRAPA - CNPT  
Passo Fundo/RS

Homologado em: 23.07.2012  
Por



GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia



PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

DEDICÓ

*À minha mãe Margaret,  
ao meu pai Anicleto e aos  
meus familiares e amigos.*

*“A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

*Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

À professora Carla Andréa Delatorre pela dedicação atribuída durante minha orientação no curso de mestrado, pelo vasto e fidedigno conhecimento científico transmitido e pelo estímulo nos momentos desafiadores. Além disso, agradeço pela amizade e ensinamentos pessoais, os quais nunca serão esquecidos.

Ao professor Marcelo Teixeira Pacheco pelo auxílio na condução das análises estatísticas e elaboração de seminários. Agradeço também pela disponibilidade e disposição em ajudar, sem dúvida um grande exemplo profissional.

Aos professores da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com que tive contato. Em especial, aos professores André Luis Thomas, Christian Bredemeier, Paulo Regis Ferreira da Silva, Luiz Carlos Federizzi, Aldo Merotto Junior e Paulo Henrique de Oliveira, por terem contribuído de diferentes formas na elaboração desse trabalho e/ou na minha formação profissional.

Ao laboratorista Fábio Martins Berndt, pelos auxílios nas atividades laboratoriais, pelo conhecimento transmitido e amizade.

A todos os colegas e amigos do Departamento de Plantas de Lavoura. Em especial à Cibele Tesser da Costa, Liliana Hentschke Dutra, Felipe de Oliveira Matzenbacher, Thanise Nogueira Füller, Juliano Fuhrmann Wagner, Ives Clayton Goulart, Augusto Kalsing, Danielle Almeida, Clever Variani, Márcio Arruda, Adriana de Andrade Figueiró, Carolina Tessele, Kelly Pellizzaro, Letícia Simionato Tonello, Adriano de Bernardi Schneider, Vladirene Macedo Vieira, Diovane Antonow, Martim Fogaça Severo, Catarine Markus, Silmara da Luz Correia, Guilherme Bastista Menegati, Anderson Luis Nunes, Everton Danilo Bortoly, Cássio Barcellos Hervé,

Daniel Arthur Gaklik Waldow, Ana Paula Fontana Valentini, Felipe Zambonato, Noryam Bervian Bispo, Angélica Gobatto, Ana Carolina Roso e Ezequiel de Oliveira.

Às funcionárias Marisa Carvalho Bello, Maria Alice Weber e Karina Pieretti, pela competência e disposição em ajudar.

À minha mãe Margaret Mocelini e ao meu pai Anicleto Francisco Cerutti, por sempre incentivarem a reconhecer o valor da educação e do conhecimento.

Aos meus irmãos de coração Tiago da Rocha e Daniel Bianchini, por me motivarem em todos os momentos.

Ao amigo Tiago Broetto, pelo companheirismo e pelas discussões sobre agricultura e ciência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos cidadãos brasileiros por terem financiado esse projeto.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram na realização desse trabalho.

# RESPOSTA DO MUTANTE *pdr1* DE *Arabidopsis thaliana* A NITROGÊNIO, FÓSFORO E CITOCININA<sup>1</sup>

Autor: Taiguer Cerutti

Orientador: Carla Andréa Delatorre

## RESUMO

O nitrogênio (N) e o fósforo (P) são os dois nutrientes mais limitantes à produção vegetal. Alguns mecanismos desenvolvidos pelas plantas para superar eventuais deficiências são bem conhecidos: secreção de fosfatases ácidas, expressão de transportadores de alta afinidade e realocação de nutrientes para órgãos com maior demanda. Porém, as rotas de sinalização desses nutrientes ainda não foram elucidadas. A caracterização de mutantes vem se mostrando útil na identificação de componentes da sinalização de N e P, bem como de sua interação e de fitormônios vegetais. O mutante *pdr1*, estudado nesse trabalho, se mostrou potencialmente útil no entendimento das respostas a nitrato (Ni) e citocinina. Além da caracterização morfológica de *pdr1*, buscou-se avaliar, em raízes do ecótipo Columbia, a expressão *in situ* de genes relacionados ao resgate da limitação de P (*AtACP5* e *AtPT1*) e ao desenvolvimento radicular (*CycB1* e *QC25*) em resposta a P, N e citocinina. A mutação de *pdr1* foi localizada no cromossomo 5. Essa alteração genética conferiu redução do comprimento da raiz primária em resposta a Ni quando sob deficiência de Pi, bem como, a concentrações elevadas de citocinina ( $10^{-5}$  mM) independente da concentração de Pi quando havia Ni no meio. Além disso, *pdr1* também apresentou maior expressão de genes relacionados ao metabolismo do carbono o que pode ter contribuído para o aumento da razão parte aérea/raiz. Observou-se interação nitrato e citocinina, e a presença de elevadas concentrações de nitrato ou de citocinina causou redução no comprimento da raiz primária de *Arabidopsis thaliana*. A análise *in situ* mostrou maior expressão de *AtACP5* e *AtPT1* com o aumento da concentração de Ni. O gene *CycB1* teve maior expressão em meio contendo Pi e com o aumento da concentração de Ni. Diferente dos genes anteriores, *QC25* teve sua expressão suprimida em função da elevação da concentração de citocinina, indicando que o centro quiescente foi exaurido na raiz primária de *Arabidopsis thaliana* em resposta a elevada citocinina. Os estudos desenvolvidos evidenciaram interação na sinalização de N e P, que as respostas morfológicas do sistema radicular a nitrato e citocinina são muito similares e que *PDR1* é um componente do processo de sinalização da condição nutricional de P e N em *Arabidopsis thaliana*.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (79 p.) Maio, 2012.

# RESPONSE OF *pdr1* MUTANT FROM *Arabidopsis thaliana* TO NITROGEN, PHOSPHORUS AND CYTOKININ<sup>1</sup>

Author: Taiguer Cerutti

Adviser: Carla Andréa Delatorre

## ABSTRACT

Nitrogen (N) and phosphorus (P) are the two most limiting nutrients for plant production. Some mechanisms developed by plants to overcome nutrient deficiencies are well known: secretion of acid phosphatase, expression of high affinity transporters and reallocation of nutrients to organs with the highest demand. However the signaling pathways of these nutrients have not been elucidated yet. The characterization of mutants has been useful in the identification of N and P signaling components as well as in the interaction of these nutrients and plant hormones. The *pdr1* mutant studied in this case proved to be useful for understanding the responses to nitrate (Ni) and cytokinin. In addition to the morphological characterization of the mutant *pdr1*, we assessed in the roots of the ecotype Columbia, *in situ* expression of genes related to P starvation response (*AtACP5* and *AtPT1*) and root development (*CycB1* and *QC25*) in response to P, N and cytokinin. The *pdr1* mutation was located in chromosome 5. This genetic alteration caused primary root length reduction in response to Ni under Pi deficiency, as well as at high cytokinin ( $10^{-5}$  mM) levels in the presence of Ni and independently of Pi availability. Moreover, *pdr1* also showed higher expression of genes related to carbon metabolism that may have contributed to increase the shoot/root ratio. Interaction was observed between nitrate and cytokinin. The presence of high concentrations of either nitrate or cytokinin caused reduction in the length of the primary root of *Arabidopsis thaliana*. *In situ* analysis showed increased expression of *AtACP5* and *AtPT1* with increasing concentration of Ni. The *CycB1* gene expression was higher in medium containing Pi and increased in response to Ni. Unlike the previous gene, *QC25* expression was suppressed by the increase of cytokinin, indicating that the quiescent center of the primary root had been exhausted in *Arabidopsis thaliana* at high cytokinin. The studies revealed interaction in the signaling of N and P, similarity between the root morphological response to nitrate and cytokinin and that *pdr1* is a signaling component of the P and N nutritional status of *Arabidopsis thaliana*.

---

<sup>1</sup> Master of Science Dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (79 p.) Maio, 2012.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Nutrição vegetal.....	3
2.2 Nitrogênio.....	4
2.3 Fósforo.....	7
2.4 Interações N x P.....	9
2.5 Citocinina no desenvolvimento radical de plantas.....	10
2.6 Análises de expressão de genes associados a deficiências de N e P.....	11
2.7 Mapeamento de mutações em <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Local de condução dos experimentos e material vegetal.....	14
3.2 Condições de crescimento das plantas.....	15
3.3 Composição dos meios.....	16
3.4 Caracterização de genótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> em diferentes concentrações de N e ausência de P.....	18
3.5 Alterações no crescimento radical em resposta a N, P e citocinina.....	19
3.6 Análise <i>in situ</i> da expressão de genes em resposta a N, P e citocinina.....	20
3.7 Mapeamento da mutação em <i>pdr1</i> .....	21
3.8 Perfil da expressão de genes alterados em <i>pdr1</i> .....	24
3.9 Análise estatística.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 Caracterização preliminar de <i>pdr1</i> .....	25
4.2 Caracterizações do comprimento da raiz primária em função da concentração de N, P e citocinina no meio.....	27
4.2.1 Diferenças no comprimento da raiz primária de <i>pdr1</i> e COL em resposta N, P e citocinina.....	28
4.2.2 Efeito de concentrações de N, P e citocinina no comprimento da raiz primária de <i>pdr1</i> e COL.....	36

	Página	
4.2.3	Efeito da interação nitrato x citocinina, em diferentes condições de suficiência de P no comprimento da raiz primária de <i>pdr1</i> e COL.....	44
4.3	Análise <i>in situ</i> da expressão de genes de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	50
4.3.1	Caracterização da expressão de genes da raiz primária de plantas submetidas a diferentes concentrações de N, P e citocinina.....	50
4.4	Expressão diferencial de genes do mutante <i>pdr1</i> .....	64
4.5	Mapeamento da mutação em <i>pdr1</i> .....	68
5	CONCLUSÕES.....	71
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
7	VITA.....	79

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Linhagens transgênicas utilizadas para visualizar a expressão de genes.....	15
2. Composição do meio padrão e fontes de nutrientes.....	17
3. <i>Primers</i> e enzimas de restrição utilizadas nas ampliações de DNA para o mapeamento da mutação em <i>pdr1</i> .....	23
4. Matriz de significância do comprimento da raiz primária de COL para a interação nitrato x citocinina. As plantas foram crescidas em meio com P, com diferentes concentrações de nitrato (0, 1 e 100 mM) e citocinina (0, 10 <sup>-8</sup> e 10 <sup>-5</sup> mM) e avaliadas aos 14 dias após a germinação. “*” diferença significativa e “ns” diferença não significativa, teste t (p≤0,05).....	46
5. Matriz de significância do comprimento da raiz primária de <i>pdr1</i> para a interação nitrato x citocinina. As plantas foram crescidas em meio com P, com diferentes concentrações de nitrato (0, 1 e 100 mM) e citocinina (0, 10 <sup>-8</sup> e 10 <sup>-5</sup> mM) e avaliadas aos 14 dias após a germinação. “*” diferença significativa e “ns” diferença não significativa, teste t (p≤0,05).....	47
6. Matriz de significância do comprimento da raiz primária de COL para a interação nitrato x citocinina. As plantas foram crescidas em meio sem P, com diferentes concentrações de nitrato (0, 1 e 100 mM) e citocinina (0, 10 <sup>-8</sup> e 10 <sup>-5</sup> mM) e avaliadas aos 14 dias após a germinação. “*” diferença significativa e “ns” diferença não significativa, teste t (p≤0,05).....	48
7. Matriz de significância do comprimento da raiz primária de <i>pdr1</i> para a interação nitrato x citocinina. As plantas foram crescidas em meio sem P, com diferentes concentrações de nitrato (0, 1 e 100 mM) e citocinina (0, 10 <sup>-8</sup> e 10 <sup>-5</sup> mM) e avaliadas aos 14 dias após a germinação. “*” diferença significativa e “ns” diferença não significativa, teste t (p≤0,05).....	49
8. Perfil de expressão de genes em <i>pdr1</i> com expressão aumentada em relação ao tipo silvestre COL.....	66

	Página
9. Perfil de expressão de genes em <i>pdr1</i> com expressão reduzida em relação ao tipo silvestre COL.....	67
10. Mapeamento cromossômico da mutação contida em <i>pdr1</i> .....	68

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Distribuição das sementes nas placas (A) e disposição das placas nos suportes de alumínio na sala de crescimento (B).....	16
2. Medida de raiz de <i>Arabidopsis thaliana</i> através do programa <i>ImageJ</i> .....	18
3. Análise da qualidade de DNA em gel de agarose 1,5%.....	22
4. Comprimento da raiz primária de COL (barras brancas) e <i>pdr1</i> (barras pretas) sob deficiência de P e diferentes disponibilidades de N ao longo do tempo, 8, 11 e 14 dias após a germinação (DAG). “*” diferença significativa entre genótipos e “ns” diferença não significativa, teste t ( $p \leq 0,05$ ). As barras superiores representam o desvio padrão.....	29
5. Comprimento da raiz primária de COL (barras brancas) e <i>pdr1</i> (barras pretas) sob suficiência de P e diferentes disponibilidades de N ao longo do tempo, 8, 11 e 14 dias após a germinação (DAG). “*” diferença significativa e “ns” diferença não significativa, teste t ( $p \leq 0,05$ ). As barras superiores representam o desvio padrão.....	30
6. Comprimento da raiz primária de COL (barras brancas) e <i>pdr1</i> (barras pretas) sob deficiência de P e diferentes disponibilidades de N na presença de citocinina ( $10^{-8}$ mM) ao longo do tempo, 8, 11 e 14 dias após a germinação (DAG). “*” diferença significativa e “ns” diferença não significativa entre genótipos, teste t ( $p \leq 0,05$ ). Barras superiores representam o desvio padrão.....	31
7. Comprimento da raiz primária de COL (barras brancas) e <i>pdr1</i> (barras pretas) sob suficiência de P e diferentes disponibilidades de N na presença de citocinina ( $10^{-8}$ mM) ao longo do tempo, 8, 11 e 14 dias após a germinação (DAG). “*” diferença significativa e “ns” diferença não significativa entre genótipos, teste t ( $p \leq 0,05$ ). Barras superiores representam o desvio padrão.....	32

8.	Comprimento da raiz primária de COL (barras brancas) e <i>pdr1</i> (barras pretas) sob deficiência de P e diferentes disponibilidades de N na presença de citocinina ( $10^{-5}$ mM) ao longo do tempo, 8, 11 e 14 dias após a germinação (DAG). “*” diferença significativa e “ns” diferença não significativa entre genótipos, teste t ( $p \leq 0,05$ ). Barras superiores representam o desvio padrão.....	34
9.	Comprimento da raiz primária de COL (barras brancas) e <i>pdr1</i> (barras pretas) sob suficiência de P e diferentes disponibilidades de N na presença de citocinina ( $10^{-5}$ mM) ao longo do tempo, 8, 11 e 14 dias após a germinação (DAG). “*” diferença significativa e “ns” diferença não significativa entre genótipos, teste t ( $p \leq 0,05$ ). Barras superiores representam o desvio padrão.....	35
10.	Efeito das doses de nitrato no comprimento da raiz primária de COL (quadrados brancos) e <i>pdr1</i> (quadrados pretos) em diferentes concentrações de citocinina e avaliadas aos 14 dias após a germinação. “a, b, c” comparação de médias das diferentes doses de nitrato para cada genótipo dentro de cada concentração de citocinina, Duncan ( $p \leq 0,05$ ).....	37
11.	Efeito das doses de nitrato no comprimento da raiz primária de COL (quadrados brancos) e <i>pdr1</i> (quadrados pretos) em diferentes concentrações de citocinina e avaliadas aos 14 dias após a germinação. “a, b, c” comparação de médias das diferentes doses de nitrato para cada genótipo dentro de cada concentração de citocinina, Duncan ( $p \leq 0,05$ ).....	38
12.	Efeitos de doses de citocinina no comprimento da raiz primária de COL (quadrados brancos) e <i>pdr1</i> (quadrados pretos). As plantas foram crescidas em meio sem P, com diferentes concentrações de citocinina (0, $10^{-8}$ e $10^{-5}$ mM), com diferentes concentrações de nitrato (0, 1 e 100 mM) e avaliadas aos 14 dias após a germinação. “a, b, c” comparação de médias das diferentes doses de nitrato para cada genótipo dentro de cada concentração de N, Duncan ( $p \leq 0,05$ ).....	41
13.	Efeitos de doses de citocinina no comprimento da raiz primária de COL (quadrados brancos) e <i>pdr1</i> (quadrados pretos). As plantas foram crescidas em meio com P, com diferentes concentrações de citocinina (0, $10^{-8}$ e $10^{-5}$ mM), com diferentes concentrações de nitrato (0, 1 e 100 mM) e avaliadas aos 14 dias após a germinação. “a, b, c” comparação de médias das diferentes doses de nitrato para cada genótipo dentro de cada concentração de N, Duncan ( $p \leq 0,05$ ).....	43
14.	Efeito da disponibilidade de fósforo e de nitrato (0, 1 e 100 mM) na expressão de <i>AtACP5::GUS</i> na raiz primária de <i>Arabidopsis thaliana</i> . As plantas foram crescidas com ou sem fósforo e fotografadas aos 8 DAG.....	52

15.	Efeito da disponibilidade de fósforo e de nitrato (0, 1 e 100 mM) na expressão de <i>AtACP5::GUS</i> na raiz primária de <i>Arabidopsis thaliana</i> . As plantas foram crescidas com ou sem fósforo, com $10^{-5}$ mM de citocinina e fotografadas aos 8 DAG.....	53
16.	Efeito da disponibilidade de fósforo e de nitrato (0, 1 e 100 mM) na expressão de <i>AtPT1::GUS</i> na raiz primária de <i>Arabidopsis thaliana</i> . As plantas foram crescidas com ou sem fósforo e fotografadas aos 8 DAG.....	56
17.	Efeito da disponibilidade de fósforo e de nitrato (0, 1 e 100 mM) na expressão de <i>AtPT1::GUS</i> na raiz primária de <i>Arabidopsis thaliana</i> . As plantas foram crescidas com ou sem fósforo, com $10^{-5}$ mM de citocinina e fotografadas aos 8 DAG.....	57
18.	Efeito da disponibilidade de fósforo e de nitrato (0, 1 e 100 mM) na expressão de <i>CycB1::GUS</i> na raiz primária de <i>Arabidopsis thaliana</i> . As plantas foram crescidas com ou sem fósforo e fotografadas aos 8 DAG.....	59
19.	Efeito da disponibilidade de fósforo e de nitrato (0, 1 e 100 mM) na expressão de <i>CycB1::GUS</i> na raiz primária de <i>Arabidopsis thaliana</i> . As plantas foram crescidas com ou sem fósforo, com $10^{-5}$ mM de citocinina e fotografadas aos 8 DAG.....	61
20.	Efeito da disponibilidade de fósforo e de nitrato (0, 1 e 100 mM) na expressão de <i>QC25::GUS</i> na raiz primária de <i>Arabidopsis thaliana</i> . As plantas foram crescidas com ou sem fósforo e fotografadas aos 8 DAG.....	62
21.	Efeito da disponibilidade de fósforo e de nitrato (0, 1 e 100 mM) na expressão de <i>QC25::GUS</i> na raiz primária de <i>Arabidopsis thaliana</i> . As plantas foram crescidas com ou sem fósforo, com $10^{-5}$ mM de citocinina e fotografadas aos 8 DAG.....	63
22.	Estimativa da posição cromossômica da mutação em <i>pdr1</i> .....	70

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

ACP5	fosfatase ácida
BAP	benzil amino purina
C	carbono
CAPS	<i>cleaved amplified polymorphic sequences</i> -marcador molecular
Cit	citocinina
COL	ecótipo Columbia
CycB1	ciclina expressa na fase G2/M da mitose
DAG	dias após a germinação
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	deoxinucleotídeos trifosfato
EMS	etil-metano-sulfonato - agente mutagênico
F <sub>1</sub>	primeira geração de cruzamento
F <sub>2</sub>	segunda geração de cruzamento
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FR	frequência de recombinação
GUS	beta-glucuronidase
K	potássio
LER	ecótipo Landsberg
MES	morfolino ácido etanosulfônico
N	nitrogênio
Ni	nitrato
P	fósforo
Pb	pares de bases
PCR	reação da polimerase em cadeia
<i>pdr1</i>	mutante <i>phosphate-deficiency response 1</i>
pH	potencial hidrogeniônico
Pi	fósforo inorgânico
Po	fósforo orgânico
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i> - marcador molecular
RNA	ácido ribonucléico
S	enxofre
SNPs	<i>single nucleotide polymorphism</i> - marcador molecular
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
UV	radiação ultravioleta

## 1 INTRODUÇÃO

Com o objetivo de buscar explicações para as respostas das plantas a disponibilidade de N e P através da utilização de linhagens mutantes, no ano 2000, Chen *et al.* identificaram 22 linhagens mutantes do ecótipo Columbia de *Arabidopsis thaliana* que respondiam de forma incomum à condição nutricional no meio. As caracterizações de algumas dessas linhagens, conduzidas por Delatorre (2002), Pinto (2005), Strieder (2009) e Costa (2011), contribuiram para o entendimento de como as plantas respondem fisiologicamente e morfológicamente ao P, ao N e à interação existente entre esses dois nutrientes.

Chen *et al.* (2000) verificaram que o mutante *pdr1* tinha menor crescimento de raiz primária quando crescido com P orgânico (RNA e DNA). Entretanto, além de incapaz de expressar as estratégias para resgatar P, *pdr1* também apresentou hipersensibilidade ao nitrato em estudo conduzido por Delattore (2002). Devido a essas características, *pdr1* foi caracterizado no intuito de identificar mais um componente do sistema de sinalização da condição nutricional de plantas.

Seguindo essa estratégia de estudo, utilizando *Arabidopsis thaliana* e seu mutante com resposta atípica a P e N (*pdr1*), nesse trabalho buscou-se identificar respostas no crescimento da raiz primária e na expressão de genes das plantas em função das alterações na disponibilidade de nutrientes (nitrato e fosfato) e do fitormônio

citocinina no meio de crescimento. Além disso, se buscou mapear o local do genoma em que a mutação de *pdr1* está contida.

As informações obtidas nesse estudo visam auxiliar na identificação dos mecanismos de percepção e sinalização da condição nutricional de N e P em plantas. A identificação da resposta de determinados genes expressos no sistema radicular, bem como o mapeamento da mutação em *pdr1*, poderá no futuro contribuir no desenvolvimento de genótipos mais eficientes em responder a eventuais estresses abióticos.

## **OBJETIVO GERAL**

Comparar as respostas de *Arabidopsis thaliana* e seu mutante *pdr1* a diferentes disponibilidades de nitrato e fosfato, buscando identificar possíveis interações desses nutrientes e do fitormônio citocinina no desenvolvimento da raiz.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar o comprimento da raiz primária do mutante *pdr1* e do ecótipo silvestre Columbia em resposta a P, N e citocinina;

Identificar a ocorrência de interações entre P, N e citocinina;

Analisar a expressão de genes relacionados ao crescimento da raiz primária e a aquisição de P em resposta a P, N e citocinina;

Estimar a posição da mutação de *pdr1* no genoma.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Nutrição vegetal**

As plantas precisam captar luz, água e nutrientes minerais do ambiente onde estão inseridas para poderem expressar seu potencial de rendimento. Geralmente, as plantas crescem em ambientes deficientes em N, P e K. Para superar essas limitações, as plantas necessitam perceber e se adaptar a essa condição adversa (Schachtman, 2007).

Os nutrientes essenciais são classificados em macronutrientes e micronutrientes, de acordo com sua concentração na planta. São considerados macronutrientes: nitrogênio, potássio, cálcio, magnésio, fósforo, enxofre e silício; os micronutrientes compreendem: cloro, ferro, boro, manganês, sódio, zinco, cobre, níquel e molibdênio. Outros elementos essenciais são hidrogênio, carbono e oxigênio, que são considerados nutrientes orgânicos, porque são obtidos da água e do dióxido de carbono (Taiz & Zeiger, 2005). No presente trabalho, foram estudados os nutrientes N e P, bem como sua interação.

Os nutrientes minerais são elementos adquiridos basicamente da solução do solo na forma de íons inorgânicos. Esses nutrientes são absorvidos pelas plantas através de suas raízes. Após sua absorção, são translocados para diferentes órgãos, onde são utilizados em diferentes processos biológicos ou armazenados (Taiz & Zeiger, 2005). Além disso, N e P também precisam ser assimilados para cumprir o seu papel no

metabolismo da planta. O processo de assimilação de N (Lea & Miñin, 2011) e o de P (Abel, 2011) são indispensáveis para o crescimento e desenvolvimento da planta.

