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

CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES CONDICIONAIS DE *Arabidopsis thaliana* L. EM ORGANOFOSFATOS

Karine Gustavo Pinto
Bióloga/PUCRS

Dissertação apresentada como um dos
requisitos à obtenção do
Grau de Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração Plantas de Lavoura

Porto Alegre (RS), Brasil
Agosto de 2005

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Dedico amorosamente este trabalho aos meus pais, João Carlos da Silva Pinto e Neiva Gustavo Pinto e ao meu irmão Leonardo Gustavo Pinto, por todo o amor, carinho e confiança.

AGRADECIMENTOS

À professora Carla Andrea Delatorre, pela precisa orientação, dedicação e, em especial, pela amizade e estímulo transmitidos durante o curso.

Especialmente aos meus pais João Carlos da Silva Pinto e Neiva Gustavo Pinto e ao meu irmão, pelo apoio, confiança e compreensão.

Ao Tiago pelo amor, amizade, confiança e incentivo, e à sua família pelo carinho.

Aos amigos Adriana Corrent, Divanilde Guerra, Emerson Limberger, Emerson Portes, Fausto Borges, Franceli Kulcheski e Tatiana Boff pelo estímulo, auxílio e compreensão.

À Cliciana Bertoldi, bolsista de iniciação cientifica, pelo companheirismo, auxílio e contribuição na realização deste trabalho.

Aos colegas Adriano da Silva, Anderson Nunes, Antonio Rosso, Carolina Tessele, Carlos Walter Alfonso, Ézio Itamar Gubiani, Fabiane Lamego, Itamar Nava, Laize Espindula, Luciane Vilela, Mércio Luiz Strieder, Naracelis Polletto, Paula Wiethölter, Paulo Roberto, Rodrigo Lopez e Tatiana Fontoura pelo convívio.

Aos técnicos dos laboratórios Fábio Berndt e Jônatan Anton, pela ajuda e colaboração nos experimentos.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Plantas de Lavoura.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

A FAPERGS, pelo apoio financeiro.

CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES CONDICIONAIS DE *Arabidopsis thaliana* L. EM ORGANOFOSFATOS[1]

Autora: Karine Gustavo Pinto
Orientadora: Carla Andrea Delatorre

RESUMO

Entre os minerais, o fósforo é um dos mais limitantes ao crescimento e desenvolvimento vegetal. Como é altamente requerido para os mais diversos processos fisiológicos e celulares, as plantas desenvolveram complexos mecanismos para manejar sua deficiência. As respostas à limitação de fósforo são bem conhecidas, mas sobre a sua percepção e a transdução do sinal pouco se sabe. Os mutantes *p9*, *p23* e *p37* estudados neste trabalho são provenientes de uma seleção que busca identificar genes regulatórios envolvidos na sinalização de fósforo. Desta forma, fez-se através da caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica destes mutantes condicionais de *Arabidopsis thaliana*, deficientes quando ácidos nucléicos são a única fonte de fosfato (Pi), a ampliação do conhecimento da rota de sinalização da limitação de Pi. Os fenótipos dos mutantes devem-se à mutação em um gene recessivo para cada mutante, sendo estes complementares. Análises do sistema radicular, acúmulo de amido e antocianinas, teor de Pi livre e do P total e atividade de nucleases em diferentes disponibilidades de fósforo e a avaliação da especificidade dos fenótipos à deficiência de P possibilitaram a criação de hipóteses para a ação dos genes mutados. A mutação de *p9* causa, provavelmente, alterações na sensibidade às concentrações de Pi, podendo estar relacionada tanto aos sensores da raiz quanto à interação da transdução dos sinais entre o sensor local e o status da planta. Devido à limitação de sementes não foi possível desenvolver hipótese sobre a ação do gene mutado em *p*23. Enquanto o gene mutado em *p37* age primordialmente sobre o elongamento e a divisão das células radiculares, estas respostas podem estar sendo influenciadas pelos níveis de citocinina. Assim, a complexidade da transdução do sinal à limitação de Pi e a interação com outras rotas de sinalização em plantas vasculares evidencia a importância de estudar suas respostas e esclarecer como esses processos são regulados.

---

[1] Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, (82p.) Agosto de 2005.

CHARACTERIZATION OF CONDITIONAL MUTANTS OF *Arabidopsis thaliana* L. IN ORGANOPHOSPHATES [2]

Author: Karine Gustavo Pinto
Adviser: Carla Andréa Delatorre

ABSTRACT

Phosphorus (P) is one of the most limitant minerals to plant growth and development. Because of its importance in several physiological and cellular processes, plants have evolved complex mechanisms to cope with its deficiency. The responses to P limitation are well known, but it's not the case of its perception and signal transduction. The mutants *p9*, *p23* and *p37* used here came from a genetic selection developed aiming to identify regulatory genes involved in P signaling. Based on that, by characterizing the morphology, physiology, and biochemistry of these conditional *Arabidopsis thaliana* mutants, which are deficient in the presence of nucleic acids as the only source of phosphate (Pi), we studied and amplified the knowledge of Pi-deficiency signaling pathway. The phenotypes are due to single gene mutations, the mutations complement each other. Through the analysis of root system, starch and anthocyanin accumulation, free-Pi and total P levels, nuclease activities at different P availability, and evaluation of phenotype specificity, we developed hypothesis to explain the mutated gen functions. *p9* mutation is probably, involved in Pi sensitivity alterations, it may be related either to root sensors or to the signal transduction interaction between local sensor and total plant status. The gen mutated in *p37* acts basically, on root cell division and elongation. These responses might be influenced by cytokinin level. Due to seed limitations we could not hypothesize the function for the mutated gen in *p23*. The Pi-deficiency signal transduction complexity allied the crosstalk with other signaling pathways in vascular plants stressed the importance of discovering the regulatory properties of these processes.

[2] M. Sc. Dissertation in Crop Science (Fitotecnia), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (82p.) August, 2005.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....1

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4

2.1 O fósforo no solo.....4

2.2 O fósforo na planta.....7

2.3 Aclimatação à limitação de fósforo.....8

2.4 O sistema de sinalização 13

2.5 Estratégias para identificação da rota de transdução.....17

3 MATERIAL E MÉTODOS.....20

3.1 Material vegetal.....20

3.2 Condições de crescimento 21

3.3 Descontaminação e meios de crescimento.....21

3.4 Purificação do ácido ribonucléico 22

3.5 Tratamento do *phytagar*.....24

3.6 Caracterização dos mutantes.....24

3.6.1 Caracterização das alterações de morfologia e arquitetura de raiz 24

3.6.2 Caracterização do crescimento radicular sob deficiência nutricional.....25

3.6.3 Acúmulo de amido e antocianinas 26

3.6.4 Atividade de enzimas nucleolíticas.....26

3.6.5 Papel da elongação e da divisão celular na composição do fenótipo.....28

3.6.6 Teores de fósforo total e fosfato livre 30

3.6.7 Resposta aos reguladores de crescimento 31

3.7 Identificação do número de genes mutados e do caráter da ação gênica. 31

3.8 Desenvolvimento de população para mapeamento 32

3.9 Análise estatística 32

4 RESULTADOS 33

4.1 Caracterização das mutações 33

4.1.1 Caracterização das alterações de morfologia e arquitetura de raiz 33

4.1.2 Caracterização do crescimento radicular sob deficiência nutricional.....43

4.1.3 Acúmulo de antocianinas e amido 44

4.1.4 Atividade de fosfatases ácidas 46

4.1.5 Papel da elongação e da divisão celular na composição do fenótipo.....48

4.1.6 Teores de fosfato livre e fósforo total 51

4.1.7 Influência dos reguladores de crescimento 55

4.2 Identificação do número de genes mutados e do caráter da ação gênica 57

4.3 Desenvolvimento de população para mapeamento 58

5 DISCUSSÃO.....59

6 CONCLUSÕES.....73

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Taxa de crescimento da raiz principal do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9* e *p37* de *Arabidopsis thaliana* em diferentes fontes de Pi. –Pi, +Pi (2,5mM) e -Pi/+RNA (0,4mg/mL).....41

Tabela 2 Comprimento de células elongadas da raiz principal do ecótipo Columbia e dos mutantes *p9* e *p37* de *Arabidopsis thaliana*. Os fenótipos cresceram nos tratamentos -Pi, +Pi (2,5mM), -Pi/+RNA (0,4mg/mL) durante sete dias. 49

Tabela 3 Número de células visíveis expressando a enzima beta-glucuronidase na raiz principal dos fenótipos *CycB1::GUS, p9* e *p37* de *Arabidopsis thaliana*, através da expressão do gene repórter GUS. As plantas cresceram durante cinco dias nos tratamentos -Pi, +Pi (2,5mM), -Pi/+RNA (0,4mg/mL).....51

Tabela 4 Análise genética do caráter da mutação. As populações F1 e F2 do retrocruzamento dos mutantes com o ecótipo Columbia de *Arabidopsis thaliana* foram fenotipadas em meio –Pi/+RNA (0,4mg/mL e as segregações testadas. 57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Crescimento de raízes do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9*, *p23* e *p37* de *Arabidopsis thaliana* em diferentes fontes de Pi, aos sete dias após germinação em +Pi (2,5mM), –Pi, –Pi/+RNA (0,4mg/mL) e aos 10 dias em 0,13mg (–Pi/+RNA).....37

Figura 2 Comprimento da raiz principal do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9*, *p23* e *p37* de *Arabidopsis thaliana* em diferentes fontes de Pi. (A) aos cinco, (B) aos sete e (C) aos 12 dias após germinação. -Pi (preto), +Pi (2,5mM) (branco), -Pi/+RNA (0,4mg/mL) (cinza). Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas comparam dentro de genótipos e minúsculas entre genótipos.....38

Figura 3 Comprimento de raiz total do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9* e *p37* de *Arabidopsis thaliana* em diferentes fontes de Pi. (A) aos cinco e (B) aos sete dias após germinação. -Pi (preto), +Pi (2,5mM) (branco), -Pi/+RNA (0,4mg/mL) (cinza). Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas comparam dentro de genótipos e minúsculas entre genótipos.....39

Figura 4 Número de raízes laterais do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9* e *p37* de *Arabidopsis thaliana* em diferentes fontes de Pi. (A) aos cinco e (B) aos sete dias após germinação. -Pi (preto), +Pi (2,5mM) (branco), -Pi/+RNA (0,4mg/mL) (cinza). Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%.....40

Figura 5 Comprimento da raiz principal do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9, p23* e *p37* de *Arabidopsis thaliana* em diferentes concentrações de Pi (μM), aos sete dias após germinação.....42

Figura 6 Razão parte aérea/raiz do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9* e *p37* de *Arabidopsis thaliana* em -Pi (preto), +Pi (2,5mM) (branco), -Pi/+RNA (0,4mg/mL) (cinza). Aos sete dias após germinação. Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas comparam dentro de genótipos e minúsculas entre genótipos.....43

Figura 7 Comprimento da raiz principal do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9*, *p23* e *p37* de *Arabidopsis thaliana* em meios com diferentes deficiências nutricionais, aos12 dias após germinação. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente. Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas comparam dentro de genótipos e minúsculas entre genótipos. 44

Figura 8 Acúmulo de amido na parte aérea do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9*, *p23* e *p37* de *Arabidopsis thaliana* em -Pi, +Pi (2,5mM) -Pi/+RNA (0,4mg/mL). Aos sete dias após germinação. Coloração preta demonstra a presença de amido. ...45

Figura 9 Acúmulo de antocianinas na parte aérea do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9*, *p23* e *p37* de *Arabidopsis thaliana*. Aos 21 dias após germinação. -Pi (preto), +Pi (2,5mM) (branco), -Pi/+RNA (0,4mg/mL) (cinza). Aos 21 dias após germinação. Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas comparam dentro de genótipos e minúsculas entre genótipos. 46

Figura 10 Atividade de fosfatases ácidas totais na parte aérea (A) e raiz (B) do ecótipo Columbia (COL) (preto) e dos mutantes *p9* (branco) e *p37* (cinza) de *Arabidopsis thaliana*. As plantas cresceram por sete dias em +Pi e depois foram transferidos para os tratamentos -Pi, +Pi (2,5mM), -Pi/+RNA (0,4mg/mL) por cinco dias. Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas comparam dentro de tratamentos e minúsculas entre tratamentos. 47

Figura 11 Consumo de RNA em solução nutritiva, observado em gel de agarose em eletroforese. Os fenótipos de *Arabidopsis thaliana* cresceram em meio +Pi (2,5mM). Após 15 dias as plantas foram transferidas para solução nutritiva –Pi/+RNA (0,4mg/mL) por sete dias. 48

Figura 12 Divisão celular no meristema apical na planta transgênica CycB1::GUS e nos mutantes p9 e p37 de Arabidopsis thaliana, aos cinco dias após germinação, nos tratamentos -Pi, +Pi (2,5mM), -Pi/+RNA (0,4mg/mL). As células marcadas estão em fase de transição G2/M. 50

Figura 13 Conteúdo de fosfato livre na parte aérea (A) e nas raízes (B) do ecótipo Columbia (preto) e nos mutantes *p9* (branco) e *p37* (cinza) de *Arabidopsis thaliana*. Os genótipos cresceram por sete dias em +Pi sendo transferidos para os tratamentos -Pi, +Pi (2,5mM), -Pi/+RNA (0,4mg/mL) por sete dias Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras

maiúsculas comparam dentro de tratamentos e minúsculas entre tratamentos. 53

Figura 14 Conteúdo de fosfato total na parte aérea (A) e nas raízes (B) do ecótipo Columbia (preto) e nos mutantes p9 (branco) e p37 (cinza) de Arabidopsis thaliana. Os genótipos cresceram por sete dias em +Pi sendo transferidos para os tratamentos -Pi, +Pi (2,5mM), -Pi/+RNA (0,4mg/mL) por sete dias. Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas comparam dentro de tratamentos e minúsculas entre tratamentos. 534

Figura 15 Comprimento de raiz principal em diferentes doses de citocinina (A), auxina (B) e ácido giberélico (C). O ecótipo Columbia (preto) e os mutantes *p9* (cinza) e *p37* (branco) de *Arabidopsis thaliana* cresceram por 10 dias nos respectivos meios de crescimento. Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas comparam dentro de tratamentos e minúsculas entre tratamentos. 506

1 INTRODUÇÃO

A carência de nutrientes minerais e a sua disponibilidade são alguns dos problemas enfrentados na agricultura. O fósforo é um dos elementos mais críticos para a produção agrícola, devido à elevada retenção por parte da matriz do solo, à falta de reposição natural e à progressiva escassez das fontes naturais, sendo sua limitação um dos maiores estresses abióticos, afetando o crescimento e o rendimento dos cultivos.

As plantas absorvem o fósforo na forma de ortofosfato (Pi), extremamente insolúvel em muitos solos devido à reação com outros minerais. A sua disponibilidade se dá em função das oscilações de fósforo lábil no solo e contra gradientes elétrico e de concentração. Para produção agrícola intensiva, usam-se largamente fontes inorgânicas e orgânicas de fósforo, mas parte desse Pi não é recuperada do solo, pois cerca de 80% torna-se adsorvido ou complexado na fração orgânica, junto com resíduos de metais pesados.

O fósforo é crucial no metabolismo vegetal. A concentração de Pi nas plantas alcança de 0,05 a 0,50% do peso seco. Este elemento desempenha papel importante em diversos processos, incluindo geração de energia, síntese de ácidos nucléicos, fotossíntese, glicólise, respiração, síntese e estabilidade de membranas, ativação e inativação de enzimas, reações redox, sinalização, metabolismo de carboidratos e fixação de nitrogênio.

Pesquisadores têm direcionado seus estudos para o melhor aproveitamento dos recursos minerais para que, no futuro, haja maiores rendimento e eficiência na produção das culturas. A eficiência na utilização dos recursos minerais é uma alternativa para redução dos custos de produção, diminuição de contaminação e maximização da produtividade. Para isto, é fundamental o conhecimento dos processos regulatórios de aquisição de Pi e das respostas adaptativas à sua disponibilidade pelas plantas. Uma das estratégias que levaria ao sucesso, segundo ABEL et al. (2002) seria a identificação dos componentes regulatórios envolvidos na sinalização de Pi, e sua utilização no desenvolvimento de cultivares mais eficientes na remoção de fósforo do solo e na sua utilização no metabolismo, contornando o problema de déficit nutricional.

Arabidopsis thaliana é atualmente a planta vascular mais bem estudada, tendo seu genoma inteiramente seqüenciado, disponibilizando muitas ferramentas moleculares, é hoje considerada uma planta modelo para estudos genéticos. Além do rápido ciclo de vida, inabilidade em interagir com micorrizas e demonstrar respostas clássicas de deficiência nutricional, fatores estes de suma importância para estudo da limitação de Pi.

Seguindo esta linha de pensamento, optou-se pelo uso de estratégia genética para buscar informações que auxiliem na elucidação da rota de sinalização da deficiência de fosfato. Neste trabalho foram avaliados mutantes de *Arabidopsis* que apresentam seu crescimento prejudicado quando o fósforo é fornecido exclusivamente na forma orgânica, buscando identificar os processos afetados pela mutação. Os objetivos deste trabalho foram estimar o

número de genes mutados e determinar a ação destes no fenótipo raízes curtas nos mutantes de *Arabidopsis thaliana*, caracterizar as respostas fisiológicas, morfológicas, bioquímicas e moleculares dos mutantes em organofosfatos e propor mecanismo de ação dos genes mutados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O fósforo no solo

Existem diferentes níveis de exigência nutricional entre as espécies e cultivares vegetais. Mesmo sob mesmas condições de fertilidade é percebida grande diversidade no crescimento e no desenvolvimento das plantas. Este comportamento pode ser de ordem interna ou externa, estando relacionado a características de absorção, translocação, remobilização e de utilização dos nutrientes minerais. Muitos pesquisadores creditam a um controle genético, o comportamento nutricional entre as plantas. São vários os mecanismos que têm sido usados para explicar esse controle, entretanto aqueles relacionados com a interface solo-raiz e aqueles intrínsecos às plantas são os mais aceitos (MARTINEZ et al., 1993).

Na maioria dos ecossistemas naturais e terras aráveis, um dos principais fatores limitantes de crescimento e desenvolvimento das plantas é a indisponibilidade do fósforo (P) (LIU et al., 1998). Além de ser um dos elementos mais requisitados é também um dos mais limitantes, depois apenas do nitrogênio. Embora a quantidade total de P no solo seja relativamente alta, na maioria das vezes este não se encontra em sua forma lábil ou ao alcance da rizosfera, pois é transportado essencialmente por difusão, sendo a velocidade desse transporte regulado por diversos fatores, tais como: teor de água no

solo, a interação entre P e os colóides e a distância a ser percorrida pelo nutriente até atingir as raízes da planta (MARSCHNER, 2002).

A forma de fósforo absorvida pelas plantas é o ortofosfato (Pi), o qual ocorre no solo em baixas concentrações (0,1-10μM) (HINSINGER, 2001). O pH ótimo para absorção de Pi pelas plantas é 4,5 – 5,0 (RAGHOTHAMA, 1999). É difícil distinguir as formas de Pi adsorvidas e precipitadas, mas a retenção ou fixação de Pi por componentes do solo é grande na presença de ferro e alumínio sob baixo pH e na de magnésio e cálcio sob alto pH (VANCE et al., 2003). Assim, a disponibilidade de Pi é controlada pelo pH do solo, resistência iônica, concentração de P e metais e pela presença de ânions competidores.

Sob condições fisiológicas normais, existe um requerimento energético grande para o transporte de Pi do solo para a planta, que se dá através da membrana plasmática devido à alta concentração de Pi no citoplasma e ao potencial negativo de membrana característico das células vegetais. O mecanismo preciso do transporte de membranas ainda não é claro. Contudo, a absorção de Pi do solo através de um processo de co-transporte de prótons (H^+), via um gradiente eletroquímico de membrana gerado com consumo de ATP, é aceito. Essa teoria baseia-se na despolarização da membrana plasmática e na acidificação do citosol, provocadas pela reposição de Pi à planta sob deficiência de fósforo (ULRICH & NOVACKY, 1990). Em seguida, a repolarização da membrana plasmática é realizada pela H^+ - ATPase, que bombeia prótons para o meio externo, mantendo o pH interno

celular e gerando a força motriz para aabsorção de fósforo (SCHACHTMAN et al., 1998).

Diferentes análises da cinética de absorção de Pi mostram que as plantas possuem dois sistemas de absorção, um de baixa afinidade e outro de alta afinidade. Em baixas concentrações de Pi (μM) o sistema que prevalece operante é o de alta afinidade, sendo induzido quando existe deficiência do nutriente, enquanto o sistema de baixa afinidade é constitutivamente expresso. A bibliografia cita a existência de apenas um sistema em raízes de cevada (DREW & SAKER, 1984) e de até sete em raízes de milho (NOVAIS & SMYTH, 1999). Apesar de inúmeros transportadores de alta afinidade terem sido clonados em *Arabidopsis*, apenas um transportador de baixa afinidade foi identificado e este não é expresso nos tecidos de raízes (RAGHOTHAMA, 2000).

Nos diversos sistemas de produção agrícola, principalmente os tropicais e subtropicais, são necessárias aplicações de Pi no solo para garantir a produtividade. A recuperação do fósforo durante o ciclo de produção é drasticamente limitada. Cerca de 80% do total de Pi aplicado torna-se indisponível, sendo imobilizado, adsorvido ou se encontra na fração orgânica, na qual já foram documentadas mais de 170 formas (HOLFORD, 1997). Contudo, a aplicação de fertilizantes é um problema, pois em longo prazo pode causar eutrofização e hipoxia em lagos e estuários marinhos. Outra razão para a preocupante disponibilidade de Pi é a depleção das reservas de rochas fosfáticas, pois calcula-se a quase extinção dessas num prazo entre 60 e 80 anos. O uso desses fertilizantes aumentou de quatro a cinco vezes entre 1960

e 2000, sendo projetado até 2030, um aumento de 20 milhões de toneladas por ano (VANCE et al., 2003).

Segundo MARTINEZ (1993), avaliações da eficiência nutricional podem levar à diferenciação entre genótipos, de modo a obter-se material adaptado a diferentes condições de fertilidade do solo. Em termos práticos, quando o suprimento de P do solo é reduzido, genótipos mais eficientes na absorção, translocação e na conversão de P são de grande interesse.

2.2 O fósforo na planta

O fósforo depois do nitrogênio é o macronutriente mais importante aos vegetais. É crucial no metabolismo vegetal. Este elemento é importante para os mais diversos processos metabólicos, incluindo geração de energia, síntese de ácidos nucléicos, fotossíntese, glicólise, respiração, síntese e estabilidade de membranas, ativação e inativação de enzimas, reações redox, sinalização, metabolismo de carboidratos e fixação de nitrogênio.

A compartimentalização no citoplasma e no vacúolo é essencial para a manutenção das concentrações internas de Pi. No citoplasma, a concentração de Pi gira em torno da faixa milimolar, por exemplo, 6 mM em milho e 4,2 mM em ervilha, podendo, sob limitação, estes valores chegarem a 0,2 mM. Durante o dia, os níveis de Pi no cloroplasto estão em torno de 2 e 2,5 mM e são essenciais para obter-se níveis ótimos de fotossíntese, enquanto concentrações abaixo de 1 mM inibem este processo (PLAXTON, 1998). Em condições não limitantes, os vacúolos são os principais reservatórios do Pi total celular, que funciona como tampão para flutuações do Pi citoplasmático. Este

mecanismo evita perturbações no metabolismo e protege a célula de respostas adaptativas mais caras energeticamente durante as alterações de curta duração nos níveis de Pi. Quando existe limitação e exaustão do que foi acumulado nos vacúolos, podendo chegar a níveis indetectáveis, as plantas passam a apresentar praticamente todo o Pi no citoplasma e nos cloroplastos (MARSCHNER, 2002).

A eficiência na translocação de fósforo para a parte aérea condiciona o suprimento do nutriente aos sítios fotossinteticamente ativos da planta. A translocação é influenciada pelo estado nutricional das células da raiz (plantas deficientes retém mais fósforo na raiz), pela taxa de transpiração e pela tolerância ao alumínio (precipita fósforo na raiz) (MARCHNER, 2002).

A maior eficiência de utilização de Pi pode estar relacionada à menor necessidade para as reações bioquímicas da planta, à maior redistribuição para os pontos de crescimento, à maior mobilização do fósforo armazenado nos vacúolos das células em situação de deficiência, ao maior sistema radicular e, conseqüentemente, à maior taxa de absorção.

2.3 Aclimatação à limitação de fósforo

Devido à importância de Pi no metabolismo das plantas e à sua baixa disponibilidade nos solos, as plantas desenvolveram mecanismos complexos para manejar sua deficiência (RAGHOTHAMA, 1999). A bibliografia divide em grupos as respostas à limitação de Pi, um que objetiva a conservação e o seu uso, sendo estas respostas imediatas à limitação, e outro que busca a aquisição e a absorção, sendo repostas tardias que promovem a

sobrevivência quando maior o tempo de exposição à deficiência. Estes grupos envolvem respostas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e, conseqüentemente, moleculares. (RAGHOTHAMA, 1999; VANCE et al., 2003; HAMMOND et al., 2004)

Dentre as respostas morfológicas, a alteração do sistema radicular é a mais importante, sendo o fator chave na absorção de Pi. Diferentemente do cálcio e outros nutrientes, a raiz inteira, independente da idade, é capaz de absorver Pi (DREW & SAKER, 1984). A baixa disponibilidade de fósforo favorece o desenvolvimento de raízes laterais, o aumento da densidade e comprimento dos pêlos radiculares e reduz o crescimento da raiz principal (LYNCH, 1995; GAHOONIA et al., 1998; BATES & LYNCH, 2001; MA et al., 2001; WILLIAMSON et al., 2001; FITTER et al., 2002). O menor comprimento da raiz principal se deve à diminuição do elongamento (WILLIAMSON et al., 2001) e/ou à redução da divisão celular (SUZUKI et al., 2004; TICCONI et al., 2004). Todas essas alterações levam ao aumento da razão da área de superfície de raiz pelo seu volume, resultando em um sistema radicular mais raso e ramificado, o qual está diretamente ligado ao aumento da habilidade de explorar o solo e de absorver Pi (LYNCH, 1995; MA et al., 2001; WILLIAMSON et al., 2001).

A contribuição de micorrizas para a nutrição de fósforo das plantas tem sido documentada como fator de impacto. Esse fenômeno é de grande valor para o desenvolvimento de agrossistemas sustentáveis, menos exigentes em adubações fosfatadas, onde os solos apresentam baixos teores de fósforo (RAUSCH et al., 2001), já que cerca de 90% das plantas terrestres possuem

associação simbiótica com fungos, tendo as hifas importante papel na aquisição de Pi do solo.

A formação de regiões na raiz com alta densidade de radículas e grande emaranhado de pêlos radiculares (raízes proteóides) especializadas na síntese e secreção de ácidos orgânicos é resposta comum em plantas da família Proteaceae às limitações de Pi (TADANO & SAKAI, 1991). Um sistema modelo bem caracterizado é a secreção de citrato pelas raízes proteóides de *Lupinus albus*, uma leguminosa. A formação dessas raízes, a atividade de genes envolvidos na síntese e na liberação de ácidos orgânicos e o incremento na habilidade para adquirir fosfato estão intensamente associados com a deficiência de Pi (RAGHOTHAMA, 2000).

Em relação às respostas fisiológicas e bioquímicas, muitas plantas mostram flexibilidade em ajustar suas taxas metabólicas e em usar rotas metabólicas alternativas, que visam a conservação interna de Pi. A mais importante delas é a manutenção dos níveis citoplasmáticos de Pi, sendo essencial quando há persistência da limitação de fósforo (SCHACHTMAN et al., 1998). Para manter as rotas glicolíticas, a respiração mitocondrial e o metabolismo de carbono, as plantas fazem uso de doadores alternativos que agem no citosol: uridinas, adeninas e pirofosfato. Destes, o pirofosfato é o único que não apresenta alterações sob deficiência de fósforo, sendo o mais importante doador alternativo quando os níveis de ATP são reduzidos (THEODOROU & PLAXTON, 1996). Durante a deficiência de Pi, a conversão de sacarose em P-hexoses pode se dar através do pirofosfato (CIERESZKO et al., 2001), além disso, este aparece com importante papel na

regulação dos vários passos que requerem Pi e adenilato na glicólise, sendo dependentes deste doador a fosfofrutoquinase e a fosfoenolpiruvato carboxilase. Para otimizar o uso de fósforo interno, as plantas reciclam Pi dos tecidos velhos para os novos. A substituição e reciclagem de fosfolipídios durante a deficiência de fósforo podem liberar Pi destes grupos. A proporção de monolipídios, sulfolipídios e galactolipídios aumentam nas membranas dos tilacóides, dando continuidade à fotossíntese pela redução do conteúdo de fosfolipídios, mantendo a integridade destas membranas e sustentando outros processos celulares como, por exemplo, a síntese de ácidos nucléicos (DÖRMANN et al., 2002; ANDERSSON et al., 2003).

O acúmulo de amido, antocianinas e de compostos secundários também são respostas típicas à deficiência de Pi. A diminuição nos níveis de Pi provoca alterações no metabolismo de carboidratos, tendo como uma das conseqüências o acúmulo de amido (ESSIGMANN et al., 1998). Este acúmulo se deve à redução do transporte antiporte de 3-fosfo-gliceraldeído e de Pi, acumulando trioses no cloroplasto e reduzindo os teores de Pi, induzindo a síntese de amido (BUCHANAN et al., 2000). Em relação ao acúmulo de antocianinas, característico em plantas com deficiência de Pi, este se deve a limitação das reações fotoquímicas da fotossíntese e busca proteger as folhas de um processo de fotoinibição (TRULL et al., 1997). Segundo VANCE et al. (2003), o metabolismo secundário, em geral, consome menos Pi, podendo servir para sua reciclagem dos ésteres de fosfato.

A produção de enzimas intracelulares e extracelulares é considerada parte integrante da resposta bioquímica das plantas à falta de Pi

(RAGHOTHAMA, 1999; BALDWIN et al., 2001; COELLO, 2002). As fosfatases ácidas liberam Pi de organosfosfatos, sendo esta uma resposta universal à limitação de P (DUFF et al., 1994). Outras enzimas nucleolíticas secretadas são fosfodiesterases (ABEL et al., 2000) e ribonucleases (NÜRNBERGER et al., 1990). As ribonucleases participam de processos relacionados à reciclagem de nutrientes durante a senescência e acaptura de Pi de RNA em combinação com as fosfatases (BARIOLA et al., 1999). Supõe-se que ribonucleases vacuolares induzidas pela limitação de Pi também atuam como enzimas recicladoras, tal como as enzimas nucleolíticas (LÖFFLER et al., 1992), quanto produtos finais e intermediários da degradação de RNA foram encontrados em vacúolos de tomate (ABEL et al., 1990).

A secreção de ácidos orgânicos pela raiz aumenta a atividade de enzimas relacionadas com a síntese desses ácidos, incluindo a fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), a citrato sintase (CS) e a malato desidrogenase (MDH) (WATT & EVANS, 1999). A secreção destes ácidos orgânicos altera o pH na rizosfera, aumentando a mobilização do fosfato ligado a cálcio, ferro ou alumínio em solos ácidos e calcários (JONES, 1998).

O transporte de Pi nas plantas tem distintas propriedades cinéticas em baixas (μM) e altas (mM) concentrações de Pi em relação ao meio externo. Os transportadores de alta afinidade são proteínas associadas à membrana que translocam Pi do meio externo, contendo baixas concentrações de P, para o citoplasma (RAGHOTHAMA, 1999). Os transportadores de alta afinidade estão bem caracterizados em plantas, cujo número aumenta durante a limitação de Pi. Entretanto, os transportadores de Pi de baixa afinidade

permanecem com atividade inalterada, pois são expressos constitutivamente e operam sob maiores concentrações de Pi disponível (FURIHATA et al., 1992). A existência de múltiplos transportadores de alta afinidade, como exemplo, nove já identificados apenas em *Arabidopsis thaliana* (RAGHOTHAMA, 1999; SHIN et al., 2004), reflete a complexidade do processo de transporte.

O Pi adquirido pelas raízes é rapidamente descarregado no xilema. O floema também tem papel no descarregamento e carregamento de Pi na parte aérea, sendo um importante componente para o movimento interno de Pi nas plantas (DELHAIZE & RANDALL, 1995).

2.4 O sistema de sinalização

Segundo RAGHOTHAMA (1999), as plantas possuem provavelmente dois mecanismos sinalizadores que mantém a homeostase de Pi, um com ação em nível celular e outro mais complexo, envolvendo diferentes órgãos vegetais. A magnitude das respostas à limitação de Pi é controlada tanto pelas concentrações locais externas de P, envolvendo sinalização local, quanto pelo status na planta, envolvendo sinalização em longa distância. (FRANCO-ZORRILLA et al., 2004). Sabe-se que os níveis de Pi são indicativos para aclimatação das plantas à sua deficiência e que as modificações são as respostas a esse estímulo, mas o processo que percebe e transduz o sinal ainda é desconhecido (DELATORRE, 2002).

Em levedura, já foi estabelecido um sistema de resgate multigênico que controla as respostas à deficiência de Pi, sendo conhecido como sistema PHO. Neste estão envolvidas proteínas reguladoras positivas e negativas numa

cascata que controla em nível transcricional a expressão de genes estruturais e componentes regulatórios. GOLDSTEIN et al. (1988) foram os primeiros a propor este sistema análogo ao sistema regulatório PHO dos microrganismos. Similaridades em relação a este sistema, já foram encontradas em vegetais transportadores de alta afinidade (RAGHOTHAMA, 1999), fosfatases ácidas (DUFF et al., 1998; BALDWIN et al., 2001; COELHO 2002), ribonucleases (NÜRNBERGER et al., 1990), fosfoenolpiruvatocarboxilase e fosfofrutoquinase dependente de pirofosfato (PLAXTON & CARSWELL, 1999) e outros genes (AtIPS1 e AtIPS2) e polipeptídios, como TPS1 e MT4, com funções ainda não conhecidas (LIU et al., 1997; MARTIN et al., 2000). Esses mecanismos bioquímicos e moleculares identificados compõem um sistema de resgate de Pi multigênico induzido pela limitação de Pi em plantas. No entanto, sugere-se que a regulação nas plantas seja bastante divergente da que ocorre em levedura, uma vez que não foram encontrados componentes correspondentes, como exemplo, fatores de transcrição.

Várias suposições são feitas em relação aos mecanismos moleculares das rotas de sinalização. Alguns autores, como WILLIAMSON et al. (2001), sugerem que células das raízes seriam responsáveis pela percepção das concentrações de Pi exógeno e endógeno. Algumas evidências da existência de um sensor interno de Pi foram obtidas em experimentos onde as raízes foram divididas, com uma parte do sistema radicular submetido à deficiência de P e a outra não, observou-se a repressão de genes conhecidamente induzidos pela limitação (MARTIN et al., 2000; BALDWIN et al., 2001). TICCONI et al. (2004) demonstraram através do mutante *pdr2* de

Arabidopsis thaliana, que o ajuste da arquitetura do sistema radicular é dependente da disponibilidade externa de Pi e não do status nutricional da planta. DONG et al. (1998) relatam que o mutante de *Arabidopsis thaliana*, *pho2*, é um hiperacumulador de Pi na parte aérea, sugerindo então a indução da expressão dos genes em resposta às alterações da concentração de Pi interna na parte aérea das plantas superiores. Segundo WU et al. (2003) a sinalização para as raízes se dá através de assimilados de carbono ou por alterações no refluxo de Pi. Recentemente, MÜLLER et al. (2005) sugeriram que não necessariamente as raízes precisam do sinal da parte aérea ou vice-versa, demonstrado através do estudo da expressão de genes em plantas resgatadas da deficiência de Pi, onde as mudanças na atividade transcricional nas raízes precederam as mudanças na parte aérea, ocorrendo o resgate de forma independente. Devido ao uso neste experimento de plantas com raiz e parte aérea excisadas, não pode ser excluída a sinalização entre estas partes em plantas intactas.

Também existem algumas evidências sobre o envolvimento de hormônios na sinalização, por agirem sobre o elongamento celular, arquitetura de raiz e formação de pêlos radiculares, quando a planta está sob limitação de fósforo (CASSON & LINDSEY, 2003).

As auxinas parecem ter importante papel na formação de raízes laterais em resposta à deficiência de Pi em *Lupinus* e *Arabidopsis* (LÓPEZ-BUCIO et al., 2005). Além disso, LÓPEZ-BUCIO et al. (2002) e AL-GHAZI et al. (2003) demonstraram que a sinalização de auxinas está relacionada às respostas na arquitetura radicular sob deficiência de Pi. Por outro lado,

WILLIAMSON et al. (2001) e LINKOHR et al. (2002), avaliando respostas de mutantes resistentes a auxinas, que responderam normalmente à mudança nas concentrações externas de Pi, sugeriram que este regulador não é requerido para as respostas de limitação de Pi.

BORCH et al. (1998) mostraram que as respostas de raízes ao etileno dependem da disponibilidade de fósforo e que as plantas são capazes de manter a extensão de suas raízes mesmo em condições limitantes, mesmo que haja redução na densidade de raízes laterais. LÓPEZ-BUCIO et al. (2002) e MA et al. (2003) sugeriram o papel do etileno no elongamento radicular, mas não na formação de raízes laterais em limitação de Pi.

A citocinina é outro regulador de crescimento que influi significativamente nas repostas à deficiência de Pi. Segundo WAGNER & BECK (1993), a aplicação exógena de citocinina promove o crescimento da parte aérea e inibe a proliferação de raízes laterais e também reprime alguns genes induzidos na limitação de Pi. LÓPEZ-BUCIO et al. (2002) indicam as citocininas como reguladores negativos do crescimento radicular. Porém, segundo MARTIN et al. (2000), a citocinina exógena não afeta a formação de pêlos radiculares. Sugere-se que as citocininas inibam as respostas ao status de Pi total da planta, mas não as respostas devidas aos teores locais.

Vários genes estruturais induzidos por limitação de Pi já foram clonados, por exemplo, os transportadores de Pi AtPT1 e AtPT2 (MUCHHAL et al., 1996), ATACP5 uma fosfatase ácida (DEL POZO et al., 1999), as ribonucleases RNS1, RNS2 e RNS3 (GREEN et al., 1994) e outros genes (AtIPS1 e AtIPS2) e polipeptídios, como TPS1 e MT4, com funções ainda não

conhecidas (LIU et al., 1998; MARTIN et al., 2000). No entanto, os sensores e os componentes regulatórios da rota de transdução do sinal que integra as respostas a Pi ainda estão por ser identificados (DELATORRE, 2002). Até o momento apenas um gene envolvido com a transdução do sinal de limitação de Pi foi clonado.

RUBIO et al. (2001) inseriram em plantas de *Arabidopsis thaliana* um gene repórter AtIPS1::GUS especificamente responsivo à limitação de Pi. Após a geração de população mutagenizada, um dos mutantes foi selecionado, *phr1* (*phosphate starvation response 1*) apresentou reduzida expressão do gene repórter na limitação de fósforo, identificando-se como um mutante defeituoso na expressão desses genes responsivos a Pi; umas das repostas deste mutante foi o acúmulo de antocianinas. PHR1 foi clonado e mostrou semelhança com o gene *psr1* (*phosphorus starvation response 1*) de *Chlamydomonas reinhardtii*. Esse gene codifica um fator de transcrição do tipo MYB. Segundo RUBIO et al. (2001), a seqüência a que PHR1 se liga está presente no promotor de genes estruturais responsivos à limitação de Pi, indicando que esta proteína age na rota de sinalização.

2.5 Estratégias para identificação da rota de transdução

Até o presente momento, diversos tipos de seleção foram desenvolvidos com propósito de identificar genes envolvidos na resposta à limitação de Pi (ABEL et al., 2002).

Uma das seleções identificou dois mutantes acumuladores de Pi. O *pho1* apresenta taxas normais de absorção de Pi do solo para as raízes, mas tem prejudicada a habilidade de carregar Pi via xilema, sendo deficiente na sua translocação (POIRIER et al., 1991). Já o *pho2* apresenta possivelmente defeito nos genes que percebem e regulam o status de Pi, pois o acumula em níveis tóxicos na parte aérea, além de apresentar exagerada resposta na arquitetura radicular (DONG et al., 1998; WILLIAMSON et al., 2001).

Um outro mutante, *pup1*, apresenta problemas em relação ao controle enzimático através de coloração histoquímica, se mostrou deficiente apenas na secreção de fosfatases ácidas e, em nenhuma outra resposta, à limitação de Pi (TRULL & DEIKMAN, 1998).

A seleção de RUBIO et al. (2001) mostrou eficiência no uso de linhas transgênicas utilizando o gene repórter AtIPS1::GUS. Estes então identificaram o gene PHR1 que codifica fatores de transcrição do tipo MYB e não acumula antocianinas.

CHEN et al. (2000) desenvolveram uma seleção de mutantes condicionais de *Arabidopsis thaliana* para dissecar a sinalização da limitação de fosfato. A seleção genética foi baseada na habilidade facultativa de tipos silvestres de *Arabidopsis* em metabolizar ácidos nucléicos exógenos (DNA) quando há limitação de fosfato inorgânico. Foram isoladas linhas mutantes que mostravam o crescimento severamente prejudicado, mas que em solução contendo Pi recuperavam-se. Esta seleção considerava que a inabilidade de crescer em ácidos nucléicos sugeriria uma mutação na cadeia sinalizadora, uma vez que as plantas produzem várias enzimas capazes de degradar ácidos

nucléicos (DELATORRE, 2002). Estes mutantes poderiam ser então defeituosos na percepção de baixos níveis de Pi, nos eventos de transdução do sinal subseqüente, na indução de genes responsivos à limitação de Pi, na secreção de enzimas nucleolíticas ou na absorção de Pi. Os mutantes identificados, com respostas alteradas à limitação Pi, nesta seleção foram *pdr1* (*phosphate-deficiency response 1*) e *pdr2*.

DELATORRE (2002) sugere que PDR1 codifique um componente regulatório da expressão gênica em resposta à limitação de P, uma vez que este apresenta mais de 20 genes responsivos a Pi com menor expressão. E que PDR2 codifique um componente de alta afinidade da sinalização de Pi externo, devido ao fato de plantas *pdr2* apresentarem um crescimento radicular lento, condicionado à limitação de P, havendo inibição da divisão celular no meristema primário radicular (TICCONI et al., 2004).

TICCONI et al. (2001) utilizaram uma seleção buscando mutantes constitutivos para respostas à limitação de P, usando um homólogo, o fosfito, que tem capacidade de desativar a sinalização da deficiência de Pi mesmo quando há total ausência deste. Esses mutantes seriam capazes de degradar ácidos nucléicos na presença de fosfito e manter o crescimento, pois expressariam os genes de resposta à deficiência de Pi constitutivamente, enquanto a planta normal seria incapaz de ativar tais genes.