Os estudos de como as plantas obtêm e utilizam os nutrientes minerais é fundamental para a agricultura moderna. Áreas de alta produtividade agrícola dependem do aporte de grandes volumes de nutrientes minerais. Para aumentar a produção de alimentos, o consumo mundial de fertilizantes (N, P e K) aumentou de 112 Mt em 1980 para 169 Mt em 2008 (Heffer, 2009). Entretanto, as plantas cultivadas utilizam menos da metade de todo o fertilizante aplicado no solo (Loomis & Connor, 1992). Os minerais restantes podem ser lixiviados para lençóis freáticos e outros corpos hídricos, permanecer aderidos às partículas de solo, imobilizados por microrganismos ou se dissiparem na atmosfera através da volatilização. Devido à natureza complexa da relação planta-solo-atmosfera, estudos de fisiologia, química, ecologia e mais recentemente genômica e proteômica têm sido fundamentais no entendimento de como as plantas percebem e utilizam nutrientes.

## **2.2 Nitrogênio**

O N é um nutriente mineral indispensável para organismos vivos por ser constituinte de nucleotídeos e proteínas. A sua disponibilidade é baixa na maioria dos ambientes terrestres. Devido a sua deficiência limitar o crescimento e produção das plantas, sua adição em sistemas agrícolas é fundamental para o aumento da produtividade (Robertson & Vitousek, 2010). Quando há deficiência de N, a maioria das plantas apresenta clorose e, se a deficiência se tornar severa, as folhas mais velhas senescem (Taiz & Zeiger, 2005).

Os fertilizantes nitrogenados inorgânicos utilizados para suprir as necessidades das plantas cultivadas são produzidos através da reação de Haber-Bosch, que é a

produção de amônia a partir do gás de nitrogênio e hidrogênio presentes na atmosfera (Smil, 2000). Essa reação foi primeiramente demonstrada por Fritz Haber em 1909 e posteriormente comprada pela empresa alemã BASF<sup>®</sup>. Carl Bosch foi o responsável por desenvolver os equipamentos necessários para tornar a reação demonstrada por Fritz Haber uma atividade industrial (Hagher, 2008). Por esse feito, Bosch e Haber foram laureados com o prêmio Nobel em 1918 e 1931, respectivamente. Estima-se que a reação de Haber-Bosch seja responsável pela produção de N que indiretamente sustenta 1/3 da população mundial (Wolfe, 2002).

Smith *et al.* (1990) estudaram o impacto da utilização de fertilizantes nitrogenados inorgânicos em diferentes culturas nos Estados Unidos da América. Esses pesquisadores estimaram que a ausência de fertilizantes nitrogenados inorgânicos corresponde em média a 41, 27, 16% de redução no rendimento de milho, arroz e trigo, respectivamente. Contudo, a adição de N em sistemas agrícolas pode gerar danos ambientais. A maioria do N utilizado em sistemas agrícolas é reativo, ou seja, está presente em formas que são biologicamente ativas no solo, em corpos hídricos e na atmosfera. Essas formas reativas de N podem levar a perda de diversidade biológica, comprometer a qualidade da água e do ar e até mesmo a saúde humana (Robertson & Vitousek, 2010). Desenvolver genótipos mais eficientes na utilização de N pode contribuir para que haja redução da adição desse nutriente e, por consequência, de danos ao ambiente.

As raízes têm um papel chave na absorção de N. Assim, entender a relação existente entre a arquitetura radicular e a condição do solo é essencial para o desenvolvimento de plantas mais eficientes em absorver esse nutriente (Wu, 2005). Além de compreender as características morfológicas de adaptação a meios com deficiência de N, também se faz necessário entender a função dos genes afetados pela

disponibilidade de N, para avançar o conhecimento molecular dessa característica e criar possíveis caminhos de manipulação genética. O crescimento radicular, além da íntima relação com o meio, também é variável em função do genótipo, aumentando ainda mais a complexidade dessa característica (Kamara *et al.*, 2003).

Para a planta regular a absorção de determinado nutriente, ela precisa perceber se há disponibilidade ou não desse nutriente no solo. O N pode ser percebido pelas plantas, tanto interna como externamente. Devido a esta habilidade, a planta consegue regular o seu metabolismo em função da concentração externa e/ou interna de N (Sakakibara *et al.*, 2006). Algumas das respostas ao N são locais, restritas apenas às raízes diretamente expostas ao sinal nutricional, enquanto outras são sistêmicas, implicando em intrincadas rotas de percepção e sinalização de N (Forde, 2002).

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 sinalização mediada por citocininas está relacionada com o desenvolvimento, síntese de proteínas e aquisição de macronutrientes. Além disso, é sugerido que o transporte de nitrato, fosfato e sulfato é regulado primeiramente ao nível de transcrição, enquanto que o transporte de potássio e cálcio é regulado principalmente ao nível de proteína (Ammann & Blatt, 2009).

Zhang *et al.* (2007) caracterizaram quatro adaptações morfológicas relacionadas à disponibilidade de N em magnoliopsidas: o efeito estimulatório local do N no alongamento de raízes laterais; o efeito sistêmico inibitório de altas concentrações de N na ativação de meristemas laterais de raiz; a supressão da iniciação de raízes laterais por alta razão carbono:nitrogênio (C:N) da planta e a inibição do crescimento da raiz primária e estímulo a produção de raízes laterais por teores externos de L-glutamato.

### 2.3 Fósforo

A principal forma de P disponível para as plantas no ambiente é o ortofosfato. O P é o principal componente de ácidos nucleicos, fosfolipídios e metabólitos intermediários do ciclo do carbono. Diferentes formas de P são encontradas no ambiente: Pi livre (ânion), precipitado com sais, P ésteres (fitato), constituinte de moléculas oriundas de organismos vivos (Po) e até mesmo fosfonatos (Grossman & Takahashi, 2001). No solo, o P é diluído e pouco móvel, pois ele ocorre como componente integral de sais de cálcio, ferro e alumínio ou na forma de moléculas orgânicas (Fang *et al.*, 2009). Como a produtividade das espécies agrícolas é limitada pela baixa disponibilidade de Pi, utiliza-se a adição de fertilizantes fosfatados para contornar essa situação (Grossman & Takahashi, 2001).

O uso de fertilizantes fosfatados é indispensável para obtenção de altos rendimentos e manutenção da fertilidade do solo. Porém, a aquisição de fertilizantes requer aporte financeiro, tornando-se problema principalmente em pequenas propriedades. Além disso, a fonte de P, rochas fosfatadas, é um recurso limitado e não-renovável (Cordell *et al.*, 2009) e, no caso de erosão e conseqüente carregamento do P para corpos hídricos, pode ocorrer eutrofização, comprometendo a qualidade da água (Bennett *et al.*, 2001).

Quando há deficiência de P no solo, as plantas apresentam alguns sintomas característicos, como o crescimento reduzido em plantas jovens, coloração verde-escuro das folhas, que podem ser mal-formadas e apresentarem pequenas manchas necróticas. Muitas espécies produzem antocianinas, conferindo à folha coloração arroxeada, não associada à clorose. Além disso, pode causar a morte das folhas mais velhas e a formação de talos delgados, bem como atraso na maturação da planta (Taiz & Zeiger, 2005).

As plantas respondem à deficiência de P através da expressão de genes capazes de aliviar esse estresse. Os transportadores de alta afinidade de P, codificados por uma pequena família de genes, são capazes de translocar o Pi que se encontra em baixa concentração no meio externo para dentro do citoplasma celular (Raghothama, 2000). A maioria dos transportadores de Pi são expressos preferencialmente em raízes sob deficiência de Pi (Liu *et al.*, 1998). Os transportadores de baixa afinidade de P são responsáveis pela mobilização de P dentro da planta. Entretanto, alguns transportadores de alta afinidade de P também podem desempenhar esse papel em outras partes da planta, como pecíolos, folhas e flores (Leggewie *et al.*, 1997).

Outra forma das plantas contornarem a condição de deficiência de P é através do aumento da atividade de fosfatases ácidas (Duff, 1994). A liberação dessas enzimas na rizosfera é uma estratégia da planta para quebrar moléculas orgânicas e aumentar a disponibilidade de P (Trull & Deikman, 1998). Muitas plantas, como arroz, trigo e tomate, secretam grandes quantidades de fosfatases ácidas na rizosfera em resposta à deficiência de P (Tadano *et al.*, 1993). Lee (1998) encontrou correlação significativa entre o influxo de fósforo e a atividade de fosfatases extracelulares em raízes de cevada conduzidas em hidroponia, reforçando o papel dessas enzimas como forma de aumentar a disponibilidade de Pi.

A limitação de P altera a alocação de carbono nas plantas. A alteração na relação raiz/parte aérea é resposta característica dessa deficiência. As plantas apresentam crescimento radicular menos afetado do que o da parte aérea (Ticconi *et al.*, 2004). Apesar do crescimento do sistema radicular ser menos afetado pela limitação de Pi, comumente observa-se redução severa do comprimento da raiz principal, quando comparado a condições de disponibilidade do nutriente (Chen *et al.*, 2000; Linkohr *et al.*, 2002).

## 2.4 Interação N x P

A interação de nutrientes para absorção e os desequilíbrios causados pela deficiência de um mineral são muito estudados (Marschner, 1995). Sabe-se que enxofre e N estão associados no metabolismo da planta. Em algumas espécies, a redução da disponibilidade de sulfato altera o metabolismo de N, resultando em folhas com elevados níveis de nitrato (Prosser *et al.*, 2001). Wang *et al.* (2002) demonstraram interação entre K e deficiência de P em tomate, identificando genes que codificam fatores de transcrição e transportadores de nutrientes que foram induzidos por deficiência de K e P. Análises com plantas de *Arabidopsis thaliana* submetidas à deficiência de P mostraram regulação positiva para transportadores de enxofre e ferro (Misson *et al.* 2005).

Em estudo com sinalização da deficiência de P em *Arabidopsis thaliana*, Delatorre (2009) observou que o mutante *phosphate deficiency response 1 (pdr1)* apresenta características de sobreposição na sinalização da deficiência de P e N. Em geral, o excesso de N faz com que a planta prolongue a sua fase vegetativa e retarde seu florescimento. O *pdr1* apresentou florescimento tardio, intensificou a sensibilidade da raiz principal ao nitrato externo e aumentou a relação de matéria seca da parte aérea em relação à raiz em meio sem limitação de nutrientes. Estas características indicam que a mutação em *pdr1* também está relacionada à sinalização de N. Tais experimentos sugerem que os níveis de P afetam a absorção e uso de N e vice-versa, mas o conhecimento referente a essa sobreposição ainda é limitado e insuficiente para elucidar a interação N x P. Além de N x P, em *Arabidopsis thaliana* há evidências de interação entre P e Fe (Strieder, 2009). A interação P x Fe afeta o crescimento radicular, pois

esses nutrientes interagem no solo, na superfície radical e dentro da planta (Ward *et al.*, 2008).

## **2.5 Citocinina no desenvolvimento radical de plantas**

Citocininas são fitormônios relacionados à divisão e diferenciação celular. A atividade desse fitormônio é considerada essencial no desenvolvimento do sistema radicular (Werner & Schmulling, 2009). As citocininas são conhecidas há muitos anos por serem reguladores negativos do alongamento e da ramificação do sistema radicular (Skoog & Miller, 1957). Mais recentemente, Werner *et al.* (2010) conseguiram através de transformação genética reduzir a concentração interna desse fitormônio, resultando na formação de um sistema radicular maior quando comparado ao controle.

O papel da citocinina na divisão e diferenciação celular relaciona-se com a atividade das ciclinas. As ciclinas são uma família de proteínas que atuam na regulação do ciclo de divisão celular (mitose). Em experimento com cultura de tecidos de *Arabidopsis*, Riou-Khamlichi (1999) constatou que houve incremento de ciclina do tipo D (CycD3) em células de mutante com altos níveis de citocinina. Além disso, análises genéticas mostraram que a ação das citocininas está relacionada ao fator de transcrição *IAA3/SHY2*, que regula a atividade de vários genes e também é induzido por auxinas, aumentando a complexidade da ação desse fitormônio no metabolismo vegetal (Loio, 2007).

Em situações de deficiência nutricional, as plantas percebem a menor disponibilidade dos nutrientes e transmitem sinais de curta e longa distância (Zhang *et al.*, 2011). As citocininas, juntamente com açúcares e auxinas, podem ter papel de sinalização na transdução do sinal de longa distância na resposta do sistema radicular à condição nutricional do meio (Forde, 2002). Em milho, plantas que estavam sob

deficiência de N e receberam nitrato ou amônio, apresentaram estímulo à biossíntese de citocinina nas raízes, e após quatro horas, aumentaram a translocação de citocinina à parte aérea (Takei *et al.*, 2001). Como as citocininas são importantes reguladores do crescimento e divisão celular, é possível que as alterações na produção de citocininas possam ser parte do caminho que regula a morfogênese da planta em resposta a mudanças na disponibilidade de N e outros nutrientes (Beck, 1999; Walch-Liu *et al.*, 2000).

## **2.6 Análises de expressão de genes associados a deficiências de N e P**

As plantas utilizam diferentes mecanismos para contornar a condição de baixa disponibilidade de nutrientes. Induzir transportadores de alta afinidade, remobilizar nutrientes, utilizar rotas alternativas, reduzir crescimento e fotossíntese são estratégias geralmente adotadas pelas plantas em resposta às diferentes deficiências nutricionais (Muchhal & Raghothama, 1999; Yang *et al.*, 2009). Para entender esses mecanismos, muitos pesquisadores têm estudado a resposta das plantas à deficiência de nutrientes, através de análises genéticas (Panigrahy *et al.*, 2009).

Genes com expressão diferenciada em resposta a deficiências nutricionais foram caracterizados através de painéis de expressão gênica e análises proteômicas em diferentes espécies (Wang *et al.*, 2007). Através de microarranjo, ou seja, uma análise que permite visualizar simultaneamente a expressão de vários genes em resposta a uma condição nutricional, Nilsson *et al.* (2010) identificaram vários componentes regulatórios do metabolismo vegetal em resposta à deficiência de Pi. As variações na disponibilidade de N e P, bem como de outros nutrientes, geram alterações na arquitetura do sistema radicular (Hell & Hillebrand, 2001). Um grande número de genes de *Arabidopsis thaliana* que respondem à deficiência de N, P e K já foi identificado.

*Phosphate deficiency response 2 (PDR2)* e *zinc finger of Arabidopsis 6 (ZAT6)* foram identificados como genes capazes de modular a atividade meristemática e a arquitetura das raízes em resposta a disponibilidade de P (Ticconi *et al.*, 2004; Devaiah *et al.*, 2007). Recentemente, Zhang *et al.* (2011), com o auxílio da análise de expressão de genes *is situ* através do sistema de gene repórter GUS, conseguiram identificar que o gene *nutrition response and root growth (NRR)* age como peça fundamental no controle do desenvolvimento da arquitetura radicular de arroz em resposta à disponibilidade de macronutrientes.

Costa *et al.* (2011) verificaram que o mutante *pdr23* de *Arabidopsis thaliana* apresenta raiz primária curta na presença de nitrato e é ineficiente no uso de ácidos nucléicos como fonte de fósforo. Além disso, se ácidos nucléicos são usados como fonte alternativa desses nutrientes, a expressão do gene *QC25*, relacionado a atividade meristemática da raiz, é mantida na planta silvestre, mas não em *pdr23*.

## **2.7 Mapeamento de mutações em *Arabidopsis thaliana***

Identificar a localização do gene que confere determinada característica tem dois objetivos básicos: aumentar o entendimento a nível molecular como determinado processo fisiológico acontece e indicar o local onde um gene que tenha potencial de conferir características superiores a plantas cultivadas está contido.

O mapeamento de genes é ferramenta largamente utilizada para se identificar genes de diferentes organismos (Chi *et al.*, 2008). O princípio utilizado no mapeamento de determinado gene é sistematicamente reduzir o intervalo genético entre um marcador e uma mutação eventual, através da exclusão sequencial de todas as outras regiões genômicas (Lukowitz *et al.*, 2000). O mapeamento só pode ser realizado através de marcadores polimórficos entre os diferentes *backgrounds* genéticos utilizados para gerar

a população de mapeamento. Diferentes estratégias de mapeamento já foram descritas e todas necessitam de grande número de marcadores disponíveis para se ter adequada resolução de mapeamento. Este talvez seja o principal fator limitante para aumentar o número de genes mapeados até o momento (Pacurar *et al.*, 2012).

Para aumentar o número de genes localizados no genoma, a forma como genes são mapeados também vem sendo modificada. Nos últimos anos, os marcadores *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) vem sendo substituídos por marcadores baseados em PCR, como os *cleaved amplified polymorphic sequences* (CAPS) (Peters *et al.*, 2003), e recentemente novas formas de mapeamento vem sendo desenvolvidas, que utilizem nova geração de seqüenciamento baseada em *single nucleotide polymorphism* (SNPs), mostrando avanço nesse tipo de estratégia (Lister *et al.*, 2009).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de condução dos experimentos e material vegetal

Os experimentos foram realizados nos anos de 2010 e 2011 no Laboratório de Fisiologia e Biologia Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura, situado na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS.

A espécie utilizada em todos os experimentos foi *Arabidopsis thaliana*. O ecótipo Columbia (COL) foi utilizado como controle nos diferentes experimentos em que havia comparação de genótipos. O mutante *pdr1* é oriundo do genótipo silvestre COL, mas sua mutação recessiva culmina em fenótipo diferenciado. Sua seleção foi feita na presença de P apenas na forma orgânica (DNA), após mutação química induzida via etil-metano-sulfonato (EMS) (Chen *et al.*, 2000).

No mapeamento de *pdr1* foram realizados cruzamentos entre *pdr1* e o ecótipo Landsberg erecta (LER). O genitor feminino foi *pdr1* e o masculino LER. As plantas F<sub>1</sub> oriundas desse cruzamento autofecundaram, dando origem às plantas F<sub>2</sub>. As plantas F<sub>2</sub> foram crescidas em meio contendo Po e as com o fenótipo característico (raiz curta) foram selecionadas para a realização do mapeamento.

Para os estudos que visavam elucidar as respostas a N e P através da análise *in situ* da expressão de determinados genes, utilizou-se plantas do ecótipo COL transformadas (Tabela 1). Estas plantas tiveram o gene repórter GUS fusionado a promotores de genes responsivos a diferentes condições nutricionais. As linhagens

transgênicas avaliadas foram *CycB1::GUS*, *QC25::GUS*, *AtACP5::GUS* e *AtPT1::GUS*, permitindo visualizar a expressão de genes relacionados a respostas nutricionais no próprio tecido vegetal.

TABELA 1. Linhagens transgênicas utilizadas para visualizar a expressão de genes.

Genótipo	Notação do gene	Referência
<i>CycB1::GUS</i>	Indicador da transição da fase G2/M da divisão celular na raiz	Cólon-Carmona <i>et al.</i> (1999)
<i>QC25::GUS</i>	Indicador de atividade no centro quiescente da raiz	Sabatini <i>et al.</i> (1999)
<i>AtACP5::GUS</i>	Expressão de fosfatase ácida na raiz	Pozo <i>et al.</i> (1999)
<i>AtPT1::GUS</i>	Expressão de transportador de alta afinidade de P na raiz	Karthikeyan <i>et al.</i> (2002)

### 3.2 Condições de crescimento das plantas

As plantas foram conduzidas em sala de crescimento com condições ambientais controladas. A temperatura média do ar era mantida a 22°C ( $\pm 3^\circ\text{C}$ ). O provimento de radiação suplementar ocorria através de lâmpadas fluorescentes, com intensidade luminosa de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 h de luz, seguido de 8 h de escuro.

Em todos os experimentos, as plantas foram crescidas em placas de petri estéreis e descartáveis contendo o meio de crescimento sólido (fonte de nutrientes). As sementes eram dispostas em duas linhas horizontais dentro de cada placa. Quando uma das finalidades era a comparação entre genótipos, cada linha era composta por um genótipo específico.

As sementes foram desinfetadas através de lavagens sucessivas com solução desinfetante e água destilada. A solução desinfetante era composta de 0,6 ml de água, 0,9 ml de hipocloreto de sódio 2,5% e 1,5  $\mu\text{l}$  de Twin 20%. Para quebrar a dormência e

Para aumentar a homogeneidade do desenvolvimento das plantas, as sementes embebidas eram mantidas a 4°C por 48 horas antes de serem distribuídas nas placas. Após a distribuição das sementes, as placas eram vedadas com fita adesiva microporosa e posicionadas no estribo de alumínio.

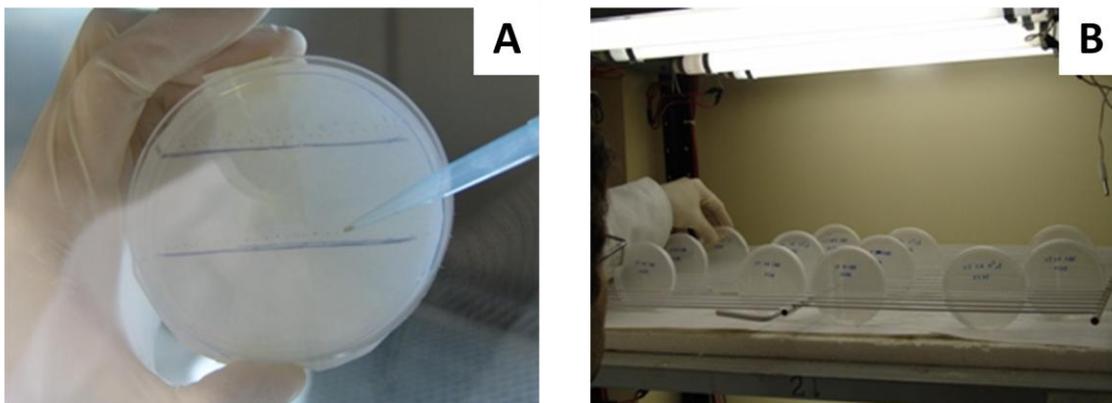


FIGURA 1. Distribuição das sementes nas placas (A) e disposição das placas nos suportes de alumínio na sala de crescimento (B).

### 3.3 Composição dos meios

Para a condução dos experimentos, foram utilizados meios de cultura com diferentes composições. Como padrão, utilizou-se meio descrito por Somerville & Ogren (1982), com 0,5% de sacarose e 0,8% de ágar *Micropropagation Agar-Type I* (Caisson Laboratories). A partir desse meio padrão, foram feitas alterações nas concentrações de N e P (Tabela 2). Conforme a finalidade do experimento, também se adicionou Po e citocinina, na forma de benzil amino purina (BAP). Os meios também continham, MES (0,25 M) como tamponante e vitaminas [myoinonitol (100 mg/l), nicotina (0,5 mg/l), piridoxina (0,5 mg/l) e tiamina (0,1 mg/l)]. O pH dos meios foi calibrado em 5,5.

Nos experimentos com meio sem N, o  $\text{KNO}_3$  e o  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  foram completamente removidos e adicionou-se  $\text{KCl}$  e  $\text{CaSO}_4$  para manter as quantidades de K e Ca do meio original. Nos experimentos em que a concentração de N era de 1 mM,

utilizou-se 1 mM de  $\text{KNO}_3$ , removeu-se o  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  e novamente equilibrou-se as concentrações de K e Ca através da adição de KCl e  $\text{CaSO}_4$ . Nos meios com a concentração de 100 mM de N, utilizou-se 100 mM de  $\text{KNO}_3$ , novamente foi removido o  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  e adicionado o  $\text{CaSO}_4$ , para suprir a necessidade de Ca das plantas.

TABELA 2. Composição do meio padrão e fontes de nutrientes.

Nutriente	Meio padrão	Fonte do nutriente	Fórmula química
N	9,00 mM	Nitrato de potássio	$\text{KNO}_3$
P	2,50 mM	Fosfato monopotássico	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
K	7,50 mM	Nitrato de potássio, fosfato monopotássico e/ou cloreto de potássio	$\text{KNO}_3$ , $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , KCl
Ca	2,00 mM	Nitrato de cálcio ou sulfato de cálcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , $\text{CaSO}_4$
Mg	2,00 mM	Sulfato de magnésio	$\text{MgSO}_4$
S	2,00 mM	Sulfato de magnésio	$\text{MgSO}_4$
Fe	50,00 $\mu\text{M}$	EDTA férrico	Fe-EDTA
B	70,00 $\mu\text{M}$	Ácido bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3$
Mn	14,00 $\mu\text{M}$	Cloreto de manganês	$\text{MnCl}_2$
Na	10,00 $\mu\text{M}$	Cloreto de sódio	NaCl
Zn	1,00 $\mu\text{M}$	Sulfato de zinco	$\text{ZnSO}_4$
Cu	0,50 $\mu\text{M}$	Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4$
Co	0,01 $\mu\text{M}$	Cloreto de cobalto	$\text{CoCl}_2$
Mo	0,20 $\mu\text{M}$	Molibdato de sódio	$\text{NaMoO}_4$

Quando o meio era sem P, o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foi removido e, para equilibrar as doses de K, foi adicionado KCl. Além disso, no meio utilizado para selecionar as plantas utilizadas para mapear a mutação em *pdr1*, removeu-se o Pi e adicionou-se Po na concentração de 0,6 mg ml<sup>-1</sup>. A fonte de Po adotada foi obtida a partir de “RNA de torula”. Para remover contaminantes e possíveis fontes de Pi, o Po foi purificado conforme protocolo descrito em Strieder (2009).