Essas seleções buscam identificar reguladores positivos e negativos na rota de sinalização de Pi, sendo os mutantes defeituosos nas repostas à limitação, valiosas ferramentas para dissecar a cascata de sinalização.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi executado em duas etapas. Na primeira, etapa os mutantes foram caracterizados em termos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos. Na segunda etapa, buscou-se identificar o número de genes mutados envolvidos com o fenótipo dos mutantes e o caráter da ação gênica.

Os trabalhos foram realizados nos Laboratórios de Fisiologia Vegetal e Biotecnologia Vegetal do Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do rio Grande do Sul, em Porto Alegre (RS).

3.1 Material vegetal

Foram utilizadas plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ecótipos Columbia e Landsberg, considerada espécie modelo para estudos de genética e biologia molecular e incapaz de associar-se a micorrizas, a planta transgênica *CycB1::GUS* (acesso Columbia), cedidas por Colón-Carmona, a expressão do gene repórter evidencia as células entre as fases G2-M, e as linhas mutantes do ecótipo Columbia (COL), *p9*, *p23* e *p37*, com alterações no crescimento radicular em meio contendo ácidos nucléicos como única fonte de Pi, desenvolvidos e selecionados por DELATORRE (2002). A escolha de ácidos nucléicos como fonte de fosfato orgânico se deve ao fato de que os mutantes defeituosos no crescimento neste meio devam apresentar

inativação de várias enzimas que degradam DNA ou RNA e sejam induzidas pela limitação de Pi, sugerindo mutações em genes regulatórios e não em genes estruturais. Os mutantes foram obtidos por meio de mutação química pelo uso do EMS (*ethyl-methane-sulfonate*), um agente alquilante, doador de grupos etil ao ácido nucléico.

3.2 Condições de crescimento

A germinação e o crescimento das plantas foi realizado em sala de crescimento ou em câmara BOD. A temperatura manteve-se entre 20 e 25ºC em todos os experimentos e a luminosidade em sala de crescimento foi constante enquanto que, em câmara BOD usou-se fotoperíodo de dia curto (8 horas luz e 16 horas de escuro), para obtenção de maior número de folhas.

3.3 Descontaminação e meios de crescimento

As sementes foram superficialmente descontaminadas em solução contendo 30 % de hipoclorito de sódio a 2 % e 0,1 % de Tween 20 (*polyoxiethyleno-sorbitan monolaurate*) por 7 a 8 minutos sob agitação, sendo então extensivamente lavadas em água deionizada estéril.

O meio sólido para crescimento foi composto por 5mM de KNO_3, 2mM de $MgSO_4$, 2mM de $Ca(NO_3)_2$, 2,5mM de KH_2PO_4, 50μM de Fe-EDTA, 70μM de H_3BO_4, 14μM de $MnCl_2$, 0,5μM de $CuSO_4$, 1μM de $ZnSO_4$, 0,2μM de $NaMoO_4$, 10μM de NaCl, 0,01μM de $CoCl_2$. Como fonte de vitaminas foi utilizado 100mg/L de mioinositol, 0,5mg/L de ácido nicotínico, 0,5mg/L de piridoxina e 0,1mg/L de tiamina. Foi adicionado 2,5mM de MES [2-(N-

morpholino)-ácido etanosulfônico] pH 5,5, e sacarose 0,5%. O pH da solução foi ajustado em 5,5 com KOH. O agente solidificante usado foi 0,8% de PHYTAGAR COMMERCIAL GRADE (Gibco). O meio acima citado será referido como tratamento +Pi, e/ou meio completo de crescimento, o qual possui alto teor de fósforo. Para o meio sem fósforo, tratamento denominado -Pi, foi omitido o KH_2PO_4. Enquanto que para o meio contendo ácidos nucléicos, tratamento denominado -Pi/+RNA, o KH_2PO_4 foi substituído por 0,4mg/mL de RNA, o que fornece aproximadamente 1,0mM de fósforo total.

3.4 Purificação do ácido ribonucléico

Optou-se pelo uso de RNA (*Ribonucleic acid from Torula yeast, typeVI* – Sigma) como fonte de fósforo orgânico, devido ao fato de já serem conhecidas algumas respostas destes mutantes em DNA, e também pela origem. O DNA é obtido de esperma de peixe, enquanto o RNA de levedura, assim os níveis de contaminantes são menores neste último, tornando mais acessíveis os processos de purificação e permeação, tanto em termos econômicos quanto em termos práticos. O RNA usado como fonte de fósforo orgânico passou pelos processos de purificação e permeação cromatográfica para remoção de proteínas, polissacarídeos e contaminantes de baixo peso molecular. 5 a 8g de RNA foram diluídos em 50mL de 1M de Tris-HCl (pH 9). Após a adição de 50mL de tampão TE [10mM de Tris-HCL (pH8) e 1mM de EDTA (ácido etileno diamino dissódico)], o material foi centrifugado por 15 minutos a 7300 rpm. Ao supernadante foi acrescentado 1,5x do seu volume de 8M de LiCl para precipitação do ácido ribonucléico e mantido a temperatura de

4°C por, no mínimo, 12 horas (*overnight*). Nova centrifugação de 30 minutos a 7300 rpm foi realizada para a coleta do *pellet*, o qual foi ressuspendido em 50mL de tampão TE. A extração se deu pela adição de 50mL de fenol:clorofórmio (50:50), seguida por centrifugação de 30 minutos a 7300 rpm. Tal processo foi repetido até a interface aquosa-orgânica se tornar transparente. À solução extraída foi adicionado 0,1x do seu volume de 3M de acetato de sódio (pH 5,5) e 1,5x o volume de etanol absoluto gelado para precipitação do ácido ribonucléico, sendo mantida a temperatura de –20ºC por, no mínimo, 15 minutos, para então a solução ser centrifugada por 30 minutos a 7300 rpm. O *pellet* coletado, ressuspendido em 30mL de tampão TE foi submetido a uma coluna cromatográfica.

Para o processo de permeação cromatográfica, foi utilizada bomba peristáltica (Tecnopon, DMC100), com taxa de vazão igual a 60 mL/h desenvolvida em coluna de vidro com dimensão de 100x3cm, preenchida com SEPHADEX™ G-25 COARSE (Amersham-Biosciences) hidratado com tampão composto por 10mM de Tris-HCl, 1mM de EDTA e 50mM de NaCl (pH 8). Aproximadamente 150mL de solução contendo RNA permeado foi coletado para então ser adicionado 0,1x o volume de 3M de acetato de sódio (pH 5,5) e 1,5x o volume de etanol absoluto gelado para nova precipitação do ácido ribonucléico à temperatura de –20ºC por no mínimo 15 minutos. O *pellet* coletado foi ressuspendido em tampão TE. A solução foi filtroesterilizada e mantida a -20ºC até o preparo do meio e solução nutritiva. Uma alíquota da solução foi quantificada em espectrofotômetro (Spectronic® Genesys™ 2). A concentração de RNA foi calculada considerando que uma unidade de

absorção corresponde a 40μg de RNA. A qualidade do RNA foi avaliada pela relação A_{260}/A_{280} nm.

3.5 Tratamento do *phytagar*

O *phytagar* foi tratado com trocador aniônico básico para remoção de fósforo e para total controle da sua concentração nos tratamentos utilizados. Aproximadamente 100g de *phytagar* foram diluídos em 3L de água destilada. Após diversas lavagens, foram imersos na solução quatro sacos de material poroso com dimensões de 6x2cm preenchidos com o trocador aniônico DOWEX G55 (Sigma-Aldrich). A solução ficou a 4ºC sob agitação por, no mínimo, 12 horas. Após remoção da água e secagem em temperatura máxima de 35ºC, o *phytagar* foi armazenado até o uso em temperatura ambiente.

3.6 Caracterização dos mutantes

3.6.1 Caracterização das alterações de morfologia e arquitetura de raiz

Aproximadamente 90 sementes dos mutantes e do ecótipo COL foram semeadas em placas de petri contendo meios nutritivos com diferentes fontes de Pi. Estas ficaram a uma temperatura de 4ºC por 48 horas para quebra da dormência, sendo então levadas para a sala de crescimento, permanecendo nesta por sete dias em posição vertical. Todas as plantas foram fotografadas com câmera digital (Sony DSC-F828) aos cinco e sete dias após emergência, para análise do comprimento de raízes principais e laterais, densidade de raízes laterais e taxa de crescimento radicular, para isso usou-se o *software* de domínio público IMAGE J (http://rsb.info.nih.gov/ij/), versão para

WINDOWS do NIH (National Institute Health). Estas plantas foram pesadas e seccionadas em raiz e parte aérea, nova pesagem foi realizada para o cálculo da razão parte aérea/raiz. Para determinação do peso seco, o material foi desidratado em estufa a 60ºC.

A resposta do ecótipo COL e dos mutantes a diferentes concentrações de Pi também foi verificada através do comprimento da raiz principal de 15 plântulas aos 10 dias após a germinação em meios com 0;10; 50; 100; 500; 1000 e 2500μM de KH_2PO_4.

3.6.2 Caracterização do crescimento radicular sob deficiência nutricional

Verificou-se o comprimento da raiz principal em aproximadamente 15 plântulas do ecótipo COL e dos mutantes aos 12 dias após emergência, em meios deficientes em ferro, nitrogênio, enxofre e potássio. Para verificar a resposta em relação à deficiência de ferro (-Fe) omitiu-se o Fe-EDTA do meio completo. Para o meio deficiente em nitrogênio (-N) omitiu-se o KNO_3, e substituiu-se o $Ca(NO_3)_2$ por $CaCl_2$. Para o meio deficiente em potássio (-K) omitiu-se o KNO_3 e substituiu-se o KH_2PO_4 por $Ca(H_2PO_4)$, a concentração de $Ca(NO_3)_2$ foi aumentada de 2mM para 5mM e o pH corrigido com NaOH. Para o meio deficiente em enxofre (-S) substituiu-se o $MgSO_4$ por $MgCl_2$, o $CuSO_4$ por $CuCl_2$ e o $ZnSO_4$ por $ZnCl_2$.

As imagens para as análises acima citadas foram avaliadas com o auxílio do *software* de domínio público IMAGE J.

3.6.3 Acúmulo de amido e de antocianinas

Durante sete dias os mutantes *p9*, *p23* e *p37* e o ecótipo COL cresceram em meios +Pi, -Pi e -Pi/+RNA. Aproximadamente 15 plântulas de cada fenótipo foram seccionadas em raiz e parte aérea. As raízes foram desprezadas e a parte aérea, após remoção dos pigmentos em etanol 95% durante 24 horas, foi submetida à reação histoquímica para detecção de acúmulo de amido de forma qualitativa. O material foi imerso em Solução Iodine (1,5% iodeto de potássio e 0,3% de iodo), por 30 minutos e extensivamente lavado após este período. As imagens foram obtidas imediatamente utilizando-se câmera digital.

Para quantificação de antocianinas utilizou-se a metodologia de LANGE et al. (1971). Foram utilizadas três repetições de 20-30 plantas do ecótipo COL e dos mutantes *p9* e *p37*. Após 21 dias em meios +Pi, -Pi e -Pi/+RNA, o material foi seccionado em raiz e parte aérea, sendo esta imediatamente pesada e macerada em nitrogênio líquido. Ao extrato vegetal foi adicionado 1mL de propanol:HCl:H_2O (18:1:82, v/v/v), e a extração de antocianinas se deu em banho-maria por três minutos. Após centrifugação por cinco minutos a 13000 rpm, o supernadante foi coletado e a absorbância mensurada em 535 e 650nm. O teor de antocianinas foi calculado através da fórmula $\Delta A = A_{535} - A_{650}$/peso fresco.

3.6.4 Atividade de enzimas nucleolíticas

Inicialmente as plantas mutantes *p9* e *p37* e o ecótipo COL cresceram em sala de crescimento em meio +Pi por sete dias para

desenvolvimento do sistema radicular. Após este período foram transferidas e mantidas em meios +Pi, -Pi e -Pi/+RNA durante mais cinco dias. Utilizou-se nestas análises três repetições com aproximadamente 600 plantas. O material foi seccionado em raiz e parte aérea, pesado e imediatamente congelado.

Para verificação da atividade de fosfatases ácidas, as raízes foram analisadas separadamente da parte aérea. A extração de proteínas se deu conforme DELATORRE (2002). Ao material macerado em nitrogênio líquido, foi adicionado 250μL do tampão de extração [100mM de Tris-Acetato pH8, 100mM de K-Acetato pH8, 2mM de EDTA, 5mM de DTT (*Dithiothreitol*), 250mM Na-Acetato e 10% de glicerol], ficando a solução sob agitação por uma hora a 4ºC. Após centrifugação por 10 minutos a 14000 rpm em baixa temperatura, o supernadante foi coletado e congelado. A concentração de proteína extraída foi mensurada, usando-se uma alíquota do extrato diluído em H_2O e adicionando-se o reagente BRADFORD (Sigma). Após cinco minutos em temperatura ambiente, fez-se a quantificação em espectrofotômetro da absorbância em 595nm, usando-se como padrão uma curva de calibração com BSA (soro de albumina bovina).

Para análise da atividade de fosfatases ácidas, utilizou-se 7μg de proteína para sete diferentes tempos. Junto ao extrato de proteínas foram adicionados 100mM de acetato de sódio pH 5.5 como solução tampão e, como substrato para atividade enzimática de fosfatases ácidas, 10mM de fosfato de fenila dissódico hexahidratado. A solução foi então incubada em temperatura de 37ºC sob agitação. Amostras da solução foram retiradas em intervalos de 10 minutos e imediatamente colocadas em 1mL de 1M de carbonato de sódio,

para inibir a atividade enzimática. A absorção foi verificada em 405nm. A atividade das enzimas fosfatases ácidas totais, foi estimada pelo ângulo da curva dos valores obtidos para cada amostra. $h = \frac{A.vol}{d.E}$; onde A=inclinação; vol=0,3cm^3; d=0,5cm; E=coeficiente de extinção (18,5μmol^{-1}cm^{-2}).

A secreção de enzimas também foi avaliada. Para isso, aproximadamente 20 exemplares de cada genótipo foram crescidos em meio +Pi durante 15 dias, sendo então transferidos para solução nutritiva contendo -Pi/+RNA (0,15mg/mL). A cada 24 horas uma alíquota da solução nutritiva foi amostrada durante sete dias. Sendo a verificação da degradação de RNA observada por análise em gel de agarose a 0,8%.

3.6.5 Papel da elongação e da divisão celular na composição do fenótipo

Durante sete dias cresceram 30-50 plantas do ecótipo COL e dos mutantes *p9* e *p37* em meios +Pi, -Pi e -Pi/+RNA. A raiz e a parte aérea foram seccionadas e as raízes imersas em formaldeído 4%, montadas em lâminas histológicas com glicerina 50% e levadas ao microscópio ótico (Eclipse E-400, Nikon). A área da raiz observada foi a do elongamento celular, identificada através da presença de pêlos radiculares. Cerca de 2500 células foram medidas por genótipo. As imagens foram capturadas em aumento de 400x. Usou-se o software livre Image J para mensurar o tamanho das células desta região.

A divisão celular foi avaliada através da expressão do gene repórter GUS. Neste experimento, fez-se uso da planta transgênica que contém o

transgene *CycB1::GUS*, o qual expressa a enzima β-glucuronidase apenas nas células que estão entre a fase G2 e M. Os mutantes *p9* e *p37* foram cruzados com a planta transgênica, afim de transferir o transgene para estes. Tanto a geração F1 quanto a geração F2 foram testadas e selecionadas em meio -Pi/+RNA e transferidas para o solo para obtenção de sementes. A geração F1 foi testada em relação ao tamanho das raízes principais, para conferir se o cruzamento havia sido eficiente. A geração F2 foi avaliada para conferir a homozigose para os dois caracteres, mutação, a qual foi verificada através do comprimento das raízes primárias, e presença do transgene, usando o método não destrutivo para análise do GUS. No método não destrutivo para análise do GUS, as plantas foram retiradas do solo e uma parte das raízes foi imersa na solução de tingimento [25% de solução nutritiva completa, 50mM de $NaPO_4$ pH7, 1mM de X-GLUC [5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-glucuronidase (USB) dissolvido em N,N dimetilformamida (USB)] a 37ºC por aproximadamente seis horas, verificando-se então em estereomicroscópio a presença ou não de células com coloração azul, localizadas no meristema radicular (OONO et al., 1998).

Aproximadamente 15 plantas da geração F3 cresceram nos meios +Pi, -Pi e -Pi/+RNA durante cinco dias, e após este período foram submetidas ao método destrutivo para análise do GUS (DELATORRE, 2002). O material foi fixado em acetona 80% e incubado em gelo por 15 a 20 minutos. Após remoção da acetona o material vegetal ficou imerso durante 10 minutos em solução tampão [50mM de $NaPO_4$ pH 7,2; 0,5mM de $K_3Fe(CN)_6$ e 0,5mM $K_4Fe(CN)_6$] para então ser submetido à solução de tingimento [50mM de

$NaPO_4$ pH 7,2; 0,5mM de $K_3Fe(CN)_6$; 0,5mM $K_4Fe(CN)_6$ e 2mM de X-GLUC] a 37ºC. Após um período máximo de 11 horas exposto à solução de tingimento, o material vegetal passou por duas séries etílicas de seis minutos, a primeira crescente (15, 50, 75 e 100%) e a segunda decrescente (75, 50, 15, e 0%), para posterior montagem em lâminas histológicas em glicerina 50%. As lâminas histológicas foram observadas em microscópio ótico e as imagens capturadas em aumento de 100X e 400X. Foi verificado o número de células radiculares com coloração azul (na transição das fases G2-M).

3.6.6 Teores de fósforo total e fosfato livre

Os mutantes *p9* e *p37* e o ecótipo COL cresceram em meio +Pi durante sete dias. Sendo transferidos para os meios +Pi, -Pi e -Pi/+RNA, permanecendo nestes por mais sete dias. As plantas foram seccionadas em raiz e parte aérea, colocadas em temperatura de 60ºC, maceradas e pesadas.

Para análise de Pi livre, aplicou-se a metodologia de AMES (1966). A extração de Pi livre foi em HCl 0,5N, durante uma hora em temperatura de 37ºC. Alíquotas do extrato foram retiradas e a estas acrescentou-se uma mistura oxi-redutora de molibdato de amônio 0,42 % em 1N de H_2SO_4 e ácido ascórbico 15 % (6:1 – v/v). Após uma hora em temperatura de 37ºC, a absorbância foi verificada em espectrofotômetro na faixa de 820nm e comparada com a curva calibrada (0-1μM de KH_2PO_4).

O material vegetal utilizado para análise de P total foi levado à mufla em temperatura de 550ºC por três horas para obtenção de cinzas. Às cinzas foi adicionado HCl 0,5N. Sendo o material mantido por 15 minutos em banho-

maria à temperatura de 100ºC. Após esfriar, seguiu-se a metodologia de AMES (1966) também utilizada para detecção de Pi livre.

3.6.7 Resposta aos reguladores de crescimento

Durante 10 dias aproximadamente 30 plantas de cada mutante e do ecótipo COL cresceram em meios com 1mM de KH_2PO_4 e diferentes concentrações de reguladores de crescimento. Foram utilizadas as seguintes concentrações: 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}mM para giberelina (GA3) e citocinina (n-benziladenina) e 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}mM para auxina (2-4 D) afim de verificar a influência destes reguladores de crescimento na resposta à limitação de fósforo. As plantas foram fotografadas e o comprimento das raízes principais foi medido com auxílio do software IMAGE J.

3.7 Identificação do número de genes mutados e do caráter da ação gênica

As plantas mutantes *p9*, *p23* e *p37* foram retrocruzadas com o pai (ecótipo Columbia). O fenótipo da geração F1 foi conferido para determinar o caráter recessivo ou dominante da mutação. As plantas da geração F1 cresceram em meio -Pi/+RNA por sete dias, quando foi verificado o fenótipo. As plantas foram então transferidas para o solo, para permitir obtenção de sementes através de autofecundação. Cerca de 100 plantas da geração F2 cresceram em -Pi/+RNA. Após sete dias, a análise do fenótipo indicou o número de genes mutados envolvidos. Para isto, utilizou-se o teste do Qui-quadrado, valor obtido pela fórmula:

$$\chi^2 = \frac{\sum (F_o - F_e)^2}{F_e}$$

Onde:

F_o = freqüência observada para cada classe;

F_e = freqüência esperada para cada classe, com base na proporção mendeliana.

3.8 Desenvolvimento de população para mapeamento

Plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* (fêmeas) foram cruzadas com o ecótipo Landsberg (macho). Sendo as síliquas colhidas individualmente. Plantas F1 foram avaliadas em meio –Pi/+RNA para verificar a eficiência do cruzamento, transferidas para solo e autofecundadas. As sementes F2 foram semeadas em meio –Pi/+RNA e as que apresentavam raiz curta (fenótipo mutante) foram selecionadas e transferidas para o solo. Folhas destas plantas F2 foram removidas para extração de DNA. Sementes F3 foram coletadas para posterior confirmação da homozigose para mutação.