### 3.4 Caracterização de genótipos de *Arabidopsis thaliana* em diferentes concentrações de N e ausência de P

Para avaliar o crescimento de genótipos de *Arabidopsis thaliana* foram distribuídas aproximadamente 30 sementes por placa e 2 placas por tratamento (repetições experimentais). As plantas foram crescidas em condições sem P, variando somente a concentração de Ni no meio (0, 1, 10 e 100 mM). O crescimento da raiz primária do mutante *pdr1*, do ecótipo COL e das linhagens transgênicas *AtACP5::GUS* e *CycB1::GUS* foi avaliado aos 14 dias após a germinação (DAG). As placas foram fotografadas e o comprimento da raiz primária de cada planta foi medido através do programa *Image J* (*Image Processing and Analysis in Java*, disponível em: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) (Figura 2).

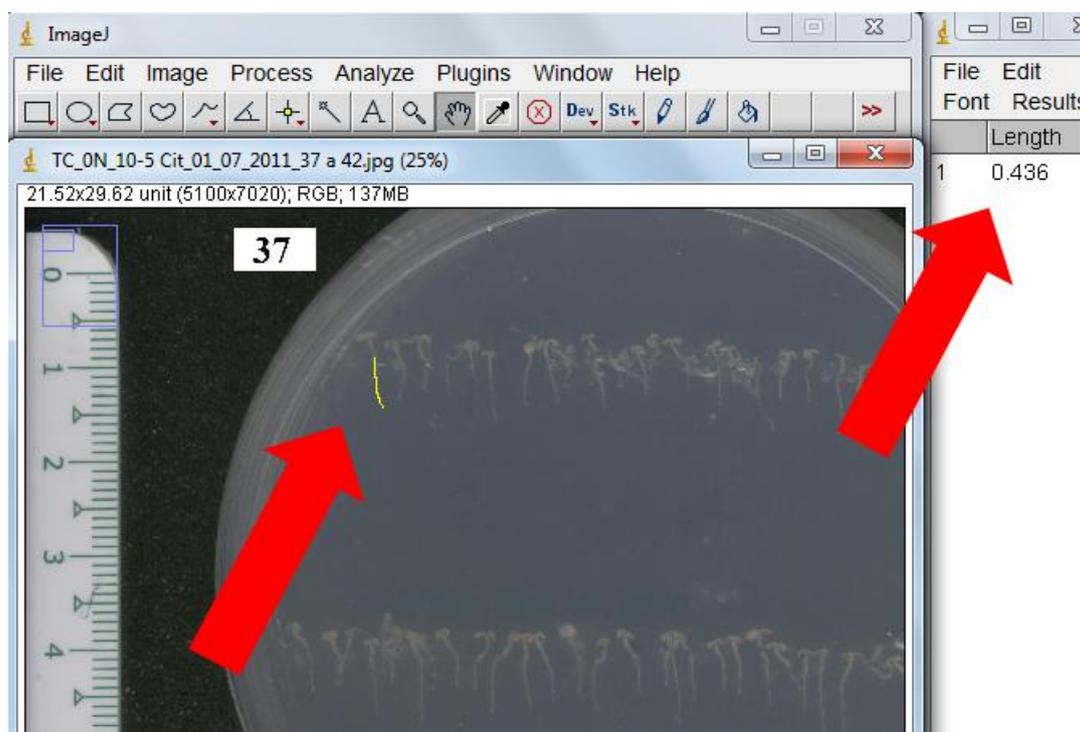


FIGURA 2. Medida de raiz de *Arabidopsis thaliana* através do programa *ImageJ*.

Além da caracterização do comprimento da raiz primária, *pdr1* e COL também tiveram a biomassa fresca da parte aérea e das raízes avaliadas. Após as plantas serem

fotografadas, separou-se a parte aérea das raízes com o auxílio de uma lâmina de corte. As partes aéreas das plantas que cresceram na mesma placa (unidade experimental) foram coletadas juntas e armazenadas no mesmo microtubo, assim como para as raízes. A massa total de cada microtubo, juntamente com a das partes aéreas ou das raízes foi pesada em uma balança de precisão e a diferença dessa medida e a de uma pesagem prévia do microtubo vazio resultou na massa do conjunto de plantas. Essa massa foi dividida pelo número de plantas contidas em cada placa para se obter a biomassa média de parte aérea e de raízes de cada repetição.

### **3.5 Alterações no crescimento radical em resposta a N, P e citocinina**

A caracterização da alteração no crescimento radical de *COL* e *pdr1* em diferentes condições de N (0, 1 e 100 mM), P (0 e 2,5 mM) e citocinina (0,  $10^{-8}$  e  $10^{-5}$  mM) foi realizada em dois experimentos diferentes: um em que as plantas foram crescidas com fósforo disponível e outro sem. Para esses experimentos foram utilizadas aproximadamente 30 sementes por placa e 6 placas por tratamento (repetições experimentais). Optou-se por utilizar esse elevado número de repetições devido à heterogeneidade da resposta nas condições testadas.

O crescimento radical foi avaliado aos 8, 11 e 14 DAG. Para se avaliar a evolução do crescimento radical na raiz principal sem alterar as condições em que as plantas estavam sendo crescidas, as placas foram escaneadas sem serem abertas e recolocadas aleatoriamente no local de crescimento. Através das imagens geradas pelo escâner foram feitas as mensurações do crescimento radical. O software utilizado para a mensuração da raiz principal novamente foi o *Image J (Image Processing and Analysis in Java)*, disponível em: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.

### 3.6 Análise *in situ* da expressão de genes em resposta a N, P e citocinina

A análise *in situ* da expressão de genes foi realizada em linhagens transgênicas buscando entender como determinados genes estavam sendo expressos em função do tratamento aplicado e quais as respostas no desenvolvimento do sistema radicular dessas plantas. Para isso, utilizou-se linhagens transgênicas que permitissem a visualização da condição de divisão celular nos meristemas da raiz principal (*CycB1::GUS*), a diferenciação celular junto ao centro quiescente (*QC25::GUS*), a produção de fosfatases ácidas (*AtACP5::GUS*) e a presença de transportadores de alta afinidade de fósforo (*AtPT1::GUS*).

A utilização do sistema gene repórter GUS permite que as plantas sejam avaliadas praticamente no momento em que as respostas ao tratamento estiverem ocorrendo. Isso é possível porque nessas linhagens transgênicas os promotores dos genes de interesse estão fusionados com o gene que expressa a enzima  $\beta$ -glucuronidase, ou seja, a expressão só é visualizada nos tecidos e no momento em que os genes estão sendo expressos.

Para se visualizar a expressão de GUS, as plantas foram coletadas e fixadas em acetona 80% e incubadas em gelo por 20 minutos (Vitha *et al.*, 1995). Após a remoção da acetona, iniciou-se um ciclo de lavagens. O material vegetal era totalmente imerso em solução de tampão citrato 2X (pH 7,0) contendo citrato de sódio 0,1M e ácido clorídrico 0,2 N por 10 minutos. Após esse período, essa solução era removida e repetia-se a imersão por mais duas vezes. Após a lavagem, adicionou-se solução com X-Gluc (1 mg de X-Gluc em 0,1 ml de metanol; 1 ml de tampão citrato 1X; 400  $\mu$ l de ferrocianeto de K 5 mM; 400  $\mu$ l de ferricianeto de K 5 mM; 10  $\mu$ l de Triton X-100 10% e 50  $\mu$ l de água milliQ autoclavada). As plantas eram incubadas no escuro e mantidas em geladeira, somente por questão de armazenamento, por aproximadamente

16 horas (nunca ultrapassando 24 horas). Após o período de reação, os materiais foram lavados com água milliQ e incubados em álcool 70% por uma hora. Após a remoção do álcool e nova lavagem com água, o material foi fixado em glicerol 50%. As raízes das plantas foram visualizadas em microscópio ótico. Foram montadas lâminas com lamínula e a expressão dos genes foi fotografada nos aumentos de 40 e 100X.

Nos tratamentos com diferentes concentrações de N (0, 1 e 100 mM), P (0 e 2,5 mM) e citocinina (0 e  $10^{-5}$  mM), foram avaliadas pelo menos 10 plantas representativas, ou seja, plantas com crescimento padrão para o determinado tratamento. Dessas plantas, será apresentada apenas uma imagem da região da raiz onde determinado gene é expresso e que representa o padrão médio observado para cada tratamento.

### **3.7 Mapeamento da mutação em *pdr1***

Para realizar o mapeamento genômico da mutação presente em *pdr1* utilizou-se a técnica de *chromosome walking*, conforme o método de Jander (2006). O mutante *pdr1* foi cruzado com o ecótipo Landsberg (LER), a F<sub>1</sub> foi avaliada molecularmente para confirmação do cruzamento e transferida para solo, para obtenção das sementes F<sub>2</sub>. Os cruzamentos e a condução das populações segregantes até F<sub>2</sub> foi realizado por Cibele Tesser da Costa no ano de 2009. Posteriormente, as sementes F<sub>2</sub> foram esterilizadas superficialmente e germinadas em meio contendo ácidos nucleicos como fonte de P. As plantas F<sub>2</sub> que apresentaram raiz curta (homozigotas para a mutação) foram selecionadas e transferidas para solo. Essas plantas foram crescidas por aproximadamente 45 dias em ambiente controlado e com suficiência de nutrientes. Após o seu crescimento, coletou-se folhas e flores destas plantas para obtenção de seu DNA. O método de extração de DNA utilizado foi o de Glazebrook *et al.* (1998). O DNA

extraído foi quantificado em espectrofotômetro e em gel de agarose (Figura 3). O número de indivíduos utilizados no mapeamento foi 28.

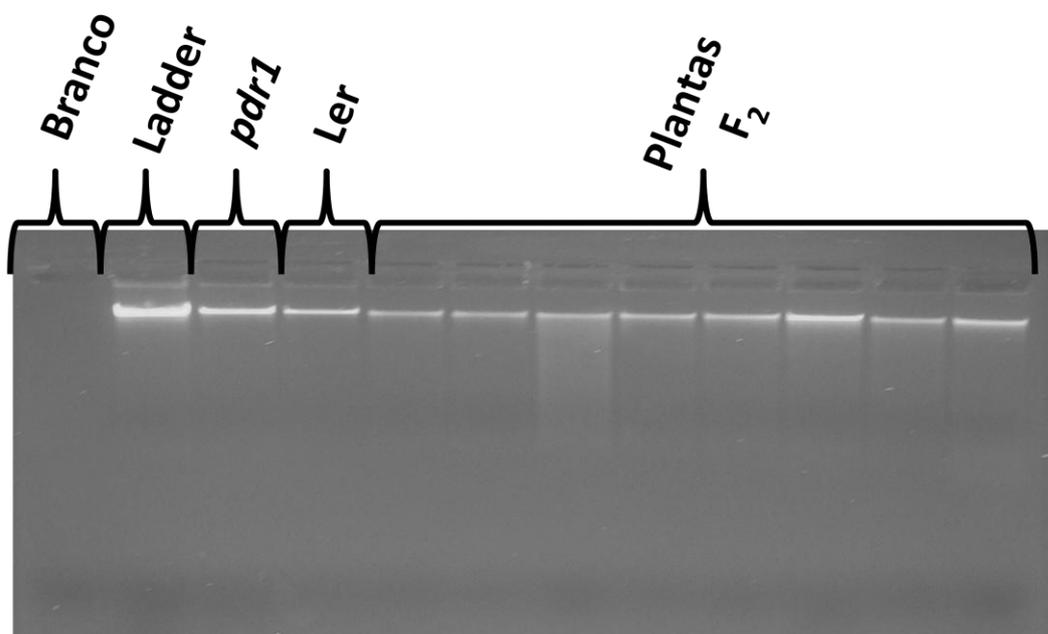


FIGURA 3. Análise da qualidade de DNA em gel de agarose 1,5%.

Para as reações de amplificação de DNA (PCR), utilizou-se marcadores moleculares *cleaved amplified polymorphisms* (CAPS), os quais estão descritos no portal eletrônico *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR). As reações de PCR foram efetuadas em placas multi canal com 96 poços. A reação molecular constou de 2  $\mu\text{l}$  solução tampão de Taq 10 x, 0,8  $\mu\text{l}$  de primers (*forward + reverse*) na concentração de 0,3  $\text{pmol}\mu\text{l}^{-1}$ , 0,6  $\mu\text{l}$  de dNTP 5 mM, 0,3  $\mu\text{l}$  de Taq polimerase, 6  $\mu\text{l}$  de DNA na concentração de 85  $\text{ng}\mu\text{l}^{-1}$  e água deionizada até completar 20  $\mu\text{l}$  por amostra. Após a amplificação, os fragmentos foram cortados com enzimas de restrição específica para cada marcador. A revelação dos resultados obtidos foi efetuada em gel de agarose 3%, com tempo de migração em torno de 2,5 h, seguido de revelação em transiluminador de ultravioleta. A imagem obtida do gel foi posteriormente analisada, discriminando-se as

bandas formadas entre aquelas com tamanho similar àquela verificada em COL e as semelhantes a LER, além de agrupar as que apresentaram bandas de ambos os ecótipos.

Ao final, calculou-se a proporção de alelos de LER (0 – *pdr1*, 1 – heterozigoto, 2 – LER) dividido pelo número total de alelos possíveis para cada marcador. Ao todo, foram utilizados 15 marcadores (Tabela 3). Com isso, obteve-se a porcentagem de alelos LER em relação ao total, cuja frequência de recombinação [FR (%)] é a estimativa da distância genética entre o marcador e o gene mutado (Pacurar *et al.*, 2012).

TABELA 3. *Primers* e enzimas de restrição utilizados nas ampliações de DNA para o mapeamento da mutação em *pdr1*.

<i>Primer</i>	Cromossomo	Enzima de restrição	Sentido	Sequência nucleotídica
ADH	1	XBAI	F* R	AAAAATGGCAACACTTTGAC GCGTGACCATCAAGACTAAT
GAPB.2	1	DDEI	F R	CACTATGTTTCAGTGCTGCG GATCACTTGCAGCTATGGC
M235	1	HINDIII	F R	AGTCCACAACAATTGCAGCC GAATCTGTTTCGCCTAACGC
NCC1	1	RSAI	F R	AAGTTATAAGGCATTAGAATCATAATC GTCCTATCTCTACGATGTGGATG
COP1	2	MSEI	F R	GCTCGGCATGTGTCAAAA CCACTCAGCGCATCCTTC
THY1	2	RSAI	F R	AACCGCCATTTTCATTCTATC GGCGACCTTGGACCTGTATACG
G4711	3	HINDIII	F R	CCTGTGAAAAACGACGTGCAGTTTC ACCAAATCTTCGTGGGGCTCAGCAG
NIT1.2	3	-	F R	CGGAATTGATGTTTTGGACC CCCTACATTCTACAACCATGTAGCC
CAT2	4	DDEI	F R	GACCAGTAAGAGATCCAGATACTGCG CACAGTCATGCGACTCAAGACTTG
G4539	4	HINDIII	F R	GGACGTAGAATCTGAGAGCTC GGTCATCCGTTCCCAGGTAAAG
T15D16	4	MSEI	F R	AATCAATTGGTTTCTACTTTTTAG AACTCCGACTGAAGGTATAGC
EG7F2	5	XBAI	F R	GCATAGAATTTGACGATAACGAGC GATCTGTGTAGGACTACGAGAC
F13K20	5	MSEI	F R	TTTGTGCAATTTATTAGGGTAG ATTTGCAGAAGTTGAAGTTGGTC
KLPNHC	5	ECORI	F R	CGTTGCTCGTGGATTTGTAA CTTGTATAAGTTCTTGCCTGTGA
PAT1.1	5	DDEI	F R	GTATGAGAACATAGTAACCCCATG GTCGACGTGGTGCGGTGGGTTG

\*F – *forward*, R – *reverse*.

### **3.8 Perfil de expressão de genes alterados em *pdr1***

Para estudar os genes alterados em *pdr1*, o mutante e o ecótipo COL foram crescidos por 7 dias em meio completo contendo 9 mM de Ni. O RNA foi extraído somente das raízes. A expressão de genes de COL foi considerada como padrão, e se observou as alterações em *pdr1*. A notação de cada gene observado no perfil de expressão foi atualizada junto ao TAIR em dezembro de 2011.

Os dados desse experimento foram gerados por Carla Andréa Delatorre e a metodologia encontra-se descrita em Delatorre (2002). A expressão gênica foi considerada diferente entre *pdr1* e COL quando diferiram mais de 20%. Devido ao grande número de genes visualizados, somente estão descritos nesse trabalho os genes com expressão em *pdr1* pelo menos duas vezes superior ou inferior a COL e que fossem úteis no entendimento do papel dessa mutação.

### **3.9 Análise estatística**

Os dados foram avaliados através do programa estatístico SAS (*Statistical Analysis System*). Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) *one-way* ou análise de modelos lineares (GLM) e o teste t ou Duncan para a comparação entre as médias, ao nível de 5% de significância.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização preliminar de *pdr1*

O mutante *pdr1* e o ecótipo COL de *Arabidopsis thaliana* foram caracterizados preliminarmente através da visualização do comprimento de sua raiz primária e biomassa da parte aérea – “Estudo 1”. Esse estudo teve como objetivo testar o crescimento de raiz primária de *pdr1* e COL em diferentes doses de Ni (0, 1, 10 e 100 mM) e sob ausência de P. Devido a suas funções no metabolismo vegetal, esses nutrientes interferem no tamanho e na arquitetura do sistema radicular, modificando a capacidade das plantas de obter água e outros nutrientes, sendo um dos principais limitantes no crescimento e no rendimento de plantas cultivadas (Price *et al.*, 1997).

O mutante *pdr1* de *Arabidopsis thaliana* foi selecionado para esse estudo devido ao menor crescimento de sua raiz primária na presença de fósforo orgânico. Além disso, esse mutante também apresentou um comportamento de hipersensibilidade ao Ni em experimentos conduzidos por Delatorre (2002), sugerindo que o gene mutado afetasse não somente a sinalização de P, mas também a de N.

Nesse estudo, observou-se que os genótipos tiveram crescimento de raiz primária diferentes em função da concentração de Ni no meio. A raiz primária de COL dobrou de comprimento com a adição de 1 mM de N ( $1,29 \pm 0,09$  e  $2,68 \pm 0,03$  cm respectivamente) e essa diferença se manteve na concentração de 10 mM de Ni ( $2,53 \pm 0,46$  cm). COL apresentou comprimento de raiz primária aproximadamente duas

vezes o de *pdr1* quando havia Ni disponível. Além disso, o mutante *pdr1*, diferente de COL, não apresentou aumento no comprimento da raiz primária quando a concentração de Ni foi elevada de 0 para 1 mM (que foi de  $1,21 \pm 0,19$  e  $1,14 \pm 0,01$  cm respectivamente). Nos resultados obtidos nesse trabalho o mutante *pdr1* não mostrou uma resposta de hipersensibilidade ao Ni quando crescido em ausência de fósforo, mas não respondeu a adição de Ni, diferindo drasticamente no comprimento da raiz primária em relação à COL. Possivelmente a mutação em *pdr1*, além de afetar a percepção de P, também afete a percepção ou a resposta a Ni. Há duas principais hipóteses para isso, na primeira, a utilização de EMS para gerar a mutação pode ter afetado algum outro gene ligado (*pdr1* foi retrocruzado 3 vezes com COL antes do início dos estudos para remoção de mutações adicionais não relacionadas ao fenótipo raiz curta), na segunda, o gene mutado em *pdr1*, além de fazer parte do sistema de resposta de P, também faça do de N. Fazendo com que *pdr1*, além de ter alterado a resposta a P, também tenha alterado a percepção, sinalização ou resposta à condição de N no meio.

Respostas ao N no comprimento da raiz primária de *Arabidopsis thaliana* crescida de forma muito similar ao desse estudo também foram encontradas por Linkohr *et al.* (2002). No experimento, os pesquisadores utilizaram doses elevadas de nitrato que também reduziram o comprimento da raiz primária. Ao contrário dos resultados obtidos no presente trabalho e por Linkohr *et al.* (2002), Zhang & Forde (1998) não observaram redução no comprimento da raízes variando as concentrações de Ni de 0,01 até 100 mM. O principal motivo para esse resultado diferente, encontrado por Zhang & Forde, pode ter sido a avaliação das plantas em uma fase mais precoce, ou, a utilização de plantas mais tolerantes a concentrações elevadas de Ni (seleção indireta de plantas crescidas em ambientes com elevada quantidade de nutrientes no meio).

O mutante *pdr1* e COL apresentaram comportamentos similares no acúmulo de biomassa da parte aérea quando crescidos em meio sem fósforo e com diferentes concentrações de Ni no meio. A biomassa acumulada em *pdr1* foi superior na concentração mais elevada de Ni (100 mM),  $3,00 \pm 1,00$  mg e similar nas concentrações de 0, 1 e 10 mM ( $0,33 \pm 0,02$ ,  $1,36 \pm 0,23$ ,  $1,28 \pm 0,20$  mg respectivamente). Para COL não houve diferença no acúmulo de biomassa da parte aérea para as concentrações de 0, 1 10 e 100 mM de Ni utilizadas ( $0,45 \pm 0,03$ ,  $1,27 \pm 0,07$ ,  $1,23 \pm 0,29$  e  $1,84 \pm 0,93$  mg respectivamente).

Devido ao pequeno número de repetições e a grande variação na biomassa entre repetições na concentração de 100 mM de Ni não foi possível diferenciar *pdr1* e COL, mas em função das médias observadas, parece que a mutação em *pdr1* também pode afetar a alocação de biomassa na parte aérea em resposta a altas concentrações de Ni. Além disso, nesse experimento preliminar a resposta das plantas a concentração de 1 e 10 mM de nitrato foi muito similar. Devido a isso, estabeleceu-se três doses de Ni para se estudar o comprimento da raiz primária frente a esse nutriente: 0 mM (ausente), 1 mM (normal) e 100 mM (elevada).

#### **4.2 Caracterizações do comprimento da raiz primária em função da concentração de N, P e citocinina no meio**

Devido ao comportamento diferenciado de *pdr1* a P e a N, além da resposta a esses nutrientes também se buscou entender a resposta desse mutante ao fitormônio citocinina. A citocinina é responsável por inibir o crescimento radicular e favorecer o crescimento da parte aérea das plantas. Este hormônio é também considerado o sinalizador da disponibilidade de N. Eventuais ajustes na arquitetura radical em condições deficientes em P podem relacionar-se com a interação entre P e citocinina

(Strieder, 2009). Rubio *et al.* (2009) sugerem também que a citocinina exógena inibe as respostas ao status de Pi total da planta. A fim de estudar essa situação, foram conduzidos dois experimentos: um com fósforo e diferentes concentrações de nitrato e citocinina e outro sem fósforo e diferentes concentrações de nitrato e citocinina.

Os experimentos que avaliam o comprimento da raiz primária muitas vezes apresentam respostas contrastantes em função da metodologia aplicada, como mostrado anteriormente nos trabalhos de Linkohr *et al.* (2002) e Zhang & Forde (1998). A época de avaliação do comprimento radicular pode interferir nos resultados obtidos, principalmente nas respostas entre genótipos. Para se observar as diferentes respostas no comprimento da raiz primária em função de diferentes condições de N, P e citocinina, avaliou-se essa característica em diferentes épocas, a fim de identificar se as diferenças entre genótipos dentro de cada tratamento se alteravam com o tempo.

Esse conjunto de experimentos foi denominado “Estudo 2”. Inicialmente, os resultados serão apresentados e discutidos comparando *pdr1* e COL nas diferentes condições de P, N e citocinina, em diferentes épocas de avaliação (8, 11 e 14 DAG). Em um segundo momento será discutido o efeito do nitrato e da citocinina no comprimento da raiz primária dentro de cada genótipo e por último será discutida a interação nitrato x citocinina nos dois experimentos (com e sem fósforo).

#### **4.2.1 Diferenças no comprimento da raiz primária de *pdr1* e COL em resposta N, P e citocinina**

No experimento sem fósforo, quando as plantas cresceram livres de citocinina exógena, ocorreram diferenças no comprimento da raiz primária de *pdr1* e COL (Figura 4).