3.9 Análise estatística

Os dados foram avaliados com auxílio do programa SAS (*Statistical Analysis System*). Utilizou-se análise de variância (ANOVA) *one-way* ou análise de modelos lineares (GLM) para delineamento completamente casualizado. Foi utilizado o teste de Duncan, em nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das mutações

O ecótipo Columbia e os mutantes *p9*, *p23* e *p37* de *Arabidopsis thaliana* foram caracterizados morfologicamente, fisiologicamente e bioquimicamente. Os mutantes *p9* e *p37* estiveram presentes em todas as analises realizadas, diferentemente do mutante *p23* que, por problemas na germinação e no desenvolvimento, não obteve repetições suficientes, para a análise estatística. Desta forma, o mutante *p23* não foi incluído nas seguintes análises: comprimento total de raízes, número de raízes laterais, taxa de crescimento da raiz principal, razão parte aérea/raiz, teor de antocianinas, atividade de fosfatases ácidas, elongação e divisão celular, teores de P livre e P total e influência dos reguladores de crescimento

4.1.1 Caracterização das alterações de morfologia e arquitetura de raiz

Os mutantes de *Arabidopsis thaliana* foram previamente selecionados devido ao menor crescimento de suas raízes principais em meio contendo DNA (ácido desoxirribonucléico) como única fonte de fósforo. Assim, era necessário avaliar a resposta em termos de crescimento e arquitetura da raiz sob diferentes condições.

O comprimento da raiz principal do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9, p23* e *p37* foi verificado em quatro meios com diferentes disponibilidades de Pi (Figura 1). Observou-se no tratamento +Pi (2,5mM) comprimento de raiz principal equivalente entre COL e o mutante *p9* aos cinco dias mas não aos sete dias. No entanto, *p23* reduziu em torno de 55% e *p37* cerca de 65% o comprimento das raízes principais em relação a COL aos 12 e sete, respectivamente). No tratamento –Pi todos, os mutantes apresentaram drástica redução no comprimento de raiz principal, assim como o ecótipo Columbia. No tratamento –Pi/+RNA (0,4mg/mL), onde o ácido nucléico foi fonte de fosfato orgânico, o comprimento de raiz principal foi similar ao observado em +Pi apenas para COL aos cinco dias, enquanto que os mutantes *p9*, *p23* e *p37* apresentaram severa redução no comprimento da raiz principal, tanto em relação a COL neste tratamento (58%, 62% e 75%, respectivamente), quanto ao comprimento de suas raízes no tratamento +Pi (58%, 37,5% e 33,3% respectivamente). Os padrões de comportamento dos genótipos foram semelhantes aos cinco e aos sete dias após emergência (Figuras 2A e 2B, respectivamente).

Quando a concentração de RNA foi reduzida significativamente para 0,13mg/mL, por conseqüência reduzindo a quantidade de fósforo, observou-se resposta ainda mais severa nos mutantes, onde o desenvolvimento da raiz foi drasticamente atingido, reduzindo cerca de 90% do comprimento radicular de COL em mesma condição (Figura 1).

O comprimento total de raiz também foi medido aos cinco e sete dias, e se deu pela soma dos comprimentos da raiz principal e das raízes

laterais. O comprimento de raiz total não apresentou aumento significativo em relação ao comprimento da raiz principal em nenhuma das condições avaliadas (Figura 3).

Além do comprimento total de raiz, o número de raízes laterais em COL e nos mutantes *p9*, e *p37* foi verificado sob diferentes disponibilidades de Pi (Figura 4). Em geral, COL apresentou maior número de raízes laterais na ausência de Pi, diferentemente dos tratamentos +Pi e –Pi/+RNA, aos cinco e sete dias, sugerindo um sistema de compensação. Este padrão não foi observado nos mutantes. Aos cinco dias após germinação, foi observado maior número de raízes laterais em COL em relação aos mutantes em –Pi (figura 4A). No tratamento +Pi, *p9 e p37* apresentaram maior número de raízes laterais do que COL (Figura 4) aos sete dias. O mutante *p9* apresentou número de raízes laterais em –Pi/+RNA igual ao *p37* em +Pi. Aos sete dias COL e os mutantes apresentaram mais raízes laterais do que aos cinco dias, mantendo COL o maior número destas em –Pi. Em +Pi, *p37* aumentou cerca de seis vezes o número de raízes laterais, e *p9* duas vezes, diferentemente de COL que praticamente não apresentou alterações quando comparado ao número de raízes laterais apresentado aos cinco dias (Figura 4). Em –Pi/+RNA *p9* dobrou o número de raízes laterais, enquanto *p37* aumentou cerca de quatro vezes também em relação ao número dessas apresentado aos cinco dias.

A taxa de crescimento da raiz principal foi verificada em COL e nos mutantes *p9* e *p37* (Tabela 1). Quando comparados os tratamentos +Pi e –Pi todos os genótipos apresentaram redução da taxa de crescimento, apresentando *p37* a resposta mais severa. No tratamento +Pi tanto *p9* quanto

p37 em relação à Columbia diminuíram a taxa de crescimento (24% e 68% respectivamente). Em relação ao tratamento –Pi/+RNA, apenas Columbia manteve a taxa de crescimento similar ao tratamento +Pi (0,227 mm/h e 0,207 mm/h, respectivamente). Os mutantes diminuíram a taxa de crescimento tanto em relação à Columbia em –Pi/+RNA (cerca de 83% para ambos os mutantes), e *p9* em 79% e *p37* em 49%, em relação a eles mesmos em +Pi.

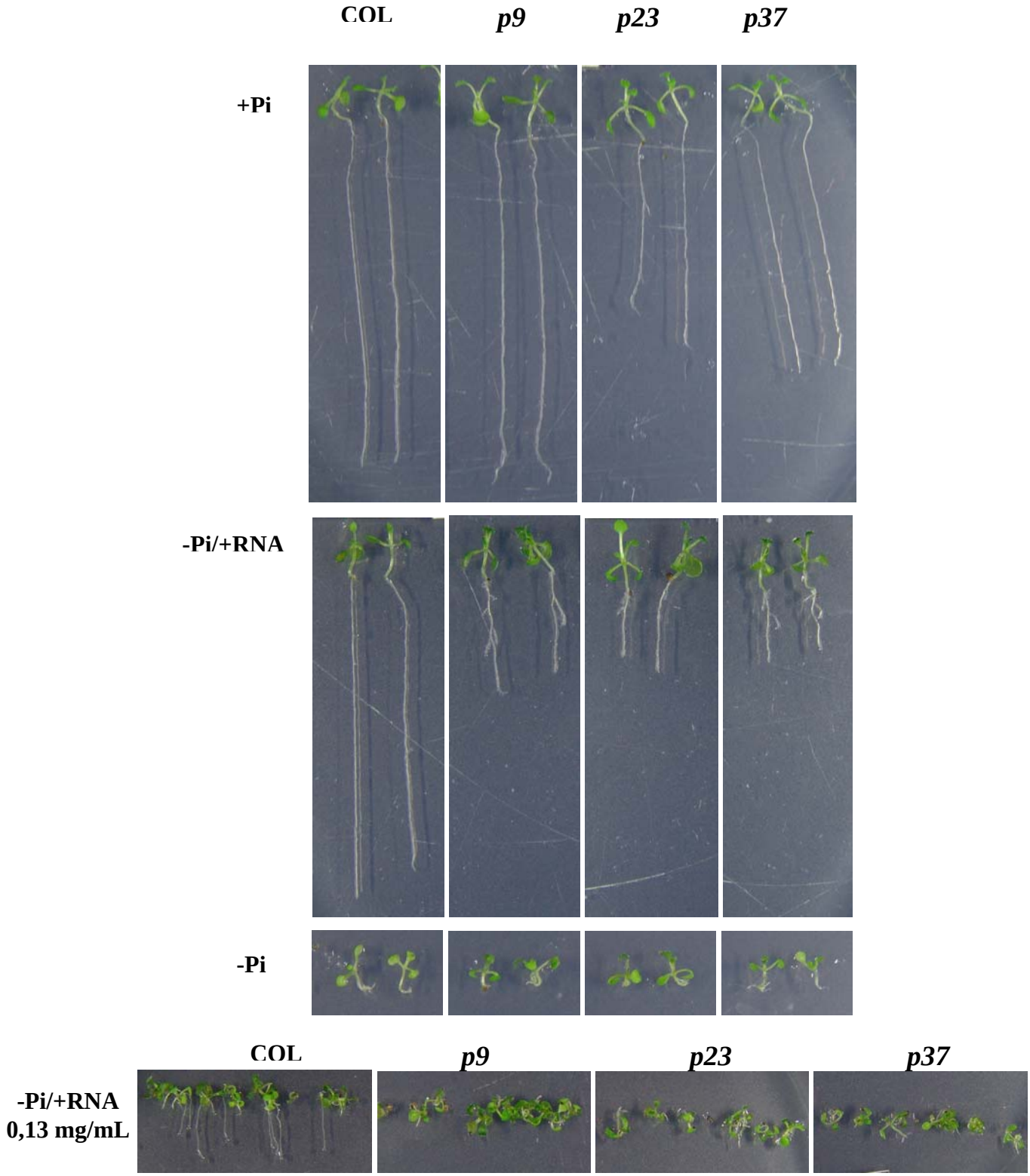

Figura 1 Crescimento de raízes do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9*, *p23* e *p37* de *Arabidopsis thaliana* em diferentes fontes de Pi, aos sete dias após germinação em +Pi (2,5mM), –Pi, –Pi/+RNA (0,4mg/mL) e aos 10 dias em 0,13mg (–Pi/+RNA).

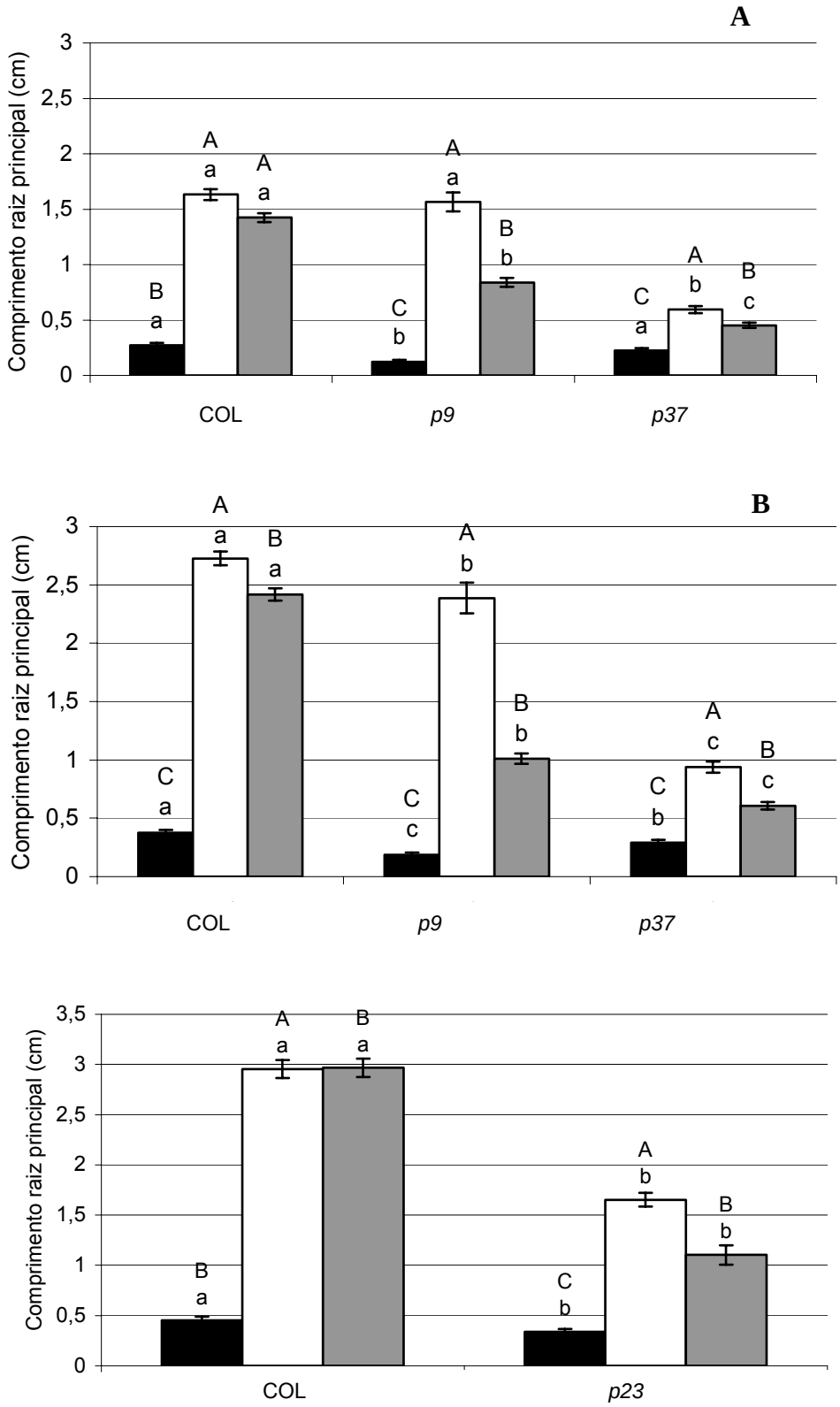

Figura 2 Comprimento da raiz principal do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9*, *p23* e *p37* de *Arabidopsis thaliana* em diferentes fontes de Pi. (A) aos cinco, (B) aos sete e (C) aos 12 dias após germinação. -Pi (preto), +Pi (2,5mM) (branco), -Pi/+RNA (0,4mg/mL) (cinza). Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas comparam dentro de genótipos e minúsculas entre genótipos.

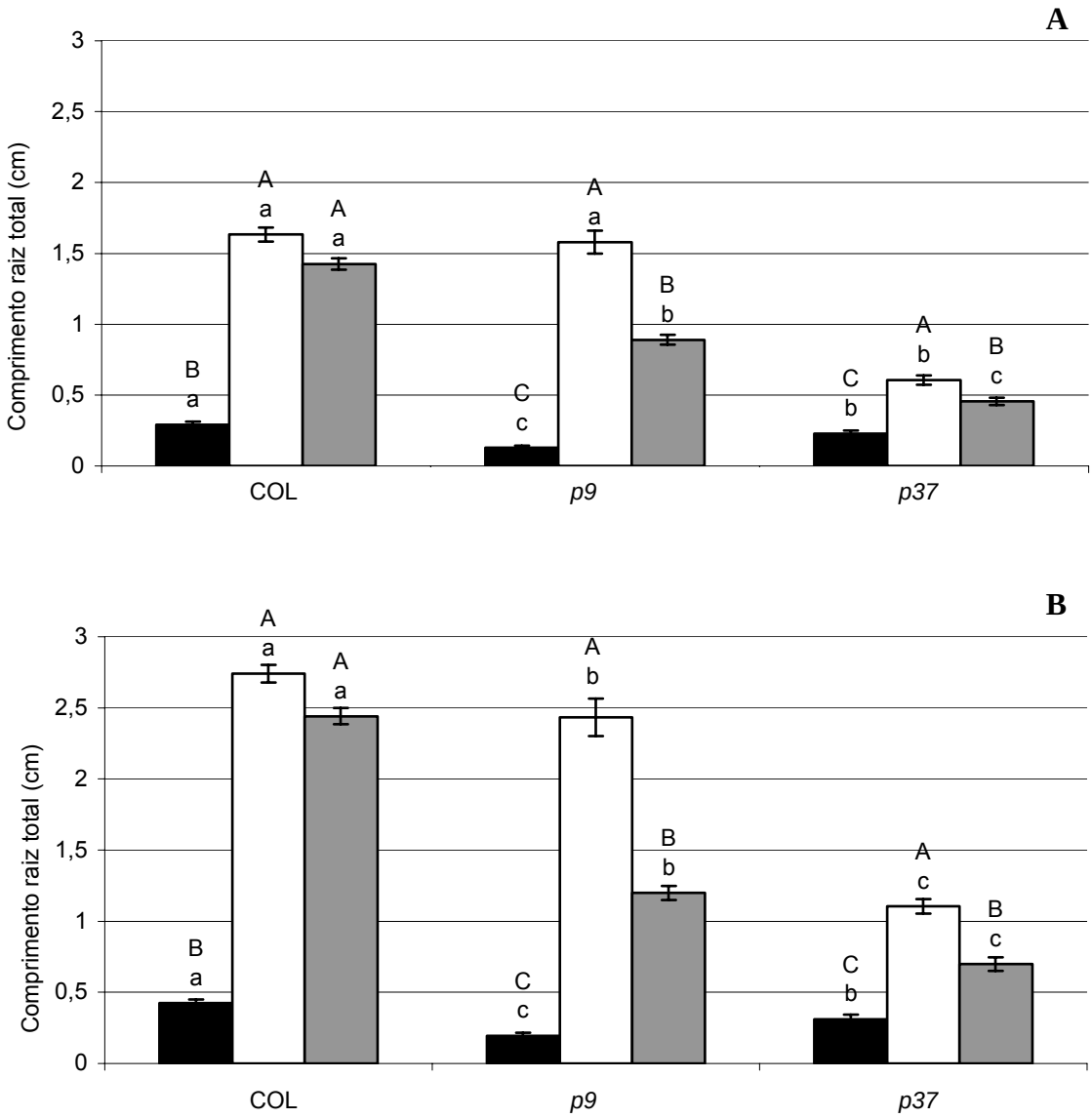

Figura 3 Comprimento de raiz total do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9* e *p37* de *Arabidopsis thaliana* em diferentes fontes de Pi. (A) aos cinco e (B) aos sete dias após germinação. -Pi (preto), +Pi (2,5mM) (branco), -Pi/+RNA (0,4mg/mL) (cinza). Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas comparam dentro de genótipos e minúsculas entre genótipos.

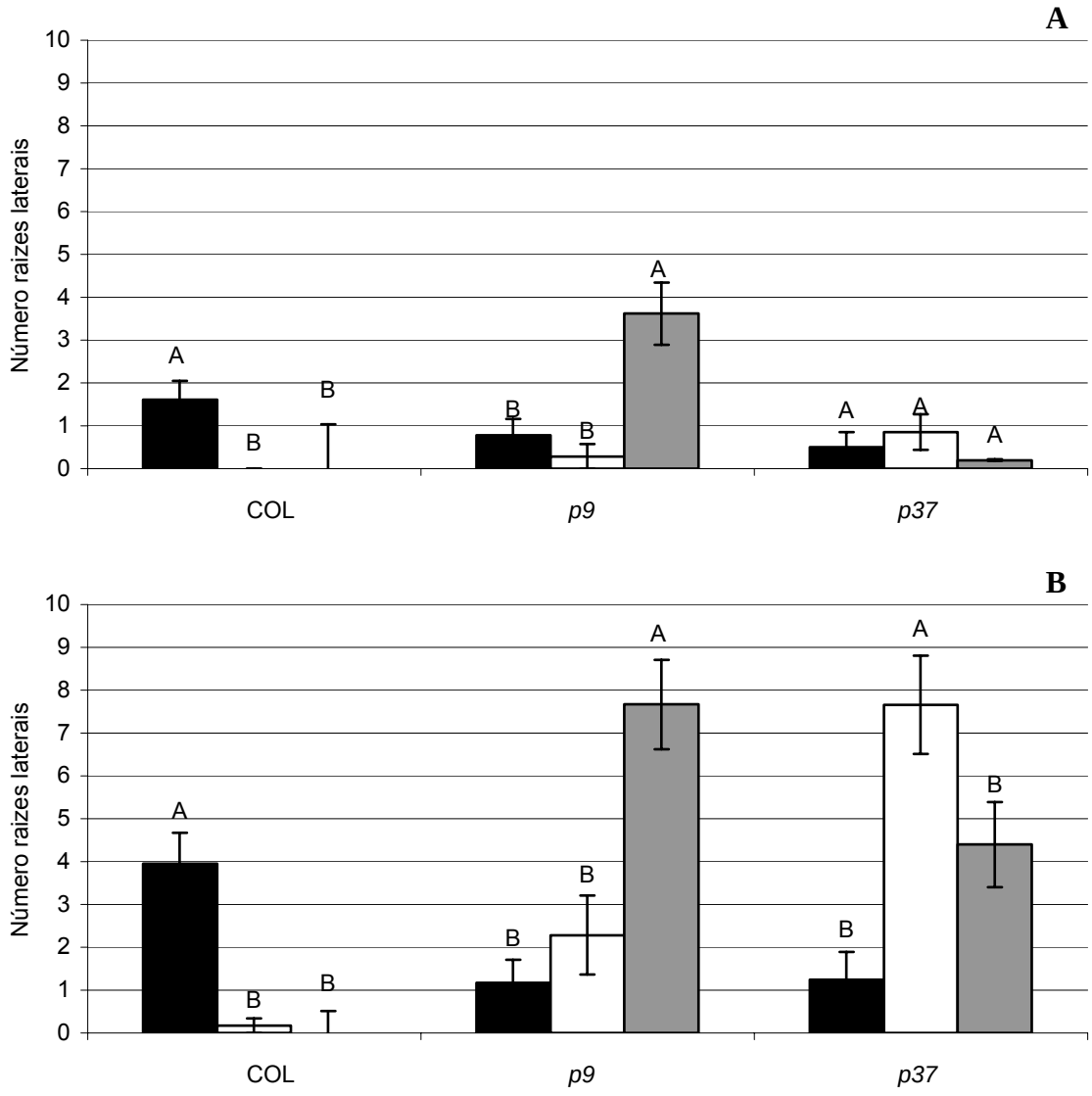

Figura 4 Número de raízes laterais do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9* e *p37* de *Arabidopsis thaliana* em diferentes fontes de Pi. (A) aos cinco e (B) aos sete dias após germinação. -Pi (preto), +Pi (2,5mM) (branco), -Pi/+RNA (0,4mg/mL) (cinza). Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%.

Tabela 1 Taxa de crescimento da raiz principal do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9* e *p37* de *Arabidopsis thaliana* em diferentes fontes de Pi. –Pi, +Pi (2,5mM) e -Pi/+RNA (0,4mg/mL).