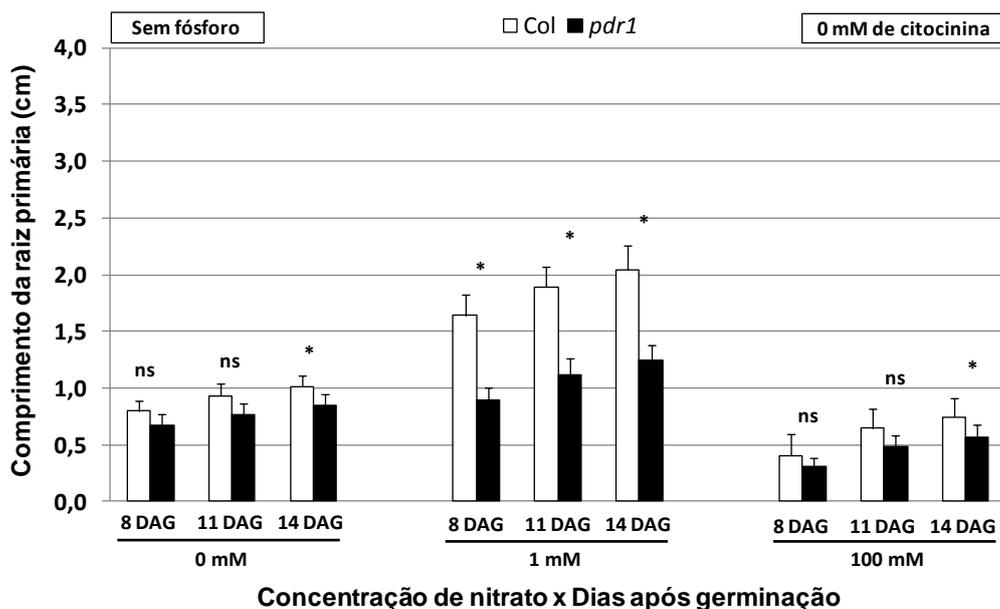


FIGURA 4. Comprimento da raiz primária de COL (barras brancas) e *pdr1* (barras pretas) sob deficiência de P e diferentes disponibilidades de N ao longo do tempo, 8, 11 e 14 dias após a germinação (DAG). “\*” diferença significativa entre genótipos e “ns” diferença não significativa, teste t ( $p \leq 0,05$ ). As barras superiores representam o desvio padrão.

No tratamento com 0 mM de nitrato, *pdr1* e COL só apresentaram diferença significativa aos 14 DAG, sendo o comprimento da raiz primária de *pdr1* levemente inferior ao de COL. Quando a concentração de nitrato foi de 1 mM, ou seja, uma condição de nitrato suficiente para o crescimento normal das raízes nesse tipo de experimento, as diferenças entre *pdr1* e COL ocorreram nas três épocas de avaliação. Nesse tratamento, o comprimento médio da raiz de *pdr1* foi aproximadamente 45% inferior ao de COL. No tratamento com 100 mM de nitrato, novamente só se observou uma pequena diferença entre *pdr1* e COL quando as plantas tiveram o seu crescimento radicular avaliado aos 14 DAG.

Os resultados apresentados na Figura 4, além de mostrarem as diferenças no comprimento da raiz primária entre *pdr1* e COL, também foram muito úteis para evidenciar a importância da época de avaliação das plantas nesse tipo de estudo. A

época de avaliação mais tardia, aos 14 DAG, mostrou diferenças entre *pdr1* e COL que não foram visualizadas aos 8 e 11 DAG. Em um experimento conduzido por Linkohr *et al.* (2002), avaliando o comprimento da raiz primária e de raízes laterais em duas épocas, também se observou maior capacidade de diferenciar tratamentos na época mais tardia. A concordância desses resultados com o presente trabalho se deve ao fato de que a raiz primária aumenta seu tamanho concomitantemente com a idade da planta, aumentando a chance de se obter diferenças estatísticas quando as plantas são avaliadas mais tardiamente, devido aos efeitos acumulativos.

Quando as plantas foram crescidas com fósforo e livre de citocinina, não houve diferença entre *pdr1* e COL em nenhuma das condições de crescimento das plantas (Figura 5). O tratamento com 100 mM de Ni foi o que propiciou menor crescimento das raízes e o de 0 e 1 mM foram praticamente iguais.

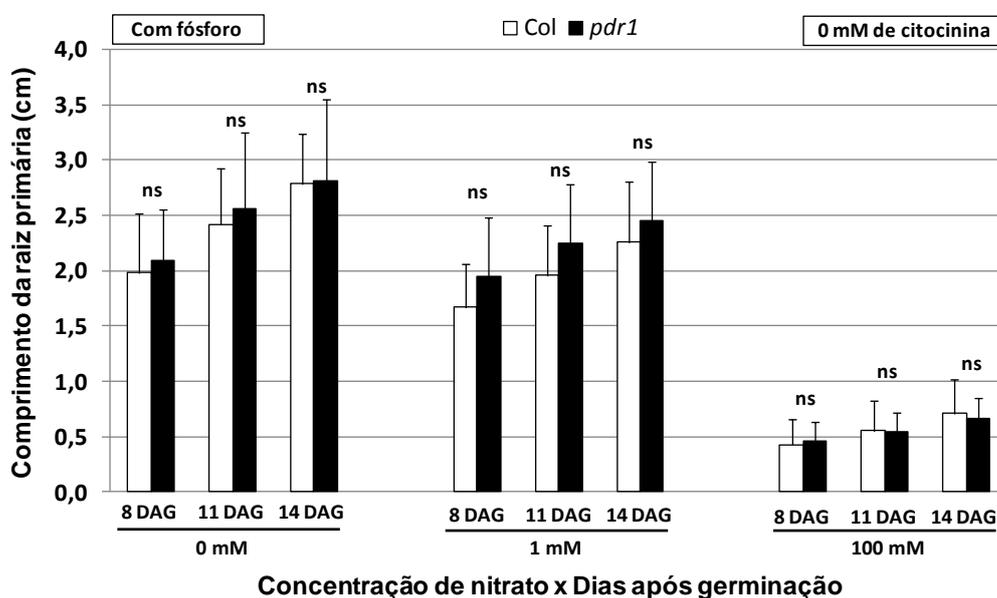


FIGURA 5. Comprimento da raiz primária de COL (barras brancas) e *pdr1* (barras pretas) sob suficiência de P e diferentes disponibilidades de N ao longo do tempo, 8, 11 e 14 dias após a germinação (DAG). “\*” diferença significativa e “ns” diferença não significativa, teste t ( $p \leq 0,05$ ). As barras superiores representam o desvio padrão.

As diferenças entre *pdr1* e COL mostram que o mutante *pdr1* apresenta hipersensibilidade ao nitrato somente sob deficiência de Pi (Figuras 4 e 5). Delatorre (2002) também estudou esse mutante e sugeriu que estaria ocorrendo sobreposição da sinalização de N e P. Mas essa sobreposição só acontece em duas situações: quando *pdr1* é crescido em meio sem Pi ou quando é crescido em meio contendo Po (RNA e DNA como fontes de P), tendo em vista que esse mutante é comprovadamente incapaz de utilizar mecanismos de resgate de Pi. Além disso, Delatorre (2002), também relatou a possibilidade de que o fitormônio citocinina pudesse estar envolvido tanto na sinalização de Pi como de Ni.

No experimento sem fósforo, mas com as plantas crescendo em um meio com  $10^{-8}$  mM de citocinina, *pdr1* e COL se diferenciaram em todas as situações (Figura 6).

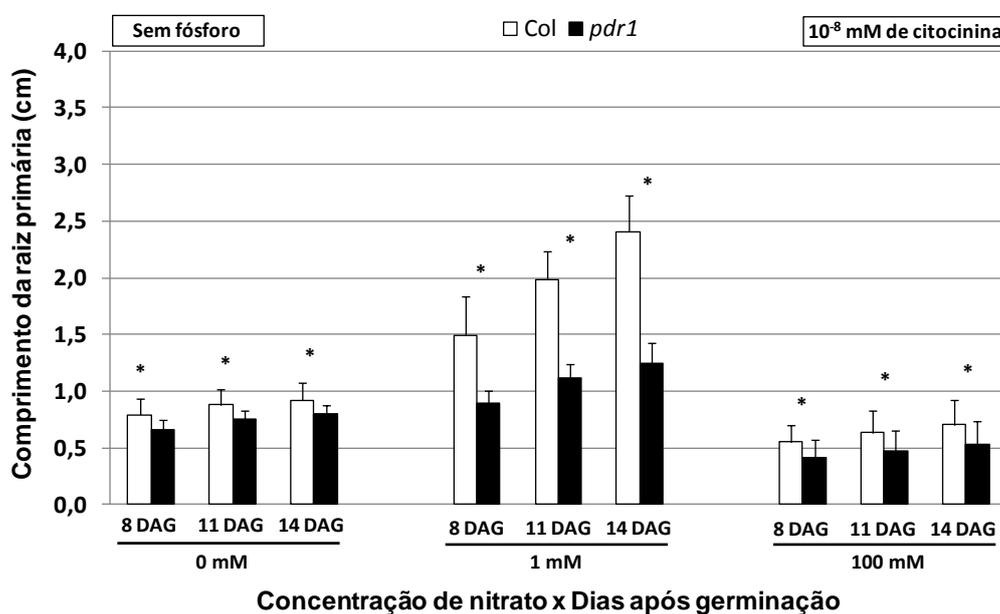


FIGURA 6. Comprimento da raiz primária de COL (barras brancas) e *pdr1* (barras pretas) sob deficiência de P e diferentes disponibilidades de N na presença de citocinina ( $10^{-8}$  mM) ao longo do tempo, 8, 11 e 14 dias após a germinação (DAG). “\*” diferença significativa e “ns” diferença não significativa entre genótipos, teste t ( $p \leq 0,05$ ). Barras superiores representam o desvio padrão.

A presença de baixo nível de citocinina permitiu verificar diferenças entre os genótipos mais precocemente, nos níveis de 0 e 100 mM de Ni, do que na ausência deste fitormônio (Figura 4). Novamente, como no tratamento sem citocinina, o comprimento médio de *pdr1* se manteve aproximadamente 45% inferior ao de COL. Trabalhando com outros mutantes (*p9*, *p23* e *p37*) obtidos na mesma seleção que *pdr1*, Strieder (2009) também encontrou respostas similares para essa concentração de citocinina.

As plantas que foram crescidas com fósforo, mas com  $10^{-8}$  mM de citocinina no meio, também não mostraram diferenças significativas entre *pdr1* e COL ao longo do tempo e nos três tratamentos com Ni (Figura 7). Provavelmente, o estímulo para crescimento radicular causado pelo Pi é superior ao da concentração de  $10^{-8}$  mM de citocinina, fazendo com que não ocorra diferença significativa entre *pdr1* e COL.

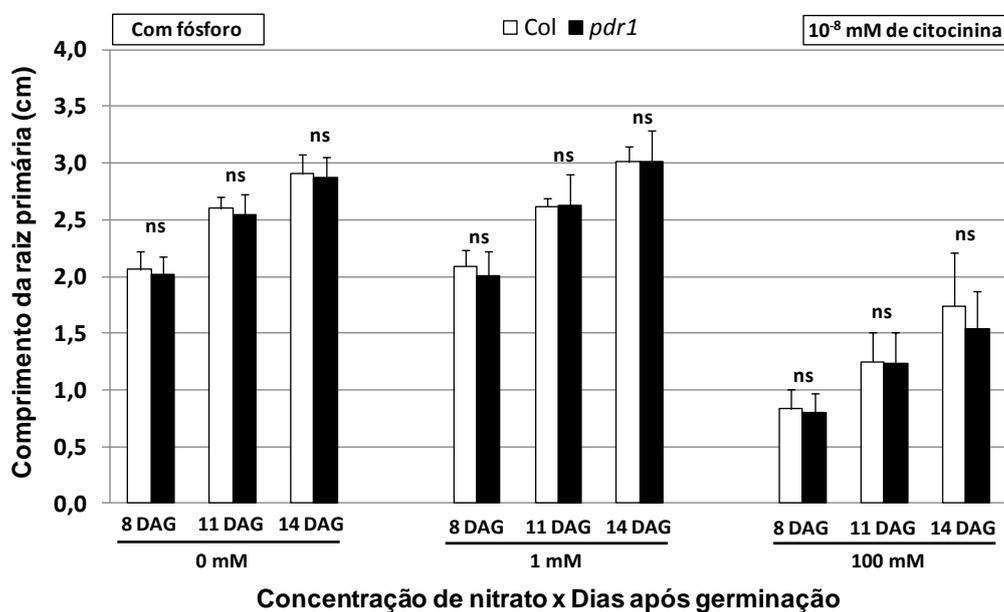


FIGURA 7. Comprimento da raiz primária de COL (barras brancas) e *pdr1* (barras pretas) sob suficiência de P e diferentes disponibilidades de N na presença de citocinina ( $10^{-8}$  mM) ao longo do tempo, 8, 11 e 14 dias após a germinação (DAG). “\*” diferença significativa e “ns” diferença não significativa entre genótipos, teste t ( $p \leq 0,05$ ). Barras superiores representam o desvio padrão.

As citocininas exercem papel fundamental no desenvolvimento da arquitetura radicular. A adição de pequena quantidade de citocinina exógena ( $10^{-8}$  mM) antecipou a percepção da diferença do comprimento da raiz primária de *pdr1* em relação à COL nos experimentos sem fósforo. Sem citocinina, a diferença só ocorreu aos 14 DAG na concentrações de 0 e 100 mM de Ni (Figura 4), mas com  $10^{-8}$  mM de citocinina as diferenças já apareceram aos 8 DAG para a concentrações de 0 e 100 mM de Ni (Figura 6). Ou seja, quando *pdr1* estava na condição sem disponibilidade de Pi, uma pequena concentração de citocinina também provocou resposta de hipersensibilidade a Ni. Esse resultado comprova que ocorre redução do comprimento da raiz primária de *pdr1* não só quando são adicionadas pequenas doses de Ni (Delatorre, 2002), mas também quando uma pequena quantidade de citocinina exógena é adicionada ao meio, ou que *pdr1* não responde ao estímulo causado por  $10^{-8}$  mM de citocinina como COL. Possivelmente isso aconteça porque *pdr1* é um sinalizador da condição de N e P, que é acionado sob condições de deficiência de P e gera crescimento da raiz primária. Além disso, devido à biossíntese de citocinina na planta ser estimulada pela presença de Ni, *pdr1* também responde a esse fitormônio, mesmo quando adicionado em uma pequena concentração ( $10^{-8}$  mM).

Quando a concentração de citocinina do experimento sem fósforo foi elevada para  $10^{-5}$  mM foram observadas diferenças no comprimento da raiz primária de *pdr1* e COL aos 8, 11 e 14 DAG somente nas concentrações de 0 e 1 mM de nitrato (Figura 8). O tratamento com 100 mM de nitrato e  $10^{-5}$  mM de citocinina reduziu drasticamente o comprimento da raiz primária de *pdr1* e COL, não havendo diferença entre os genótipos.

Ao contrário dos resultados anteriores em meio com fósforo e com 0 e  $10^{-8}$  mM de citocinina, o aumento da concentração de citocinina para  $10^{-5}$  mM de citocinina reduziu o comprimento da raiz primária e fez com que *pdr1* e COL tivessem diferenças nos tratamentos nas concentrações de 1 e 100 mM de nitrato (Figura 9). Quando a concentração de nitrato era de 1 mM, *pdr1* e COL se diferenciaram nas três épocas de avaliação. Na concentração de 100 mM de Ni somente se observou diferença entre *pdr1* e COL quando as plantas foram avaliadas aos 11 DAG. As raízes primárias de COL mostraram-se ligeiramente mais longas que as de *pdr1*. O maior comprimento das raízes de COL em relação às de *pdr1* na presença de citocinina sugere que *pdr1* possua maior sensibilidade a este fitohormônio.

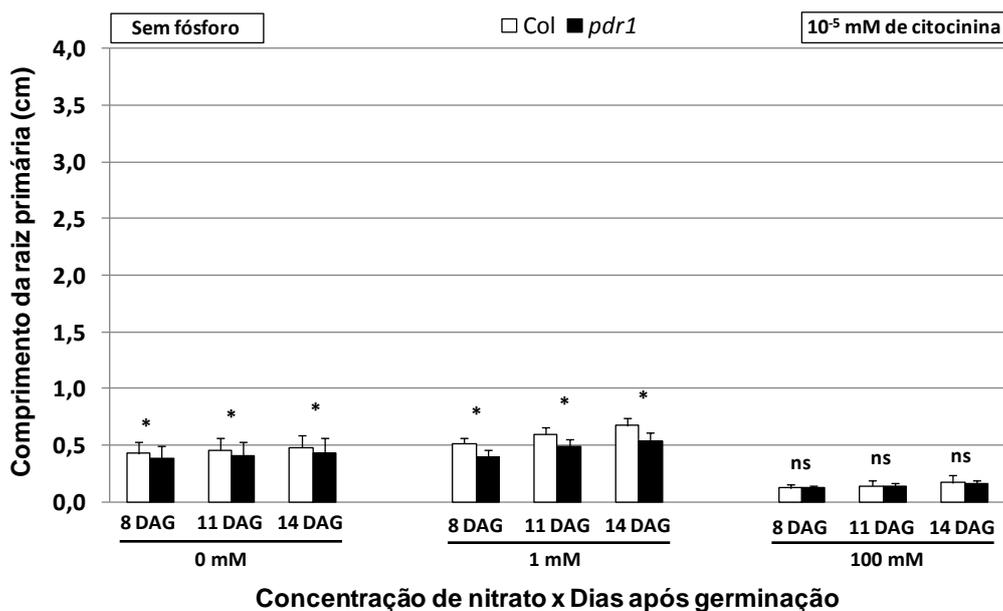


FIGURA 8. Comprimento da raiz primária de COL (barras brancas) e *pdr1* (barras pretas) sob deficiência de P e diferentes disponibilidades de N na presença de citocinina ( $10^{-5}$  mM) ao longo do tempo, 8, 11 e 14 dias após a germinação (DAG). “\*” diferença significativa e “ns” diferença não significativa entre genótipos, teste t ( $p \leq 0,05$ ). Barras superiores representam o desvio padrão.

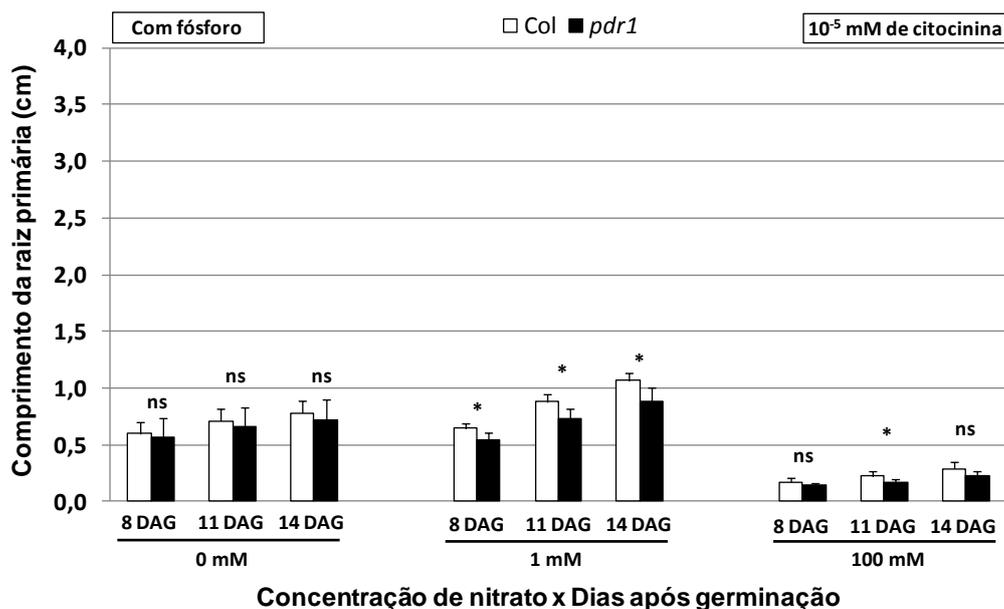


FIGURA 9. Comprimento da raiz primária de COL (barras brancas) e *pdr1* (barras pretas) sob suficiência de P e diferentes disponibilidades de N na presença de citocinina ( $10^{-5}$  mM) ao longo do tempo, 8, 11 e 14 dias após a germinação (DAG). “\*” diferença significativa e “ns” diferença não significativa entre genótipos, teste t ( $p \leq 0,05$ ). Barras superiores representam o desvio padrão.

O comprimento da raiz primária dos mutantes *p9*, *p23* e *p37* também foi avaliado em plantas crescidas por 8 dias em diferentes concentrações de citocinina. Nesse experimento, Strieder (2009) não encontrou diferença no comprimento da raiz primária dos mutantes crescidos em meio com  $10^{-5}$  mM de citocinina, independente da disponibilidade de Pi. Diferente dos resultados obtidos com os mutantes *p9*, *p23* e *p37*, no presente trabalho são observadas diferenças entre *pdr1* e COL crescidas com e sem Pi e avaliadas em diferentes épocas. Provavelmente, essa diferente resposta se deve ao fato de que os mutantes utilizados por Strieder (2009) não apresentaram as características de hipersensibilidade ao nitrato e também à citocinina como no caso de *pdr1*.

#### 4.2.2 Efeito de diferentes concentrações de N, P e citocinina no comprimento da raiz primária de *pdr1* e COL

De maneira geral, as plantas apresentaram maior comprimento da raiz primária quando a concentração de nitrato era de 1 mM. Quando a concentração de nitrato foi elevada para 100 mM ou a de citocinina para  $10^{-5}$  mM ocorreu redução significativa no comprimento da raiz primária para ambos os genótipos, mas com maior intensidade em *pdr1*.

A importância de observar a resposta das plantas a diferentes concentrações de N se deve ao fato de que esse nutriente é fundamental para a produção da maioria das culturas. Vários pesquisadores já estudaram o efeito de níveis desse nutriente em plantas vasculares (Walch-Liu, 2006; Wang *et al.*, 2007; Delatorre, 2009; Strieder, 2009). Além disso, também se estuda a interação do N com outros nutrientes, como P e ferro, ou com fitormônios, como auxina e citocinina (Chevalier *et al.*, 2003; Strieder, 2009) na busca de um entendimento mais amplo da fisiologia da planta frente a esses nutrientes.

Nesse estudo, as plantas crescidas em meio sem fósforo e avaliadas aos 14 DAG, apresentaram diferentes comprimentos de raiz primária em função da concentração de citocinina e nitrato (Figura 10). *pdr1* e COL tiveram um comportamento similar quando crescidas em meio com 0 mM de citocinina em resposta às diferentes concentrações de nitrato. Ambos os genótipos cresceram mais quando a concentração de nitrato no meio era de 1 mM. Além disso, *pdr1* e COL tiveram maior comprimento de raiz primária quando crescidas em meio com a concentração de nitrato de 0 mM do que em 100 mM. Essa resposta indica claramente um fator inibitório no crescimento da raiz primária causado por uma elevada concentração de nitrato no meio.

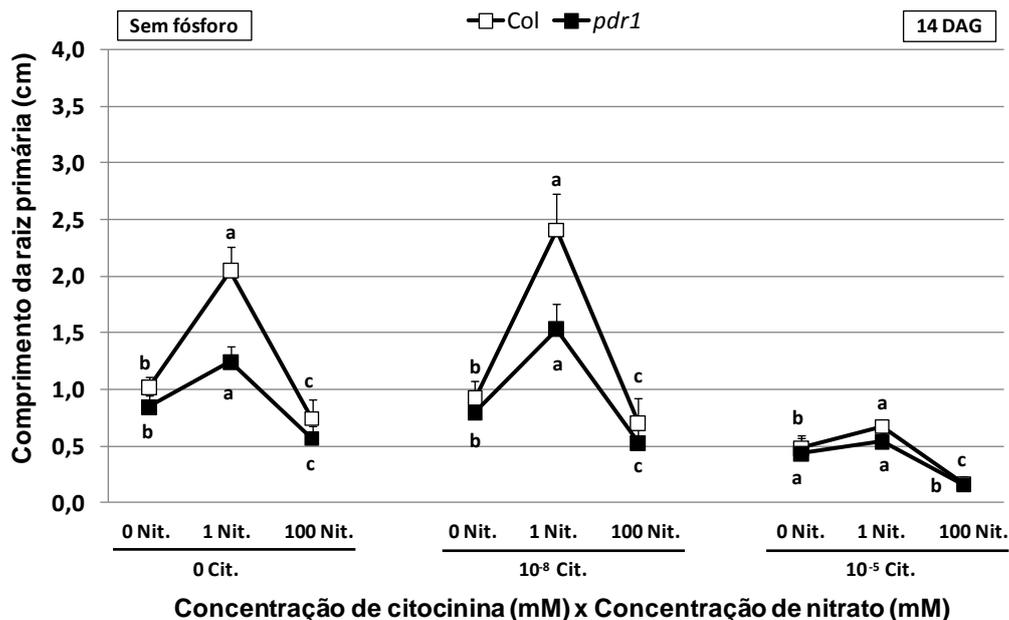


FIGURA 10. Efeito das doses de nitrato no comprimento da raiz primária de COL (quadrados brancos) e *pdr1* (quadrados pretos) em diferentes concentrações de citocinina e avaliadas aos 14 dias após a germinação. “a, b, c” comparação de médias das diferentes doses de nitrato para cada genótipo dentro de cada concentração de citocinina, Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Aumentando a concentração de 0 mM para  $10^{-8}$  mM de citocinina, o comportamento de *pdr1* e COL se manteve praticamente igual. Novamente, a ordem das concentrações de nitrato que propiciaram o maior comprimento de raiz primária, assim como quando as plantas foram crescidas sem citocinina, foi de 1 mM, 0 mM e 100 mM.