	Taxa de crescimento (mm/h)		
	Raiz Principal		
	COL	***p9***	***p37***
–Pi	0,021 ± 0,002 B a	0,013 ± 0,002 C b	0,014 ± 0,002 C b
+Pi	0,227 ± 0,010 A a	0,171 ± 0,017 A b	0,071 ± 0,008 A c
–Pi/+RNA	0,207 ± 0,007 A a	0,035 ± 0,003 B b	0,036 ± 0,06 B b

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas comparam dentro de genótipos (colunas) e minúsculas entre genótipos (linhas).

Conforme observado na figura 2B os mutantes comportaram-se diferentemente entre si e ao ecótipo COL em relação ao comprimento da raiz primária em meio contendo Pi. Desta forma, a resposta do comprimento da raiz primária do ecótipo COL e dos mutantes *p9*, *p23* e *p37* foi verificada em meios nutritivos com concentrações intermediárias de Pi. Usou-se 0, 10, 50, 100, 500, 1000 e 2500μM de Pi, buscando-se determinar se havia diferenças na resposta a concentrações intermediárias de P (Figura 5). A percepção da limitação de Pi ocorre nas plantas, em geral, entre as concentrações de 50 e 100μM. Foi observado que ecótipo COL manteve crescimento progressivo da raiz principal em relação ao aumento da dose de Pi no meio, aumentando cerca de quatro vezes o comprimento entre a dose inicial e a final. O mutante *p9* também demonstrou crescimento progressivo, no entanto o comprimento da raiz principal não foi equivalente ao ecótipo COL (Figura 5), diferindo do demonstrado anteriormente (Figuras 1 e 2). Os mutantes *p23* e *p37* apresentaram, na última dose de Pi, 50% do comprimento da raiz principal do ecótipo COL. Enquanto o mutante *p9* dobrou o comprimento da raiz principal a

partir da dose de 100μM, *p23* e *p37* precisaram de uma concentração de Pi cinco vezes maior, para alcançar crescimento equivalentes à *p9*, mesmo assim apresentando crescimento 60% menor do que COL na mesma concentração (500μM) de Pi (Figura 5).

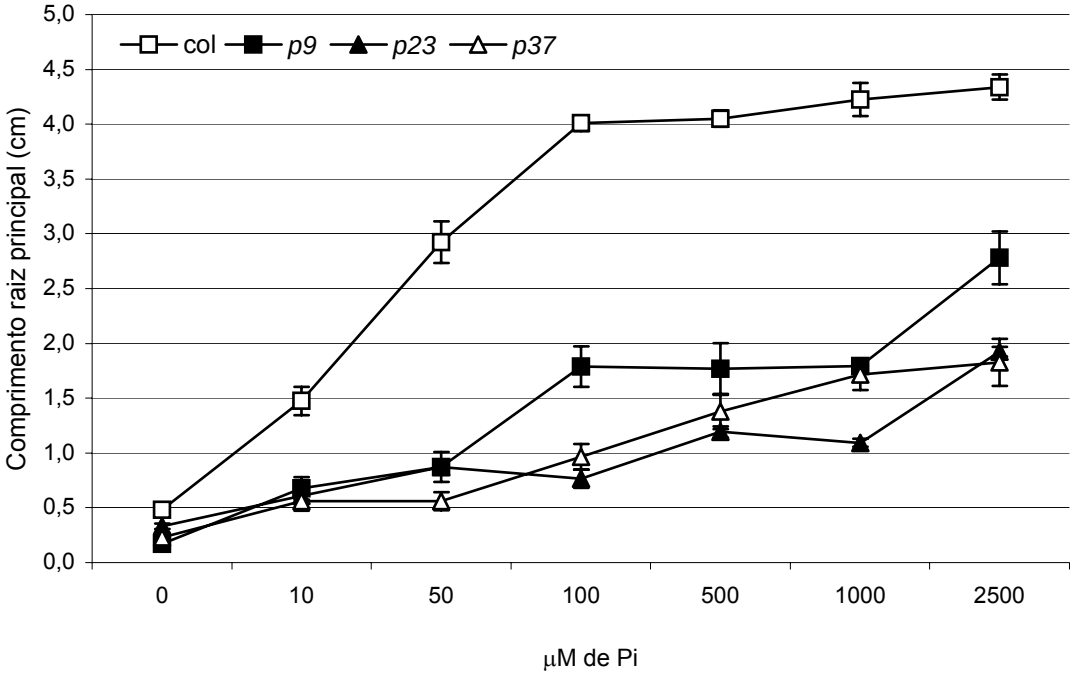

Figura 5 Comprimento da raiz principal do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9, p23* e *p37* de *Arabidopsis thaliana* em diferentes concentrações de Pi (μM), aos sete dias após germinação.

Uma das alterações mais comuns em resposta à deficiência de Pi em plantas é a modificação da alometria. O desenvolvimento da parte aérea é mais afetado que o do sistema radicular, uma vez que há priorização da busca por recursos minerais. A razão raiz/parte aérea foi verificada nos tratamentos +Pi, –Pi, –Pi/+RNA (Figura 6). Tanto COL quanto os mutantes reduziram a razão parte aérea/raiz em –Pi. COL e *p9*, mas não apresentaram diferença na alometria das plantas crescidas em +Pi, *p37* nesta condição favoreceu o crescimento da parte aérea. Em –Pi/+RNA os mutantes *p9* e *p37* aumentaram a razão parte aérea/raiz em relação aos seus comportamentos no meio –Pi.

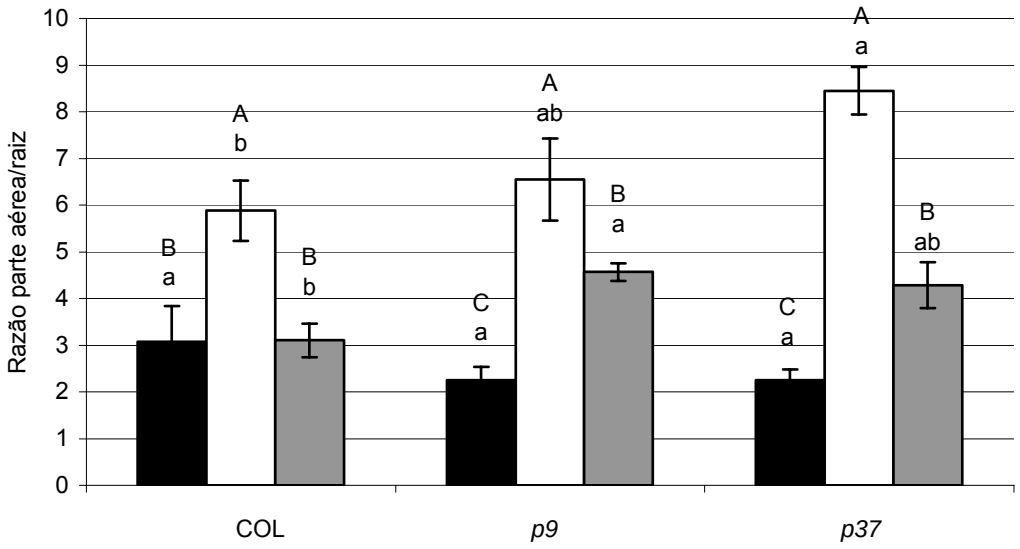

Figura 6 Razão parte aérea/raiz do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9* e *p37* de *Arabidopsis thaliana* em -Pi (preto), +Pi (2,5mM) (branco), -Pi/+RNA (0,4mg/mL) (cinza). Aos sete dias após germinação. Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas comparam dentro de genótipos e minúsculas entre genótipos.

4.1.2 Caracterização do crescimento radicular sob deficiência nutricional

O crescimento das raízes principais tanto em COL como nos mutantes foi verificado em relação à deficiência de outros nutrientes minerais além de fósforo, com o intuito de determinar se os mutantes condicionais apresentavam fenótipo apenas em resposta a fosfato ou se diferiam na resposta à deficiência de outros nutrientes. Os genótipos foram submetidos à deficiência em nitrogênio (-N), enxofre (-S), potássio (-K) e ferro (-Fe) e os tratamentos +Pi e –Pi foram usados como controles (Figura 7).

O ecótipo COL apresentou aumento do comprimento da raiz principal no tratamento –K, assim como o mutante *p9* em relação ao tratamento +Pi. Os mutantes *p9* e *p23* também apresentaram aumento do comprimento da raiz principal no tratamento –Fe. A raiz principal do mutante *p23* aumentou também nos tratamentos –N e –S, no entanto o comprimento da

raiz principal deste mutante mostrou-se sempre inferior ao comprimento do ecótipo COL nestestratamentos. Em relação ao tratamento –K, as raízes dos mutantes *p23* e *p37* apresentaram redução quando comparadas com +Pi, porém não tão drástico quanto ao que ocorreu em –Pi. O mutante *p37* também apresentou no tratamento –S comprimento de raiz principal diferente do tratamento +Pi. Nenhum dos genótipos avaliados tem respostas alteradas drasticamente em relação à deficiência de outros minerais.

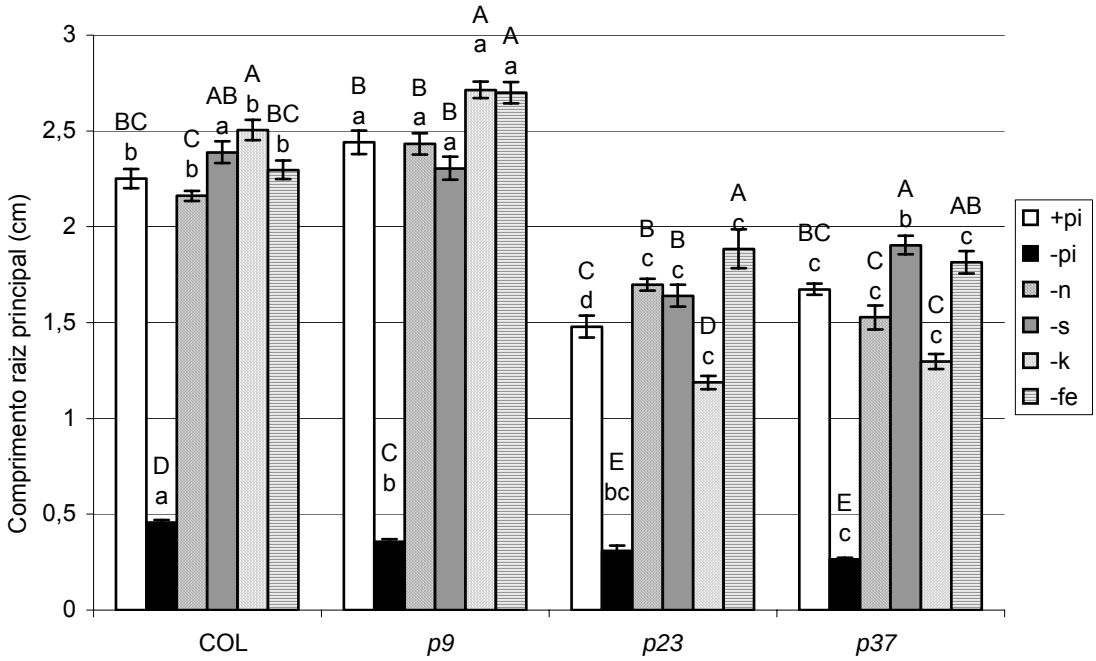

Figura 7 Comprimento da raiz principal do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9*, *p23* e *p37* de *Arabidopsis thaliana* em meios com diferentes deficiências nutricionais, aos12 dias após germinação. Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente. Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas comparam dentro de genótipos e minúsculas entre genótipos.

4.1.3 Acúmulo de antocianinas e amido

Outra resposta relacionada à deficiência de fósforo foi o acúmulo de antocianinas e amido nos tecidos vegetais.

O acúmulo de amido foi verificado qualitativamente na parte aérea do ecótipo COL e dos mutantes (Figura 8). Tanto COL quanto os mutantes *p9*, *p23* e *p37* responderam de forma semelhante ao tratamento –Pi, demonstrando acúmulo de amido. Quando submetidos ao tratamento –Pi/+RNA, apenas COL e o mutante *p23* não acumularam amido, os mutantes *p9* e *p37* se comportaram neste tratamento igualmente como em –Pi.

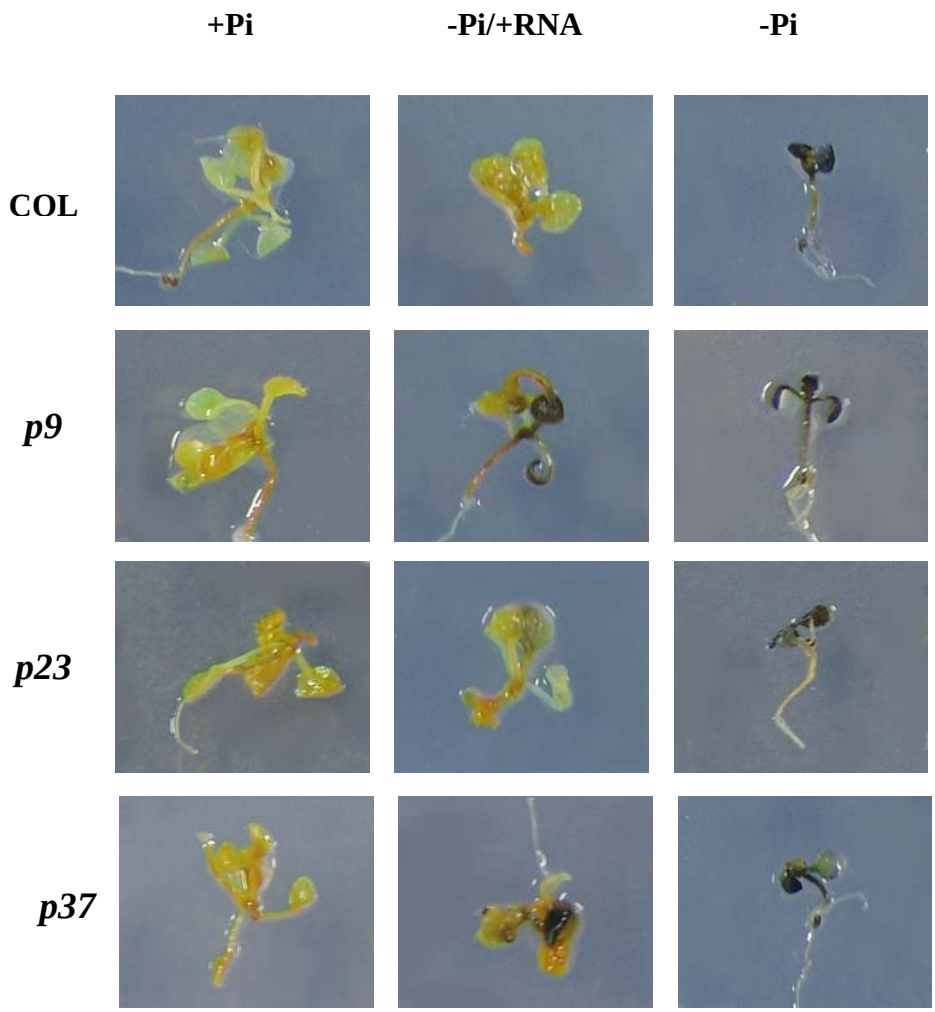

Figura 8 Acúmulo de amido na parte aérea do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9*, *p23* e *p37* de *Arabidopsis thaliana* em -Pi, +Pi (2,5mM) -Pi/+RNA (0,4mg/mL). Aos sete dias após germinação. Coloração preta demonstra a presença de amido.

Em relação ao acúmulo quantitativo de antocianinas, tanto COL quanto os mutantes *p9* e *p37* apresentaram alto teor deste pigmento no

tratamento –Pi. No tratamento –Pi/+RNA, o mutante *p9* acumulou este pigmento em quantidade superior ao acumulado em +Pi (Figura 9).

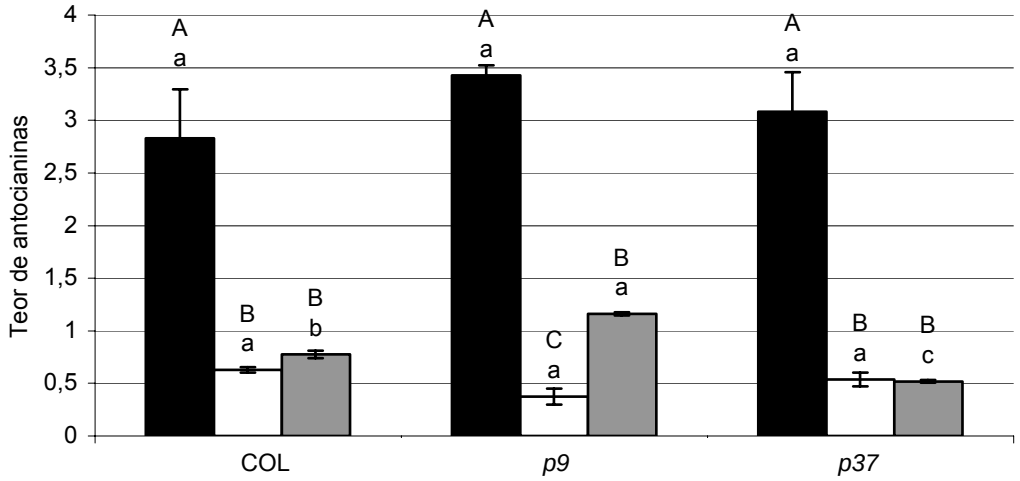

Figura 9 Acúmulo de antocianinas na parte aérea do ecótipo Columbia (COL) e dos mutantes *p9*, *p23* e *p37* de *Arabidopsis thaliana*. Aos 21 dias após germinação. -Pi (preto), +Pi (2,5mM) (branco), -Pi/+RNA (0,4mg/mL) (cinza). Aos 21 dias após germinação. Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas comparam dentro de genótipos e minúsculas entre genótipos.

4.1.4 Atividade de fosfatases ácidas

A atividade de fosfatases ácidas totais foi analisada no ecótipo Columbia e nos mutantes *p9* e *p37* nas raízes e na parte aérea separadamente (Figura 10A e 10B). Na parte aérea (Figura 10A), tanto COL quanto os mutantes apresentaram semelhante atividade destas enzimas nos tratamentos –Pi e –Pi/+RNA. O mutante *p37* no tratamento +Pi também apresentou atividade enzimática igual aos tratamentos –Pi e –Pi/+RNA, diferentemente de COL e *p9*, que reduziram a atividade em relação a esses tratamentos. No tratamento –Pi/+RNA, apesar de não significativo, houve uma tendência de queda na atividade de tais enzimas no mutante *p9*, diferentemente de COL que manteve o mesmo comportamento do tratamento –Pi. A atividade enzimática nas raízes (Figura 10B) nos tratamentos –Pi e +Pi não diferiu entre COL e os

mutantes. Moderada diminuição na atividade de fosfatases ácidas foi observada no tratamento –Pi/+RNA nos mutantes em relação a COL.

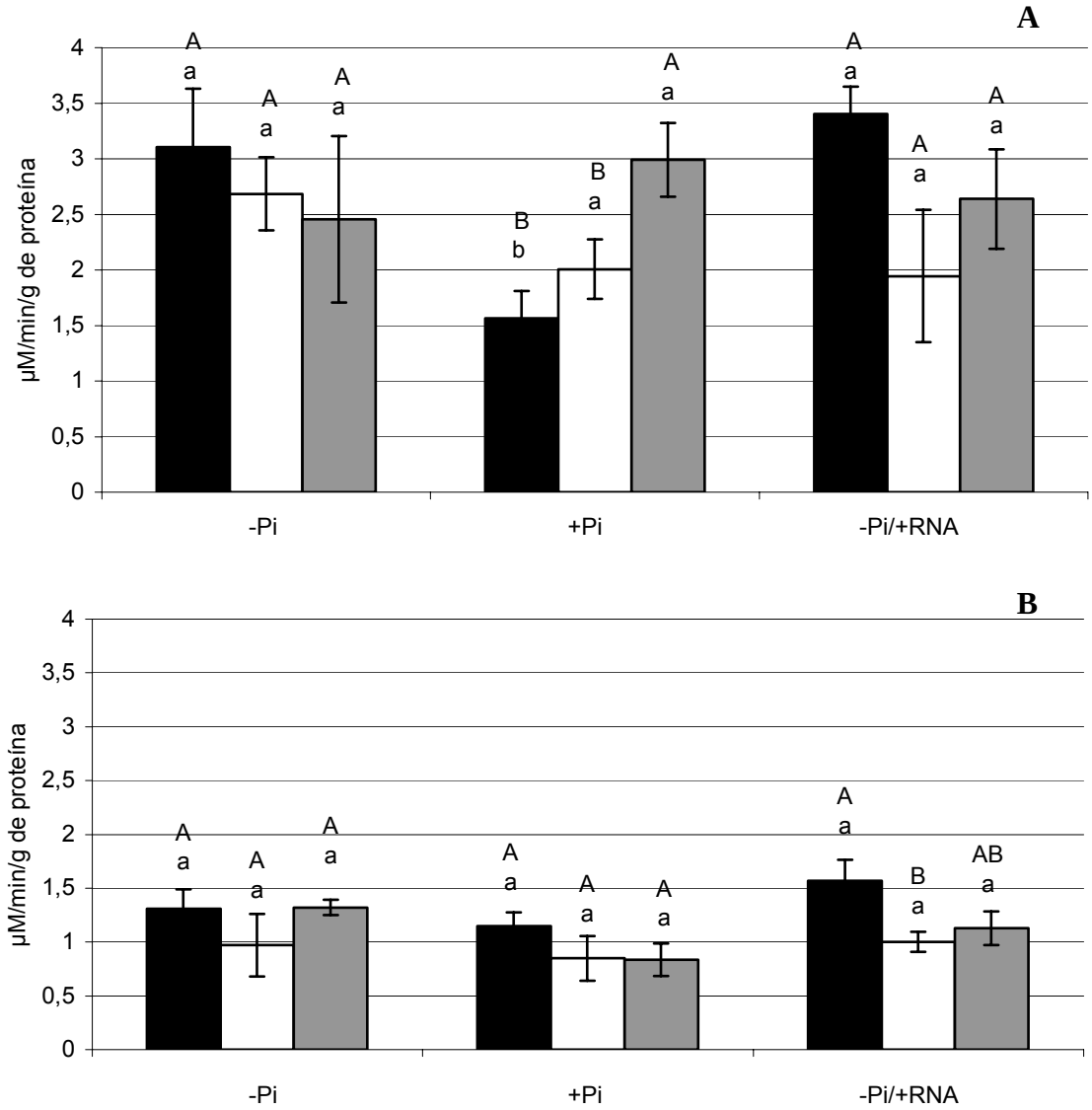

Figura 10 Atividade de fosfatases ácidas totais na parte aérea (A) e raiz (B) do ecótipo Columbia (COL) (preto) e dos mutantes *p9* (branco) e *p37* (cinza) de *Arabidopsis thaliana*. As plantas cresceram por sete dias em +Pi e depois foram transferidos para os tratamentos -Pi, +Pi (2,5mM), -Pi/+RNA (0,4mg/mL) por cinco dias. Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas comparam dentro de tratamentos e minúsculas entre tratamentos.