O aumento da concentração de citocinina no meio de 0 e  $10^{-8}$  para  $10^{-5}$  mM reduziu o comprimento da raiz primária de *pdr1* e COL nas três concentrações de nitrato. Nessa condição, diferente das situações anteriores, o comprimento da raiz primária de *pdr1* não diferiu entre a concentração de 0 e 1 mM de nitrato, mas novamente no meio com 100 mM de nitrato houve o menor comprimento da raiz primária. Para COL, assim como em 0 e  $10^{-8}$  mM de citocinina, as plantas tiveram maior crescimento da raiz primária nas concentrações de nitrato de 1, 0 e 100 mM, respectivamente.

No experimento em que as plantas foram crescidas com suficiência de fósforo e avaliadas aos 14 DAG, quando não havia citocinina no meio, o comprimento da raiz primária de *pdr1* e COL não diferiu nas três concentrações de nitrato (Figura 11). Entretanto, as plantas tiveram o comprimento da raiz primária maior com 0 mM de nitrato do que com 1 e 100 mM de nitrato, diferente do padrão observado no experimento sem fósforo (Figura 10 e 11). O comprimento da raiz primária de COL na ausência de N e presença de P (Figura 5) foi superior ao obtido na ausência de P (Figura 4). No entanto, foi similar em 100 mM de N, indicando que o efeito inibitório desta concentração de N foi independente de P.

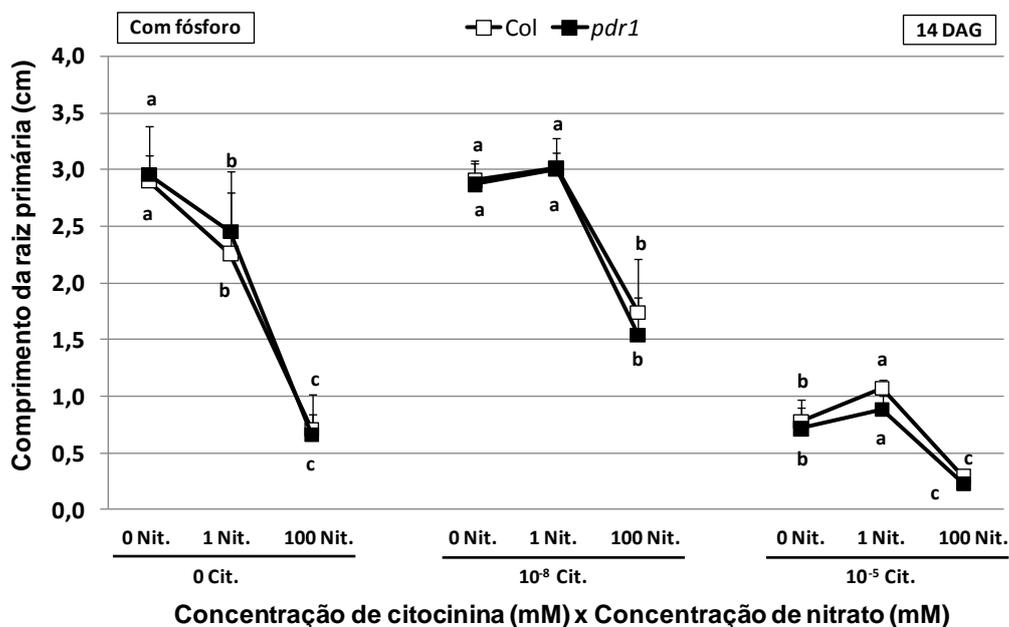


FIGURA 11. Efeito das doses de nitrato no comprimento da raiz primária de COL (quadrados brancos) e *pdr1* (quadrados pretos) em diferentes concentrações de citocinina e avaliadas aos 14 dias após a germinação. “a, b, c” comparação de médias das diferentes doses de nitrato para cada genótipo dentro de cada concentração de citocinina, Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Talvez pelo fato das plantas terem sido crescidas em ambiente com disponibilidade de Pi e de todos os demais nutrientes (exceto N), estarem apenas com

14 DAG e em condição favorável ao crescimento, houve estímulo de crescimento da raiz primária na expectativa de encontrar uma fonte de Ni. Entretanto, esse não é o comportamento normal de plantas em condições com deficiência de N, que normalmente desenvolvem o seu sistema radicular somente quando encontram “nichos” de N (Hermans *et al.*, 2006).

Quando as plantas foram crescidas em meio com  $10^{-8}$  mM de citocinina, *pdr1* e COL apresentaram o mesmo comprimento de raiz primária nas concentrações de 0 e 1 mM de nitrato (Figura 11). As plantas que cresceram em meio com 100 mM de nitrato reduziram em aproximadamente 50% o seu comprimento de raiz primária.

Na condição de  $10^{-5}$  mM de citocinina, as plantas reduziram o comprimento da raiz primária nas três concentrações de nitrato (Figura 11). O mutante *pdr1* e o ecótipo COL não diferiram o seu comportamento em resposta as diferentes condições de nitrato. Em ambos, a concentração de 1 mM de nitrato permitiu o maior comprimento da raiz primária e as de 100 e 0 mM os menores.

Muitos estudos têm demonstrado que a concentração de Ni no meio afeta de diferentes formas o comprimento da raiz primária e o desenvolvimento de raízes laterais e que os transportadores de alta afinidade de nitrato, como o *NRT2.1*, possuem papel fundamental nessas alterações radiculares (Tsay *et al.*, 2011). Em experimento para caracterizar o papel do gene *NRT2.1*, plantas que cresceram com baixa concentração de Ni (0,01 – 0,5 mM) e grande concentração de sacarose (7,5%) tiveram redução do enraizamento lateral no ecótipo silvestre e aumento no mutante *nrt2.1* (Little, 2005). Em outro estudo em que as plantas foram crescidas em condição normal de Ni (1 mM), houve aumento do desenvolvimento de raízes laterais no ecótipo silvestre e redução no mutante *nrt2.1* (Remans *et al.*, 2006).

Similar ao ocorrido com as raízes laterais do mutante *nrt2.1* no experimento anterior, o mutante *pdr1* apresentou menor comprimento da raiz primária em condições com presença de Ni (1 mM) e ausência de Pi (Figura 10). Mas esse comportamento não foi observado quando as plantas foram crescidas com Pi (Figura 11). Devido a esse comportamento de *pdr1* em reduzir o comprimento de sua raiz primária na presença de Ni e ausência de Pi ter se repetido em pelo menos três estudos diferentes, dois nesse mesmo trabalho e em um conduzido por Delatorre (2002), confirma-se a hipótese de que o gene *PDR1* participa do processo que regula o desenvolvimento da raiz primária de *Arabidopsis thaliana* em resposta a condição de N e P no meio de crescimento.

Quando os dados são analisados considerando constante o nível de N e variando a adição de citocinina, se observa comportamento muito similar entre *COL* e *pdr1* na condição sem fósforo (Figura 12). Quando as plantas foram crescidas em meio com 0 mM de nitrato, não houve diferença no comprimento da raiz primária quando as plantas foram crescidas com 0 e  $10^{-8}$  mM de citocinina. Mas houve redução de aproximadamente 45% no comprimento da raiz primária de *pdr1* e *COL* quando a concentração de citocinina foi elevada para  $10^{-5}$  mM.

O fitormônio citocinina é considerado um dos principais reguladores do desenvolvimento do sistema radicular (Mok & Mok, 2001; Werner & Schmülling, 2009). Em 1957, Skoog & Miller demonstraram que a citocinina é capaz de inibir o alongamento da raiz primária e das raízes laterais. Mais recentemente, também vem sendo utilizadas ferramentas de biologia molecular para se regular a quantidade interna desse fitormônio, como superexpressão de genes de enzimas que degradem citocinina, redução da síntese de citocinina, indução de mutações em genes que percebem citocinina ou supressão do sistema de sinalização de citocinina (Werner *et al.*, 2010),

reforçando a importância de se entender o papel desse fitormônio no desenvolvimento do sistema radicular.

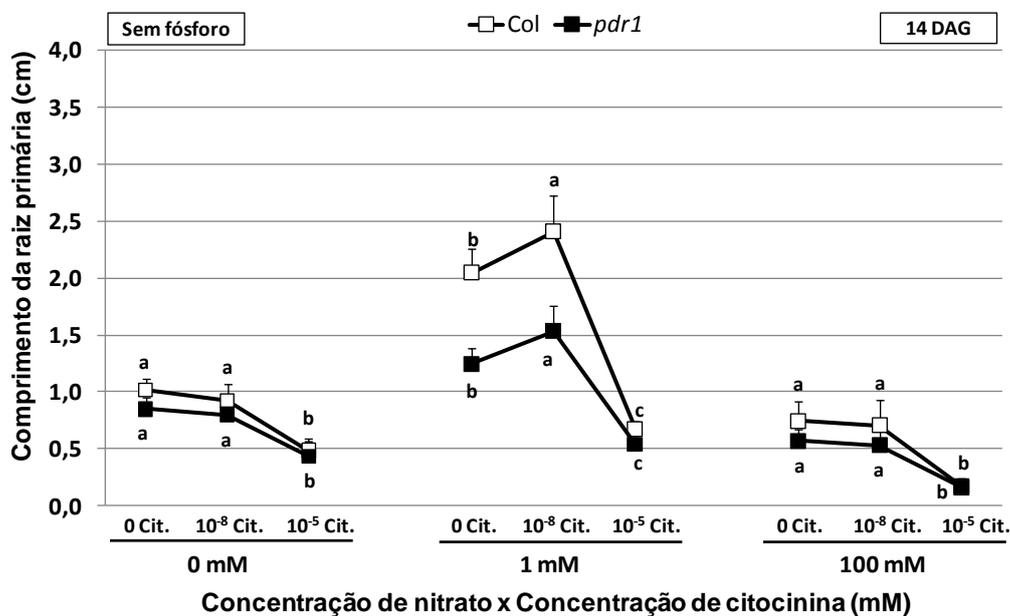


FIGURA 12. Efeitos de doses de citocinina no comprimento da raiz primária de COL (quadrados brancos) e *pdr1* (quadrados pretos). As plantas foram crescidas em meio sem P, com diferentes concentrações de citocinina (0, 10<sup>-8</sup> e 10<sup>-5</sup> mM), com diferentes concentrações de nitrato (0, 1 e 100 mM) e avaliadas aos 14 dias após a germinação. “a, b, c” comparação de médias das diferentes doses de nitrato para cada genótipo dentro de cada concentração de N, Duncan (p≤0,05).

No meio sem fósforo e com 1 mM de nitrato, novamente *pdr1* e COL tiveram resposta similar a variação de citocinina, mas um pouco diferente da condição com 0 mM de nitrato. As plantas crescidas com 1 mM de nitrato tiveram maior comprimento de raiz primária na concentração de 10<sup>-8</sup> mM de citocinina em relação a 0 mM e 10<sup>-5</sup> mM de citocinina. Provavelmente, isso ocorra porque a citocinina é sinalizador secundário da presença de nitrato, fazendo com que a planta alongue o sistema radicular porque recebeu um estímulo como se houvesse nitrato para ser absorvido nesse local.

Quando o meio era sem fósforo e com 100 mM de nitrato, o comprimento da raiz primária de *pdr1* e COL, em resposta as concentrações de citocinina, foi similar ao do tratamento com 0 mM de nitrato. Novamente, não houve diferença no comprimento da raiz primária de *pdr1* e COL nas concentrações de 0 e  $10^{-8}$  mM de citocinina. Na concentração de  $10^{-5}$  mM de citocinina as plantas apresentaram o menor comprimento de raiz primária para ambos os genótipos.

No experimento com fósforo e diferentes concentrações de nitrato, as plantas também apresentaram comprimento da raiz primária variável com a concentração de citocinina (Figura 13). Em meio com 0 mM de nitrato, *pdr1* e COL apresentaram o mesmo padrão de comprimento da raiz primária nas concentrações de 0 e  $10^{-8}$  mM de citocinina. Quando a concentração de nitrato era de 0 mM e a de citocinina de  $10^{-5}$  mM ocorreu redução de aproximadamente 75% no comprimento da raiz primária em comparação as concentrações de 0 e  $10^{-8}$  mM de citocinina.

As diferenças no comprimento da raiz primária de *pdr1* e COL em função da concentração de citocinina no meio foram maiores com 1 mM do que com 0 mM de nitrato. Em 1 mM de nitrato, a concentração de  $10^{-8}$  mM de citocinina fez com que os genótipos tivessem o maior comprimento de raiz primária. Nas concentrações de 0 e  $10^{-5}$  mM de citocinina, *pdr1* e COL tiveram novamente comportamento similar. Assim como, em outras condições, novamente na concentração de  $10^{-5}$  mM de citocinina ocorreu o menor comprimento da raiz primária para ambos os genótipos quando a concentração de nitrato era de 1 mM.

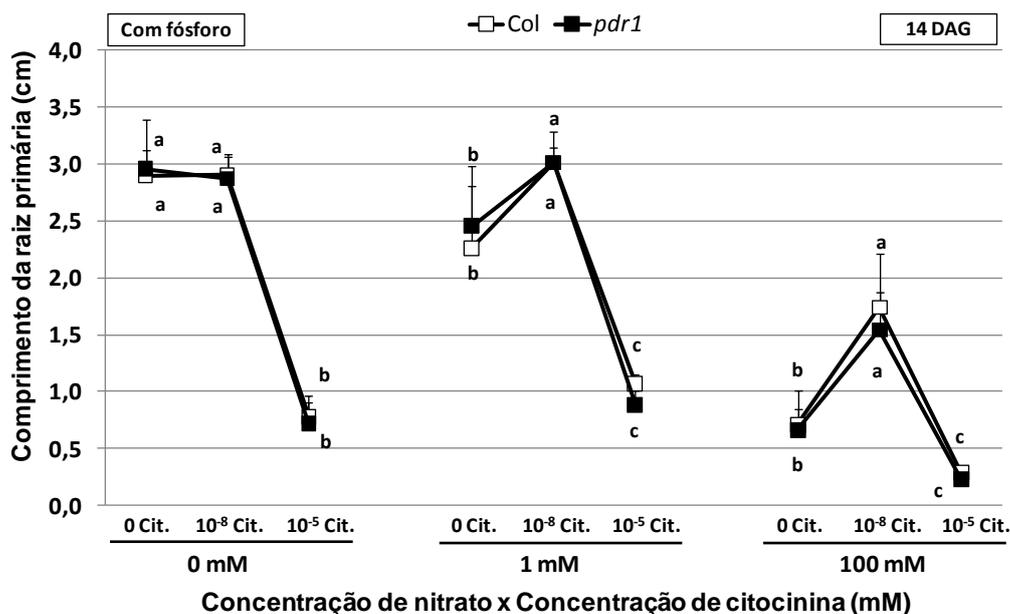


FIGURA 13. Efeitos de doses de citocinina no comprimento da raiz primária de COL (quadrados brancos) e *pdr1* (quadrados pretos). As plantas foram crescidas em meio com P, com diferentes concentrações de citocinina (0,  $10^{-8}$  e  $10^{-5}$  mM), com diferentes concentrações de nitrato (0, 1 e 100 mM) e avaliadas aos 14 dias após a germinação. “a, b, c” comparação de médias das diferentes doses de nitrato para cada genótipo dentro de cada concentração de N, Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Com 100 mM de nitrato no meio, as diferenças de comprimento da raiz primária em função das concentrações de citocinina foi similar ao tratamento com 1 mM de nitrato. Novamente, houve maior comprimento da raiz primária na concentração de  $10^{-8}$  mM de citocinina, comprimento intermediário com 0 mM de citocinina e menor comprimento na concentração com  $10^{-5}$  mM de citocinina.

A redução no comprimento da raiz primária em função do aumento de doses de citocinina no meio também já foi verificada para diferentes genótipos de *Arabidopsis thaliana* por Strieder (2009). Entretanto, no presente trabalho, a adição de  $10^{-8}$  mM de citocinina aumentou o comprimento da raiz primária tanto de *pdr1* como de COL quando a concentração de nitrato era de 1 mM, em ambos os experimentos (com e sem fósforo). No trabalho conduzido por Strieder (2009), quando as plantas foram crescidas

com Pi e sem Ni, COL e o mutante *p9* também apresentaram maior crescimento da raiz primária na concentração de  $10^{-8}$  mM de citocinina. Ainda nesse mesmo trabalho, Strieder (2009) também verificou redução do comprimento da raiz primária quando a concentração de citocinina no meio era elevada para  $10^{-5}$  mM de citocinina para todos os mutantes testados, inclusive o tipo silvestre COL.

Os dados deste trabalho (Figura 12 e 13), bem como os de Strieder (2009), corroboram os de Lopez-Búcio *et al.* (2002), que confirmaram a inibição do sistema radicular de plantas em função do fornecimento de citocininas no meio de crescimento. Como essas respostas foram verificadas em duas condições, com e sem Pi, reforça-se a ideia de que esse efeito hormonal de redução do comprimento da raiz primária, quando é adicionada dose elevada de citocinina ( $10^{-5}$  mM) no meio de crescimento das plantas, é independente da condição de Pi. Mas o fato de que a adição de uma pequena dose de citocinina ( $10^{-8}$  mM) aumentou o comprimento da raiz primária, quando a dose de Ni no meio era de 1 mM remete a uma nova forma de visualização dos efeitos desse fitormônio. É indubitável que grandes concentrações de citocinina reduzam o crescimento do sistema radicular, mas também ficou evidenciado que, se esse fitormônio for utilizado em concentrações muito pequenas, pode gerar efeito positivo no comprimento da raiz primária de *Arabidopsis thaliana*, provavelmente porque pequenas concentrações de citocinina sinalizem de forma muito similar a resposta da presença de “nichos” de N.

#### **4.2.3 Efeito da interação nitrato x citocinina, em diferentes condições de suficiência de P no comprimento da raiz primária de *pdr1* e COL**

Em ambos os experimentos do Estudo 2, conduzidos para analisar o crescimento da raiz primária de *pdr1* e COL, nas diferentes concentrações de nitrato e citocinina, a interação de maior grau significativo foi nitrato x citocinina. A ocorrência de interações

significativas indica que um fator depende da presença ou ausência do outro para interferir na característica observada (Perecin & Cargnelutti Filho, 2008). No presente trabalho, a forma de estudar o comportamento de um fator dentro de cada nível do outro fator foi através de matrizes de significância. Os resultados dessas interações foram comparados através do teste t e estão contidos nas Tabelas 4, 5, 6 e 7.

Além da resposta morfológica no comprimento da raiz primária de plantas observada no presente trabalho (Figuras 10, 11, 12 e 13), a interação nitrato x citocinina é embasada, mais recentemente, em informações moleculares. Um estudo identificou diversos genes que tem sua expressão afetada com variações na disponibilidade de nitrato ou na de citocinina no meio de crescimento de *Arabidopsis thaliana* (Sakakibara *et al.*, 2006). Aparentemente, o nitrato favorece a biossíntese de citocinina através da regulação dos genes *IPT3* e *CYP735A*. Além disso, também é difícil estudar de forma separada a resposta de nitrato e citocinina, porque o nitrato rapidamente regula a síntese de citocinina, sobrepondo a sinalização primária devido ao estímulo causado pelo nitrato e a sinalização secundária em função da citocinina (Sakakibara *et al.*, 2006).

No presente trabalho, quando as plantas de COL foram crescidas com fósforo, houve diferença no comprimento da raiz primária para as diferentes combinações de nitrato x citocinina no meio de crescimento (Tabela 4). Os tratamentos 1 mM de nitrato x  $10^{-8}$  mM de citocinina não diferiram dos tratamentos 0 mM de nitrato x 0 mM de citocinina e 0 mM de nitrato x  $10^{-8}$  de citocinina. Também não diferiram entre si o comprimento de raiz primária das plantas crescidas com 0 mM de nitrato x  $10^{-5}$  mM de citocinina e 1 mM de nitrato x  $10^{-5}$  mM de citocinina e as crescidas em 100 mM de nitrato x 0 mM de citocinina e 0 mM de nitrato x  $10^{-5}$  mM de citocinina.

TABELA 4. Matriz de significância do comprimento da raiz primária de COL para a interação nitrato x citocinina. As plantas foram crescidas em meio com P, com diferentes concentrações de nitrato (0, 1 e 100 mM) e citocinina (0,  $10^{-8}$  e  $10^{-5}$  mM) e avaliadas aos 14 dias após a germinação. “\*” diferença significativa e “ns” diferença não significativa, teste t ( $p \leq 0,05$ ).

COL (+P)		0 mM de nitrato			1 mM de nitrato			100 mM de nitrato		
		0	$10^{-8}$	$10^{-5}$	0	$10^{-8}$	$10^{-5}$	0	$10^{-8}$	$10^{-5}$
0 mM de nitrato	0		ns	*	*	ns	*	*	*	*
	$10^{-8}$			*	*	ns	*	*	*	*
	$10^{-5}$			*	*	*	ns	ns	*	*
1 mM de nitrato	0			*	*	*	*	*	*	*
	$10^{-8}$			*	*	*	*	*	*	*
	$10^{-5}$			*	*	*	*	*	*	*
100 mM de nitrato	0			*	*	*	*	*	*	*
	$10^{-8}$			*	*	*	*	*	*	*
	$10^{-5}$			*	*	*	*	*	*	*

Em *pdr1*, o comprimento da raiz primária diferiu, na maioria dos casos, em função da combinação da dose de nitrato x citocinina no experimento com fósforo (Tabela 5). As igualdades no comprimento da raiz primária, em função da combinação da dose de nitrato e citocinina que ocorreram com COL, se repetiram em *pdr1*. Além disso, *pdr1* também apresentou comprimento da raiz primária igual as plantas crescidas em 100 mM de nitrato x 0 mM de citocinina e 1 mM de nitrato x  $10^{-5}$  mM de citocinina e as crescidas em 100 mM de nitrato x  $10^{-8}$  mM de citocinina e 100 mM de nitrato x 0 mM de citocinina.

TABELA 5. Matriz de significância do comprimento da raiz primária de *pdr1* para a interação nitrato x citocinina. As plantas foram crescidas em meio com P, com diferentes concentrações de nitrato (0, 1 e 100 mM) e citocinina (0,  $10^{-8}$  e  $10^{-5}$  mM) e avaliadas aos 14 dias após a germinação. “\*” diferença significativa e “ns” diferença não significativa, teste t ( $p \leq 0,05$ ).

<i>pdr1</i> (+P)		0 mM de nitrato			1 mM de nitrato			100 mM de nitrato		
		0	$10^{-8}$	$10^{-5}$	0	$10^{-8}$	$10^{-5}$	0	$10^{-8}$	$10^{-5}$
0 mM de nitrato	0		ns	*	*	ns	*	*	*	*
	$10^{-8}$			*	*	ns	*	*	*	*
	$10^{-5}$			*	*	*	ns	ns	*	*
1 mM de nitrato	0			*	*	*	*	*	*	*
	$10^{-8}$			*	*	*	*	*	*	*
	$10^{-5}$						ns	*	*	*
100 mM de nitrato	0							ns	*	*
	$10^{-8}$								*	*
	$10^{-5}$									*

Removido o fósforo do meio de crescimento das plantas de COL, novamente se observou um grande número de diferenças em função da combinação da dose de nitrato x citocinina (Tabela 6). As únicas combinações de nitrato x citocinina no meio que não se diferenciaram foram: 0 mM de nitrato x  $10^{-8}$  mM de citocinina e 0 mM de nitrato x 0 mM de citocinina, 1 mM de nitrato x  $10^{-5}$  mM de citocinina e 0 mM de nitrato x  $10^{-5}$  de citocinina, 100 mM de nitrato x 0 mM de citocinina e 0 mM de nitrato x  $10^{-8}$  de citocinina, 100 mM de nitrato x 0 mM de citocinina e 1 mM de nitrato e  $10^{-5}$  mM de citocinina, 100 mM de nitrato x  $10^{-8}$  mM de citocinina e 1 mM de nitrato x  $10^{-5}$  mM de

citocinina e 100 mM de nitrato x  $10^{-8}$  mM de citocinina e 100 mM de nitrato x 0 mM de citocinina.

TABELA 6. Matriz de significância do comprimento da raiz primária de COL para a interação nitrato x citocinina. As plantas foram crescidas em meio sem P, com diferentes concentrações de nitrato (0, 1 e 100 mM) e citocinina (0,  $10^{-8}$  e  $10^{-5}$  mM) e avaliadas aos 14 dias após a germinação. “\*” diferença significativa e “ns” diferença não significativa, teste t ( $p \leq 0,05$ ).

COL (-P)		0 mM de nitrato			1 mM de nitrato			100 mM de nitrato		
		0	$10^{-8}$	$10^{-5}$	0	$10^{-8}$	$10^{-5}$	0	$10^{-8}$	$10^{-5}$
0 mM de nitrato	0		ns	*	*	*	*	*	*	*
	$10^{-8}$			*	*	*	ns	*	*	*
	$10^{-5}$			*	*	ns	*	*	*	*
1 mM de nitrato	0			*	*	*	*	*	*	*
	$10^{-8}$			*	*	*	*	*	*	*
	$10^{-5}$			ns	ns	*	ns	ns	*	*
100 mM de nitrato	0			ns	*	*	ns	*	*	*
	$10^{-8}$			*	*	*	*	*	*	*
	$10^{-5}$			*	*	*	*	*	*	*

Quando as plantas de *pdr1* cresceram sem fósforo, também se observou um grande número de diferenças em função da combinação da dose de nitrato x citocinina (Tabela 7). As únicas combinações de nitrato x citocinina no meio que não se diferenciaram foram: 0 mM de nitrato x  $10^{-8}$  mM de citocinina e 0 mM de nitrato x 0 mM de citocinina, 1 mM de nitrato x  $10^{-5}$  mM de citocinina e 0 mM de nitrato x  $10^{-5}$  de citocinina, 100 mM de nitrato x 0 mM de citocinina e 0 mM de nitrato x  $10^{-5}$  de citocinina, 100 mM de nitrato x 0 mM de citocinina e 1 mM de nitrato e  $10^{-5}$  mM de

citocinina, 100 mM de nitrato x  $10^{-8}$  mM de citocinina e 1 mM de nitrato x  $10^{-5}$  mM de citocinina e 100 mM de nitrato x  $10^{-8}$  mM de citocinina e 100 mM de nitrato x 0 mM de citocinina.

TABELA 7. Matriz de significância do comprimento da raiz primária de *pdr1* para a interação nitrato x citocinina. As plantas foram crescidas em meio sem P, com diferentes concentrações de nitrato (0, 1 e 100 mM) e citocinina (0,  $10^{-8}$  e  $10^{-5}$  mM) e avaliadas aos 14 dias após a germinação. “\*” diferença significativa e “ns” diferença não significativa, teste t ( $p \leq 0,05$ ).

<i>pdr1</i> (-P)		0 mM de nitrato			1 mM de nitrato			100 mM de nitrato		
		0	$10^{-8}$	$10^{-5}$	0	$10^{-8}$	$10^{-5}$	0	$10^{-8}$	$10^{-5}$
0 mM de nitrato	0		ns	*	*	*	*	*	*	*
	$10^{-8}$			*	*	*	*	*	*	*
	$10^{-5}$			*	*	ns	ns	*	*	*
1 mM de nitrato	0			*	*	*	*	*	*	*
	$10^{-8}$			*	*	*	*	*	*	*
	$10^{-5}$			ns	ns	*	ns	ns	*	*
100 mM de nitrato	0			ns	*	*	ns	*	*	*
	$10^{-8}$			*	*	*	*	*	*	*
	$10^{-5}$			*	*	*	*	*	*	*

Para todas as comparações possíveis entre doses de nitrato e de citocinina para *pdr1* e COL estudadas nesse trabalho, com ou sem Pi, a combinação de 100 mM de nitrato x  $10^{-5}$  mM de citocinina foi a única combinação que sempre foi diferente das demais (Tabelas 4, 5, 6, 7). Essa diferença corresponde ao menor comprimento da raiz primária das plantas crescidas nessa condição (Figuras 12 e 13). Esses resultados

sugerem que a interação nitrato x citocinina seja um dos fatores mais importantes no alongamento da raiz primária de *Arabidopsis thaliana*. Além disso, essa confirmação reforça a ideia de sobreposição do sistema de sinalização que envolve nitrato e citocinina. Aparentemente a percepção dos níveis de nitrato por parte da planta regula positivamente a biossíntese de citocinina (Takei *et al.*, 2004), e este fitormônio regula respostas morfológicas, síntese de proteínas e até mesmo a capacidade de absorver macronutrientes (Sakakibara *et al.*, 2006).

### **4.3 Análise *in situ* da expressão de genes de *Arabidopsis thaliana***

Considerando que houve interação dos efeitos de P e N no crescimento da raiz primária, como também do N com citocinina, analisou-se a expressão de genes de *Arabidopsis thaliana* em resposta ao N, P e citocinina. Para isso, foram conduzidos três experimentos -“Estudo 3”, com quatro linhagens transgênicas: *AtACP5::GUS*, *AtPT1::GUS*, *CycB1::GUS* e *QC25::GUS*. Cada uma dessas linhagens transgênicas permite observar de forma qualitativa a expressão de gene que codifica uma fosfatase ácida, um transportador de Pi de alta afinidade, uma ciclina que atua na fase G2-M na divisão celular e de um gene relacionado a atividade do centro quiescente da raiz, respectivamente.

#### **4.3.1 Caracterização da expressão de genes da raiz primária de plantas submetidas a diferentes concentrações de N, P e citocinina**

A linhagem transgênica *AtACP5::GUS* tem o promotor do gene que codifica uma fosfatase ácida fusionado ao gene repórter GUS, ou seja, quando a planta tenta buscar Pi através do aumento da expressão do gene *ACP5*, ocorre expressão também do

gene GUS, o qual em contato com o substrato produz a coloração azul na célula que está expressando o gene de interesse, permitindo localizar a expressão.

A enzima ACP5 é normalmente produzida em condições de limitação de P, sendo útil na reciclagem deste. As plantas que cresceram na presença de fósforo tiveram diferentes respostas na expressão do gene da enzima ACP5 em função da variação da concentração de nitrato no meio (Figura 14). Sob 0 mM de Ni, não foi observada atividade da enzima GUS, mas quando a concentração de nitrato passou para 1 mM, observou-se expressão de GUS na região já diferenciada da raiz, onde já há ocorrência de pêlos radiculares. Na concentração com 100 mM de nitrato, a expressão de GUS se tornou bem visível na região vascular em toda a extensão da raiz, sugerindo que o aumento na disponibilidade de N aumente a busca e o consumo de P na planta. Na condição sem fósforo, como esperado, as raízes apresentaram resposta ainda mais intensa à disponibilidade de N quanto a expressão de *AtACP5* (Figura 14). Nos tratamentos com 1 e 100 mM de nitrato, a expressão de *AtACP5* foi muito intensa. Em 1 mM novamente a expressão, apesar de maior, manteve-se ausente da região de divisão e alongamento celular, já enquanto em 100 mM de N, todas as regiões da raiz apresentaram expressão e esta não ficou restrita ao tecido vascular. No tratamento sem nitrato, as raízes não apresentaram nenhum sinal de expressão de *AtACP5*, mesmo estando na ausência de N, o que sugere que a sinalização de N sobreponha a sinalização de P, ou seja, como não há N para o crescimento a busca por P não é estimulada.

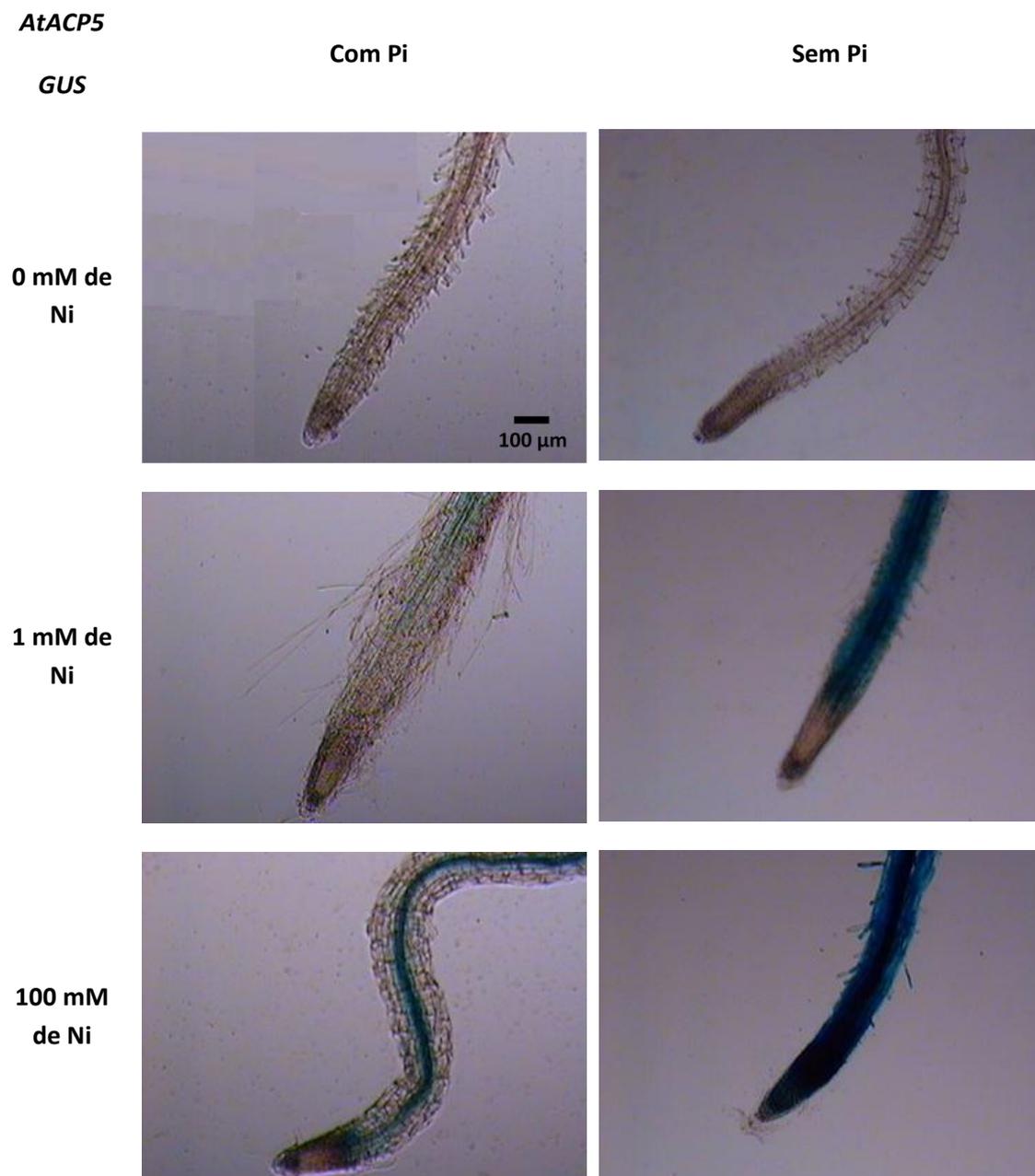


FIGURA 14. Efeito da disponibilidade de fósforo e de nitrato (0, 1 e 100 mM) na expressão de *AtACP5::GUS* na raiz primária de *Arabidopsis thaliana*. As plantas foram crescidas com ou sem fósforo e fotografadas aos 8 DAG.

Quando as plantas foram crescidas em meio contendo fósforo e citocinina ( $10^{-5}$  mM) a expressão de *AtACP5* com diminuição do nível de nitrato no meio foi reduzida (Figura 15). Nas concentrações de 0 e 1 mM de nitrato não houve expressão de *AtACP5*.

Porém, em 100 mM de nitrato, ocorreu expressão de *AtACP5* apenas na parte da raiz mais próxima a parte aérea.

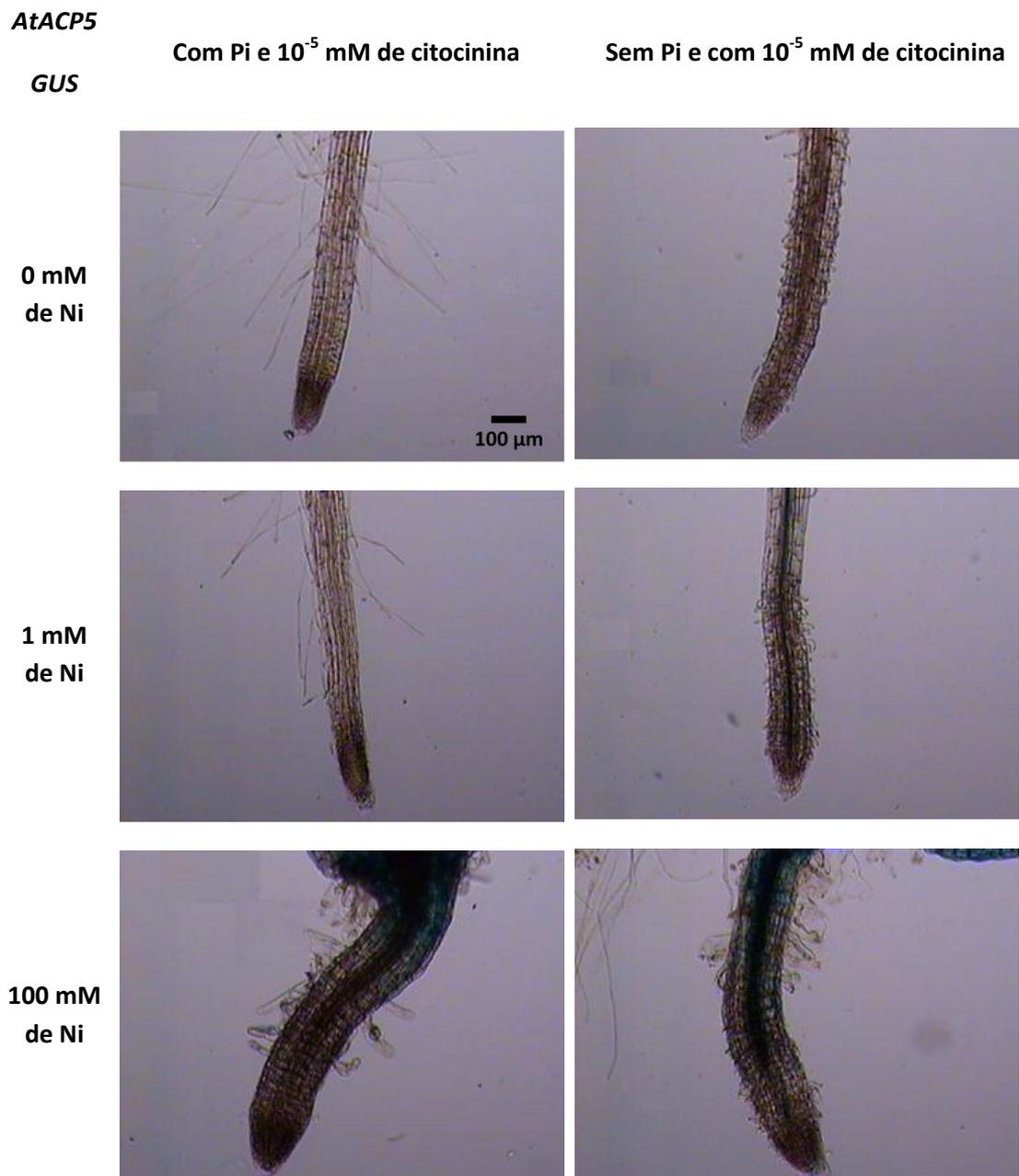


FIGURA 15. Efeito da disponibilidade de fósforo e de nitrato (0, 1 e 100 mM) na presença de citocinina exógena ( $10^{-5}$  mM) na expressão de *AtACP5::GUS* na raiz primária de *Arabidopsis thaliana*. As plantas foram fotografadas aos 8 DAG.

Quando o fósforo foi removido do meio, novamente não ocorreu expressão de *AtACP5* nas raízes em meio com 0 mM de nitrato. Mas, em 1 mM de nitrato, houve expressão de *AtACP5*, principalmente no cilindro central da raiz, enquanto sob 100 mM de nitrato, as raízes apresentaram expressão de *AtACP5* similar à obtida no meio com fósforo (parte da raiz mais próxima a parte aérea). Desta forma, a adição de  $10^{-5}$  mM de citocinina reduziu o efeito do N como de P na expressão de *AtACP5*.

A expressão de fosfatases ácidas é um dos mecanismos de resgate de Pi de plantas em situações de deficiência desse nutriente. Assim como ocorrido no presente trabalho, o aumento da expressão de *AtACP5* sob deficiência de Pi já havia sido comprovado por Pozo *et al.* (1999). Além disso, esses pesquisadores também perceberam que a atividade da enzima ACP5 era afetada pelo ácido absísico e estresse salino. No presente trabalho, os resultados mostraram que a expressão de *AtACP5* também foi afetada positivamente pelo aumento na concentração de Ni no meio. Esse evento reforça a existência da interação nitrato e fósforo. Na medida em que a planta percebeu que havia condição de suficiência de N, passou a investir mais no mecanismo de resgate de Pi. Além disso, mesmo com suficiência de Pi, as plantas aumentaram a atividade de *AtACP5* em função do aumento de Ni no meio, mostrando que esse mecanismo de resgate de Pi também é regulado pela condição de Ni no meio de crescimento.

Quando se avaliou a resposta da atividade de fosfatase ácida de plantas crescidas em meio contendo grande concentração de citocinina exógena, as plantas reduziram a expressão do gene envolvido no mecanismo de resgate de Pi. Esse resultado também foi encontrado por Martín *et al.* (2000) e pode ser explicado porque, quando há deficiência de Pi, os níveis de citocinina diminuem e sua aplicação exógena reprime a indução de genes de resgate de Pi. Porém, com a concentração elevada de Ni (100 mM), as plantas

apresentaram pequena expressão do gene *AtACP5*, porque a citocinina e o Ni quando aplicados em doses elevadas reduzem o comprimento da raiz primária, mas não a biomassa da parte aérea, fazendo com que ocorra concentração do resgate de Pi na raiz primária, ou seja, há mais genes do sistema de resgate de Pi sendo expressos em menos área de tecido radicular.

O papel do Ni e da citocinina na regulação da expressão do gene *AtACP5*, para resgatar Pi, parece antagônico. O aumento da concentração de Ni eleva a expressão de *AtACP5*, mas o aumento de citocinina reduz. Esperava-se que, aumentando a concentração de nitrato para um nível elevado (100 mM), isso resultaria em aumento da biossíntese de citocinina, o que reduziria a expressão de genes de resgate de Pi. Isso sugere que a sinalização de N também aja por outras vias além daquela por citocininas.

Na linhagem transgênica *AtPT1::GUS*, o promotor de um transportador de Pi de alta afinidade foi fusionado ao gene repórter GUS, ou seja, quando a planta aumenta a expressão do gene que codifica o transportador PT1 ocorre coloração azul em sua raiz.

No experimento com suficiência de fósforo, o gene do transportador PT1 foi expresso nas três concentrações de nitrato em que as plantas foram crescidas (Figura 16). A única diferença perceptível é um pequeno aumento na expressão de *AtPT1* nos meios com 1 e 100 mM de nitrato em relação ao meio sem nitrato. Quando as plantas foram crescidas no meio sem fósforo, novamente ocorreu a expressão de *AtPT1* nas três concentrações de nitrato. Nas concentrações de 1 e 100 mM de nitrato, percebe-se um aumento da expressão de *AtPT1* quando comparado à concentração de 0 mM, especialmente na região meristemática. Além disso, percebeu-se que no experimento sem fósforo ocorreu maior expressão de *AtPT1* do que no experimento com fósforo, nas concentrações de 1 e 100 mM de nitrato, o que era esperado, já que este gene é induzido por deficiência de P (Karthikeyan *et al.*, 2002).

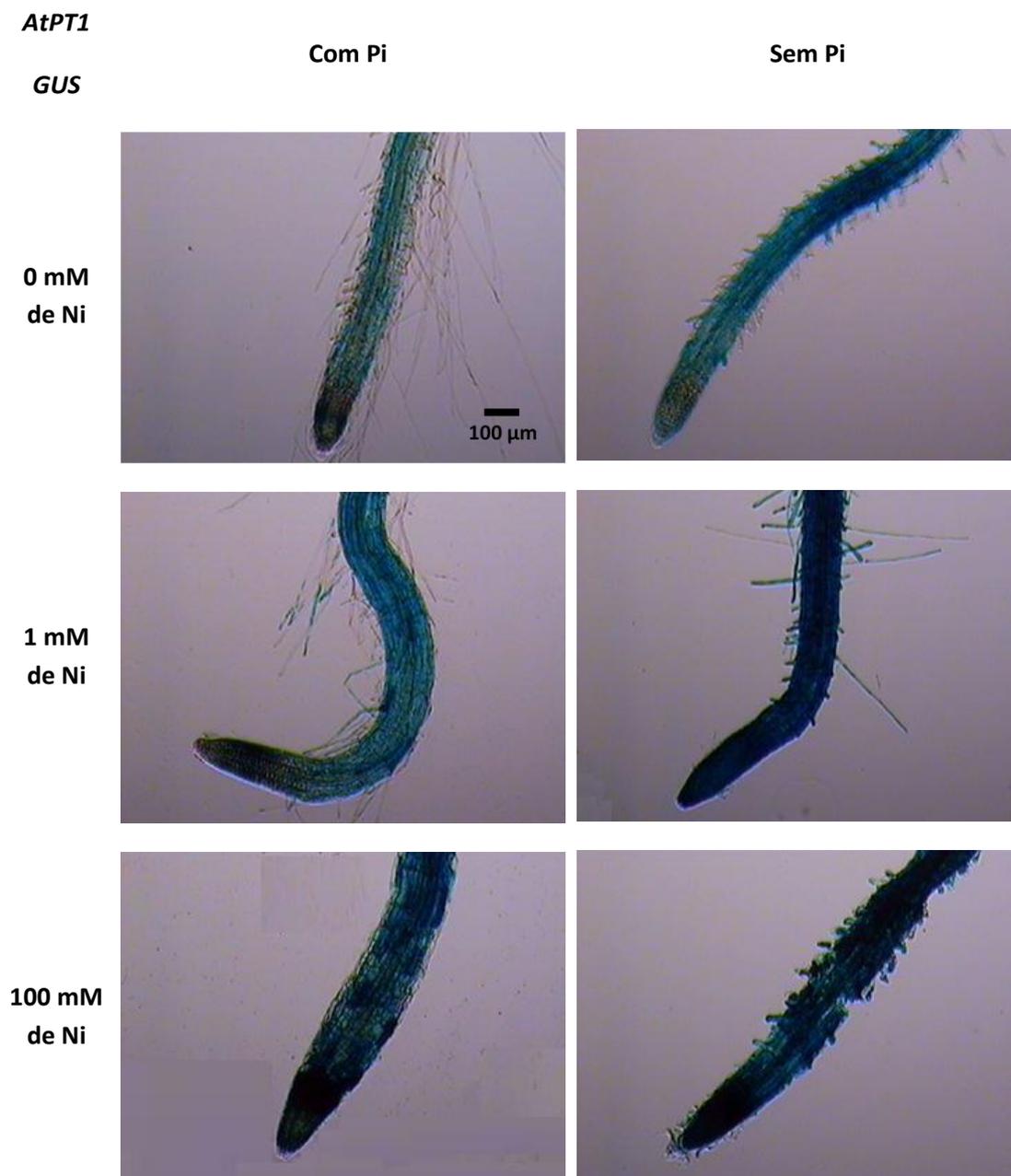


FIGURA 16. Efeito da disponibilidade de fósforo e de nitrato (0, 1 e 100 mM) na expressão de *AtPT1::GUS* na raiz primária de *Arabidopsis thaliana*. As plantas foram crescidas com ou sem fósforo e fotografadas aos 8 DAG.

Com adição de  $10^{-5}$  mM de citocinina no meio, as plantas crescidas com fósforo tiveram variação na expressão de *AtPT1* para as diferentes concentrações de nitrato (Figura 17). A expressão de *AtPT1* aumentou de junto com a concentração de nitrato no meio, sendo maior na concentração de 100 mM e menor na de 0 mM. Plantas que

creceram sem fósforo tiveram expressão de *AtPT1* similar a das plantas crescidas em meio com fósforo. Entretanto, na ausência de N, houve expressão apenas no ápice radicular, diferente do observado nas demais condições.