A atividade e a secreção de nucleases foram indiretamente verificadas pela análise da degradação de RNA da solução nutritiva em gel de agarose (Figura 11). Foi observado que o ecótipo Columbia apresentou forte

degradação de RNA a partir do 2º dia de tratamento, e que aos sete dias já havia consumido todo o RNA disponível na solução. Os mutantes *p9* e *p23*, também demonstraram consumo de RNA. No entanto, este ocorreu de forma mais lenta em relação a COL, demonstrando visualmente diferentes concentrações de RNA presentes após os sete dias. Já o mutante *p37* não mostrou degradação de RNA durante o período avaliado.

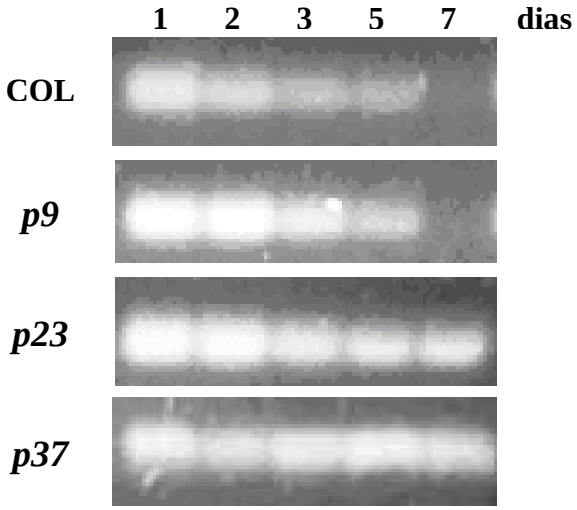

Figura 11 Consumo de RNA em solução nutritiva, observado em gel de agarose em eletroforese. Os fenótipos de *Arabidopsis thaliana* cresceram em meio +Pi (2,5mM). Após 15 dias as plantas foram transferidas para solução nutritiva –Pi/+RNA (0,4mg/mL) por sete dias.

4.1.5 Papel da elongação e da divisão celular na composição do fenótipo

O típico fenótipo de raiz curta sob deficiência de fósforo se deve a alterações no elongamento e/ou na divisão das células das raízes. Os mutantes *p9*, *p37* e o ecótipo Columbia tiveram avaliados o elongamento das células da raiz (Tabela 2), enquanto os mutantes transgênicos *p9 e p37* e planta transgênica *CycB1::GUS* foram avaliados em relação ao grau de expressão do gene repórter GUS, e a contagem do número de células radiculares na transição das fases G2-M (Figura 12 e Tabela 3).

Foi observado no tratamento +Pi, diferença entre todos os genótipos, apresentando *p9* e COL os maiores comprimentos nas células radiculares (132µm e 126µm respectivamente), em relação ao mutante *p37* (102µm) (Tabela 2). No tratamento –Pi, todos os genótipos apresentaram drástica redução do comprimento das células radiculares em relação ao tratamento +Pi (67µm, 64µm e 46µm para COL, *p9* e *p37,* respectivamente). O ecótipo Columbia apresentou maior o comprimento celular radicular no tratamento –Pi/+RNA, quando comparado ao tratamento +Pi (136µm), enquanto os dois mutantes demonstraram redução (92µm em *p9* e 76µm em *p37*). O mutante *p37* mostrou menor elongação em relação aos outros genótipos para todos os tratamentos avaliados.

Tabela 2 Comprimento de células elongadas da raiz principal do ecótipo Columbia e dos mutantes *p9* e *p37* de *Arabidopsis thaliana*. Os fenótipos cresceram nos tratamentos -Pi, +Pi (2,5mM), -Pi/+RNA (0,4mg/mL) durante sete dias.

	Comprimento celular (µm)		
	-Pi	**+Pi**	**-Pi/+RNA**
COL	67,3 ± 1,0 C a	126,5 ± 1,3 B b	136,0 ± 1,3 A a
p9	64,8 ± 0,8 C b	132,9 ± 1,6 A a	92,0 ± 1,1 B b
p37	45,9 ± 0,6 C c	101,8 ± 1,3 A c	76,4 ± 0,9 B c

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas comparam dentro de genótipos (linhas) e minúsculas entre genótipos (colunas).

Em relação ao grau de expressão do gene repórter GUS, pouca diferença visual foi observada entre *CycB1::GUS* e os mutantes transgênicos em +Pi e –Pi, sendo alto e baixo o grau de expressão nestes tratamentos, respectivamente. Em relação ao tratamento –Pi/+RNA o mutante *p37* demonstra redução na expressão deste gene em relação aos outros genótipos

analisados (Figura 12), o que se confirma quando o número de células na transição das fases G2-M é contado (Tabela 3). Enquanto *CycB1::GUS* e *p9* apresentaram em torno de 10 e 11 células na transição G2-M respectivamente, *p37* apresentou média de quatro a cinco células nesta condição.

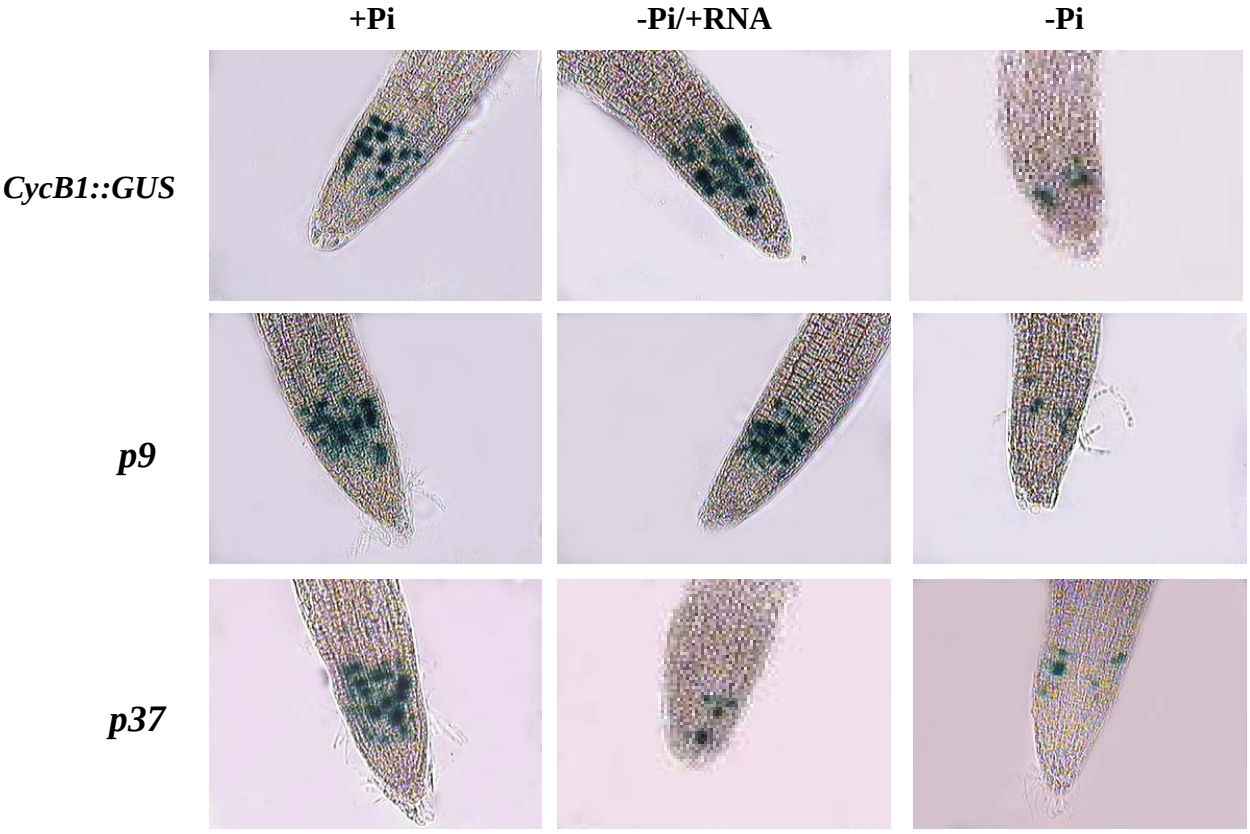

Figura 12 Divisão celular no meristema apical na planta transgênica CycB1::GUS e nos mutantes p9 e p37 de Arabidopsis thaliana, aos cinco dias após germinação, nos tratamentos -Pi, +Pi (2,5mM), -Pi/+RNA (0,4mg/mL). As células marcadas estão em fase de transição G2/M.

Tabela 3 Número de células visíveis expressando a enzima beta-glucuronidase na raiz principal dos fenótipos *CycB1::GUS, p9* e *p37* de *Arabidopsis thaliana*, através da expressão do gene repórter GUS. As plantas cresceram durante cinco dias nos tratamentos -Pi, +Pi (2,5mM), -Pi/+RNA (0,4mg/mL).

	Número de células visíveis em G2/M		
	-Pi	**+Pi**	**-Pi/+RNA**
CycB1::GUS	6,08 ± 0,72 B a	10,57 ± 0,66 A a	10,46 ± 0,79 A a
p9	5,66 ± 0,66 B a	10,57 ± 1,52 A a	11,71 ± 0,78 A a
p37	4,62 ± 0,56 B a	8,66 ± 0,77 A a	4,55 ± 0,78 B b

Médias seguidas de mesmas letras não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas para genótipo (linha) e minúsculas (coluna) para tratamento.

4.1.6 Teores de fosfato livre e fósforo total

Os valores obtidos nos teores de fosfato livre (Pi livre) nas raízes foram geralmente 1/3 menores do que aqueles encontrados na parte aérea em todos os tratamentos analisados (Figura 13A e 13B). Nenhuma diferença significativa foi observada entre *p9*, *p37* e COL em –Pi, tanto na parte aérea quanto nas raízes nos baixos teores de Pi livre verificados. Em relação ao tratamento +Pi, igual teor de Pi livre entre os genótipos foi observado na análise das raízes. Porém em relação à parte aérea o mutante *p9* apresentou redução quando comparado ao ecótipo Columbia e ao mutante *p37*. Quando verificado o teor de Pi livre em –Pi/+RNA, observou-se similaridade entre os genótipos na parte aérea, mas não nas raízes, onde *p9* demonstrou redução em relação a COL e *p37*. Tanto *p9* e *p37* apresentaram redução no conteúdo de fosfato livre nas raízes no tratamento –Pi/+RNA em relação ao tratamento +Pi, diferentemente do ecótipo COL que manteve-se igual.

Em relação aos teores de fósforo total (P total), semelhante ao observado na análise de Pi livre, em todos os tratamentos obteve-se na parte aérea em média o dobro dos teores quando comparados com os obtidos nas

raízes (Figura 14A e 14B). Em –Pi não foi verificada diferença significativa entre Columbia e os mutantes em relação aos teores de fósforo total na parte aérea e nas raízes. No tratamento +Pi todos os genótipos apresentaram teores altos de P total, não havendo diferença entre suas respostas quando avaliada a parte aérea, diferentemente do observado nas raízes, onde o mutante *p37* mostrou redução quando comparado a COL e *p9*. No tratamento –Pi/+RNA, a análise dos teores de fósforo total tanto na parte aérea quanto nas raízes não mostrou diferenças entre os genótipos, no entanto foi observada redução desses teores nas raízes *p37* em relação ao tratamento +Pi.

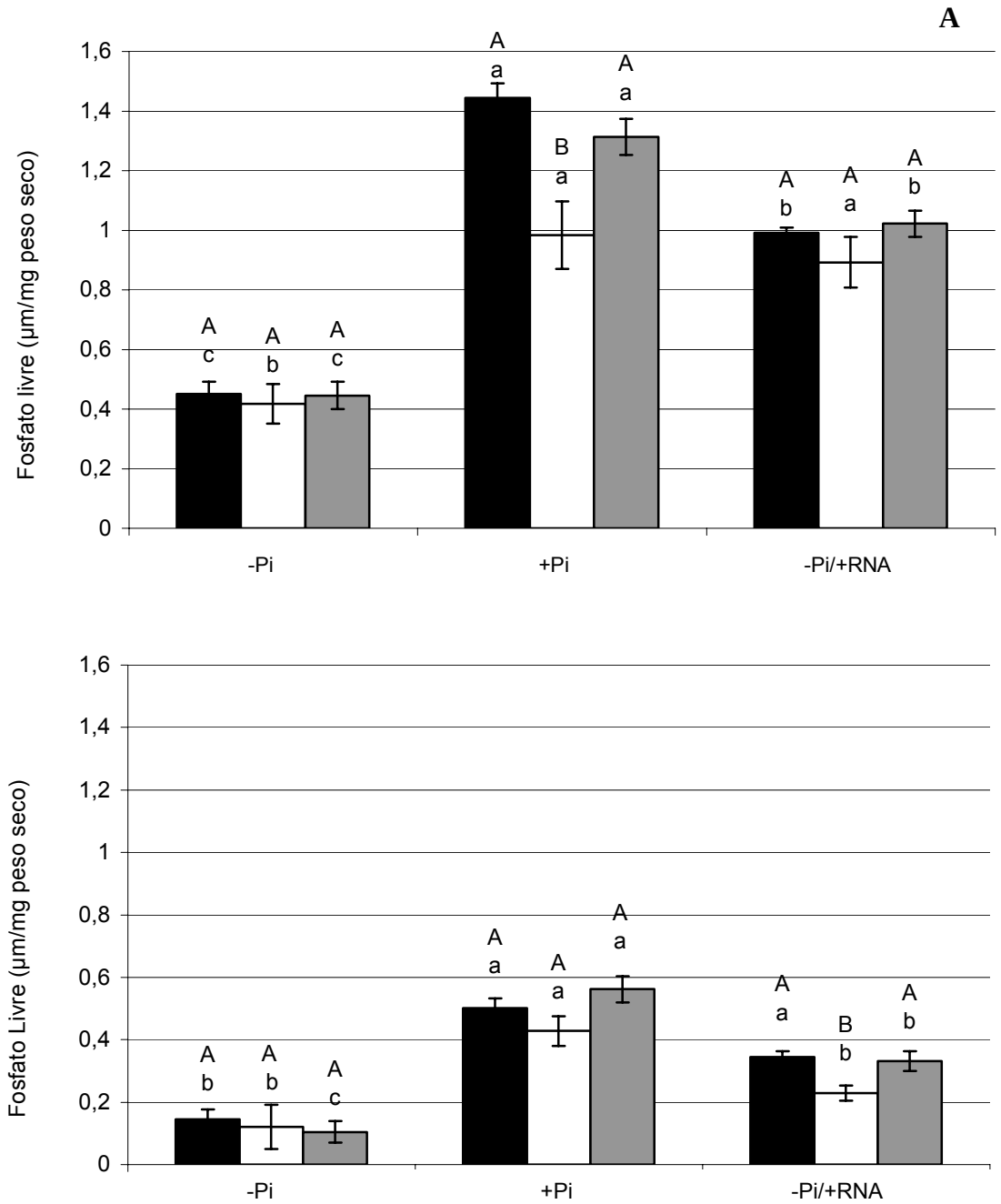

Figura 13 Conteúdo de fosfato livre na parte aérea (A) e nas raízes (B) do ecótipo Columbia (preto) e nos mutantes *p9* (branco) e *p37* (cinza) de *Arabidopsis thaliana*. Os genótipos cresceram por sete dias em +Pi sendo transferidos para os tratamentos -Pi, +Pi (2,5mM), -Pi/+RNA (0,4mg/mL) por sete dias Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas comparam dentro de tratamentos e minúsculas entre tratamentos.

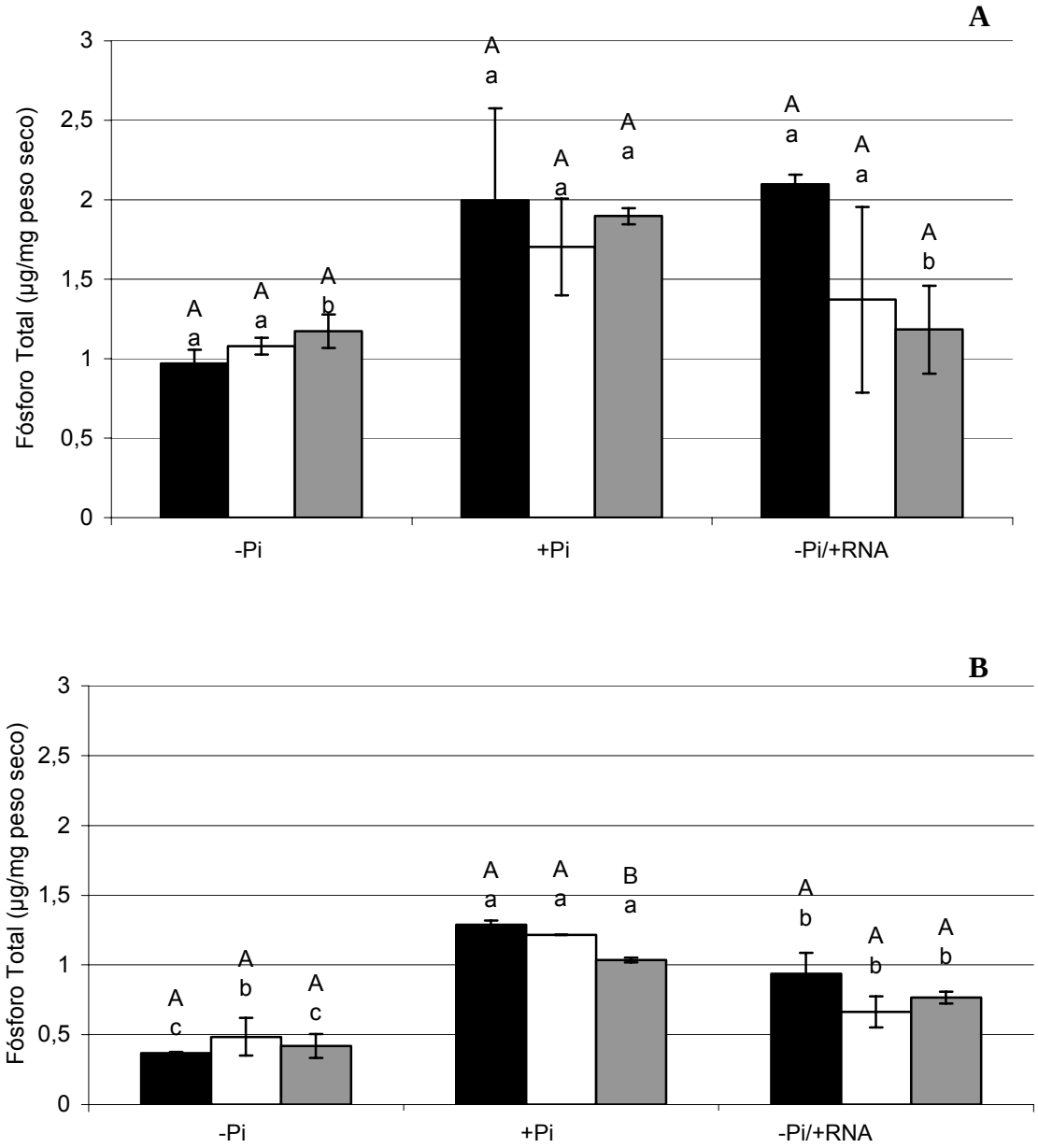

Figura 14 Conteúdo de fosfato total na parte aérea (A) e nas raízes (B) do ecótipo Columbia (preto) e nos mutantes p9 (branco) e p37 (cinza) de Arabidopsis thaliana. Os genótipos cresceram por sete dias em +Pi sendo transferidos para os tratamentos -Pi, +Pi (2,5mM), -Pi/+RNA (0,4mg/mL) por sete dias. Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas comparam dentro de tratamentos e minúsculas entre tratamentos.

4.1.7 Influência dos reguladores de crescimento

O crescimento das raízes principais tanto em COL como nos mutantes foi verificado em relação à deficiência de outros nutrientes minerais além de fósforo, com o intuito de determinar se os mutantes condicionais apresentavam fenótipo apenas em resposta a fosfato ou se diferiam na resposta à deficiência de outros nutrientes. Os genótipos foram submetidos à deficiência em nitrogênio (-N), enxofre (-S), potássio (-K) e ferro (-Fe) e os tratamentos +Pi e –Pi foram usados como controles (Figura 7).