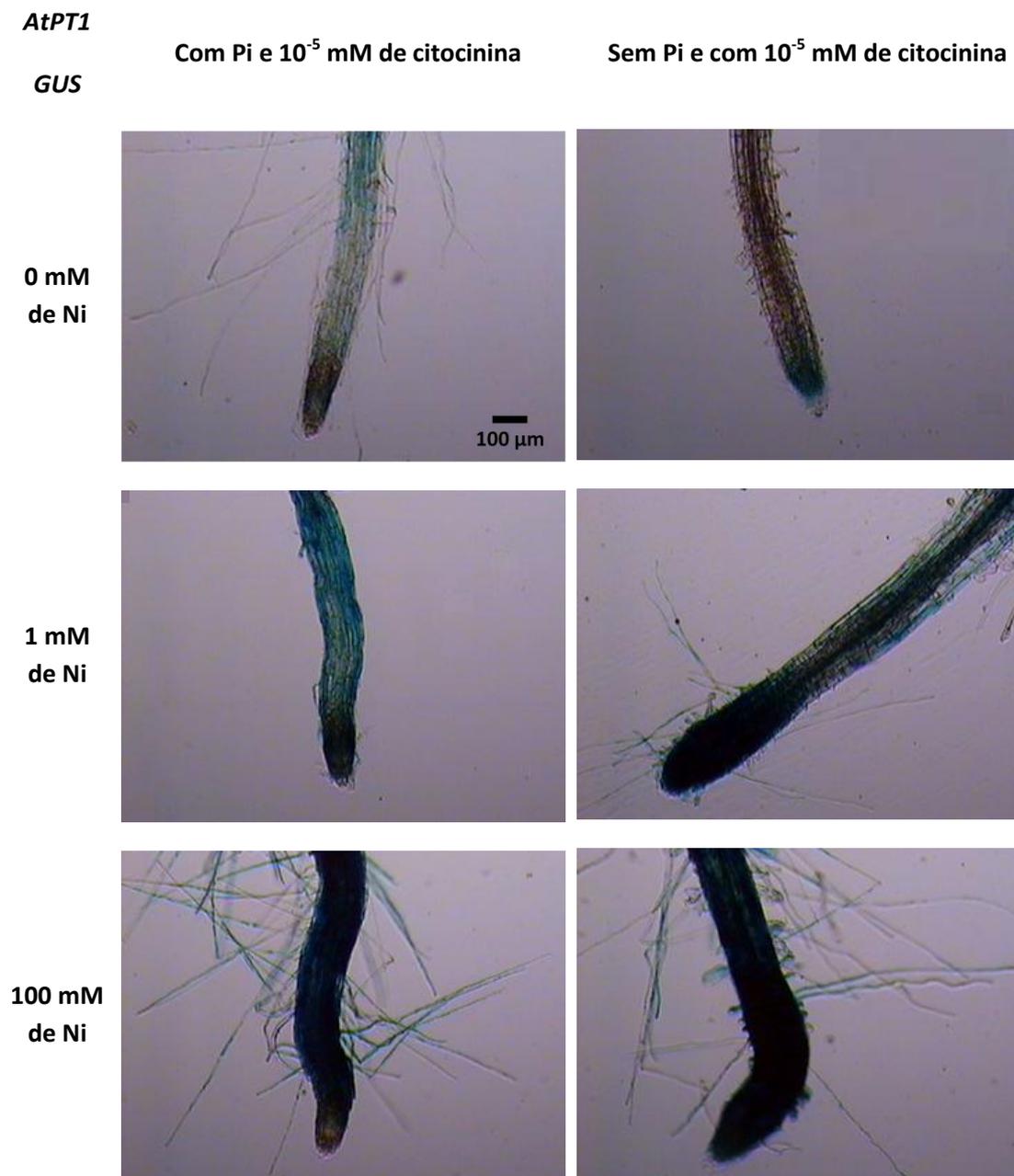


FIGURA 17. Efeito da disponibilidade de fósforo e de nitrato (0, 1 e 100 mM) na expressão de *AtPT1::GUS* na raiz primária de *Arabidopsis thaliana* na presença de citocinina exógena ( $10^{-5}$  mM). As plantas foram crescidas com ou sem fósforo, e fotografadas aos 8 DAG.

O gene do transportador PT1 também foi mais expresso com o aumento da concentração de Ni no meio de crescimento das plantas, indicando mais uma vez a interação dos metabolismos de N e P. Wang *et al.* (2002) relataram que existem interações nos caminhos de sinalização de P, K e Fe. Os dados contidos no presente trabalho auxiliam na consolidação da existência da interação N x P, principalmente na regulação do metabolismo de P em função do N disponível. Para avançar ainda mais nesse conhecimento, seria interessante desenvolver um estudo similar ao conduzido nesse trabalho, mas utilizando promotores de genes relacionados ao metabolismo do N e variando as concentrações de Pi no meio de crescimento das plantas. Dessa forma, entenderíamos melhor como ocorre parte da regulação do metabolismo de N em função do P disponível no meio.

Plantas crescidas com citocinina apresentaram diferença sutil na expressão do gene *AtPT1* em comparação com aquelas crescidas sem citocinina. Somente nos tratamentos sem Ni houve redução da expressão de *AtPT1* quando as plantas foram crescidas com citocinina. Resultados similares foram descritos por Sakakibara *et al.* (2006), em que a citocinina reprimiu a expressão de genes transportadores de macronutrientes como Ni, amônia, S e Pi. Parece que a citocinina é capaz de reduzir a expressão desse transportador de Pi somente quando não há Ni no meio, ou seja, o sinal gerado pelo nitrato foi mais forte do que o pela citocinina na regulação do transportador de fósforo PT1.

A linhagem transgênica *CycB1::GUS* tem o promotor de uma ciclina que é expressa especificamente na fase G2-M da mitose fusionado ao gene repórter GUS, ou seja, as células da raiz que estão sofrendo mitose apresentam a coloração azul.

Quando as plantas foram crescidas com fósforo, houve pequena variação na atividade mitótica das células das raízes (Figura 18). Nas concentrações de 1 e 100 mM

a expressão de *CycB1* foi observada em número de células superior ao de 0 mM, sugerindo que a ausência de N afete negativamente a divisão celular.

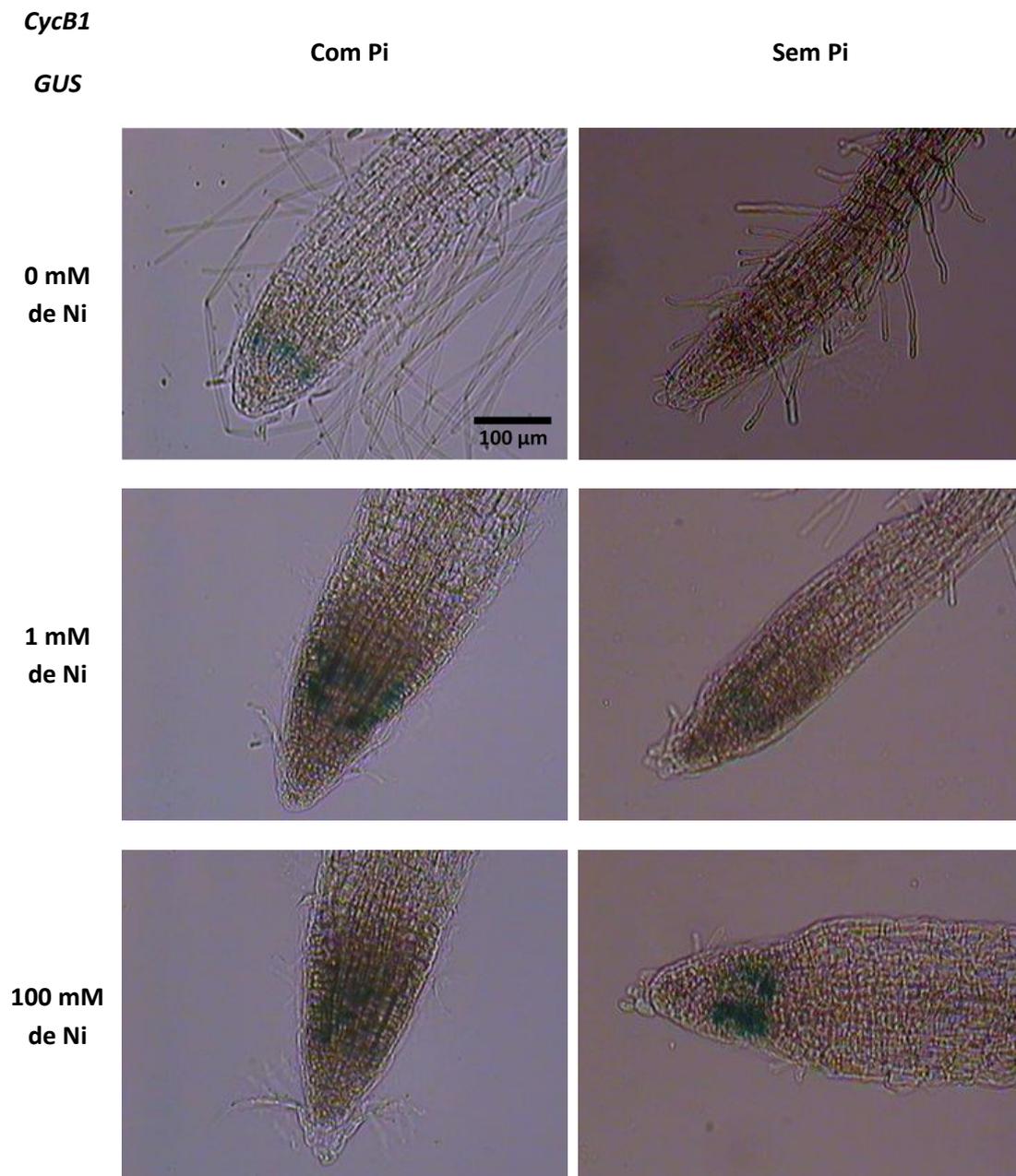


FIGURA 18. Efeito da disponibilidade de fósforo e de nitrato (0, 1 e 100 mM) na expressão de *CycB1::GUS* na raiz primária de *Arabidopsis thaliana*. As plantas foram crescidas com ou sem fósforo e fotografadas aos 8 DAG.

No experimento sem fósforo, as plantas apresentaram menor divisão celular, mas o aumento na concentração de N aumentou o número de células em divisão, sugerindo que a presença de N possa sobrepor, parcialmente, a sinalização da limitação de P, gerando a manutenção da divisão celular no meristema. É interessante recordar que em 100 mM de N e sem P, as raízes primárias eram mais curtas que em 0 mM de N (Figura 4), porém a divisão celular era superior (Figura 18), sugerindo que o efeito maior sobre o crescimento, neste caso, seja sobre a divisão celular.

As raízes das plantas que cresceram no meio com fósforo e  $10^{-5}$  mM de citocinina apresentaram reduzida expressão de *CycB1* (Figura 19), a exceção da ausência de N, onde a expressão se mostrou um pouco mais aparente que na ausência de citocinina (Figura 18), sugerindo que a citocinina possa ter mimetizado o efeito de N. Na ausência de P, nas concentrações de 0 e 1 mM de N, praticamente não se observou expressão de *CycB1* em nenhuma célula da raiz. As plantas que cresceram com 100 mM de nitrato também tiveram expressão de *CycB1* muito reduzida na raiz, mas um pouco mais aparente do que com 0 e 1 mM.

O aumento da concentração de Ni e a presença de Pi favoreceram a expressão de *CycB1* devido ao fato de que, quando a planta encontra local com N, tende a desenvolver o sistema radicular naquela direção. Já as plantas que cresceram sem Pi, apresentaram uma raiz primária com menor expressão de *CycB1*, possivelmente porque não é interessante para a planta continuar o alongamento radicular na direção que naturalmente se tenha menor disponibilidade de P. Strieder (2009) também verificou a resposta da raiz primária de *Arabidopsis thaliana* crescida em ambiente com diferentes concentrações de Pi. Esse pesquisador percebeu que, à medida que aumenta o tempo de exposição das plantas à deficiência total de P, ocorre redução gradual na divisão celular. Esses resultados podem estar associados também ao menor comprimento da raiz

primária das plantas crescidas em condições sem Pi em relação as com Pi (Figuras 4 e 5) ou com elevada citocinina (Figuras 8 e 9).

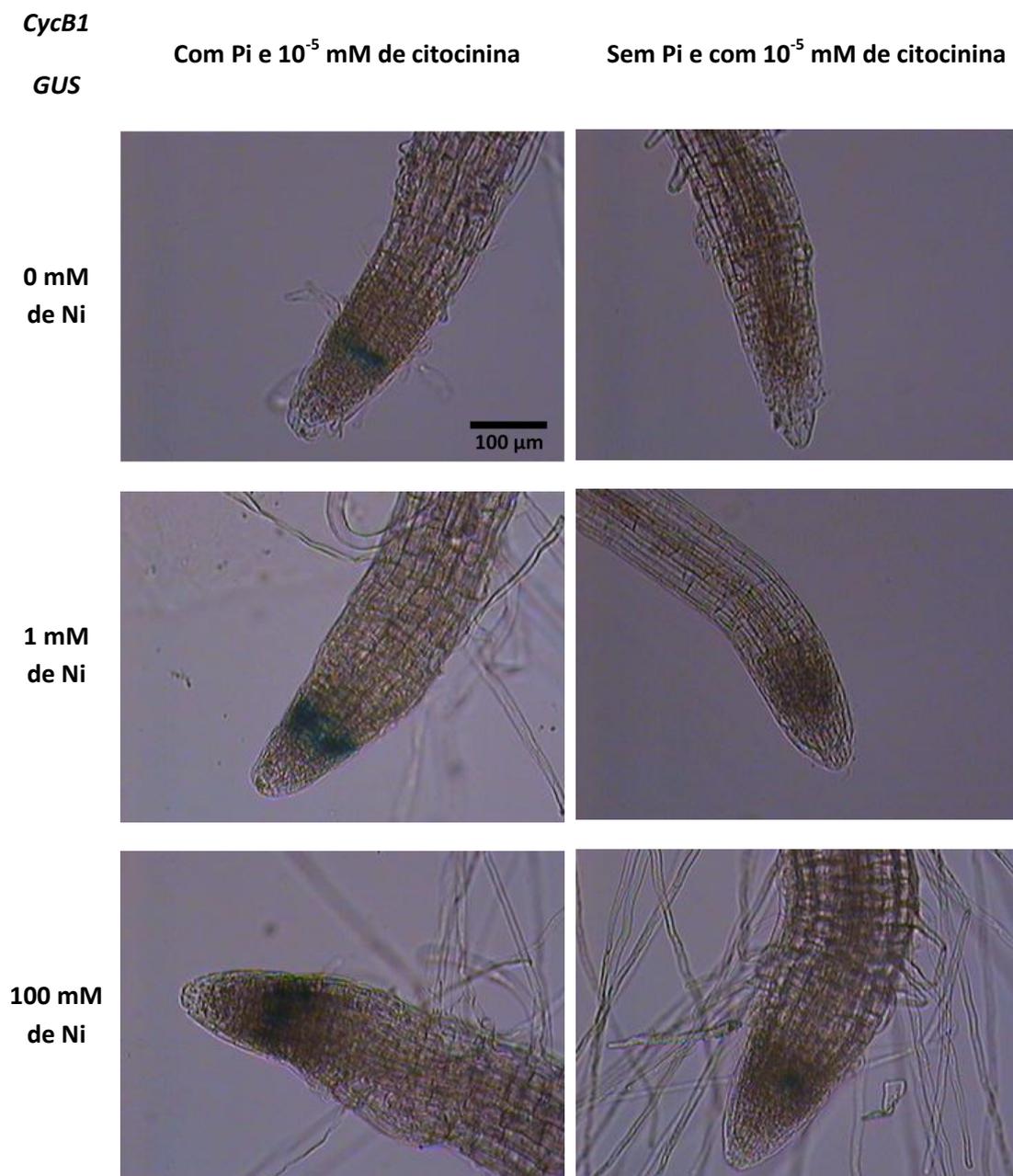


FIGURA 19. Efeito da disponibilidade de fósforo e de nitrato (0, 1 e 100 mM) na expressão de *CycB1::GUS* na raiz primária de *Arabidopsis thaliana* na presença de citocinina exógena ( $10^{-5}$  mM). As plantas foram crescidas com ou sem fósforo e fotografadas aos 8 DAG.

A linhagem transgênica *QC25::GUS* tem o promotor de um gene marcador de centro quiescente do meristema radical fusionado ao gene repórter GUS, ou seja, as células do centro quiescente apresentam a coloração azul quando esse gene é expresso (Figura 20).

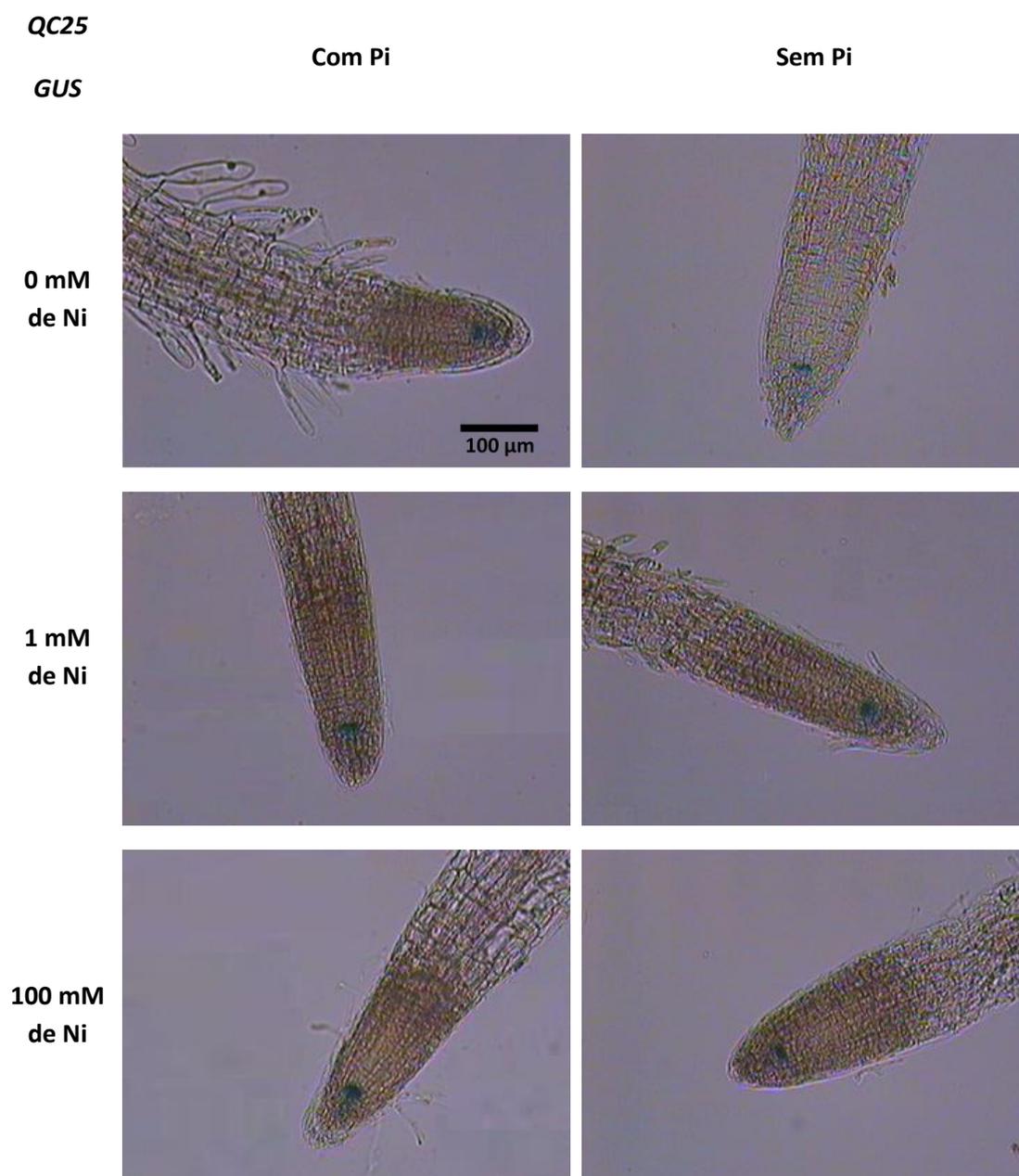


FIGURA 20. Efeito da disponibilidade de fósforo e de nitrato (0, 1 e 100 mM) na expressão de *QC25::GUS* na raiz primária de *Arabidopsis thaliana*. As plantas foram crescidas com ou sem fósforo e fotografadas aos 8 DAG.

Independente da condição de P e N no meio, nas raízes primárias foi observada expressão do marcador de identidade de centro quiescente aos 8 DAG (Figura 20). Entretanto, quando as plantas foram crescidas no meio contendo  $10^{-5}$  mM de citocinina, não foi observada atividade de centro quiescente nas raízes primárias (Figura 21).

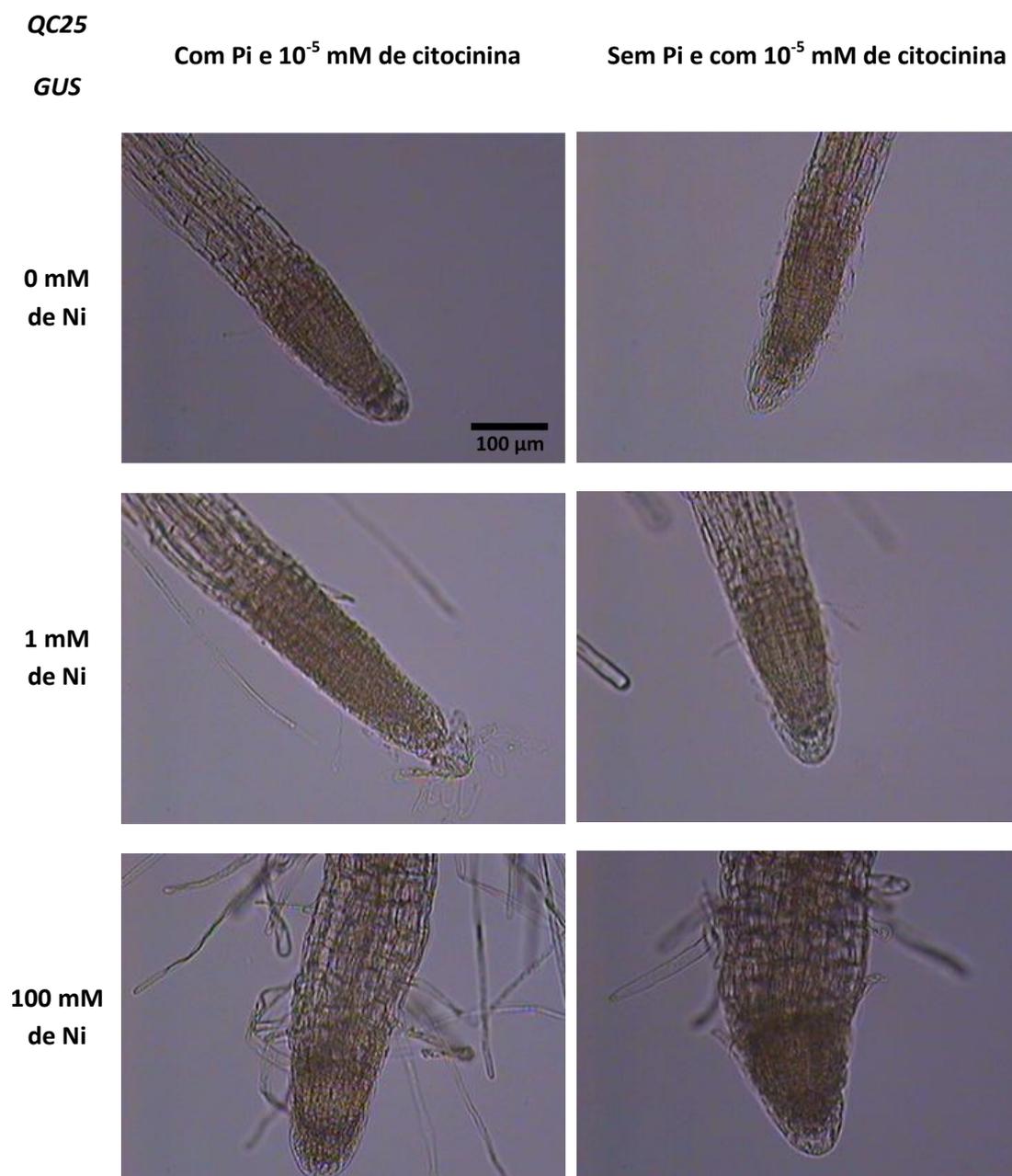


FIGURA 21. Efeito da disponibilidade de fósforo e de nitrato (0, 1 e 100 mM) na expressão de *QC25::GUS* na raiz primária de *Arabidopsis thaliana* na presença de citocinina exógena ( $10^{-5}$  mM). As plantas foram crescidas com ou sem fósforo e fotografadas aos 8 DAG.

Em outras palavras, o elevado teor de citocinina causou diferenciação das células do centro quiescente. A atividade no centro quiescente da raiz primária também é de fundamental importância para se entender o alongamento da raiz primária em diferentes condições nutricionais. As células do centro quiescente são circundadas por primórdios de células meristemáticas e consideradas as células tronco das raízes (Sabatini *et al.*, 2003). Nas plantas crescidas sem citocinina, não houve diferenças na atividade do centro quiescente em função do Ni ou do Pi. Contudo quando foi adicionada alta concentração de citocinina, ocorreu exaustão da atividade do centro quiescente em todas as concentrações de Ni e de Pi. Em trabalho desenvolvido por Müller & Sheen (2008) buscando elucidar o papel da citocinina no desenvolvimento radicular, os autores comprovaram que esse fitormônio, juntamente com a auxina, é fundamental na divisão celular das raízes, alterando a atividade de células precursoras do centro quiescente. A citocinina em doses elevadas tem a capacidade de suprimir a atividade no centro quiescente, justificando o porquê da redução do comprimento da raiz primária de plantas submetidas a esse tipo de tratamento.

#### **4.4 Expressão diferencial de genes do mutante *pdr1* em resposta ao nitrato**

Os resultados obtidos nesse experimento são trabalho complementar de identificação de genes do mutante *pdr1* que tiveram sua expressão alterada em relação a COL quando crescidos em meio completo com 9 mM de N. Os resultados foram obtidos por Delatorre (2002), atualizou-se a notação de cada um dos genes observados e selecionou-se alguns com o intuito de explicar, molecularmente, porque *pdr1* responde de forma diferente ao estímulo causado por Ni. A este trabalho se denominou “Estudo 4”.

Um total de 22810 genes foi analisado, dos quais 15411 foram detectados. Destes, 972 aumentaram sua expressão em *pdr1* em relação à COL e 1619 diminuíram. Desse grande número de genes alterados em *pdr1*, os que tiveram alteração maior que duas vezes (positiva ou negativa) em relação à COL e com notação descrita no TAIR foram estudados (Tabelas 8 e 9).

Wang *et al.* (2000) estudaram a ação do Ni no perfil de expressão de genes, utilizando os genes contidos no chip Affymetrix ATH1, e demonstraram que 10% desses genes foram alterados em resposta ao Ni. No presente trabalho, *pdr1* apresentou aumento na expressão de vários genes relacionados à fotossíntese e à glicólise (Tabela 8). Esse resultado, junto com aumento de expressão de transportadores de triose-fosfato (duas vezes maior em *pdr1* do que em COL), sugere que ocorre aumento da necessidade de esqueletos de carbono, possivelmente para assimilar N. Além disso, também se verificou grande aumento na expressão de genes relacionados ao metabolismo de auxina, um importante regulador do crescimento radicular (Kiba *et al.*, 2011), que pode sinalizar redução no crescimento da raiz primária. Isso pode ajudar a explicar porque *pdr1*, aparentemente, sinaliza de forma equivocada, que há grande quantidade de N no meio quando crescido sob deficiência de Pi, mesmo quando a concentração de Ni é normal, fazendo com que as raízes primárias cresçam menos que o esperado.

TABELA 8. Perfil de expressão de genes em *pdr1* com expressão aumentada em relação ao tipo silvestre COL.

Número de vezes*	Gene	Atividade/Função/Relação	Notação gênica
39	At2g20800	Glicólise	NADH-ubiquitina oxireductase
28	At3g5906	Transcrição	Proteína da família bHLH
18	At1g21250	Sinalização	Quinase WAK1
17	At4g34770	Resposta a auxina	-
14	At4g13790	Resposta a auxina	-
8,6	At1g29500	Resposta a auxina	-
7,5	At1g29440	Resposta a auxina	-
7	At2g13000	Transporte de elétrons	Proteína da família transposase CACTA
4	At1g72930	Receptor de sinais	Proteína da família TIR
3,5	At4g21940	Sinalização	-
3,5	At3g22120	Sinalização	Proteína da família LTP
3,5	At1g72610	Reserva de nutrientes	Proteína GER1
3,2	At2g21330	Glicólise	Aldolase frutose-bifosfatase
3	At1g52230	Fotossíntese	Subunidade VI do centro de reação do fotossistema I
3	At4g38840	Resposta a auxina	-
2,8	At1g12900	Glicólise	Desidrogenase gliceraldeído 3-fosfato
2,8	At2g18540	Sinalização	Proteína da família <i>cupin</i>
2,8	At2g43660	Glicólise	-
2,6	At4g12800	Fotossíntese	Subunidade XI do centro de reação do fotossistema I
2,6	At1g29910	Fotossíntese	Proteína CAB2A
2,6	At4g38970	Glicólise	Aldolase frutose-bifosfatase
2,5	At1g03130	Fotossíntese	Subunidade II do centro de reação do fotossistema I
2,5	At1g19150	Fotossíntese	Proteína junto a clorofila A-B, LHCI tipo II
2,3	At3g54890	Fotossíntese	Proteína junto a clorofila A-B, CAB
2,3	At3g55800	Metabolismo de carbono	Sedoheptulose-bifosfatase
2,1	At2g30570	Fotossíntese	Subunidade W do centro de reação do fotossistema II
2,1	At1g15820	Fotossíntese	Proteína junto à clorofila A-B, LHCB6
2,1	At1g42970	Glicólise	NADP-gliceraldeidofosfato desidrogenase subunidade B

\*número de vezes em que o gene foi expresso em relação a COL

Os genes que foram reprimidos em *pdr1* em relação à COL estão, principalmente, relacionados com sinalizadores e fatores de transcrição (Tabela 9).

Fatores de sinalização e de transcrição estão associados ao processo de transdução de

sinais e a regulação de outros genes em resposta a estresses abióticos (Kizis *et al.*, 2001). Provavelmente, a forma deficiente com que o mutante *pdr1* responda ao Ni tenha relação com a menor expressão dos fatores contidos na Tabela 9. Contudo, mais estudos são necessários para se explicar o papel de cada um desses fatores e elucidar a resposta de plantas ao N e P.

TABELA 9. Perfil de expressão de genes em *pdr1* com expressão reduzida em relação ao tipo silvestre COL.

Número de vezes	Gene	Atividade/Função/Relação	Notação gênica
-28	At4g18250	Ativação de enzimas	Transdução de sinais - quinase
-18	At3g53600	Transcrição	Proteína <i>zinc finger</i> (C2H2)
-7,5	At4g34410	Transcrição	Responsivo a etileno - fator de transcrição
-2,8	At1g77120	Transporte de elétrons	Álcool desidrogenase (ADH)
-2,3	At5g46480	Receptor de sinais	Receptor de sinais de patógenos
-2,5	At2g30750	Transporte de elétrons	Citocromo P450 71A12 (CYP71A12)
-2,6	At1g28480	Transporte de elétrons	Proteína glutaredoxina
-2,1	At2g23770	Ativação de enzimas	Ativação de enzimas - quinase
-2,1	At4g04840	Transcrição	Regulador de transcrição
-2,1	At1g74930	Transcrição	Regulador de transcrição do grupo AP2

\*número de vezes em que o gene foi expresso em relação a COL.

Ainda não está claro como a deficiência em resgatar P e crescer raiz em meio sem Pi e Ni elevado esteja relacionada com um aparente incremento na biomassa da parte aérea de *pdr1*, mas o que pode ser definido é que o aumento na expressão de genes relacionados ao metabolismo do C podem ter favorecido o aumento de biomassa, bem como o aumento na expressão dos genes responsivos a auxina auxiliaram na redução do comprimento da raiz primária.

#### 4.5 Mapeamento da mutação em *pdr1*

Buscou-se estimar o local no genoma onde a mutação de *pdr1* está contida – “Estudo 5”. Para isso, o mutante *pdr1* foi cruzado com o ecótipo LER. As plantas F<sub>1</sub> oriundas desse cruzamento tiveram sua heterozigose confirmada molecularmente, ou seja, houve a fecundação do óvulo de *pdr1* pela célula espermática de LER. Plantas F<sub>1</sub> autofecundaram-se, dando origem a plantas F<sub>2</sub>. Plantas F<sub>2</sub> foram crescidas em meio sem Pi e com Po, selecionando fenotipicamente indivíduos homozigotos para a mutação *pdr1* (fenótipo raiz curta). Foram selecionados 28 indivíduos que tiveram seu DNA utilizado para mapear a mutação em *pdr1*.

As frequências de recombinação foram variáveis entre os marcadores dos cinco cromossomos (Tabela 10). No cromossomo 5, a frequência de recombinação foi menor do que 30%. Este resultado indica que a mutação presente em *pdr1* está localizada no cromossomo 5 (Figura 22). Mas, uma vez verificado o cromossomo em que se localiza a mutação, há necessidade de desenhar novos *primers* para refinar a informação obtida. Resultado similar foi encontrado por Delatorre (2002) que também mapeou a mutação de *pdr1* no cromossomo 5, estimando sua localização entre 17,3 e 17,7 Mpb.

O cromossomo 5 de *Arabidopsis thaliana* foi completamente sequenciado no ano 2000. Análises proteômicas identificaram 5874 proteínas nesse cromossomo, sendo 868 (21,1 %) relacionadas ao metabolismo celular, 469 (11,4 %) ao crescimento, 420 (10,2 %) a sinalização e o restante a outros processos vegetais (Tabata *et al.*, 2000).

TABELA 10. Mapeamento cromossômico da mutação contida em *pdr1*.

Cr.	Primer	Indivíduos F <sub>2</sub> com fenótipo de <i>pdr1</i>																												FR (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
1	ADH	1	2	-	0	0	2	1	0	0	-	-	-	-	-	2	0	0	2	0	1	0	2	0	0	0	2	1	2	40,9
1	GAPB2	0	1	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	1	-	-	-	-	-	1	1	0	-	-	1	35,0
1	M235	1	1	0	0	-	0	1	-	2	-	-	-	0	1	1	2	1	0	1	1	1	1	1	2	0	1	1	1	43,2
1	NCC1	1	1	-	0	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	2	0	0	2	1	2	2	2	1	1	1	55,6
2	COP1	2	0	-	1	-	-	0	1	1	-	-	-	2	-	1	0	0	2	2	0	1	2	0	2	2	1	1	1	52,4
2	THY1	1	-	-	1	-	1	0	0	1	1	-	-	-	-	0	0	1	0	0	-	-	2	0	2	2	1	1	1	39,5
3	G4711	1	1	-	1	-	-	0	-	-	-	-	-	0	1	1	2	1	1	-	-	1	0	1	2	0	2	1	47,1	
3	NIT1.2	1	1	-	1	-	-	0	1	1	2	0	2	2	0	2	2	0	0	1	1	1	2	1	1	2	1	2	0	50,0
4	CAT2	-	-	2	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	0	2	2	1	2	-	0	2	2	76,7
4	G4539	2	1	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2	1	1	1	0	1	1	1	2	0	1	1	1	52,6
4	T15D16	1	2	-	1	0	1	0	-	-	-	-	-	-	-	1	2	1	2	1	0	0	1	1	2	0	1	1	2	45,0
5	EG7F2	0	1	-	1	0	2	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	2	1	1	2	1	0	1	1	1	1	1	50,0
5	F13K20	1	0	-	2	-	-	1	0	0	-	0	0	-	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	-	2	0	1	27,3
5	KLPNHC	1	2	-	2	-	-	1	-	0	-	-	2	1	1	2	0	1	1	2	1	-	2	2	1	2	1	0	1	61,9
5	PAT1.1	1	2	-	2	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	2	0	0	1	1	0	2	2	0	0	63,9

“0, 1, 2” número de alelos de LER em cada indivíduo.

Além disso, os genes contidos no cromossomo 5 apresentam similaridade com os de outros organismos (Tabata, 2000), indicando potencial de aplicação prática do conhecimento dessas informações no desenvolvimento de plantas cultivadas superiores. Como houve maior aumento de biomassa da parte aérea de *pdr1* do que de COL quando crescido em condições com nitrato elevado, talvez a alteração dos genes de uma ou mais dessas proteínas seja capaz de fazer uma planta cultivada acumular mais biomassa, aumentando seu potencial produtivo. Essa hipótese, entretanto, só seria possível se a manipulação de um ou mais genes não acarretasse redução da biomassa das raízes como foi em *pdr1*. Caso contrário, teríamos uma planta com maior capacidade de acumular biomassa na parte aérea, mas com um sistema radicular menor, provavelmente mais ineficiente em captar água e nutrientes.

Nesse estudo, a mutação de *pdr1* foi mapeada no cromossomo 5, mas a FR(%) de 27,3 é considerada elevada para afirmar a posição exata do gene mutado. Para refinar essa informação, necessita-se desenvolver uma segunda fase de mapeamento, utilizando outros marcadores até chegar a FR(%) mais próxima possível de 0.

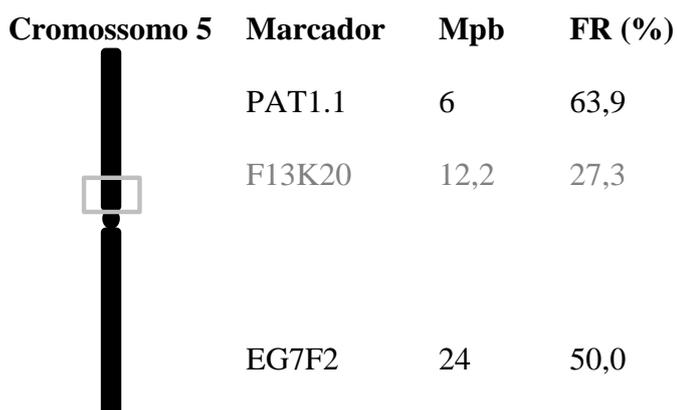


FIGURA 22. Estimativa da posição cromossômica da mutação em *pdr1*.

## 5 CONCLUSÕES

A elevada concentração de nitrato (100 mM), bem como, de citocinina ( $10^{-5}$  mM) reduz o crescimento da raiz primária de *Arabidopsis thaliana*.

O mutante *pdr1* tem crescimento radicular reduzido em função da presença de nitrato e citocinina em meios sem fosfato.

A mutação de *pdr1* está contida no cromossomo 5.

O gene *PDR1* é possivelmente componente do processo de sinalização da condição nutricional em *Arabidopsis thaliana* em resposta a N e P.

O gene *CycB1* foi mais expresso na presença de fosfato e *QC25* teve sua expressão suprimida sob alta concentração de citocinina ( $10^{-5}$  mM).

Há interação N x P, os genes *AtACP5* e *AtPTI* têm expressão elevada na ausência de fosfato e também com o aumento da concentração de nitrato.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, S. Phosphate sensing in root development. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 14, n. 3, p. 303-309, 2011.

About Arabidopsis. **The Arabidopsis Information Resource**. Disponível em: <<http://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp>>. Acesso em: 15 dez. 2011.

AMTMANN, A.; BLATT, M. R. Regulation of macronutrient transport. **New Phytologist**, Cambridge, v. 181, n. 1, p. 35-52, 2009.

BECK, E.H. Regulation of shoot/root ratio by cytokinins from roots in *Urtica dioica*: Opinion. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 185, n. 1, p. 1-12, 1999.

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.

CHEN, D. L. et al. Conditional identification of phosphate-starvation-response mutants in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Heidelberg, v. 211, n. 1, p. 13-22, 2000.

CHEVALIER, F. et al. Effects of phosphate availability on the root system architecture: large scale analysis of the natural variation between Arabidopsis accessions. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 1839-1850, 2003.

CHI, X. F.; LOU, X. Y.; SHU, Q. Y. Progressive fine mapping in experimental populations: an improved strategy toward positional cloning. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 253, n. 4, p. 817-823, 2008.

COLÓN-CARMONA, A. et al. Spatio-temporal analysis of mitotic activity with labile cyclin-GUS fusion protein. **The Plant Journal**, Oxford, v. 20, n. 1, 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, n. 2, p. 292-305, 2009.

COSTA, C.T. et al. Phosphorus and nitrogen interaction: loss of QC identity in responde to P or N limitaion is anticipated in *pdr23* mutant. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 23, p. 219-229, 2011.

DELATORRE, C. A. **Phosphate-deficiency response**: searching for the signaling pathway. 2009. Köln: Lambert Academic Publishing, 2009. 141 p.

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

DEVAIAH, B. N.; NAGARAJAN, V. K.; RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate homeostasis and root development in Arabidopsis are synchronized by the zinc finger transcription factor ZAT6. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, n. 1, p. 147-159, 2007.

DUFF, S. M. G.; SARATH, G.; PLAXTON, W. C. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 90, n. 4, p. 791-800, 1994.

FANG, Z. et al. Phosphate signaling in Arabidopsis and *Oryza sativa*. **Plant Science**, Limerick, v. 176, n. 2, p. 170–180, 2009.

FORDE, B. G. Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, n. 1, p. 203-224, 2002.

GLAZEBROOK, J. et al. Use of cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) as genetic markers in Arabidopsis thaliana. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 82, n. 4, p. 173-182, 1998.

GROSSMAN, A.; TAKAHASHI, H. Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interaction. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, n. 1, p. 163-210, 2001.

HAGHER, T. **The alchemy of air**. Broadway: Crown Publishing Group, 2008. 336 p.

HEFFER, P. Assessment of fertilizer use by crop at the global level. **International Fertilizer Industry Association**, Paris, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2009.

HELL, R.; HILLEBRAND, H. Plant concepts for mineral acquisition and allocation. **Current Opinion Biotechnology**, London, v. 12, n. 2, p. 161-168, 2001.

HERMANS, C. et al. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? **Trends in Plant Science**, London, v. 11, n. 12, p. 610-617, 2006.

JANDER, G. Gene Identification and cloning by molecular marker mapping. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 323, n. 2, p. 115-126, 2006.

KAMARA, A. Y. et al. Agronomic performance of maize (*Zea mays* L.) breeding lines derived from a low nitrogen maize population. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 141, n. 1, p. 221-230, 2003.

KARTHIKEYAN, A. S. et al. Regulated expression of Arabidopsis phosphate transporters. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, n. 1, p. 221-233, 2002.

KIBA, T. et al. Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin abscisic acid, and cytokinin. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 4, p. 1399-1409, 2011.

KIZIS, D.; LUMBRERAS, V.; PAGES, M. Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 498, n. 2, p. 187-189, 2001.

LEA, P. J.; MILFIN, B. J. Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement. **Annual Plant Reviews**, Palo Alto, v. 42, n. 1, p. 1-40, 2011.

LEE, R. B. Phosphate influx and extracellular phosphatase activity in barley roots and rose cells. **New Phytologist**, New York, v. 109, n. 1, p. 141-148, 1988.

LEGGEWIE, G.; WILLMITZER, L.; RIESMEIER, J. W. Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: identification of phosphate transporters from higher plants. **The Plant Cell**, Cambridge, v. 9, n. 3, p. 381-392, 1997.

LINKOHR, B. I. et al. Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 751-760, 2002.

LISTER, R.; GREGORY, B. D.; ECKER, J. R. Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes, and beyond. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, n. 2, p. 107-118, 2009.

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. 38, p. 13693-13698, 2005.

LIU, C. et al. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 1, p. 91-99, 1998.

LOIO, R. D. et al. Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. **Current Biology**, London, v. 17, n. 8, p. 678-682, 2007.

LOOMIS, R. S.; CONNOR, D. J. **Crop ecology: productivity and management** In agricultural systems. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. 520 p.

LOPEZ-BÚCIO, J. et al. Na auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 137, n. 1, p. 681-691, 2005.

LUKOWITZ, W.; GILLMOR, C. S.; SCHEIBLE, W. R. Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you? **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, n. 3, p. 795-806, 2000.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. San Diego: Academic Press, 1995. 889 p.

MARTÍN, A. C. et al. Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 559-567, 2000.

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 Sciences of the USA**, Washington, v. 102, n. 33, p. 11934–11939, 2005.

MOK, D. W.; MOK, M. C. Cytokinin metabolism and action. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, n. 1, p. 89-118, 2001.

MUCHHAL, U. S.; RAGHOTHAMA, K. G. Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 10, p. 5868-5872, 1999.

MÜLLER, B.; SHEEN, J. Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. **Nature**, New York, v. 453, n. 1, p. 1094-1098, 2008.

NARANG, R. A.; BRUENE, A.; ALTMANN, T. Analysis of phosphate acquisition efficiency in different *Arabidopsis* accessions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, n. 4, p. 1786-1799, 2000.

NILSSON, L.; MULLER, R.; NIELSEN, T. H. Dissecting the plant transcriptome and the regulatory responses to phosphate deprivation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 139, n. 2, p. 129-143, 2010.

PACURAR, D. I. et al. A collection of INDEL markers for map-based cloning in seven *Arabidopsis* accessions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 6, p. 1-11, 2012.

PANIGRAHY, M; RAO, D. N.; SARLA, N. Molecular mechanisms in response to phosphate starvation in rice. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 4, p. 389-397, 2009.

PERECIN, D.; CARGNELUTTI FILHO, A. Efeitos por comparações e por experimento em interações de experimentos fatoriais. **Ciência Agrotecnológica**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 68-72, 2008.

PETERS, J. L.; CNUUDE, F.; GERATS, T. Forward genetics and map-based cloning approaches. **Trends in Plant Science**, London, v. 8, n. 10, p. 484-491, 2003.

PINTO, K. G. **Caracterização de mutantes condicionais de *Arabidopsis thaliana* em organofosfatos**. 2005. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

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.

PRICE, A. H.; TOMOS, A. D. Genetic dissection of root growth in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 95, n. 1, p. 143-152, 1997.

PROSSER, I. et al. Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 354, p. 113-121, 2001.

RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate transport and signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, n. 3, p. 182-187, 2000.

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 limitations in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n. 3, p. 909-921, 2006.

RIOU-KHAMILICHI, C. et al. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. **Science**, Washington, v. 283, n. 5407, p. 1541-1544, 1999.

ROBERTSON, G. P.; VITOUSEK, P. M. Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource. **Annual Review of Environment and Resources**, Palo Alto, v. 34, n.1, p. 97-125, 2009.

RUBIO, V. et al. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plant and in unicellular algae. **Gene & Development**, New York, v. 15, n. 1, p. 2122-2133, 2001.

SABATINI, S. *et al.* An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. **Cell**, Cambridge, v. 99, n. 1, p. 463-472, 1999.

SABATINI, S. Scarecrow is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. **Genes & Development**, New York, v. 17, n. 1, p. 354-358, 2003.

SAKAKIBARA, H.; TAKEI, K.; HIROSE, N. Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. **Trends in Plant Science**, London, v. 11, n. 9, p. 440-448, 2006.

SCHACHTMAN, D. P.; SHIN, R. Nutrient sensing and signaling: NPKS. **The Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, n. 1, p. 47-69, 2007.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue culture *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, n. 1, p. 118-131, 1957.

SMIL, V. **Enriching the earth**: Fritz Haber, Carl Bosch, and the transformation of world food production. Cambridge: MIT Press, 2000. 358 p.

SMITH, E. G. et al. **Impact of chemical use reduction on crop yields and costs**. Texas: [S.n.], 1990.

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

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

TABATA, S. et al. Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, New York, v. 408, n. 6814, p. 823-826, 2000.

TADANO, T. et al. Secretion of acid phosphatase by the roots of crop plants under phosphorus-deficient conditions and some properties of the enzyme secreted by lupin roots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 155, n. 1, p. 95-98, 1993.

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Plant physiology**. 3 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2005. p. 67-86.

TAKEI, K. et al. Nitrogen dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 85-93, 2001.

TAKEI, K.; YAMAYA, T.; SAKAKIBARA, H. *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-Zeatin. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 1, p. 41866-41872, 2004.

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.

TRULL, M. C.; DEIKMAN, J. An *Arabidopsis* mutant missing one acid phosphatase isoform. **Planta**, Heidelberg, v. 206, n. 4, p. 544-550, 1998.

TSAY, Y. F. et al. Integration of nitrogen and potassium signaling. **The Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 62, n. 1, p. 207-226, 2011.

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

WALCH-LIU, P. et al. Nitrogen regulation of root branching. **Annals of Botany**, Oxford, v. 97, n. 1, p. 875-881, 2006.

WALCH-LIU, P. et al. Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 343, p. 227-237, 2000.

WANG, R. et al. Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. **The Plant Cell**, Cambridge, v. 12, n. 1, p. 1491-1509, 2000.

WANG, R.; XING, X.; CRAWFORD, N. Nitrite acts as a transcriptome signal at micromolar concentrations in *Arabidopsis* roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, n. 1, p. 1735-1745, 2007.

WANG, Y. H.; GARVIN, D. F.; KOCHIAN, L. V. Rapid induction of regulatory and transporter genes in response to phosphorus, potassium and iron deficiencies in tomato roots. Evidence for cross talk and root/rhizosphere-mediated signals. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, n. 3, p. 1361–1370, 2002.

WARD, J. T. *et al.* The effect of iron on the primary root elongation of *Arabidopsis* during phosphate deficiency. **Plant Physiology**, Rockville, v. 147, n. 1, p. 1181-1191, 2008.

WERNER, T. et al. Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and Tobacco. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 1, p. 3905-3920, 2010.

WERNER, T.; SCHMULLING, T. Cytokinin action in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, n. 5, p. 527-538, 2009.

WOLFE, D. W. **Tales from the underground**: a natural history of subterranean life. New York: Basic Books. 2002. 240 p.

WU, L. et al. Developing existing plant root system architecture models to meet future agricultural challenges. **Advances in Agronomy**, Newark, v. 85, n. 1, p. 181-219, 2005.

YANG, Z. et al. Molecular evolution and functional divergence of HAK potassium transporter gene family in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Genetics and Genomics**, Beijing, v. 36, n. 3, p. 161-172, 2009.

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.

ZHANG, H.; RONG, H.; PILBEAM, D. Signaling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 9, p. 2329-2338, 2007.

ZHANG, Y. et al. A novel Rice gene, *NRR* responds to macronutrient deficiency and regulates root growth. **Molecular Plant**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 1-10, 2011.

## **7 VITA**

Taiguer Cerutti é filho de Margaret Mocelini e Anicleto Francisco Cerutti. Nasceu em Três Passos – RS, em 02 de maio de 1988. Estudou até a quarta série do ensino fundamental no Colégio Érico Veríssimo. Completou o ensino fundamental e cursou o ensino médio no Colégio Ipiranga, Três Passos – RS. Em 2005 ingressou no Curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, onde se graduou Engenheiro Agrônomo em 2010. No mesmo ano, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre – RS, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).