O ecótipo COL apresentou aumento do comprimento da raiz principal no tratamento –K, assim como o mutante *p9* em relação ao tratamento +Pi. Os mutantes *p9* e *p23* também apresentaram aumento do comprimento da raiz principal no tratamento –Fe. A raiz principal do mutante *p23* aumentou também nos tratamentos –N e –S, no entanto o comprimento da raiz principal deste mutante mostrou-se sempre inferior ao comprimento do ecótipo COL nestes tratamentos. Em relação ao tratamento –K, as raízes dos mutantes *p23* e *p37* apresentaram redução quando comparadas com +Pi, porém não tão drástico quanto ao que ocorreu em –Pi. O mutante p37 também apresentou no tratamento –S comprimento de raiz principal diferente do tratamento +Pi. Nenhum dos genótipos avaliados tem respostas alteradas drasticamente em relação à deficiência de outros minerais.

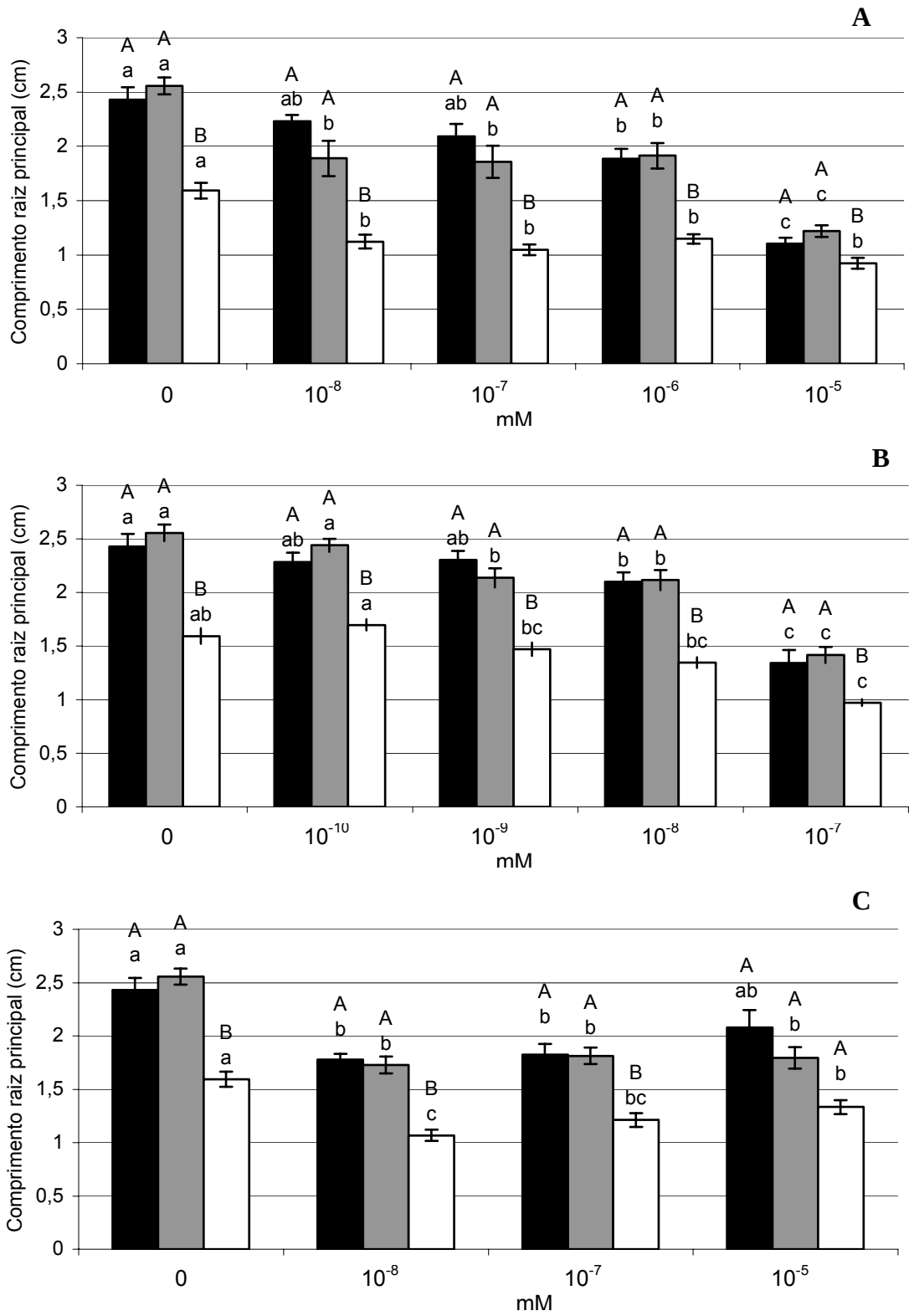

Figura 15 Comprimento de raiz principal em diferentes doses de citocinina (A), auxina (B) e ácido giberélico (C). O ecótipo Columbia (preto) e os mutantes *p9* (cinza) e *p37* (branco) de *Arabidopsis thaliana* cresceram por 10 dias nos respectivos meios de crescimento. Letras iguais não diferem significativamente em Duncan 5%. Letras maiúsculas comparam dentro de tratamentos e minúsculas entre tratamentos.

4.2 Identificação do número de genes mutados e do caráter da ação gênica

As mutações foram geneticamente caracterizadas. O cruzamento dos mutantes *p9*, *p23* e *p37* (mães) e Columbia (pai) resultou em fenótipo com raiz longa para toda progênie F1 em meio com –Pi/+RNA, indicando que as mutações apresentavam caráter recessivo (Tabela 4). Para verificar o número de genes mutados envolvidos com o fenótipo dos mutantes, a F1 passou por autofecundação, sendo a progênie F2, avaliada em meio –Pi/+RNA. Obtiveram-se dois fenótipos, um de raiz longa e outro de raiz curta. Seguindo a segregação mendeliana, não se obteve diferença estatística para a relação 3:1 (raiz longa:raiz curta), podendo-se, portanto, afirmar que o fenótipo de cada mutante se deve a uma única mutação recessiva.

Tabela 4 Análise genética do caráter da mutação. As populações F1 e F2 do retrocruzamento dos mutantes com o ecótipo Columbia de *Arabidopsis thaliana* foram fenotipadas em meio –Pi/+RNA (0,4mg/mL) e as segregações testadas.

	Geração	Número de plantas		Relação	X^2
		Raiz longa	Raiz curta		
***p9* x Col**	F1	42	0		
	F2	289	100	3:1	$0,75^{ns}$
***p23* x Col**	F1	33	0		
	F2	88	23	3:1	$0,29^{ns}$
***p37* x Col**	F1	37	0		
	F2	106	25	3:1	$0,12^{ns}$

^{ns} Não significativo em nível de 5% de probabilidade

4.3 Desenvolvimento de população para mapeamento

Os mutantes *p9* e *p37* foram cruzados com o ecótipo Landsberg. Foram selecionados na F2 em –Pi/+RNA as plantas com o fenótipo raiz curta. Esta população será utilizada no mapeamento das mutações.

5 DISCUSSÃO

O uso de mutantes é uma estratégia genética importante e vem sendo amplamente utilizada para identificação de rotas de sinalização para os mais variados processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares em microorganismos, animais e vegetais. Tal estratégia tem servido para identificação de componentes estruturais e regulatórios na rota de sinalização de Pi. Devido à importância deste macronutriente para os vegetais e pelo fato de processos como assimilação, estocagem e homeostase serem altamente regulados, a dissecação da rota de transdução é complicada. A sua interação com outras rotas envolvidas na sinalização da disponibilidade de outros nutrientes, como nitrogênio, e com o metabolismo do carbono adicionam complexidade ao estudo.

Dentro da linha de pesquisa da limitação de fósforo, várias seleções genéticas foram desenvolvidas, identificando mutantes de *Arabidopsis thaliana* com as mais variadas respostas. A maior parte dos genes clonados até o momento está relacionada com componentes estruturais, principalmente os transportadores. A primeira seleção a identificar um componente regulatório foi a de RUBIO et al. (2001). Nesta seleção, foi identificado o gene PHR1, que codifica um fator de transcrição do tipo MYB. Os autores sugerem a ação deste gene no controle transcricional parcial da limitação de Pi, afetando algumas das respostas moleculares de resgate a este nutriente.

No presente trabalho, foram utilizados mutantes de *Arabidopsis thaliana* L. identificados na seleção de CHEN et al. (2000). Esta seleção é baseada na habilidade facultativa de tipos silvestres de *Arabidopsis* em utilizar fosfohidrolases para metabolizar ácidos nucléicos quando a disponibilidade de Pi é limitada. As vantagens desta seleção de mutantes se devem basicamente a dois motivos. O primeiro consiste no fato dos mutantes que apresentam alterações no comprimento de raízes, provavelmente estarem limitados na utilização do Pi presente nos ácidos nucléicos. Como há várias enzimas capazes de quebrar estes compostos, o fenótipo tem maior chance de dever-se à mutação em um dos componentes regulatórios envolvidos na rota de resposta da sinalização à deficiência de Pi. O segundo motivo está relacionado ao uso de *Arabidopsis thaliana*, hoje uma planta modelo para estudos genéticos. *Arabidopsis* é atualmente a planta vascular mais bem estudada, tendo seu genoma inteiramente seqüenciado, assim disponibilizando muitas ferramentas moleculares. Além do rápido ciclo de vida, a inabilidade em interagir com micorrizas e de demonstrar respostas clássicas de deficiência nutricional, fatores estes de suma importância para estudo da limitação de Pi.

É sugerido que os mutantes identificados nesta seleção, sejam potencialmente defectivos na percepção de baixos níveis de Pi, nos eventos de transdução de sinais (sinalização), na expressão de genes induzidos ao resgate de Pi, na secreção de enzimas nucleolíticas ou na absorção de Pi (DELATORRE, 2002).

Para verificar em qual hipótese melhor se enquadram, os mutantes foram caracterizados e identificados em relação às respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas relacionadas à deficiência de Pi.

A identificação genética dos mutantes demonstrou que os seus fenótipos devem-se à mutação em apenas um gene em cada mutante, os quais são recessivos e complementares. Todas as modificações observadas para cada mutante são decorrências da alteração do funcionamento de um único gene. Estas modificações são em diferentes aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos da planta, sugerindo que o gene mutado não seja estrutural, mas sim de ação regulatória. Estes resultados adicionam mais uma vantagem no uso destes mutantes como ferramentas para fornecimento de informações que venham a ampliar o conhecimento da complexa cascata de sinalização da limitação de Pi.

Dentre as análises para caracterização de mutantes, fez-se algumas relacionadas à especificidade dos fenótipos em relação a fósforo. O comportamento de Columbia (COL) e dos mutantes foi verificado em tratamentos com deficiência de nitrogênio, ferro, enxofre e potássio, e como controle foram usados os tratamentos +Pi e –Pi (Figura 7). Os resultados da análise do comprimento da raiz principal indicam que os genótipos dos mutantes *p9*, *p23* e *p37* são específicos à deficiência de Pi.

No entanto, apesar dos mutantes responderem à deficiência de alguns nutrientes de forma diferente em relação ao comportamento de Columbia (COL), estas diferenças não são tão críticas quanto àquelas apresentadas em relação à deficiência de P. No caso de –K, ocorreu uma

redução do crescimento da raiz nos mutantes *p23* e *p37* e no caso do –Fe houve maior crescimento do mutante *p23* do que no meio completo, porém não o suficiente para resgatar o fenótipo. Apesar disso, não se deve descartar totalmente a possibilidade de interação, uma vez que as plantas podem utilizar a mesma rota para diferentes sinais do ambiente ou rotas que se integram. A bibliografia traz diversos exemplos destas interações.

DELATORRE (2002) sugeriu que o fenótipo de raiz curta do mutante *pdr1*, de *Arabidopsis thaliana,* em meio completo possa ser causado por hipersensibilidade a doses altas de nitrogênio, quando observou que, na ausência de N, o fenótipo é completamente resgatado, apresentando o mutante comprimento de raiz principal semelhante ao de Columbia. WANG et al. (2002) mostraram em raízes de tomate rápida indução de genes regulatórios e transportadores sob deficiência de P, Fe e K, sugerindo a coordenação e a co-regulação na absorção destes três minerais. E em *Chlamydomonas reinhardtii* foi demonstrado que o gene LPB1, que possui grande similaridade com proteínas expressas em *Arabidopsis* e em arroz, é importante na aclimatação às deficiências de P e S (CHANG et al., 2005).

O mutante *p23* de *Arabidopsis* apresenta respostas interessantes à limitação de P, nos tratamentos +Pi e –Pi/+RNA. Além do comprimento da raiz principal deste mutante ser menor em –Pi/+RNA, também apresenta significativa redução em relação a COL, quando o suprimento de Pi não é limitado (Figuras 1 e 2C). Pelo alto número de raízes laterais que este mutante apresenta em +Pi (dados não apresentados), acredita-se que o comprimento

de raiz total neste tratamento possa ser recuperado, aproximando ou igualando-se ao de COL.

Os comprimentos das raízes principais de *p23* e *p37* são semelhantes em +Pi. Esta semelhança foi mais evidenciada quando se avaliou o comprimento das raízes principais em relação ao aumento nas doses de P no meio. Ambos os mutantes não apresentam respostas expressivas ao gradual aumento de P (Figura 5). No entanto, diferentemente de *p9* e *p37*, não foi possível verificar acúmulo de amido em –Pi/+RNA no mutante *p23* (Figura 8). É intrigante este mutante não acumular amido quando a única fonte de Pi são ácidos nucléicos, pois foi verificado que *p23* degrada RNA do meio de forma mais lenta que Columbia (Figura 11). Este fato é consistente com a redução da atividade de duas ribonucleases (RNS1 e RNS2) e de duas fosfatases ácidas (com tamanhos de 80kDa e 120kDa), verificada por DELATORRE (2002) quando fez a análise do extrato total deste mutante em tratamento –Pi/+DNA em relação a COL.

Estas análises sugerem limitação nos níveis internos de Pi livre e/ou P total, que deveriam resultar em acúmulo de amido. Uma possibilidade seria alteração na alocação de Pi, lembrando o que ocorre no mutante de *Arabidopsis pho2*, que acumula Pi em níveis excessivos na parte aérea, enquanto o sistema radicular se mantém sob deficiência. Talvez *p23* transfira o Pi que absorve preferencialmente para a parte aérea e, por esta razão, não acumula amido nos cloroplastos. No entanto, este mutante é mais complexo que o *pho2*, pois a mutação afetou também a indução as respostas de enzimas hidrolíticas induzidas por Pi.

Devido ao pequeno número de análises realizadas no mutante *p23*, não é possível o desenvolvimento de hipótese em relação à sua mutação, pois análises mais significativas, por exemplo, teores de Pi livre e P total, divisão e elongamento celular são necessárias para ampliar o conhecimento das respostas de *p23*.

Os resultados obtidos pelas análises do comportamento do mutante *p9* em meio contendo RNA como única fonte de fosfato orgânico, demonstraram sensibilidade alterada, já que este induz respostas à limitação. Em relação a COL, na mesma condição, *p9* reduziu cerca de 58% o comprimento da raiz principal no tratamento -Pi/+RNA (Figura 2A) e aumentou significativamente o número de raízes laterais neste mesmo tratamento, em relação às outras disponibilidades de Pi (Figura 4B). No entanto, o comprimento total de raízes nesta condição não foi suficiente para equivaler-se ao da raiz principal em meio +Pi (Figura 3B), mesmo utilizando uma estratégia que visa ampliar a área de solo explorada. O aumento do número de raízes laterais poderia também aumentar a densidade de pêlos radiculares (não avaliado), resposta drástica em raízes proteóides (GILBERT et al., 2000).

A redução do crescimento da raiz primária do mutante *p9* em meio contendo RNA como fonte de Pi é devida principalmente à redução do elongamento celular (Tabela 2). As células epidérmicas reduziram 31% o seu tamanho em relação a +Pi. A redução da elongação é uma característica observada em resposta à deficiência de Pi em COL (Tabela 2). Nestas plantas ocorreu uma redução de 47% no tamanho das células em –Pi em relação a +Pi. Estes dados sugerem que *p9* estaria sofrendo deficiência de Pi na

presença de RNA, provavelmente por alguma limitação na sua degradação ou na absorção do Pi liberado.

No entanto, foi verificado através da análise da degradação de RNA da solução nutritiva, que *p9* degradou RNA em uma taxa não igual, mas semelhante a COL, sugerindo que o mutante *p9* não tem severa alteração na atividade e na secreção de nucleases (Figura 11). Este fato foi suportado por DELATORRE (2002), que verificou um comportamento complexo na atividade de enzimas especificas à limitação de Pi no extrato total das plantas do mutante *p9*. Foi verificado por DELATORRE (2002), que o mutante *p9* em –Pi/+DNA tem, em relação a COL, maior atividade das enzimas RNS1 e RNS2 e menor atividade das fosfatases ácidas de 80kDa e 120kDa.

Foi analisada no presente trabalho, a atividade das fosfatases ácidas totais nas raízes e na parte aérea, separadamente. Apesar de ambas as partes vegetais não terem demonstrado diferença significativa, foi percebida tendência à redução da atividade em –Pi/+RNA em relação a COL. Neste caso, os resultados não foram similares aos obtidos anteriormente, devido à análise das fosfatases ácidas totais não ser uma avaliação específica para as enzimas que respondem à limitação de fósforo. Existe nos tecidos vegetais, em geral, muitas fosfatases ácidas, sendo expressas pelos mais variados motivos. Assim, ainda se faz necessário analisar individualmente a atividade de nucleases específicas à limitação de Pi nas raízes e na parte aérea em relação não apenas no mutante *p9*, mas também em *p23* e *p37*.

O comportamento do mutante *p9*, quando foram realizadas análises relacionadas ao status interno de Pi, foi intrigante em relação às suas outras

respostas. O mutante *p9* acumulou amido na parte aérea, tanto em –Pi quanto em –Pi/+RNA, típica resposta à limitação de P (Figura 8). O acúmulo de amido na parte aérea e a limitação de fósforo estão relacionados, devido à redução nos níveis de Pi causarem acúmulo de trioses no cloroplasto, reduzindo assim, o transporte antiporte de Pi e de 3-fosfo-gliceraldeído. Entretanto, foi verificado teor similar de fosfato livre na parte aérea quando avaliados os tratamentos +Pi e –Pi/+RNA (Figura 13A e 13B), sendo estes teores significativamente reduzidos em relação a COL em +Pi, mas iguais a COL em –Pi/+RNA. Uma vez que Columbia, em ambos os tratamentos não acumulou amido, e p9 também não o faz em +Pi, é curioso o fato do mutante ter apresentado acúmulo quando ácidos nucléicos são fonte de fosfato orgânico. Em relação ao P total (Pi livre + P integrante de componentes orgânicos), *p9* tende a acumular menos em –Pi/+RNA do que COL (Figura 14A e 14B), sugerindo compensação para manter os teores de Pi livre.

Depois de também verificado que *p9* responde diferentemente de COL ao aumento gradual das doses de Pi, mesmo atingindo comprimento de raiz principal similar na dose mais alta (Figura 5), percebeu-se em baixa disponibilidade de P resposta limitada, o que sugere percepção alterada dos níveis de Pi. Desta forma, é possível hipotetizar que este mutante não tenha eficaz percepção das concentrações de P nas suas raízes. Esta deficiência explicaria respostas como o acúmulo de antocianinas e a drástica redução do sistema radicular em meio –Pi/+RNA, mesmo tendo favorável sua condição interna de Pi livre.

No entanto, o acúmulo de amido na parte aérea no tratamento –Pi/+RNA pode estar relacionado com o crescimento, uma vez que o mutante *p9* apresentou drástica redução do comprimento celular nas raízes. É possível supor que ocorre menor consumo de carbono pelas raízes, provocando menor utilização e, por conseqüência, menor formação de sacarose. Assim, o Pi é mantido seqüestrado em metabólitos intermediários do metabolismo de carbono, impedindo sua troca com trioses fosfato e acumulando amido no cloroplasto, similar ao que ocorre quando há estresse por baixa temperatura.

Uma segunda hipótese para a mutação de *p9* pode estar vinculada à existência de um sensor externo (ou local) de Pi. Apesar de muitas evidências estabelecerem que boa parte das adaptações à limitação de Pi é controlada pelo status da planta, diversos estudos mostram indícios da existência de um sensor local, sugerindo que a regulação de algumas respostas não estão submetidas ao status da planta, mas sim à situação local da raiz (WILLIAMSON et al., 2001; LINKOHR et al., 2002; WANG et al., 2002 e TICCONI et al., 2004). É possível sugerir então que a interação entre estes sensores possa ser requerida para as respostas à limitação. Neste caso, o mutante *p9*, no tratamento –Pi/+RNA, teria o sinal do status da planta indicando que as condições internas são favoráveis, mas um provável defeito na sua percepção ou transdução, impossibilitaria o uso desta informação. Assim, o sinal do sensor externo que, por sua vez, detecta baixas concentrações de Pi, proveniente do RNA, sobrepõe-se ao sinal do status, gerando respostas à limitação de Pi. Porém, quando existe disponibilidade de P, no caso do tratamento +Pi, mesmo que a sinalização do status da planta seja defeituosa, o

sensor externo informa não haver limitação das concentrações externas de Pi e, desta forma, o mutante não expressa as respostas de resgate a Pi.

Como já dito anteriormente, *p37* apresentou algumas semelhanças a *p23*, uma delas foi em relação ao comportamento das raízes. O comprimento da raiz principal do mutante *p37* foi analisado sob diferentes disponibilidades de Pi. Foi observado que este mutante reduziu o comprimento de suas raízes em torno de 65% em relação a COL no tratamento +Pi, e em 34% do seu comprimento no tratamento –Pi/+RNA (Figura 2B). Estas reduções refletem menor taxa de crescimento das raízes deste mutante (Tabela 1).

A estratégia usada por *p9* no meio –Pi/+RNA para ampliar a área de exploração do solo por meio do aumento do número de raízes laterais foi utilizada por *p37*, tanto em –Pi/+RNA como em +Pi. Apesar de, em ambas situações, ter superado COL no número de raízes laterais (Figura 4B), *p37* não obteve sucesso, pois o comprimento total de raízes permaneceu inalterado (Figura 3). As raízes eram formadas, mas seu o crescimento destas era muito lento, de tal forma que o comprimento de nenhuma raiz lateral alcançou o da raiz principal.

O menor tamanho da raiz principal de *p37* se deve ao somatório dos efeitos de redução do elongamento celular (Tabela 2) e da menor taxa de divisão celular (Figura 12 e Tabela 3) em meio contendo RNA. Em +Pi, a redução da raiz se deve principalmente ao menor elongamento celular que COL, entretanto não é adequado eliminar a possibilidade da divisão celular também influenciar o resultado final.

Por meio da análise de degradação de RNA em solução nutritiva foi demonstrado que as concentrações do ácido nucléico permaneceram quase que inalteradas (Figura 11), sugerindo então que *p37* seja deficiente na produção e/ou secreção de nucleases. DELATORRE (2002) também investigou a atividade das ribonucleases RNS1 e RNS2 e a das fosfatases ácidas de 80kDa e 120kDa em extrato total. Todas as enzimas demonstraram baixa atividade em relação a COL em –Pi/+DNA. No entanto, quando analisada a atividade de fosfatases ácidas total nas raízes, separadamente da parte aérea, *p37* não apresentou diferenças significativas em nenhum dos tratamentos para as duas partes vegetais avaliadas em relação a COL (Figura 10).

A hipótese de que o mutante *p37* apresenta diferenças na expressão de nucleases entre os órgãos vegetais não pode ser totalmente descartada. Como dito anteriormente, a atividade de nucleases específicas à limitação de Pi precisa ser analisada.

É interessante notar a resposta do comprimento de raiz principal de *p37* quando foi avaliado em diferentes concentrações de citocinina. A única alteração do comprimento radicular demonstrada por este mutante se deu em relação à primeira dose deste regulador de crescimento, diferentemente de Columbia e de *p9*, que reduziram o comprimento das raízes proporcional ao gradual aumento da concentração de citocinina. O comprimento alcançado por p37 em 10^{-8} mM de citocinina equivaleu-se ao comprimento de COL em 10^{-5} mM (Figura 15A).

Devido a esta constatação, é possível sugerir que o mutante *p37* apresenta alterações na sensibilidade e/ou na transdução dos sinais que são

intermediados por citocininas. Em relação à sensibilidade, é possível que a resposta máxima a citocinina já tenha sido alcançada, ou então o número de receptores livres tenha sido saturado na dose de citocinina exógena mais baixa. Como já é sabido, as citocininas estão envolvidas no controle do ciclo celular, da organogênese, da senescência, da alometria e das relações fonte-dreno (BUCHANAN, 2000).

O mutante *p37* não acumulou antocianinas em –Pi/+RNA (Figura 9), não respondeu significativamente ao aumento nas doses de Pi em relação ao comprimento das raízes principais (Figura 5) e não apresentou redução dos níveis de Pi livre, tanto nas raízes quanto na parte aérea (Figuras 13A e 13B). DELATORRE & ABEL (dados não publicados) verificaram que *p37* não tem a taxa de absorção de Pi alterada em relação à Columbia e apresenta em relação a este aumento da indução do transportador AtPT1 em resposta à limitação de Pi. Esses dados indicam que parte das respostas à limitação de Pi não é induzida no mutante *p37*. A literatura evidencia que as citocininas reprimem parte das respostas específicas à deficiência no status geral de Pi, e afetam a translocação de nutrientes para a parte aérea, aumentando a deficiência nas raízes, integrando respostas a deficiências minerais e especificas à Pi (MARTIN et al., 2000).

Baseados nos dados obtidos com *p37* e nas informações da literatura, pode-se hipotetizar que devido a alterações na transdução do sinal de citocininas, *p37* tenha alocação preferencial de massa para a parte aérea. Esta modificação afeta a taxa de crescimento da raiz principal,

independentemente da concentração externa de Pi, devido ao menor estímulo à divisão celular.

Redução na divisão celular da raiz principal estimula a iniciação de raízes laterais, resposta comum à deficiência local de Pi e ampliada no mutante *pdr2* de *Arabidopsis* (TICCONI et al., 2004). Além disso, a sinalização de citocininas alterada em *p37* causaria repressão de parte dos genes envolvidos no resgate de Pi, as nucleases por exemplo, limitando a utilização do RNA como fonte de Pi. A menor captação de Pi por *p37* conduziria a uma reestruturação da sua utilização do mesmo, reduzindo os teores de P orgânico na planta, buscando manter a homeostase do Pi livre.

O acúmulo de amido em *p37* não está relacionado à limitação de Pi livre, assim como discutido anteriormente para o mutante *p9*. A redução drástica do crescimento radicular em *p37* diminuiria severamente o uso de sacarose, causando acúmulo de amido.

Uma outra possibilidade surge quando se considera o mutante *pdr1*, este mutante de *Arabidopsis* apresenta mais de 20 genes responsivos ao Pi com expressão reduzida e também possui um menor crescimento em +Pi, e parece ser resistente a citocininas (DELATORRE, 2002). O mutante *pdr1* é resgatado pela remoção de nitrato do meio, indicando interação entre aa sinalizações de Pi e N. Sabe-se que o nitrato induz a síntese e a translocação de citocininas (ZHANG & FORDE, 1997). Desta forma poder-se-ia supor que *p37* possui defeito na percepção e/ou na sinalização dos níveis de nitrogênio, gerando o fenótipo acima relatado. Entretanto, quando *p37* cresceu em meio deficiente em N não houve resgate do fenótipo (Figura 7). Para confirmação

das hipóteses para *p37* se faz extremamente necessário outras análises, que possam complementar as informações até aqui obtidas, elucidando a rota de sinalização de Pi, que envolve a drástica alteração de seu sistema radicular.

6 CONCLUSÕES

Apenas um gene recessivo para cada um dos mutantes de *Arabidopsis thaliana* é o responsável pelas suas respostas em meio contendo ácidos nucléicos como única fonte de Pi. Estes genes são complementares entre si.

A mutação de *p9* causa provavelmente alterações na sensibilidade às concentrações de Pi, podendo estar relacionada tanto aos sensores de raiz quanto à interação da transdução dos sinais entre o sensor local de Pi e ao status da planta.

O mutante *p23* requer maior número de análises para desenvolvimento de hipótese de ação do gene mutado.

O gene mutado em *p37* age primordialmente no controle de elongamento e da divisão das células do sistema radicular.

A complexidade da transdução do sinal à limitação de Pi e a interação com outras rotas de sinalização em plantas vasculares evidencia a importância de estudar suas respostas e esclarecer como esses processos são regulados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, S.; NÜRNBERGER, T.; AHNERT, V.; KRAUSS, G.J.; GLUND, K. Induction of an extracellular cyclic nucleotide phosphodiesterase as an accessory ribonucleolytic activity during phosphate starvation of cultured tomato cells. **Plant Physiology**, Rockville, v.122, n.2, p.543-552, 2000.

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

AL-GHAZY, Y.; PINLOCHE, S.; TRAMBARGER, T.J.; ROSSIGNOL, M.; TARDIEU, F.; DOUMAS, P. Temporal responses of *Arabidopsis* root architecture to phosphate starvation: evidence for the involvement of auxin signalling. **Plant Cell Environment**, Oxford, v.26, p.1053-1066, 2003.

AMES, B.N. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. In: NEUFELD, E.; GINSBURG, V. **Methods in Enzymology**. San Diego: Elsevier Academic Press, 1966. v.8, p.115-118.

ANDERSSON, M.X.; STRIDH, M.H.; LARSSON, K.E.; LILJENBERG, C.; SANDELIUS, A.S. Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. **FEBS Letters**, Amsterdan, v. 537, n. 27, p. 128-132, 2003.

BALDWIN, J.C.; KARTHIKEYAN, A.S., RAGHOTHAMA, K.G. LEPS2, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, n. 2, p. 728-737, 2001.

BARIOLA, P.A.; MACINTOSH, G.C.; GREEN, P.J. Regulation of S-like ribonuclease levels in *Arabidopsis*. Antisense inhibition of RNS1 or RNS2 elevates anthocyanin accumulation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, n. 1, p. 331-342, 1999.

BATES, T.R.; LYNCH, J.P. Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. **Plant Cell Environment**, Oxford, v.19, n.5, p.529-538, 1996.

BATES, T.R.; LYNCH, J.P. Root hairs confer a competitive advantage under low phosphorus availability. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 236 , n. 2, p. 243-250, 2001 .

BORCH, K.; BOUMA, T.J.; LYNCH, J.P.; BROWN, K.M. Ethylene: a regulator of root architectural responses to soil phosphorus availability. **Plant Cell Environment**, Oxford, v.22, n.5, p.425-431, 1999.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEN, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plants Physiologists, 2000. 1367p.

CASSON, S.A.; LINDSEY, K. Genes and signalling in root development. **New Phytologist**, Oxford, v. 158, n. 1, p. 11-38, 2003.

CHANG, C.W.; MOSELEY, J.L., WYKOFF, D.; GROSSMAN, A.R.The LPB1 gene is important for acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to phosphorus and sulfur deprivation. **Plant Physiology**, Rockville, v.138, n.1, p. 319-329, 2005.

CHEN, D.L.; DELATORRE, C.A.; BAKKER, A; ABEL, S. conditional identification of phosphate-starvation-response mutants in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, , v.211, n.1, p.13-22, 2000.

CIERESZKO, I.; JOHANSSON, H.; HURRY, V.; KLECZKWISKI, L.A. Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and pho mutants of *Arabidopsis*. **Planta**, New York , v. 212, n. 4, p. 598-605, 2001.

COELLO P. Purification and characterization of secreted acid phosphatase in phosphorus-deficient *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 116, n. 3, p. 293-298, 2002.

DEL POZO, J.C.; ALLONA, I.; RUBIO, V.; DE LA PENA, A.; ARAGONCILLO, C.; PAZ-ARES, J. A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilizing/ oxidative stress conditions. **Plant Journal**, Oxford, v.19, n.5, p.579-589, 1999.

DELATORRE, C.A. **Phosphate-deficiency response:** understanding the signaling pathway. 2002. 158p. Dissertation (Doctor of Philososy in Plant Biology) – University of California, Davis.

DELHAIZE, E.; RANDALL, P.J. Characterization of a phosphate-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, n.1, p. 207-213, 1995.

DONG, B.; RENGEL, Z.; DELHAIZE, E. Uptake and translocation of phosphate by pho2 mutant and wilt-type seedlings of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Berlin, v.205, n. 2, p.251-256, 1998.

DÖRMAN, P.; BENING, C. Galactolipids rule in seed plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 7, n. 3, p. 112-118, 2002.

DREW, M.C.; SAKER, L.R. Uptake a long distance transport of phosphate, potassium and chloride in relation to internal ion concentrations in barley: evidence of non-allosteric regulation. **Planta**, Berlin, v.60, n.6, p.500-507,1984.

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

ESSIGMAN, B.; GULER, S.; NARANG, R.A.; LINKE, D.; BENNING, C. Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in Arabidopsis thaliana. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 4, p. 1950-1955, 1998.

FITTER, A.; WILLIAMSON, L.; LINKOHR, B.; LEYSER, O. Root system architecture determines fitness in an Arabidopsis mutant in competition for immobile phosphate ions but not for nitrate ions. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, London, v. 269, n. 1504, p. 2017-2022, 2002.

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

FRANCO-ZORRILLA, J.M.; GONZALEZ, E.; BUSTOS, R.; LINHARES, F.; LEVYA, A.; PAZ-ARES, J. The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 396, p. 285-293, 2004.

GOLDSTEIN, A.H.; DANON, A.; BEARTLEIN, D.; MCDANIEL, R.G. Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicum esculentum* excretion of acid phosphatase by tomato plants and suspension cultured cells. **Plant Physiology**, Rockville, v.87, n.3, p.711-715, 1988.

GREEN, P.J. The ribonucleases of higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v.45, n.3, p.421-445, 1994.

HAMBURGER, D.; REZZONICO, E.; MACDONALD-COMBER PETÉTOT, J.; SOMERVILLE, C.; POIRIER, Y. Identification and characterization of the

Arabidopsis PHO1 gene involved in phosphate loading to the xilem. **Plant Cell**, Rockville, v.14, n.4, p.889-902, 2002.

HAMMOND, J.P, BROADLEY, M.R.; WHITE, P.J. Genetic responses to phosphorus deficiency. **Annals of Botany**, Oxford, v.94, n.3, p. 323-332, 2004.

HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant and Soil,** Dordrecht , v.237, n.2, p.173-175,2001.

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

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

LI, J.; CHORY, J. Preparation of DNA *Arabidopsis*. In: MARTINEZ-ZAPATER, J.M.; SALINAS, J. (Eds). **Arabidopsis protocols: methods in molecular biology**. Towata: Human Press, 1998. p.55-60.

LINKOHR, B.L.; WILLIAMSON, L.C.; FITTER, A.H.; LEYSER, H.M.O. Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. **Plant Journal**, Oxford, v. 29, n.6, p.751-760, 2002 .

LIU, C.M; MUCHHAL, U.S.; UTHAPPA, M.; KONONOWICZ, A.K.; RAGHOTHAMA, K.G. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. **Plant Physiology**, Rockville, v.116, n.1, p.91-99, 1998.

LÖFLER, A.; ABEL, S.; JORT, W.; BEINTEMA, J.J.; GLUND, K. Phosphate-regulated induction of intracellular ribonucleases in cultured tomato (*Lycopersicum sculentum*) cells. **Plant Physiology**, Rockville, v.98, n.4, p.1472-1478, 1992.

LOPEZ-BUCIO, J.; HERNANDEZ-ABREU, E.; SANCHEZ-CALDERON, L.; NIETO-JACOBO, M.S.; HERRERA-ESTRELLA, L.Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. **Plant Physiology**, Rockville, v.129, n.1, p.244-256, 2002 .

LOPEZ-BUCIO, J.; CRUZ-RAMIREZ, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. The role of nutrient availability in regulating root architecture. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, n. 3, p. 280-287, 2003 .

LOPEZ-BUCIO, J.; HERNANDEZ-ABREU, E.; SANCHEZ-CALDERON, L.; PEREZ-TORRES, A.; RAMPEY, R.A.; BARTEL, B.; HERRERA-ESTRELLA, L. An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in arabidopsis. Identification of BIG as a

mediator of auxin in pericycle cell activation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 137n. 2, p.681-691, 2005.

LYNCH, J. Root architecture and plant productivity. **Plant Physiology**, Rockville, v.109, n.1, p.7-13, 1995.

MA, Z.; BIELENBERG, D.G.; BROWN, K.M.; LYNCH, J.P. Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Environment**, Oxford, v.24, n.4, p.459-467, 2001.

MARSCHNER, H. Functional of mineral nutrients: macronutrients. In: Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press., 1995. 330p.

MARTIN, A.C.; DEL POZO, J.C.; IGLESIAS, J.; RUBIO, V.; SOLANA, R.; DE LA PENA, A.; LEYVA, A.; PAZ-ARES, J. Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, Oxford, v.2, n.5, p.559-567, 2000.

MARTINEZ, H.E.P.; NOVAIS, R.F.;SACRAMENTO, L.V.S do; RODRIGUES, L.A. Comportamento de variedades de soja cultivadas sob diferentes níveis de fósforo: translocação do fósforo absorvido e eficiência nutricional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas 17: 239-244,1993.

MUCHHAL, U.S.; PARDO, J.M.; RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana.* **Plant Biology**, Rockville, v.93, n.19, p.10519-10523, 1996.

MUCHHAL, U.S.; RAGHOTHAMA, K.G. Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. **Plant Biology**, Rockville, v.96, n.10, p.5868-5872, 1999.

MÜLLER, R.; NILSSON, L.; NIELSEN, L.K.; NIELSEN, T.H. Interaction between phosphate starvation signalling and hexokinase-independent sugar sensing in *Arabidopsis* leaves. **Physiologia Plantarum**, Frederiksberg, v. 124, n. 1, p. 81-90, 2005 .

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.T. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 399p.

NÜRNBERGER, T.; ABEL, S.; JOST, W.; GLUND, K. Induction of an extracellular ribonucleases in cultured tomato cells upon phosphate starvation. **Plant Physiology**, Rockville, v.92, n.4, p.970-976, 1990.

PLAXTON, W.C. Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. In: LYNCH, J.P. and DEIKMAN, J. (Eds). **Phosphorus in plant biology: regulatory roles in molecular, cellular, organismic and ecosystem processes**. Rockville: American Sociey Of Plant Physiologists, 1998. p.229-241.

PLAXTON, W.C.; CARSWELL, M.C. **Metabolic aspects of the phosphate starvation response in plants. In: LERNER, H.R. (Ed). Plants Responses to Environmental Stresses: From Phytocromes to Genome Reorganization. New York: Marcel Dekker Inc, 1999. p.349-372.**

POIRIER, Y.; THOMAS, S.; SOMERVILLE, C.; SCHIEFELBEIN, J. A mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, n.3, p.1087-1093, 1991.

RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biological**, Palo Alto, v.50, p.665-693, 1999.

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

RAUSCH, C.; DARAM, P.; BRUNNER, P.; JANSA, J.; LALOI, M.; LEGGWIE, G.; AMRHEI, N.; BUCHER, M. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. **Nature,** London, v.414, n.6862, p.462-466, 2001.

RUBIO, V.; LINHARES, F.; SOLANO, R.; MARTIN, A.C.; IGLESIAS, J.; LEYVA, A.; PAZ-ARES, J. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae.**Genes & Development**, Nova Iorque, v.15, n.16, p.2122-2133, 2001.

SCHACHTMAN, D.P.; REID, R.J.; ALING, S.M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. **Plant Physiology,** Rockville, v.116, n.2, p.447-453, 1998.

SHIN, H.; SHIN, H.S; DEWBRE, G.;R.; HARRISON, M.J. Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate. **Plant Journal**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 629-642, 2004.

SUZUKI, T.; INAGAKI, S.; NAKAJIMA, S.; AKASHI, T.; OHTO, M.; KOBAYASHI, M.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; KATO, T.; TABATA, S.; NAKAMURA, K.; MORIKAMI, A. A novel *Arabidopsis* gene TONSOKU is required for proper cell arragemnte in root and shoot apical mesristems. **Plant Journal**, Oxon, v. 38, n. 4, p. 673-584, 2004.

TADANO, T.; SAKAI, H. Secretion of acid phophatase by the roots of several crops species under phosphorus-deficient conditions. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokio, v.37, n.1, p.129-140, 1991.

THEODOROU, M.E.; PLAXTON, W.C. Purification and characterization of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from phosphate-starved

Brassica nigra suspension cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, n. 1, p. 343-351, 1996.

TICCONI, C.A.; DELATORRE, C.A.; ABEL, S. Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. **Plant Physiology,** Rockville, v.127, n.3, p.963-972, 2001.

TICCONI, C.A.; DELATORRE, C.A.; LAHNER, B.; SALT, D.E.; ABEL, S. *Arabidopsis pdr2* reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. **Plant Journal**, Oxon, v. 37, n. 6, p. 801-814, 2004 .

TRULL, M.C.; GUILTINAN, M.J. LYNCH, J.P.; DEIKMAN, J. The responses of wild-type and ABA mutant *Arabidopsis thaliana* plants to phosphorus starvation. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 85-92, 1997 .

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

ULLRICH, C.; NOVACKY, A. Extra- and intracellular pH and membrane potential changes indiced by K+, Cl-, H2PO4- and NO3 uptake and fusicoccin in root hairs of *Limnobium stoloniferum*. **Plant Physiology,** Rockville, v.94, p.1561-1567, 1990.

VANCE, C.P.; UHDE-STONE C.; ALLAN D.L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, Oxford, v.157, n.3, p. 423-447, 2003.

WAGNER, B.M & BECK, E. Cytokinins in the perennial herb *Urtica dioica* L. as influenced by its nitrogen status. **Planta**, Berlin, v.190, n.5, p.511-518, 1993.

WANG, Y.H.; GARVIN, D.F.; KORCHIAN, 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.

WILLIAMSON, L.C.; RIBRIOUX, S.P.C.P.; FITTER, A.H.; LEYSER, H.M.O. Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, n. 2, p. 875-882, 2001.

WU, P.; MA, L.; HOU, X.; WANG, M.; WU, Y.; LIU, F.; DENG, X.W. Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves. **Plant Physiology,** Rockville, v.132, n.3, p.1260-1271, 2003.

ZHANG, H.M & FORDE, B.G. Functional analysis of a novel nitrogen-inducible MADS-box gene expressed in *Arabidopsis* roots. **Plant Physiology**, Rockville, v.114, n.3, p.278-278, 1997.

8 VITA

Karine Gustavo Pinto, filha de Neiva Gustavo Pinto e João Carlos da Silva Pinto, nasceu em 14 de março de 1980 em Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

No Instituto Marista Nossa Senhora das Graças, em Viamão cursou o ensino básico. Na Escola Santa Família, em Porto Alegre concluiu o ensino médio em 1997.Formou-se no curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) em Porto Alegre em agosto de 2002. Em março de 2003 ingressou no curso de Mestrado em Fitotecnia do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Manejo e Fisiologia de Plantas de Lavoura, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFGRS).

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo