

MARCELO DE ALMEIDA GUIMARÃES

USO DE *Thlaspi caerulescens* E *Arabidopsis thaliana* EM ESTUDOS DE ACÚMULO E  
TOLERÂNCIA A ZINCO E LÍTIO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2009

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

G963u  
2009

Guimarães, Marcelo de Almeida, 1977-

Uso de *Thlaspi caerulescens* e *Arabidopsis thaliana* em estudos de acúmulo e tolerância a zinco e lítio / Marcelo de Almeida Guimarães. – Viçosa, MG, 2009.  
xiii, 99f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Hormônio (Plantas). 2. Metais. 3. Enxertia.
  4. Germinação. 5. Pigmentos. 6. Íons pesados - Absorção e adsorção. 7. Clorofila. 8. *Thlaspi caerulescens*.
  9. *Arabidopsis thaliana*. 10. *Thlaspi perfoliatum*.
- I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 582.12

MARCELO DE ALMEIDA GUIMARÃES

USO DE *Thlaspi caerulescens* E *Arabidopsis thaliana* EM ESTUDOS DE ACÚMULO E  
TOLERÂNCIA A ZINCO E LÍTIO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2009.

---

Prof. Nairam Félix de Barros  
(Coorientador)

---

Pesq. Francis Júlio Fagundes Lopes  
(Coorientador)

---

Pesq. Paulo César de Lima

---

Pesq. André Narvaes da Rocha Campos

---

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro  
(Orientador)

A Deus por tudo;  
A minha esposa Amanda,  
meus pais, Anamaria e Nivaldir,  
meus irmãos Alexandre e Fábio,  
minhas irmãs Ana Paula e Daniela,  
minha sobrinha Mariana,  
minha sogra Maria de Fátima,  
minhas avós Herdy (*in memoriam*), Dolores e Marieta,  
meus avôs Edson (*in memoriam*) e Manoel (*in memoriam*),  
pelo amor, confiança e constante apoio  
à todas as decisões de minha vida:

**OFEREÇO E DEDICO.**

“Eu tudo posso naquele que me fortalece”

*Deus*

“Estudar as manifestações da natureza é trabalho que agrada a Deus. É o mesmo que orar. Procurando conhecer as leis naturais, glorificando o primeiro inventor, o artista do Universo. Desta forma se aprende a amá-lo, pois um grande amor a Deus nasce de um grande saber”.

*Leonardo da Vinci*

“Há duas formas para viver a sua vida:

Uma é acreditar que não existe milagre.

A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre”.

*Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fisiologia Vegetal, pela confiança na capacidade de desenvolvimento deste trabalho;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo;

Aos Professores Marcelo Ehlers Loureiro e David Edward Salt, por confiarem em minha capacidade e contribuírem para o meu desenvolvimento intelectual.

Aos Professores Marco Aurélio, Fábio DaMatta, Andréa M. de Almeida, José Cambraia, Raimundo dos Santos, Derly J. H. Da Silva e Paulo C. R. Fontes por todos os ensinamentos, dicas e conversas ao longo deste curso de Pós-Graduação.

Aos colegas (Téssio, Laiany e Webert) que tanto ajudaram nos trabalhos iniciais com a espécie *Thlaspi caerulescens*;

Aos colegas de curso Carol, Mateus, Élcio, Cleberson, Werner, Valdir, Kelly, Waginho, Aginaldo, Ana Maria, Francis, André, Aleson, Franciscleudo, Dimas e todos os demais que de alguma forma contribuíram para minha formação como profissional e como pessoa.

A Luciene (secretária), Carlos Raimundo, Dona Mercês, Angêlo, Fran e todos os outros funcionários que de alguma forma me ajudaram durante estes últimos quatro anos.

Aos colegas da Universidade de Purdue (Tommy, Kumar, Monica, Brett, Marina, Jeff, Prashant e Helena) por todo o apoio e ajuda com experimentos, análises e ensinamentos;

Ao Jaime por tocar “corneta” durante os meus estudos, quebrando a monotonia da leitura;

Aos irmãos da Igreja Cristã Maranata por todas as orações, ajudas e incentivos nos momentos de dificuldade e alegria;

A Deus, por ter me escolhido para o projeto de Salvação.

## BIOGRAFIA

Marcelo de Almeida Guimarães, filho de Nivaldir Guimarães e Anamaria de Almeida Guimarães, nasceu em 6 de fevereiro de 1977, em São Caetano do Sul, Estado de São Paulo.

Iniciou o Curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, no ano de 1997, colando grau em maio de 2002.

Em agosto de 2002, iniciou o Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia (Produção Vegetal) na Universidade Federal de Viçosa, obtendo o título de Magister Scientiae em 16 de agosto de 2004.

Em setembro de 2004, foi convidado para estagiar na Empresa *Little Miami Flowers*, situada na cidade de Yellow Springs, no estado de Ohio, nos Estados Unidos, onde permaneceu até junho de 2005, época em que foi convidado pelos Professores Marcelo Ehlers Loureiro e David Edward Salt para estagiar no laboratório do *Horticulture & Landscape Architecture*, localizado na Universidade de Purdue, no Estado de Indiana, nos Estados Unidos, local em que permaneceu até julho de 2005.

Em agosto de 2005, iniciou o Curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa. Durante o Doutorado, em agosto de 2007 foi selecionado pelo CNPq para participar do Curso "*Biorremediación. Estrategias eco-migables para la preservación del medio ambiente*", oferecido pelo Centro Argentino-Brasileño de Biotecnología, realizado em Tucúman na Argentina. Em setembro de 2007 foi selecionado pelo CNPq para realizar Doutorado-Sanduiche sob a orientação do Professor David Edward Salt no *Horticulture & Landscape Architecture*, localizado na Universidade de Purdue, no Estado de Indiana, nos Estados Unidos, local em que permaneceu de dezembro de 2007 a dezembro de 2008. Em maio de 2009, foi aprovado em primeiro lugar no concurso realizado pela Universidade Federal do Amazonas, para o cargo de Professor do Curso de Ciências Agrárias, situado no Campus Universitário de Benjamin Constant-AM. Em 31 de julho de 2009, obteve o título de Doctor Scientiae em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa.

## CONTEÚDO

RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	3

### CAPÍTULO I

#### ENXERTIA RECÍPROCA SEPARA O PAPEL DA RAIZ E DA PARTE AÉREA NA HIPERACUMULAÇÃO A ZINCO EM *Thlaspi caerulescens*

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
1 - INTRODUÇÃO .....	8
2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	10
2.1 - Material vegetal .....	10
2.2 - Enxertia de <i>Thlaspi</i> .....	10
2.3 - Condições de crescimento das plantas .....	10
2.4 - Quantificação de Zn, Cd e Clorofila na parte aérea .....	11
2.5 - Estatísticas .....	11
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	12
3.1 - Enxertia de <i>Thlaspi</i> .....	12
3.2 - Papel da raiz na hiperacumulação de Zn .....	13
3.3 - Papel da raiz na acumulação de cádmio .....	16
3.4 - Papel da parte aérea na tolerância a Zn .....	17
4 - CONCLUSÃO .....	21
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	22

## CAPÍTULO II

### CARACTERIZAÇÃO DO MUTANTE "132:31" DE *Arabidopsis thaliana*

RESUMO .....	25
ABSTRACT .....	26
1 - INTRODUÇÃO .....	27
2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	34
2.1 - Caracterização do fenótipo mutante .....	34
2.2 - Caracterização fisiológica do mutante .....	34
2.2.1 - Uso da enxertia para desvendar o papel da parte aérea e do sistema radicular na sensibilidade ao lítio do mutante "132:31" .....	34
2.2.2 - Quantificação do etileno produzido por plantas de <i>Arabidopsis</i> submetidas a 15 mM de LiCl .....	35
2.2.3 - Efeito do precursor de etileno (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano - ACC) na germinação de sementes submetidas a 40 mM de LiCl .....	36
2.2.4 - Efeito do CaCl <sub>2</sub> no crescimento das plantas de <i>Arabidopsis</i> submetidas a 15 mM de LiCl .....	37
2.2.5 - Quantificação de pigmentos de plantas de <i>Arabidopsis</i> submetidas a 15 mM de LiCl .....	37
2.2.6 - Determinação da peroxidação de lipídeos de plantas de <i>Arabidopsis</i> submetidas a 15 mM de LiCl .....	38
2.2.7 - Exposição ao frio .....	40
2.3 - Caracterização do gene(s) responsável(is) pelo fenótipo mutante .....	40
2.3.1 - Avaliação fenotípica comparativa das linhagens Salk em relação ao mutante e ao Col-0 em meio enriquecido com 40 mM de LiCl .....	41
2.3.2 - Avaliação fenotípica comparativa das linhagens Salk em relação ao mutante e ao Col-0 em meio enriquecido com 15 mM de LiCl .....	42
2.3.3 - PCR semi-quantitativo para avaliação da expressão gênica das linhagens Salk em comparação aos genótipos mutante e Col-0 em meio enriquecido com 15 mM de LiCl .....	43

<b>3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	47
3.1 - Caracterização do fenótipo mutante .....	47
3.2 - Caracterização fisiológica do mutante .....	48
3.2.1 - <i>Uso da enxertia para avaliar o efeito da toxidez por lítio na parte aérea e no sistema radicular</i> .....	48
3.2.2 - <i>Produção de etileno por plantas de Arabidopsis submetidas a 15 mM de LiCl</i> .....	53
3.2.3 - <i>Efeito do precursor de etileno ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) na germinação de sementes submetidas a 40 mM de LiCl</i> .....	55
3.2.4 - <i>Efeito do CaCl<sub>2</sub> no crescimento das plantas de Arabidopsis submetidas a 15 mM de LiCl</i> .....	56
3.2.5 - <i>Quantificação de pigmentos de plantas de Arabidopsis submetidas a 15 mM de LiCl</i> .....	59
3.2.6 - <i>Quantificação de aldeído malônico (MDA) em plantas de Arabidopsis submetidas a 15 mM de LiCl</i> .....	61
3.2.7 - <i>Exposição ao frio</i> .....	63
3.3 - Determinação do gene(s) responsável(is) pelo fenótipo mutante .....	64
3.3.1 - <i>Avaliação fenotípica comparativa das linhagens Salk em relação ao mutante e ao Col-0 em meio enriquecido com 40 mM de LiCl</i> .....	64
3.3.2 - <i>Avaliação fenotípica comparativa das linhagens Salk em relação ao mutante e ao Col-0 em meio enriquecido com 15 mM de LiCl</i> .....	64
3.3.3 - <i>Avaliação fenotípica comparativa dos mutantes dos genes candidatos quanto ao teor de lítio nas folhas e raízes</i> .....	65
3.3.4 - <i>PCR semi-quantitativo para avaliação da expressão gênica das linhagens Salk em comparação aos genótipos mutante e Col-0 em meio enriquecido com 15 mM de LiCl</i> .....	67
<b>4 - CONCLUSÃO</b> .....	71
<b>5 - PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	72
<b>6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	73

## CAPÍTULO III

### EFEITO DA GIBERELINA, TEMPERATURA E FOTOPERÍODO NO FLORESCIMENTO DE *Thlaspi caerulescens*

RESUMO .....	78
ABSTRACT .....	79
<b>1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>2 - MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>83</b>
2.1 - Material vegetal .....	83
2.2 - Germinação .....	83
2.3 - Condições de crescimento .....	83
2.4 - Tratamentos .....	84
2.5 - Características avaliadas .....	84
2.6 - Estatísticas .....	84
<b>3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>85</b>
3.1 - Relação entre os diferentes tratamentos e o florescimento .....	85
3.2 - Relação entre os diferentes tratamentos e a altura do pendão principal .	87
3.3 - Relação entre os diferentes tratamentos e a produção de sementes .....	89
<b>4 - CONCLUSÃO .....</b>	<b>92</b>
<b>5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>93</b>
<b>6 - APÊNDICE .....</b>	<b>97</b>

## RESUMO

GUIMARÃES, Marcelo de Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Uso de *Thlaspi caerulescens* e *Arabidopsis thaliana* em estudos de acúmulo e tolerância a zinco e lítio.** Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Coorientadores: Francis Júlio Fagundes Lopes e Nairam Félix de Barros.

Nos capítulos 1 e 2, foram conduzidos inúmeros experimentos com o objetivo de se gerar informações consideradas essenciais para a melhor compreensão de como se processam a absorção e a translocação de íons minerais em plantas. No capítulo 1 foi empregada a enxertia recíproca entre uma espécie hiperacumuladora de Zn, *Thlaspi caerulescens*, e uma não acumuladora, *Thlaspi perfoliatum*, para determinar a importância relativa da raiz e da parte aérea na hiperacumulação e hipertolerância a Zn. Folhas provenientes de plantas de *T. perfoliatum* como porta-enxerto com *T. caerulescens* como enxerto não acumulam Zn, enquanto plantas com *T. caerulescens* como porta-enxerto e *T. perfoliatum* como enxerto acumulam Zn. No entanto, ainda que folhas provenientes de plantas com *T. caerulescens* como porta-enxerto e *T. perfoliatum* como enxerto acumulem altos teores de Zn, sob altas concentrações deste elemento, as folhas dessas plantas apresentam sintomas de toxidez a Zn significativos, ao contrário de folhas de *T. caerulescens* auto-enxertadas. A hiperacumulação de Zn em folhas de *T. caerulescens* é primeiramente ditada por processos que ocorrem na raiz. Além disso, os mecanismos controladores da tolerância de Zn no hiperacumulador *T. caerulescens* são dirigidos por processos que ocorrem na parte aérea. No capítulo 2 nós utilizamos o mutante de *Arabidopsis thaliana* "132:31", obtido a partir da irradiação por nêutrons de alta energia. Foi verificado que este mutante apresenta uma deleção de oito genes no cromossomo 2. Nós conseguimos identificar três fenótipos básicos do mutante: maior sensibilidade ao lítio, maior produção de etileno e maior nível de estresse oxidativo. Nossos resultados mostram que o lítio reduziu o crescimento da parte aérea de ambos os genótipos e das raízes do mutante. A aplicação de cálcio ao meio de cultivo, reverteu parcialmente o efeito do lítio nas raízes de ambos os genótipos. Através da técnica da

enxertia recíproca, demonstrou-se que não somente a parte aérea, mas também o sistema radicular do 132:31 apresenta maior sensibilidade ao lítio do que Col-0. A maior produção de etileno observada no mutante, torna-se ainda mais evidente em sua presença. O aumento na produção do etileno poderia explicar: a redução do crescimento da parte aérea e raízes, diminuição dos teores de clorofila *a* e carotenóides. São necessárias outras análises para construir uma explicação convincente dos mecanismos responsáveis pelos fenótipos encontrados. No capítulo 3, buscamos gerar informações necessárias para a antecipação do florescimento e maximização da produção de sementes da espécie *T. caerulescens*. Esta espécie é muito utilizada em estudos de hiperacumulação de metais como Cd, Ni e Zn. *T. caerulescens* necessita de longo período frio (4°C) para a indução do crescimento do pendão principal e florescimento. Para isso, foram estudados diferentes condições como: fotoperíodo (8 ou 12 h de luz (100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )), temperatura (4 ou 21°C), semanas de exposição às condições de luz e temperatura citadas anteriormente (6 ou 8 semanas) e a aplicação de diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> (0, 15, 30 e 60  $\mu\text{g}\ \mu\text{l}^{-1}$ ). Verificou-se que baixas temperaturas (4°C) são essenciais para a indução ao florescimento e produção de sementes de *T. caerulescens* e que o tempo de exposição das plantas à baixa temperatura (4°C) é muito importante para a potencialização da produção de sementes de *T. caerulescens*, sendo desejados períodos mais longos de exposição. GA<sub>3</sub> juntamente com a condição de dia longo (12 h de luz) proporciona certo grau de florescimento, no entanto, não é eficaz para a produção de sementes de *T. caerulescens*. A aplicação de GA<sub>3</sub> afeta negativamente a produção de sementes de plantas desta espécie quando submetidas a dias curtos (8 h de luz) e dias longos, quando se utiliza a concentração de 60  $\mu\text{g}\ \mu\text{l}^{-1}$  deste hormônio. GA<sub>3</sub> foi capaz de induzir o alongamento do pendão principal, independentemente do fotoperíodo utilizado, sendo este efeito observado somente em plantas de *Thlaspi* que não foram submetidas a baixas temperaturas (21°C).

## ABSTRACT

GUIMARÃES, Marcelo de Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009. ***Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis thaliana* use in studies of zinc and lithium accumulation and tolerance.** Advisor: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-advisers: Francis Júlio Fagundes Lopes and Nairam Félix de Barros.

In the chapters 1 and 2 were lead a great number of experiments with the purpose to generate essential information to better understand how plants controls the absorption and translocation of mineral ions. In the chapter 1 we used reciprocal grafting between a Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and non-accumulator *Thlaspi perfoliatum* to determine the relative importance of roots and shoots in Zn hyperaccumulation and hypertolerance. Leaves from plants with *T. perfoliatum* rootstock with *T. caerulescens* shoot scion do not hyperaccumulate Zn, whereas plants with *T. caerulescens* rootstock and *T. perfoliatum* shoot scion do hyperaccumulate Zn. However, even though leaves from plants with *T. caerulescens* rootstock and *T. perfoliatum* shoot scion hyperaccumulate Zn, at high zinc loads these leaves show significant symptoms of zinc toxicity, unlike leaves of self grafted *T. caerulescens*. Hyperaccumulation of Zn in leaves of the hyperaccumulator *T. caerulescens* is primarily dictated by root processes. Further, the mechanisms controlling Zn hypertolerance in the hyperaccumulator *T. caerulescens* are driven primarily by shoot processes. In the chapter 2 we used an *Arabidopsis thaliana* "132:31" mutant obtained by fast neutrons irradiation. It was verified that this mutant has eight genes deleted in chromosome 2. We have identified three basic mutant phenotypes: higher lithium sensitivity, higher ethylene production and higher oxidative stress levels. Our results show that lithium promotes higher decrease in the shoot growth for both genotypes, and also for the mutant's roots. The use of calcium in the medium was partially able to reverse the effects of the lithium in the roots of both genotypes. Through reciprocal grafting was showed that not just only shoot, but also the roots of 132:31, showed higher sensitivity to lithium than Col-0 shoots and roots. The higher production of ethylene, observed in the mutant, even under the control, became much clear under

lithium treatment. This higher increase in the ethylene production could explain: the shoot and root growth reduction, chlorophyll *a* and carotenoids reductions. Other analyses are needed to create a persuasive explanation of the responsible mechanisms for the observed phenotypes. In the chapter 3, we looked to generate information for earlier flowering and to maximize seeds production of *T. caerulescens*. This specie is used to study Cd, Ni and Zn metal hyperaccumulation. It needs a long time of exposure under cold (4°C) for the induction of the main stem elongation and flowering. For this studied, we simulated different conditions: photoperiod (8 or 12 h of light (100  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )), temperature (4 or 21 °C), weeks under the photoperiod and temperature described before (6 or 8 weeks) and the application of different concentrations of GA<sub>3</sub> (0, 15, 30 and 60  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ). We found that low temperatures (4°C) are essential for the flowering induction and seed production in *T. caerulescens* and that the long period of exposure to (4°C) is very important to increase *T. caerulescens* seeds production, being required long exposition under this condition. GA<sub>3</sub> together with long day condition (12 h of light) provide flowering at certain degree, however, it is not efficient to promote seed production in *T. caerulescens*. Furthermore, GA<sub>3</sub> application regulates the production of seeds in this specie negatively, under short-days (8 h of light) and long-days, when 60  $\mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$  of this hormone were used; down regulates the production of seeds. GA<sub>3</sub> induced main stem elongation when *Thlaspi* plants were not under low temperature (21°C) independently of the photoperiod condition.

## INTRODUÇÃO GERAL

As plantas realizam um importante e diverso papel em nossa sociedade, economia e no meio ambiente. Pesquisas em biodiversidade, desenvolvimento, fisiologia e evolução são necessárias para o entendimento da sua biologia, de suas funções e também para aumentar o nosso conhecimento com o objetivo de se utilizá-las de uma forma benéfica (Dangl et al., 2002). A comunidade científica que estuda a biologia das plantas concorda que é primordial o estabelecimento das funções biológicas de todos os genes presentes no genoma de *Arabidopsis thaliana* (Chory et al., 2000; Dangl et al., 2002). Isto tornará possível compreender o comportamento das plantas sobre as mais variadas condições ambientais, bem como promover o desenvolvimento de plantas modificadas geneticamente que possam auxiliar o homem na melhoria das condições de vida da população mundial. A caracterização dos genes irá ajudar a entender como plantas absorvem e translocam íons minerais. Isto nos permitirá aumentar o valor nutricional de certas culturas e limpar solos já contaminados por poluentes como metais pesados ou outros íons tóxicos aos seres humanos (Guerinot & Salt, 2001).

A absorção e a translocação de íons minerais é essencial para o crescimento das plantas, saúde humana, nutrição e limpeza do meio ambiente através da fitorremediação (Guerinot & Salt, 2001). Apesar dos recentes avanços (Maser et al., 2001), o conjunto de genes e suas interações, que controlam a absorção de íons minerais, continuam amplamente desconhecidas (Lahner et al., 2003). Um melhor entendimento desta rede gênica e como ela interage com outros sistemas celulares tal como o genoma, o proteoma e o meio ambiente são essenciais para o completo entendimento de como se dá a integração do seu metabolismo orgânico e inorgânico (Lahner et al., 2003). Sendo assim, o estudo das alterações fisiológicas em mutantes, nos ajudam a entender o mecanismo de ação dos genes, bem como compreender como as plantas se comportam sob diferentes condições do meio em que estão inseridas (Liang et al., 1996; Naranjo et al., 2003; Bueso et al., 2007).

Além do uso de mutantes, na última década, a comunidade científica tem voltado sua atenção para o estudo de espécies hiperacumuladoras e/ou hipertolerantes a metais e semi-metais, com o objetivo de desvendar os mecanismos que as levam a possuir estas características. Dentre todas as espécies, *T. caerulescens* tem ganhado especial atenção nos últimos anos por ter sido selecionada como sistema modelo para estudos de genética molecular do sobre-acúmulo de metais por plantas (Peer et al., 2003). Segundo diversos pesquisadores, essa espécie, pode hiperacumular vários metais como: Cd, Ni e Zn (Reeves &

Brooks, 1983; Salt et al., 2000; Schat et al., 2000; Lasat et al., 2000; Pence et al., 2000; Assunção et al., 2001; Assunção et al., 2003; Peer et al., 2003; Prasad & Freitas, 2003; Cobbet, 2003; Nascimento & Xing, 2006). No entanto, possui a grande desvantagem de ter um ciclo de vida longo (planta bienal; Peer et al., 2003), necessitando de uma primeira estação fria para a quebra da dormência das sementes e uma segunda estação fria para a vernalização da planta, com o objetivo de promover o florescimento.

Diversos estudos tem sido realizados com a espécie *Arabidopsis thaliana*, com o objetivo de se estabelecer rotas de florescimento, o que permite o pleno entendimento dos mecanismos e condições que levam esta espécie ao florescimento (Henderson & Dean, 2004; Komeda, 2004; Ausín et al., 2005; Bernier & Périlleux, 2005; Blazquez, 2000; Quesada et al., 2005; Balasubramanian et al., 2006; Bouveret et al., 2006). No entanto, para *T. caerulescens*, da mesma família da *Arabidopsis* (Brassicaceae), há pouca informação disponível para a simulação das melhores condições ambientais que proporcionem seu florescimento.

Desta forma, nós objetivamos, com os trabalhos desenvolvidos nesta Tese de Doutorado, obter informações que preencham lacunas importantes, existentes no estudo do acúmulo e tolerância a metais como zinco e lítio, bem como desenvolver sistema precoce e abundante de produção de sementes de *T. caerulescens*, o que reduziria seu ciclo de crescimento e desenvolvimento, permitindo a obtenção de respostas rápidas quando da utilização desta espécie em pesquisa científica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSUNÇÃO, A.G.L.; MARTINS, P.D.; DE FOLTER, S.; VOOIJS, R.; SCHAT, H.; AARTS, M.G.M. Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant, Cell & Environment**, 24:217-226, 2001.
- ASSUNÇÃO, A.G.L.; SCHAT, H.; AARTS, M.G.M. *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. **New Phytologist**, 159:351-360, 2003.
- AUSÍN, I.; ALONSO-BLANCO, C.; MARTÍNES-ZAPATER, J.M. Environmental regulation of flowering. **International Journal of Developmental Biology**, 49:689-705, 2005.
- BALASUBRAMANIAN, S.; SURESHKUMAR, S.; LEMPE, J.; WEIGEL, D. Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. **PlosGenetics**, 2:980-989, 2006.
- BERNIER, G.; PÉRILLEUX, C. A physiological overview of the genetics of flowering time control. **Plant Biotechnology Journal**, 3:3-16, 2005.
- BLAZQUEZ, M.A. Flower development pathways. **Journal Cell Science**, 113:3547-3548, 2000.
- BOUVERET, R.; SCHÖNROCK, N.; GRUISSEM, W.; HENNIG, L. Regulation of flowering time by Arabidopsis MSI1. **Development**, 133:1693-1702, 2006.
- BUESO, E.; ALEJANDRO, S.; CARBONELL, P.; PEREZ-AMADOR, M.A.; FAYOS, J.; BELLES, J.M.; RODRIGUES, P.L.; SERRANO, R. The lithium tolerance of the Arabidopsis cat2 mutant reveals a cross-talk between oxidative stress and ethylene. **The Plant Journal**, 52:1052-1065, 2007.
- CHORY, J.; ECKER, J.R.; BRIGGS, S.; CABOCHE, M.; CORUZZI, G.M.; COOK, D.; DANGL, J.; GRANT, S.; GUERINOT, M.L.; HENIKOFF, S.; MARTIENSSSEN, R.; OKADA, K.; RAIKHEL, N.V.; SOMERVILLE, C.R.; WEIGEL, D. National Science Foundation-Sponsored Workshop Report: "The 2010 Project". Functional genomics and the virtual plant. A blueprint for understanding how plants are built and how to improve them. **Plant Physiology**, 123:423-425, 2000.
- COBBET, C. Heavy metals and plants – model systems and hyperaccumulators. **New Phytologist**, 159:289-293, 2003.

- DANGL, J.; COOK, D.; HASELKORN, R.; LAST, R.L.; MARTIENSSEN, R.; MCCOUCH, S.; RETZEL, E.F.; SOMERVILLE, C.R.; WESSLER, S.; YATES, J. The national plant genomics initiative: objectives for 2003-2008. **Plant Physiology**, 130:1741-1744, 2002.
- GUERINOT, M.L.; SALT, D.E. Fortified foods and phytoremediation: two sides of the same coin. **Plant Physiology**, 125:164-167, 2001.
- HENDERSON, I.R.; GEAN, C. Control of Arabidopsis flowering: the chill before the bloom. **Development**, 131:3829-3838, 2004.
- KOMEDA, Y. Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. **Annual Review of Plant Biology**, 55:521-535, 2004.
- LAHNER, B.; GONG, J.; MAHMOUDIAN, M.; SMITH, E.L.; ABID, K.B.; ROGERS, E.E.; GUERINOT, M.L.; HARPER, J.F.; WARD, J.M.; MCINTYRE, L.; SCHROEDER, J.I.; SALT, D.E. Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Biotechnology**, 21:1215-1221, 2003.
- LASAT, M.M.; PENCE, N.S.; GARVIN, D.F.; EBBS, S.D.; KOCHIAN, L.V. Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Journal of Experimental Botany**, 51:71-79, 2000.
- LIANG, X.; SHEN, N.F. Theologis A. Li<sup>+</sup>-regulated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, 10:1027-1036, 1996.
- MASER, P.; THOMINE, S.; SCHROEDER, J.I.; WARD, J.M.; HIRSCHI, K.; SZE, H.; TALKE, I.N.; AMTMANN, A.; MAATHUIS, F.J.M.; SANDERS, D.; HARPER, J.F.; TCHIEU, J.; GRIBSKOV, M.; PERSANS, M.W.; SALT, D.E.; KIM, S.A.; GUERINOT, M.L. Phylogenetic relationships within cation-transporter families of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, 126:1646-1667, 2001.
- NARANJO, M.A.; ROMERO, C.; BELLES, J.M.; MONTESINOS, C.; VICENTE, O.; SERRANO, R. Lithium treatment induces a hypersensitive-like response in tobacco. **Planta**, 217:417-424, 2003.
- NASCIMENTO, C.W.A.; XING, B. Phytoextraction: A review on enhanced metal availability and plant accumulation. **Scientia Agricola**, 63:299-311, 2006.
- PEER, W.A.; MAMOUDIAN, M.; LAHNER, B.; REEVES, R.D.; MURPHY, A.S.; SALT, D.E. 2003. Identifying model metal hyperaccumulating plants: germplasm analysis of 20 Brassicaceae accessions from a wide geographical area. **New Phytologist**, 159:421-430, 2003.

- PENCE, N.S.; LARSEN, P.B.; EBBS, S.D.; LETHAM, D.L.D.; LASAT, M.M.; GARVIN, D.F.; EIDE, D.; KOCHIAN, L.V. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 97:4956-4960, 2000.
- PRASAD, M.N.V.; FREITAS, H.M.O. Metal hyperaccumulation in plants – Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. **Electronic Journal of Biotechnology**, 6:285-321, 2003.
- QUESADA, V.; DEAN, C.; SIMPSON, G.G. Regulated RNA processing in the control of Arabidopsis flowering. **International Journal of Developmental Biology**, 49:773-780, 2005.
- REEVES, R.D.; SCHWARTZ, C.; MOREL, J.L.; EDMONDSON, J. Distribution and metal-accumulating behavior of *Thlaspi caerulescens* and associated metallophytes in France. **International Journal Phytoremediation**, 3:145-172, 2001.
- SALT, D.E.; KRAMER, U.; SMITH, R.D.; RASKIN, I. The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. In: TERRY, N.; BAÑUELOS, G. (Eds). **Phytoremediation of contaminated soil and water**. Boca Raton: Lewis Publishers. p.189-200. 2000.
- SCHAT, H.; LLUGANY, M.; BERNHARD, R. Metal-specific patterns of tolerance, uptake and transport of heavy metals in hyperaccumulating and nonhyperaccumulating metallophytes. In: TERRY N.; BAÑUELOS G. (Eds). **Phytoremediation of contaminated soil and water**. CRC Press LLC, p.171–188. 2000.

## CAPÍTULO I

### **Enxertia recíproca separa o papel da raiz e da parte aérea na hiperacumulação a zinco em *Thlaspi caerulescens***

**Resumo:** O fenótipo de acumulação de zinco (Zn), encontrado em muitas espécies de Brassicaceas, é determinado por mecanismos que promovem elevada tolerância a Zn e alto nível de acumulação deste elemento na parte aérea. Foi empregada a enxertia recíproca entre uma espécie hiperacumuladora de Zn, *Thlaspi caerulescens*, e uma não acumuladora, *Thlaspi perfoliatum*, para determinar a importância relativa da raiz e da parte aérea na hiperacumulação e hipertolerância a Zn. Folhas provenientes de plantas de *T. perfoliatum* como porta-enxerto com *T. caerulescens* como enxerto não acumulam Zn, enquanto plantas com *T. caerulescens* como porta-enxerto e *T. perfoliatum* como enxerto acumulam Zn. No entanto, ainda que folhas provenientes de plantas com *T. caerulescens* como porta-enxerto e *T. perfoliatum* como enxerto acumulem altos teores de Zn, sob altas concentrações deste elemento, as folhas dessas plantas apresentam sintomas de toxidez a Zn significativos, ao contrário de folhas de *T. caerulescens* auto-enxertadas. A hiperacumulação de Zn em folhas de *T. caerulescens* é primeiramente ditada por processos que ocorrem na raiz. Além disso, os mecanismos controladores da tolerância de Zn no hiperacumulador *T. caerulescens* são dirigidos por processos que ocorrem na parte aérea.

**Palavras-chaves:** Clorofila, enxertia, hiperacumulador, ICP-MS, *Thlaspi caerulescens*, *Thlaspi perfoliatum* e zinco.

## CHAPTER I

### **Reciprocal grafting separates the role of the root and shoot in zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens***

**Abstract:** The phenotype of zinc (Zn) hyperaccumulation, found in several Brassicaceae species, is determined by mechanisms that promote elevated Zn tolerance and high level of Zn accumulation in shoots. We used reciprocal grafting between a Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and non-accumulator *Thlaspi perfoliatum* to determine the relative importance of roots and shoots in Zn hyperaccumulation and hypertolerance. Leaves from plants with *T. perfoliatum* rootstock with *T. caerulescens* shoot scion do not hyperaccumulate Zn, whereas plants with *T. caerulescens* rootstock and *T. perfoliatum* shoot scion do hyperaccumulate Zn. However, even though leaves from plants with *T. caerulescens* rootstock and *T. perfoliatum* shoot scion hyperaccumulate Zn, at high zinc loads these leaves show significant symptoms of zinc toxicity, unlike leaves of self grafted *T. caerulescens*. Hyperaccumulation of Zn in leaves of the hyperaccumulator *T. caerulescens* is primarily dictated by root processes. Further, the mechanisms controlling Zn hypertolerance in the hyperaccumulator *T. caerulescens* are driven primarily by shoot processes.

**Key words:** Chlorophyll, grafting, hyperaccumulator, ICP-MS, *Thlaspi caerulescens*, *Thlaspi perfoliatum* and zinc.

## 1- INTRODUÇÃO

Zinco (Zn) é um micronutriente essencial para muitos processos em plantas, mas em excesso, pode ser tóxico. Desta forma, as plantas regulam os níveis de Zn necessários para os processos essenciais, além de se protegerem contra a toxidez em caso de excesso de acúmulo. *Thlaspi caerulescens* desenvolveu a habilidade de hiperacumular Zn acima de 30.000  $\mu\text{g g}^{-1}$  de biomassa seca na parte aérea, quando crescidas em seu habitat natural (Baker et al., 2000). Isso significa um acúmulo de 10 a 100 vezes maior do que outras espécies crescidas no mesmo local. Os mecanismos que controlam a elevada acumulação de Zn e a sua tolerância nos hiperacumuladores, *T. caerulescens* e *Arabidopsis halleri*, estão sob controle de um limitado número de genes (Verbruggen et al., 2009).

Está claro que a acumulação de Zn na parte aérea em *A. halleri* é controlada, principalmente, pela expressão constitutiva e elevada de *AhHMA4*, um gene que codifica para um transportador de Zn envolvido na liberação de Zn do simplasto para dentro dos vasos do xilema na raiz e sua translocação para a parte aérea (Hanikenne et al., 2008; Courbot et al., 2007; Willems et al., 2007). O aumento do fluxo de Zn para a parte aérea em *A. halleri*, mediado por *HMA4*, desencadeia o aumento da expressão de transportadores de Zn presentes na membrana plasmática, levando ao aumento da absorção de Zn pela raiz (Hanikenne et al., 2008). É provável que *HMA4* também desempenhe um papel similar em *T. caerulescens* (Bernard et al., 2004).

Há evidências de que altos níveis de expressão constitutiva, na parte aérea, do transportador vacuolar *ZnMTP1* realiza um importante papel na hipertolerância a Zn no hiperacumulador de Zn *A. halleri* (Becher et al., 2004; Dräger et al., 2004; Willems et al., 2007), e possivelmente em *T. caerulescens* (Assunção et al., 2001) e *Thlaspi goesingense* (Persans et al., 2001; Gustin et al., 2009). Além disso, foi demonstrado recentemente que a expressão heteróloga de *MTP1* na parte aérea, do não acumulador *Arabidopsis thaliana*, eleva a tolerância ao Zn e aumenta a expressão de transportadores de Zn na planta (Gustin et al., 2009). Por proporcionar maior dreno vacuolar de Zn na parte aérea de hiperacumuladores, a expressão elevada e constitutiva de *MTP1* confere aumento na tolerância ao Zn e sinaliza para a deficiência deste micronutriente, ativando a expressão de transportadores de Zn na raiz e parte aérea.

Os níveis elevados de *HMA4* e *MTP1* nos hiperacumuladores parecem estar relacionados a um mecanismo de retro-alimentação entre a raiz e a parte aérea. Este

mecanismo inclui o aumento da absorção e do fluxo de Zn do solo para a raiz e desta para a parte aérea. Na parte aérea o fluxo de Zn é dirigido para dentro de compartimentos vacuolares, para destoxificação e armazenamento por longo período. Este modelo propõe que a hiperacumulação de Zn é controlada primeiramente por processos radiculares, com somente uma pequena parte da acumulação de Zn sendo influenciada pela parte aérea.

Neste trabalho, nós propomos que a hipertolerância ao Zn deva ser, primeiramente, determinada por processos que ocorrem na parte aérea. Para testar esta hipótese, realizamos enxertia recíproca de porta-enxertos e enxertos do hiperacumulador de Zn *T. caerulescens* e do não acumulador *T. perfoliatum*. Os resultados obtidos são consistentes com este modelo, no qual a raiz é o primeiro direcionador da hiperacumulação enquanto a parte aérea está envolvida na hipertolerância ao Zn.

## 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 - *Material Vegetal*

As sementes originais do hiperacumulador *T. caerulescens* St. Félix de Pallières (Tc) e do não acumulador *T. perfoliatum* Col de Gláize (Tp) foram recebidas da França, como descrito por Peer et al. (2003).

### 2.2 - *Enxertia de Thlaspi*

A enxertia foi realizada usando um método adaptado de Rus et al., (2006). As sementes de *T. caerulescens* e *T. perfoliatum* foram estratificadas a seco por 5 dias a 4°C, no escuro. As sementes estratificadas foram superficialmente esterilizadas com uma breve incubação em etanol 70%, seguido por um tratamento de 5 minutos em solução de água sanitária 10% (v/v) e Tween 20 0.1% (v/v). Após esterilizadas, as sementes foram lavadas seis vezes com água deionizada estéril e misturadas em solução de ágar 0.1%. As sementes foram semeadas em solução nutritiva contendo 0,5x MS vitamina (CAISSON Laboratories, Inc), 12 g L<sup>-1</sup> ágar (SIGMA-ALDRICH Inc., St. Louis MO), e 3 mg L<sup>-1</sup> Benomil (metil 1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazolcarbamato (Sigma, St. Louis, MO)) em placas de petri (100 x 15 mm). Foram semeadas 20 sementes por placa para a produção de plantas para auto-enxertia e 10 sementes por placa para enxertia recíproca. Após a semeadura, as placas de petri, contendo as sementes, foram dispostas de forma vertical e colocadas em casa de vegetação, a 23°C, durante o dia e 18°C durante a noite, com um ciclo de 16h/8h (dia/noite). Sete dias após a semeadura, as plântulas foram cortadas em um ângulo de 90° no meio do hipocótilo, sobre a superfície do ágar, para serem enxertadas. Utilizou-se bisturi apropriado para esta função - 15° Stab Knife (Fine Scientific Tools, North Vancouver, BC) - não sendo utilizado colar para a união dos enxertos (Turnbull et al., 2002). Todo o trabalho de enxertia foi conduzido sob uma lupa (Ken-a-vision, modelo: T-2200). As plântulas enxertadas foram mantidas nas placas por 17 dias para permitir a união entre as partes. O total de plântulas obtidas por tipo foi: Tc = 40, Tp = 40, Tc/Tc = 42, Tp/Tp = 49, Tc/Tp = 60, Tp/Tc = 65.

### 2.3 - *Condições de crescimento das plantas*

As plântulas enxertadas foram transferidas diretamente para substrato (Premier Promix PGX, Canadá) e cultivadas nas estufas da Universidade de Purdue, sendo irrigadas uma vez por semana com fertilizante (em mg por litro): 200 N, 29 P, 167 K, 67 Ca, 30 Mg e

micronutrientes fornecidos por uma formulação comercial (MiracleGro® Excel® 15-5-15 Cal-Mag, The Scotts Co., Marysville, Ohio) e pH ajustado para uma faixa de 5,7 a 6,0 (Aschenbeck & Eddy, 2004). As plantas foram crescidas em casa de vegetação, nas condições descritas acima. Após quatro semanas, as plantas foram aleatoriamente divididas em dois blocos, um controle e um de tratamento com Zn, cada um contendo um conjunto representativo de indivíduos enxertados. O grupo controle recebeu irrigação alternada de água destilada e água com fertilizante, enquanto o grupo tratado com Zn recebeu o mesmo programa de irrigação com acréscimo de diferentes concentrações de  $Zn(NO_3)_2$  (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 mM), em intervalos semanais.

#### **2.4 - Quantificação de Zn, Cd e Clorofila na parte aérea**

Foi coletada, de cada planta, uma folha totalmente expandida (5 - 10 mg de matéria seca), que foi analisada por *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry* (ICP-MS) (Elan DRCe; PerkinElmer). As primeiras coletas foram realizadas quando as plantas estavam na idade de quatro semanas, e antes da primeira aplicação do tratamento com Zn. Depois disso, folhas foram coletadas em intervalos semanais antecedendo cada aplicação do tratamento com Zn. As folhas coletadas foram lavadas com água e colocadas em tubos de digestão Pyrex (16x100 mm). As amostras foram secas por 24 h a 92°C e pesadas, após atingirem temperatura ambiente. Todas as amostras foram digeridas usando 0.7 mL de ácido nítrico concentrado (AR Select grade; Mallinckrodt) a 110°C por 4 h, e diluídas para 6.0 mL com água. As amostras foram analisadas para Li, B, Na, Mg, P, K, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, e Cd usando ICP-MS. O teor de clorofila foi quantificado como o valor médio de três folhas totalmente expandidas de diferentes plantas utilizando-se clorofilômetro (Minolta SPAD-502, Japan) no momento da coleta.

#### **2.5 - Estatísticas**

Todos os dados foram estatisticamente analisados utilizando-se análise de variância (ANOVA), e testados por significância ( $P \leq 0.05$ ) para se determinar a diferença entre os tratamentos. Utilizou-se o teste de Tukey.

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 - Enxertia de *Thlaspi*

Houve 100% de germinação das sementes de ambas as espécies de *Thlaspi* semeadas. Após quatro semanas do transplântio das placas para o solo as plântulas de *T. caerulescens* não enxertadas tiveram um índice de sobrevivência de 98% comparado a 88% da *T. perfoliatum* (Tabela 1). As plantas auto-enxertadas mostraram níveis de sobrevivência mais elevados ao transplântio, quando comparadas às plantas enxertadas reciprocamente. Plantas tendo *T. perfoliatum* como enxerto apresentaram níveis de sobrevivência mais elevados uma semana após o transplântio, 82 e 60%, quando comparado às plantas que tiveram *T. caerulescens* como enxerto, com 48 e 37% de sobrevivência (Tabela 1). Uma maior sobrevivência foi também observada para *T. perfoliatum* comparado a *T. caerulescens* como enxerto, após quatro semanas do transplântio (Tabela 1).

**Tabela 1.** Valores absolutos de sobrevivência ao transplântio, da placa para o solo, de *T. caerulescens* (Tc) e *T. perfoliatum* (Tp), enxertadas e não enxertadas. Universidade de Purdue, 2008.

Parte aérea/ Raiz	Transplantadas	Semana 1	Semana 4
<b>Tc</b>	100%	100%	98%
<b>Tc/Tc</b>	55%	48%	38%
<b>Tc/Tp</b>	50%	37%	27%
<b>Tp</b>	100%	93%	88%
<b>Tp/Tp</b>	84%	82%	71%
<b>Tp/Tc</b>	65%	60%	57%

Tc - *T. caerulescens* não enxertada, Tp - *T. perfoliatum* não enxertada, Tc/Tc - *T. caerulescens* auto-enxertada, Tp/Tp - *T. perfoliatum* auto-enxertada, Tc/Tp - *T. caerulescens* como enxerto e *T. perfoliatum* como porta-enxerto, Tp/Tc - *T. perfoliatum* como enxerto e *T. caerulescens* como porta-enxerto (Tp/Tc). Os dados representam o número de plântulas sobreviventes como uma porcentagem do número total de plântulas de cada tipo (total de plântulas de Tc = 40, Tp = 40, Tc/Tc = 42, Tp/Tp = 49, Tc/Tp = 60, Tp/Tc = 65).

Diferenças na eficiência de sobrevivência devem-se a produção de calos na união do enxerto entre as duas espécies. Verificou-se também que o tecido de *T. perfoliatum* era mais fácil de cortar que o de *T. caerulescens*, o que poderia ter causado cortes imperfeitos em *T. caerulescens*, se comparado a *T. perfoliatum*, resultando em redução da união das partes enxertadas. Com prática, pôde-se realizar mais de 30 enxertos por hora. Aproximadamente 30% das plantas enxertadas desenvolveram raízes adventícias na região do enxerto. Todas as raízes adventícias foram removidas.

### **3.2 - Papel da raiz na hiperacumulação de Zn**

Plantas foram amostradas e concentrações de metal avaliadas no início do período de tratamento e, subsequentemente, antes de cada tratamento. Ao longo de todo o tratamento com Zn, as concentrações deste metal na parte aérea de plantas de *T. caerulescens* não-enxertadas e auto-enxertadas não foram significativamente diferentes (Tabela 2). Resultado similar foi obtido também para indivíduos de *T. perfoliatum* não enxertados e auto-enxertados (Tabela 2). Isto sugere que a enxertia não afeta a acumulação de Zn na parte aérea das espécies estudadas. Como o esperado, *T. caerulescens* não enxertada e auto-enxertada apresentou, maior acúmulo de Zn na parte aérea quando comparado a *T. perfoliatum* não enxertada e auto-enxertada. No final do experimento, plantas com parte aérea de *T. caerulescens* não enxertada e auto-enxertada, tinham hiperacumulado mais que 10.000 µg de Zn por g de matéria seca (Tabela 2, Figura 1). Surpreendentemente, *T. caerulescens* enxertada em porta-enxerto *T. perfoliatum* não acumulou elevadas concentrações de Zn, acumulando Zn de forma similar na parte aérea de *T. perfoliatum* ao longo de todo o tratamento de Zn (Tabela 2 e Figura 1). Porém, quando *T. perfoliatum* foi enxertado em cima de *T. caerulescens* como porta-enxerto, o acúmulo de Zn em *T. perfoliatum* foi muito similar a indivíduos de *T. caerulescens* não enxertadas ou auto-enxertadas nos tratamentos com 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mM de Zn (Tabela 2, Figura 1). Este resultado demonstra, que a raiz de *T. caerulescens* direciona o aumento no acúmulo de Zn na parte aérea. No entanto, sob as concentrações de 8 e 16 mM de Zn, o acúmulo de Zn na parte aérea em plantas com *T. perfoliatum* como enxerto e *T. caerulescens* como porta-enxerto foi reduzido quando comparado a *T. caerulescens*, não enxertada ou auto-enxertada (Tabela 2, Figura 1). Nós propomos que isto é, pelo menos parcialmente, um resultado da toxidez de Zn observada nestas plantas, como discutido abaixo.

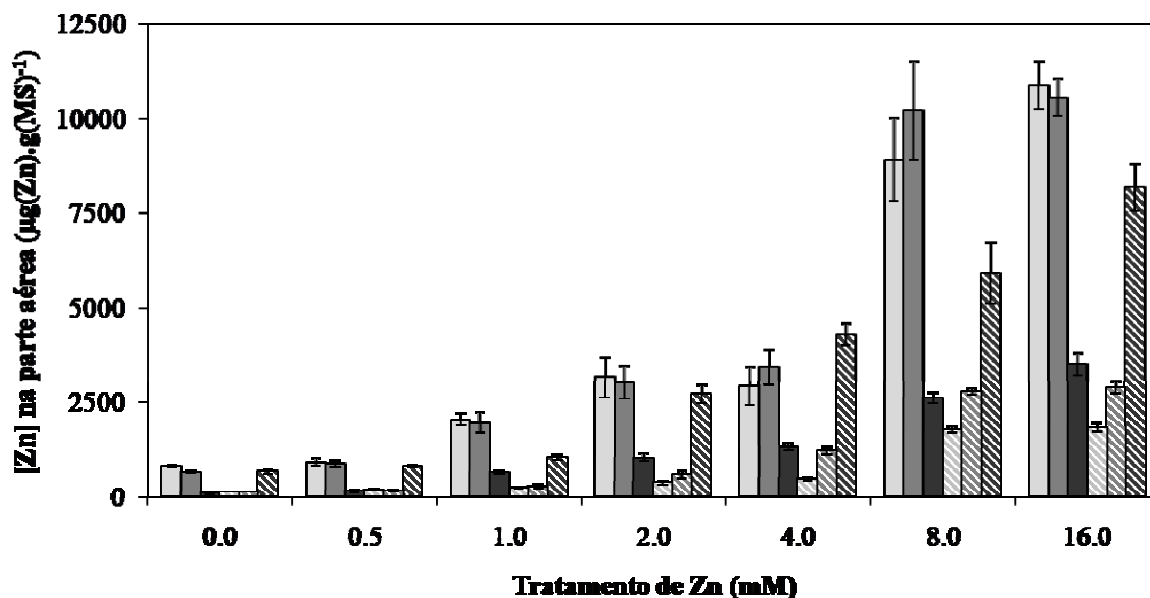
**Tabela 2.** Acúmulo de Zn na parte aérea de plantas não enxertadas e enxertadas do hiperacumulador de Zn *T. caerulescens* (Tc) em relação ao não acumulador *T. perfoliatum* (Tp) em diferentes concentrações de Zn no decorrer de 7 semanas ( $\mu\text{g}(\text{Zn}).\text{g}(\text{MS})^{-1}$ ).

Parte aérea /Raiz	Concentrações (mM) de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ no solo							
	0.0	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	16.0	
<b>Tc</b>	812 a	904 a	2030 a	3143 a	2914 a	8890 a	10856 a	
<b>Tc/Tc</b>	637 a	873 a	1947 a	3006 a	3411 a	10193 a	10551 a	
<b>Tc/Tp</b>	82 b	142 b	623 b	1022 b	1306 b	2770 c	3489 c	
<b>Tp</b>	110 b	174 b	218 c	354 b	446 b	1760 c	1824 c	
<b>Tp/Tp</b>	106 b	146 b	264 c	575 b	1199 b	2595 c	2883 c	
<b>Tp/Tc</b>	643 a	792 a	1027 b	2698 a	4274 a	5889 b	8161 b	

Letras diferentes indicam diferença significativa entre médias para plantas enxertadas e não enxertadas sob o mesmo tratamento (colunas). (Teste de ANOVA,  $P \leq 0.05$ ). O tamanho das amostras para o experimento foram Tc (n=8), Tc/Tc (n=6), Tc/Tp (n=5), Tp (n=7), Tp/Tp (n=7) e Tp/Tc (n=7).

Nosso estudo de enxertia mostrou que a raiz do hiperacumulador *T. caerulescens* apresenta maior capacidade para absorver e carregar Zn para o transporte para a parte aérea. Além disso, esta função é essencialmente independente do genótipo da parte aérea, e suficiente para dirigir o elevado acúmulo de Zn observado no hiperacumulador. Isto é coerente com a prévia observação de que raízes de *T. caerulescens* têm uma elevada taxa de absorção de Zn (Lasat et al., 1996; Pence et al., 2000). Recentemente, Hanikenne et al. (2008) estabeleceram que a elevada expressão de *HMA4*, codificando uma proteína envolvida no carregamento de Zn dentro do xilema para translocação para a parte aérea, é requerida para acumulação de Zn em *A. halleri*. Dado o papel crítico do *HMA4*, que participa no aumento da translocação de Zn em *A. halleri*, nós propomos que a expressão desta proteína na raiz, é responsável por dirigir a hiperacumulação de Zn em *T. caerulescens*. Esta conclusão é baseada no fato de que a expressão de *HMA4* é conhecidamente elevada em raízes de *T. caerulescens* quando comparada às raízes do não acumulador *A. thaliana* (Bernard et al., 2004). Estudos anteriores mostraram que os membros da família ZIP (*ZIP3*, *ZIP4*, *ZIP9* e *ZIP10*), conhecidos transportadores de Zn, são altamente expressos nas raízes de *T. caerulescens* quando comparados às espécies não acumuladoras (Pence et al., 2000; van de Mortel et al., 2006). Tais observações são também consistentes com os elevados níveis da

expressão de *HMA4*, ativando absorção de Zn em raízes de *T. caerulescens*, como observado em *A. halleri* (Hanikenne et al., 2008).



**Figura 1.** Acúmulo de Zn na parte aérea de plantas reciprocamente enxertadas do hiperacumulador de Zn *T. caerulescens* (Tc) em relação ao não acumulador *T. perfoliatum* (Tp). As barras representam dados de plantas enxertadas e não enxertadas de *T. caerulescens*; cinza claro (Tc), cinza - *T. caerulescens* auto-enxertadas (Tc/Tc), cinza escuro - *T. caerulescens* como enxerto com *T. perfoliatum* como porta-enxerto (Tc/Tp), cinza claro rachurado - *T. perfoliatum* (Tp), cinza rachurado - *T. perfoliatum* auto-enxertadas (Tp/Tp), cinza escuro rachurado - *T. perfoliatum* enxerto com *T. caerulescens* como porta-enxerto (Tp/Tc). Plantas com três semanas de idade foram tratadas com concentrações crescentes de  $Zn(NO_3)_2$  (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 mM) no decorrer de 7 semanas, com uma única aplicação de cada tratamento de Zn realizada semanalmente. Amostras da parte aérea foram retiradas para análise de Zn, uma semana após cada tratamento. Os dados representam  $\pm$  erro padrão médio. O tamanho das amostras para o experimento foram Tc (n=8), Tc/Tc (n=6), Tc/Tp (n=5), Tp (n=7), Tp/Tp (n=7) e Tp/Tc (n=7). Dados mostrados da ANOVA na tabela 2.

Outras descrições do papel da raiz na hiperacumulação e tolerância a Zn seriam apoiadas pela avaliação direta das raízes de plantas enxertadas. No entanto, nós não obtivemos sucesso em nossas tentativas de transferir plântulas enxertadas de *Thlaspi* para cultura hidropônica, devido à baixa taxa de sobrevivência de indivíduos auto-enxertados e reciprocamente enxertados transferidos. A baixa sobrevivência após a transferência foi,

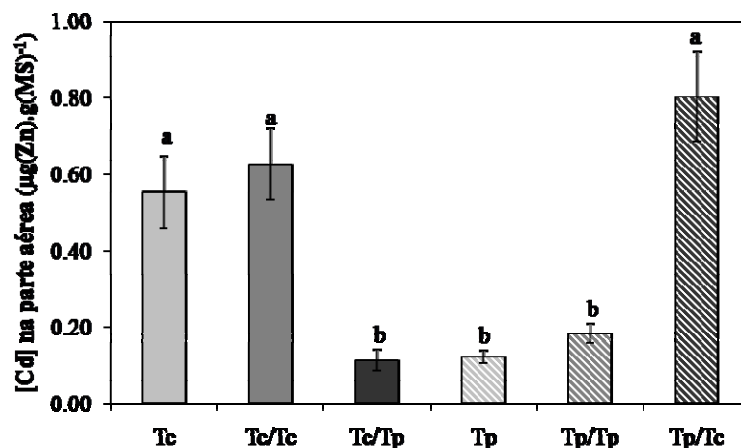
aparentemente, devido à enxertia, uma vez que plântulas não enxertadas de *T. caerulescens* e *T. perfoliatum* poderiam ser prontamente transferidas com sucesso. A incapacidade de recuperação de um número suficiente de plantas enxertadas em cultura hidropônica limitou nossa capacidade para avaliar diretamente a fisiologia da raiz. Todavia, nossas conclusões sobre o papel da raiz na hiperacumulação de Zn são bem apoiadas pelas análises na parte aérea das plantas enxertadas.

### **3.3 - Papel da raiz na acumulação de cádmio**

O ecótipo *T. caerulescens* usado neste estudo (St. Félix de Pallières) também é bem conhecido como hiperacumulador de cádmio (Cd) em seu habitat natural (Robinson et al., 1998; Reeves et al., 2001). Baixos níveis de Cd estavam presentes na mistura de solo usado neste experimento, o que nos permitiu examinar os efeitos da enxertia na acumulação de Cd. Como o esperado, os níveis de Cd na parte aérea de *T. caerulescens* (não enxertada e auto-enxertada) foram elevados quando comparados a *T. perfoliatum* (não enxertada e auto-enxertada) (Figura 2). De forma similar ao Zn, a elevada concentração de Cd na parte aérea observada em *T. caerulescens* é também dirigida, principalmente, pela raiz, uma vez que plantas com *T. caerulescens* como porta-enxerto e *T. perfoliatum* como enxerto acumularam Cd até os mesmos níveis observados em *T. caerulescens* (não enxertada e auto-enxertada). Além disso, a parte aérea da hiperacumuladora parece não influenciar a acumulação de Cd, já que as plantas com *T. caerulescens* como enxerto e *T. perfoliatum* como porta-enxerto acumularam Cd na parte aérea em níveis observados em *T. perfoliatum* (não enxertada e auto-enxertada).

Diferentes populações de *T. caerulescens*, incluindo a população St. Félix de Pallières usada neste estudo, mostram acumulação de Cd, na parte aérea, maior que  $1.000 \mu\text{g g}^{-1}$  (Robinson et al., 1998; Reeves et al., 2001). Devido aos baixos níveis de Cd presentes nos solos usados nos experimentos descritos aqui, a concentração absoluta de Cd observada na parte aérea de *T. caerulescens* é baixa quando comparada àqueles níveis observados em plantas crescendo em seu habitat natural. No entanto, o aumento do acúmulo de Cd em *T. caerulescens*, quando comparado ao não acumulador *T. perfoliatum* é claramente observado. Além disso, este aumento na habilidade para acumular Cd é governado pela raiz, de forma similar ao observado para Zn nestas plantas. Ainda está sendo debatido se o aumento do

acúmulo de Cd e Zn observado em *T. caerulescens* é governado pelo mesmo mecanismo molecular na raiz (revisado por Verbruggen et al., 2009).

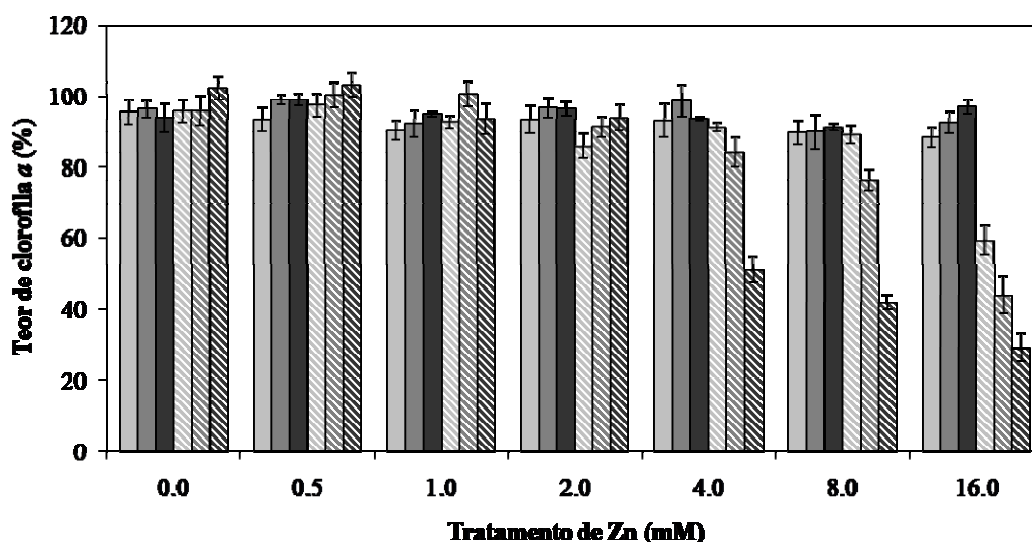


**Figura 2.** O acúmulo de Cd em plantas de *T. caerulescens* (Tc) hiperacumuladoras de Zn reciprocamente enxertadas em relação ao não acumulador *T. perfoliatum* (Tp). As plantas foram crescidas por 10 semanas sem adição de Zn suplementar. As barras representam dados de plantas enxertadas e não enxertadas. Dados representam  $\pm$  erro padrão médio. O tamanho das amostras para o experimento foram Tc (n=8), Tc/Tc (n=6), Tc/Tp (n=5), Tp (n=7), Tp/Tp (n=7) e Tp/Tc (n=7). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre médias para plantas enxertadas e não enxertadas sob o mesmo tratamento. (Teste de ANOVA,  $P \leq 0.05$ ).

### 3.4 - Papel da parte aérea na tolerância a Zn

Pesquisas anteriores mostraram que o teor de clorofila é um bom marcador para avaliar a toxidez por Zn em plantas hiperacumuladoras e não acumuladoras (Lasat et al., 1996). Baseado nisto, o teor de clorofila foi usado neste trabalho para avaliar a toxidez a Zn em plantas de *T. caerulescens* e *T. perfoliatum*, enxertadas e não enxertadas. Ambas as plantas de *T. caerulescens*, não enxertadas e auto-enxertadas, não mostraram redução no conteúdo de clorofila ou sintomas visíveis de toxidez a Zn ao longo de todos os tratamentos de Zn (Figuras 3 e 4), demonstrando tolerância a Zn por parte destas plantas. Porém, para o não acumulador de Zn, *T. perfoliatum*, tanto plantas não enxertadas quanto auto-enxertadas mostraram redução significativa no conteúdo de clorofila e sintomas claros de toxidez a Zn, particularmente no tratamento de maior concentração de Zn, 16,0 mM (Figuras 3 e 4). Além disso, quando as plantas de *T. perfoliatum* foram usadas como enxerto sobre *T. caerulescens*

como porta-enxerto, o teor de clorofila das folhas foi muito reduzido quando comparado a *T. perfoliatum* (Figura 3). Para estas plantas os sintomas visíveis de toxidez a Zn começaram a aparecer a partir do tratamento com 4,0 mM de Zn, sendo a toxidez, observada nas folhas, reflexo do aumento do acúmulo de Zn na parte aérea destas plantas quando comparado a *T. perfoliatum* não enxertadas ou auto-enxertadas (Tabela 2, Figura 1). Plantas com *T. perfoliatum* como porta-enxerto enxertadas com *T. caerulescens* como enxerto, não mostraram sintomas de toxidez a Zn, assim como *T. caerulescens* não enxertadas e auto-enxertadas (Figuras 3 e 4). Estas observações indicam que a hipertolerância a Zn em *T. caerulescens* é predominantemente conferida pela parte aérea, indiferentemente do genótipo da raiz.



**Figura 3.** Conteúdo de clorofila *a* em plantas reciprocamente enxertadas do hiperacumulador de Zn *T. caerulescens* (Tc) em relação ao não acumulador *T. perfoliatum* (Tp). As barras representam dados de plantas enxertadas e não enxertadas; cinza claro - *T. caerulescens* (Tc), cinza - *T. caerulescens* auto-enxertadas (Tc/Tc), cinza escuro - *T. caerulescens* como enxerto com *T. perfoliatum* como porta-enxerto (Tc/Tp), cinza claro rachurado - *T. perfoliatum* (Tp), cinza rachurado - *T. perfoliatum* auto-enxertadas (Tp/Tp), cinza escuro rachurado - *T. perfoliatum* como enxerto com *T. caerulescens* como porta-enxerto (Tp/Tc). As plantas com três semanas foram tratadas como na Figura 1. Amostras da parte aérea foram retiradas para análise de clorofila uma semana após cada tratamento. Os dados representam  $\pm$  erro padrão médio do conteúdo de clorofila *a* das folhas como um percentual do conteúdo de clorofila das plantas da mesma idade não tratadas com Zn. O tamanho das amostras para o experimento foram Tc (n=8), Tc/Tc (n=6), Tc/Tp (n=5), Tp (n=7), Tp/Tp (n=7) e Tp/Tc (n=7).

A maioria do Zn na parte aérea de *T. caerulescens* se acumula nos vacúolos de células da epiderme e do mesófilo (Küpper et al., 1999; 2000). Assim, um transporte eficiente de Zn para dentro dos vacúolos é, provavelmente, um fator importante para o armazenamento do Zn acumulado na parte aérea do hiperacumulador. Tem sido sugerido que o transportador de Zn, *MTP1*, localizado no vacúolo tem um papel importante no acúmulo de Zn em tal organela (Assunção et al., 2001; Persans et al., 2001; Becher et al., 2004; Dräger et al., 2004; Willems et al., 2007; Gustin et al., 2009).

**Figura 4.** Sintomas visíveis de toxidez por Zn em plantas reciprocamente enxertadas do hiperacumulador de Zn *T. caerulescens* em relação ao não acumulador *T. perfoliatum*. Tc - *T. caerulescens* não enxertada, Tp - *T. perfoliatum* não enxertada, Tc/Tc - *T. caerulescens* auto-enxertada, Tp/Tp - *T. perfoliatum* auto-enxertada, Tc/Tp - *T. caerulescens* como enxerto e *T. perfoliatum* como porta-enxerto, Tp/Tc - *T. perfoliatum* como enxerto e *T. caerulescens* como porta-enxerto (Tp/Tc). As plantas com três semanas foram tratadas por 7 semanas como na Figura 1. Os controles não foram tratados. As fotografias foram tiradas no final do período de tratamento, 7 semanas.

Recentemente foi mostrado que o alto nível da expressão heteróloga de *MTP1*, especialmente na parte aérea de *A. thaliana*, é suficiente para conferir elevada tolerância a Zn (Gustin et al., 2009). Estes dados dão base à nossa teoria de que o mecanismo de tolerância a Zn observado em *T. caerulescens* é dirigido pela parte aérea.

Evidenciou-se que os mecanismos que governam o acúmulo de Zn na parte aérea e a tolerância no hiperacumulador de Zn, *T. caerulescens*, são dirigidos pela raiz e pela parte aérea, respectivamente. Estas observações são coerentes com o modelo que considera elevada expressão constitutiva de *HMA4* em raízes e *MTP1* na parte aérea, ambos interagindo para conferir aumento na absorção de Zn, carregamento do xilema, acumulação na parte aérea e tolerância em *A. halleri* e *T. caerulescens* (Becher et al., 2004; Dräger et al., 2004; Willems et al., 2007; Hanikenne et al., 2008; Gustin et al., 2009).

#### 4 - CONCLUSÃO

Folhas provenientes de plantas de *T. perfoliatum* como porta-enxerto com *T. caerulescens* como enxerto não acumulam Zn, enquanto plantas com *T. caerulescens* como porta-enxerto e *T. perfoliatum* como enxerto acumulam Zn. No entanto, folhas provenientes de plantas com *T. caerulescens* como porta-enxerto e *T. perfoliatum* como enxerto acumulando altos teores de Zn, apresentam sintomas de toxidez a Zn significativos, ao contrário de folhas de *T. caerulescens* auto enxertadas. A hiperacumulação de Zn em folhas do hiperacumulador *T. caerulescens* é principalmente governada por processos que ocorrem na raiz, sendo que os mecanismos controladores da hipertolerância a Zn em *T. caerulescens* são dirigidos por processos que ocorrem na parte aérea.

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASCHEBECK, L.; EDDY, R. **Growth of Arabidopsis seedlings under differing irrigation and fertilization methods.** Purdue University, West Lafayette, Indiana. 7p. 2004. <http://www.hort.purdue.edu/hort/facilities/downloads/101materialsMethods.pdf>.
- ASSUNÇÃO, A.G.L.; MARTINS, P.D.; DE FOLTER, S.; VOOIJS, R.; SCHAT, H.; AARTS, M.G.M. Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant, Cell & Environment**, 24:217-226, 2001.
- BAKER, A.J.M.; MCGRATH, S.P.; REEVES, R.D.; SMITH, J.A.C. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biochemical resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry, N., Bañuelos, G., eds. **Phytoremediation of contaminated soil and water.** Boca Raton, FL, USA: Lewis Publishers, 85-107, 2000.
- BECHER, M.; TALKE, I.N.; KRALL, L.; KRÄMER, U. Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. **Plant Journal**, 37:251-268, 2004.
- BERNARD, C.; ROSENS, N.; CZERNIC, P.; LEBRUN, M.; VERBRUGGEN, N. A novel CPx-ATPase from the cadmium hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **FEBS Letters**, 569:140-148, 2004.
- COURBOT, M.; WILLEMS, G.; MOTTE, P.; ARVIDSSON, S.; ROSENS, N.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; VERBRUGGEN, N. A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with *HMA4*, a gene encoding a heavy metal ATPase. **Plant Physiology**, 144:1052-1065, 2007.
- DRÄGER, D.B.; DESBROSSES-FONROUGE, A.G.; KRACH, C.; CHARDONNENS, A.N.; MEYER, R.C.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; KRÄMER, U. Two genes encoding *Arabidopsis halleri* *MTP1* metal transport proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high *MTP1* transcript levels. **Plant Journal**, 39:425-439, 2004.
- GUSTIN, J.L.; LOUREIRO, M.E.; KIM, D.; NA, G.; TIKHONOVA, M.; SALT, D.E. *MTP1*-dependent Zn sequestration into shoot vacuole's suggests dual roles in Zn tolerance and accumulation in Zn hyperaccumulating plants. **Plant Journal**, 57:1116-1127, 2009.

- HANIKENNE, M.; TALKE, I.N.; HAYDON, M.J.; LANZ, C.; NOLTE, A.; MOTTE, P.; KROYMANN, J.; WEIGEL, D.; KRAMER, U. Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of *HMA4*. **Nature**, 453:391-396, 2008.
- KÜPPER, H.; ZHAO, F.J.; MCGRATH, S.P. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant Physiology**, 119:305-311, 1999.
- KÜPPER, H.; LOMBI, E.; ZHAO, F.J.; MCGRATH, S.P. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. **Planta**, 212:75-84, 2000.
- LASAT, M.M.; BAKER, A.J.M.; KOCHIAN, L.V. Physiological characterization of root Zn<sup>2+</sup> absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. **Plant Physiology**, 112:1715-1722, 1996.
- PEER, W.A.; MAMOUDIEN, M.; LAHNER, B.; REEVES, R.D.; MURPHY, A.S.; SALT, D.E. 2003. Identifying model metal hyperaccumulating plants: germplasm analysis of 20 Brassicaceae accessions from a wide geographical area. **New Phytologist**, 159:421-430, 2003.
- PENCE, N.S.; LARSEN, P.B.; EBBS, S.D.; LETHAM, D.L.D.; LASAT, M.M.; GARVIN, D.F.; EIDE, D.; KOCHIAN, L.V. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 97:4956-4960, 2000.
- PERSANS, M.W.; NIEMAN, K.; SALT, D.E. Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. **Proceedings of National Academy of Science USA**, 98:9995-10000, 2001.
- REEVES, R.D.; SCHWARTZ, C.; MOREL, J.L.; EDMONDSON, J. Distribution and metal-accumulating behavior of *Thlaspi caerulescens* and associated metallophytes in France. **International Journal Phytoremediation**, 3:145-172, 2001.
- ROBINSON, B.H.; LEBLANC, M.; PETIT, D.; BROOKS, R.R.; KIRKMAN, J.H.; GREGG, P.E.H. The potential of *Thlaspi caerulescens* for phytoremediation of contaminated soils. **Plant and Soil**, 203:47-56, 1998.
- RUS, A.; BAXTER, I.; MUTHUKUMAR, B.; GUSTIN, J.; LAHNER, B.; YAKUBOVA, E.; SALT, D.E. Natural variation of *AtHKT1* enhances Na accumulation in two wild populations of *Arabidopsis*. **PLoS Genetics**, 2:e210, 2006.
- TURNBULL, C.G.N.; BOOKER, J.P.; LEYSER, H.M.O. Micrografting techniques for testing long-distance signaling in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, 32:255-262, 2002.

- VAN DE MORTEL, J.E.; VILLANUEVA, L.A.; SCHAT, H.; KWEKKEBOOM, J.; COUGHLAN, S.; MOERLAND, P.D.; VAN THEMAAT, E.V.L.; KOORNNEEF, M.; AARTS, M.G.M. Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant Physiology**, 142:1127-1147, 2006.
- VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. **New Phytologist** (in press), 2009.
- WILLEMS, G.; DRÄGER, D.B.; COURBOT, M.; GODE, C.; VERBRUGGEN, N.; SAUMITOU-LAPRADE, P. The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp *halleri* (Brassicaceae): An analysis of quantitative trait loci. **Genetics**, 176:659-674, 2007.

## CAPÍTULO II

### Caracterização do mutante “132:31” de *Arabidopsis thaliana*

**Resumo:** Entender como as plantas se comportam nos mais variados tipos e condições de ambiente é condição essencial para o desenvolvimento de estratégias que ajudem a humanidade a melhorar suas condições de vida. Sendo assim, faz-se necessário o conhecimento dos processos e rotas fisiológicas, bem como dos genes participantes dos processos que integram a vida das plantas. Neste trabalho, nós utilizamos o mutante de *Arabidopsis thaliana* “132:31”, obtido a partir da irradiação por nêutrons de alta energia. Foi verificado que este mutante apresenta uma deleção de oito genes no cromossomo 2. Após diversos experimentos de caracterização fenotípica com este mutante em comparação com seu tipo selvagem “Col-0”, nós conseguimos identificar três fenótipos básicos do mutante: maior sensibilidade ao lítio, maior produção de etileno e maior nível de estresse oxidativo. Nossos resultados mostram que o lítio reduziu o crescimento da parte aérea de ambos os genótipos e das raízes do mutante. A aplicação de cálcio ao meio de cultivo, reverteu parcialmente o efeito do lítio nas raízes de ambos os genótipos. Através da técnica da enxertia recíproca, demonstrou-se que não somente a parte aérea, mas também o sistema radicular do 132:31 apresenta maior sensibilidade ao lítio do que Col-0. A maior produção de etileno observada no mutante, torna-se ainda mais evidente em sua presença. O aumento na produção do etileno poderia explicar: a redução do crescimento da parte aérea e raízes, diminuição dos teores de clorofila *a* e carotenóides. São necessárias outras análises para construir uma explicação convincente dos mecanismos responsáveis pelos fenótipos encontrados.

**Palavras-chave:** Aldeído malônico, cálcio, etileno, germinação, ICP-MS, lítio, pigmentos e T-DNA.

## CHAPTER II

### Characterization of the *Arabidopsis thaliana* mutant “132:31”

**Abstract:** The comprehension of how plants survive under a diversity of environmental conditions is essential condition for the development of strategies that can help the humanity to achieve better life conditions. In this way, it is necessary to elucidate physiologic process and routes, as well as the genes that are part of the processes and integrates plant's life. In this work, we used an *Arabidopsis thaliana* “132:31” mutant obtained by fast neutrons irradiation. It was verified that this mutant has eight genes deleted in chromosome 2. We have identified three basic mutant phenotypes: higher lithium sensitivity, higher ethylene production and higher oxidative stress levels. Our results show that lithium promotes higher decrease in the shoot growth for both genotypes, and also for the mutant's roots. The use of calcium in the medium was partially able to reverse the effects of the lithium in the roots of both genotypes. Through reciprocal grafting was showed that not just only shoot, but also the roots of 132:31, showed higher sensitivity to lithium than Col-0 shoots and roots. The higher production of ethylene, observed in the mutant, even under the control, became much clear under lithium treatment. This higher increase in the ethylene production could explain: the shoot and root growth reduction, chlorophyll *a* and carotenoids reductions. Other analyses are needed to create a persuasive explanation of the responsible mechanisms for the observed phenotypes.

**Key words:** Malonaldehyde, calcium, ethylene, germination, ICP-MS, lithium, pigments and T-DNA.

## 1 - INTRODUÇÃO

As plantas realizam um importante e diverso papel em nossa sociedade, economia e no meio ambiente. Pesquisas em biodiversidade, desenvolvimento, fisiologia e evolução são necessárias para o entendimento da sua biologia, de suas funções e também para aumentar o nosso conhecimento com o objetivo de se utilizá-las de uma forma benéfica (Dangl et al., 2002). A comunidade científica que estuda a biologia das plantas concorda que é primordial o estabelecimento das funções biológicas de todos os genes presentes no genoma de *Arabidopsis thaliana* (Chory et al., 2000; Dangl et al., 2002). Isto tornará possível compreender o comportamento das plantas sobre as mais variadas condições ambientais, bem como promover o desenvolvimento de plantas modificadas geneticamente que possam auxiliar o homem na melhoria das condições de vida da população mundial. A caracterização dos genes irá ajudar a entender como plantas absorvem e translocam íons minerais. Isto nos permitirá aumentar o valor nutricional de certas culturas e limpar solos já contaminados por poluentes como metais pesados ou outros íons tóxicos aos seres humanos (Guerinot & Salt, 2001).

A absorção e a translocação de íons minerais é essencial para o crescimento das plantas, saúde humana, nutrição e limpeza do meio ambiente através da fitorremediação (Guerinot & Salt, 2001). Apesar dos recentes avanços (Maser et al., 2001), o conjunto de genes e suas interações, que controlam a absorção de íons minerais, continuam amplamente desconhecidas (Lahner et al., 2003). Um melhor entendimento desta rede gênica e como ela interage com outros sistemas celulares tal como o genoma, o proteoma e o meio ambiente são essenciais para o completo entendimento de como se dá a integração do seu metabolismo orgânico e inorgânico (Lahner et al., 2003). Sendo assim, o estudo das alterações fisiológicas em mutantes, nos ajudam a entender o mecanismo de ação dos genes, bem como compreender como as plantas se comportam sob diferentes condições do meio em que estão inseridas (Liang et al., 1996; Naranjo et al., 2003; Bueso et al., 2007).

Uma das principais formas de se determinar a função de um gene é analisar as mudanças que ocorrem no organismo quando um gene em particular é mutado. Esta ferramenta da genética clássica, conhecida como genética direta (*forward genetics*), a qual tem sido utilizada desde os trabalhos desenvolvidos por Mendel, começa com um fenótipo que é identificado em um mutante ou para o qual procura-se identificar o gene responsável (Emmanuel & Levy, 2002).

Em 2003, Lahner e colaboradores utilizando ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*), quantificaram 18 elementos minerais, simultaneamente, incluindo elementos essenciais macro- e micronutrientes, e vários elementos não essenciais, na parte aérea de 6000 plantas M2 de *Arabidopsis thaliana* mutadas com nêutrons de alta energia (*fast-neutron*). Estes pesquisadores isolaram 51 mutantes que apresentaram alteração na concentração de elementos minerais em suas partes aéreas e, baseado na frequência de mutação do perfil original de acúmulo de elementos minerais, estimaram que em torno de 2-4% do genoma da *A. thaliana* estaria envolvido na regulação de transporte e assimilação de nutrientes (Salt, 2004).

Durante os anos de 2003 e 2004, no laboratório do Dr. Salt, Universidade de Purdue, Ana Rus começou a caracterizar o mutante 132:31. Ela observou que no solo, a parte aérea do mutante era um pouco menor do que do tipo selvagem Col-0, sendo os bordos foliares do mutante, mais serrados do que do Col-0. Além disso, quando o mutante era crescido in vitro, o tamanho das plantas, tanto da parte aérea, como do sistema radicular era mais severamente afetado por lítio do que o tipo selvagem. Este fenótipo que causa a sensibilidade ao LiCl no mutante “132:31”, é resultado de uma mutação recessiva, devido ao fato de que o tamanho das raízes (fenótipo da toxidez apresentada pelo mutante), das plantas F1 do cruzamento, 132:31 x Col-0 tinham tamanho similar ao das raízes das plantas do tipo selvagem na presença de 15 mM de LiCl. A sensibilidade ao LiCl foi utilizada para separar a população de mapeamento obtida através da polinização cruzada do 132:31 com o acesso Ler (Ana Rus, anotações pessoais).

Usando “PCR-based mapping” (SSLP markers), a mutação causadora da sensibilidade ao LiCl foi localizada na parte inferior do braço do cromossomo 2, no clone BAC F5J6. Simultaneamente, foi adotado uma técnica diferente, baseada na utilização de uma sonda composta a partir de DNA genômico de vários indivíduos mutantes ou Col-0 (BSA, Bulk Segregation Analysis) das plantas F2 provenientes do cruzamento do mutante com outro ecótipo, a qual foi hibridizada a um microarranjo contendo todos os genes de *Arabidopsis*. Baseado nesta técnica, foi identificado uma deleção de 27,535 Kbp que vai da posição 47,852 para a posição 75,387 bp do clone BAC F5J6. A sequência correspondente, no tipo selvagem, foi sequenciada e nela foram identificados 8 genes, At2g17360, At2g17370, At2g17380, At2g17390, At2g17410, At2g17420, At2g17430 e At2g17440.

De acordo com Birch (1991), citado por Liang et al. (1996), o íon  $\text{Li}^+$  é o menor alcali dos metais, e exerce profundo efeito neural e no desenvolvimento de humanos e outros

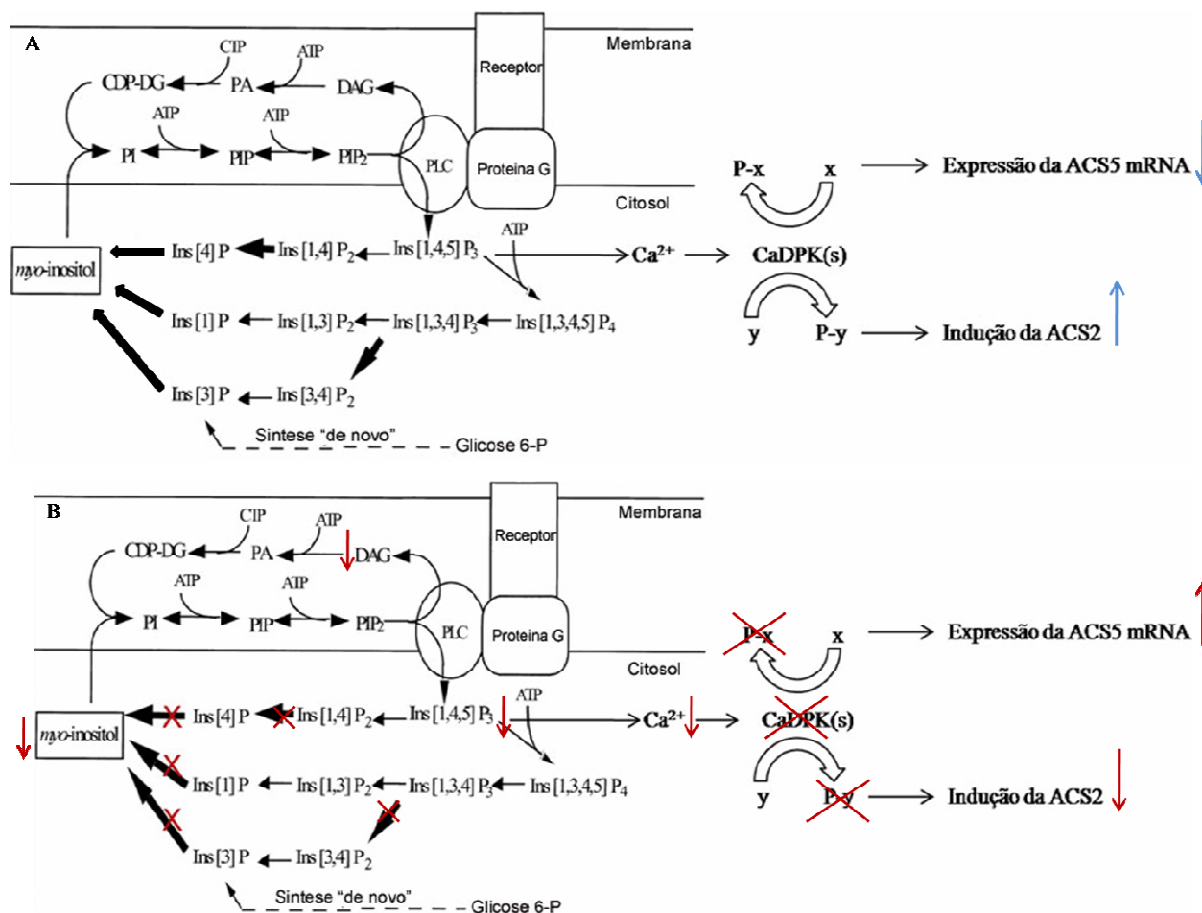
animais. De acordo com O'Donnell et al. (2000), psicose maníaca depressiva pode ser controlada por lítio, sendo este também capaz de causar alterações no desenvolvimento de muitos organismos (Klein & Melton, 1996).

Plantas não contêm lítio sob condições normais de crescimento, mas podem absorvê-lo se este íon estiver presente no meio de crescimento (Liang et al., 1996). Em plantas, lítio inibe os movimentos do pulvino e de pétalas (Birch (1991), citado por Liang et al. (1996)), prejudica o desenvolvimento normal do pólen e sua germinação (Zonia & Tupy, 1995a; Zonia & Tupy, 1995b) e causa necrose em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.; Naranjo et al., 2003). Adicionalmente, diminui o comprimento do sistema radicular, o conteúdo de clorofila e a massa fresca de plantas de *Brassica carinata* (Li et al., 2009).

De acordo com Berridge e Irvine (1989), o mecanismo molecular para a atuação do lítio ainda não é completamente conhecido. Uma hipótese para explicar o mecanismo de ação do lítio é a hipótese da depleção do inositol (Figura 1). Esta hipótese se baseia nos efeitos inibitórios do lítio no ciclo do inositol fosfato (IP), responsável por gerar mensageiros secundários como o inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e o diacilglicerol (DAG). O lítio causa inibição não-competitiva da atividade da inositol monofosfatase (IMPase), levando ao acúmulo de inositol monofosfato e uma depleção correspondente de mio-inositol (Nahorski et al., 1991).

A redução no nível do mio-inositol prejudica a formação eficiente do IP, do mio-inositol e da citidina difosfodiácilglicerol (CDP-DG). Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) é quebrado nos dois mensageiros secundários, Ins[1,4,5]P<sub>3</sub> e DAG que tem sua concentração decrescida. Desta forma, postula-se que haja uma redução da atividade do ciclo IP.

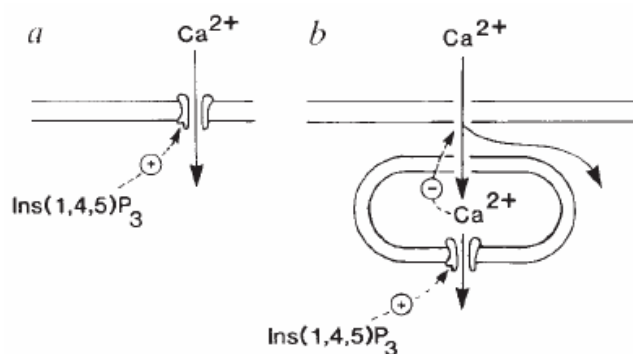
De acordo com Berridge e Irvine (1989) e Liang et al. (1996) o ciclo do inositol fosfato sensível ao lítio, medeia a mobilização de cálcio, que por sua vez regula a atividade de proteínas quinase dependentes de cálcio (Figuras 1 e 2). Então poderia ser uma proteína quinase dependente de cálcio (CaDPK) multifuncional ou, por exemplo hipotético, duas CaDPKs responsáveis pela regulação de algumas enzimas da 1-carboxílico-1-aminociclopropano sintase (ACS), uma das enzimas que controlam a síntese do etileno. A ACS é codificado por uma família multigênica constituída por pelo menos 6 genes, os quais a expressão é induzida por hormônios, sinais de desenvolvimento e inibição da síntese de proteínas (Etheridge et al., 2006). Dentre estes genes, Liang et al. (1996) mostraram que o ciclo do inositol fosfato tem atuação direta na expressão da ACS5 e na indução da ACS2.



**Figura 1.** A) Ciclo do inositol fosfato (ciclo IP) funcionando corretamente. As setas em azul significam diminuição da expressão da ACS5 e aumento da indução da ACS2. B) Ciclo IP afetado pela atuação do lítio. As cruzes e setas vermelhas indicam a inibição da atuação da inositol monofosfatase pelo lítio, com conseqüente diminuição de compostos secundários (DAG e  $IP_3$ ) e  $Ca^{2+}$ . A inibição da atuação da inositol monofosfatase impede a conversão de inositol-1-fosfato, ( $Ins[1]P$ ), inositol-3-fosfato, ( $Ins[3]P$ ), inositol-4-fosfato, ( $Ins[4]P$ ), a mio-inositol, levando ao acúmulo de inositol monofosfato e ao decréscimo de mio-inositol. (modificado de O'Donnell et al., 2000 e Liang et al., 1996).

De acordo com o modelo proposto por Liang et al. (1996, Figura 1), a expressão do gene da ACS5 requer a presença de uma proteína X em sua forma defosforilada. Quando cálcio é mobilizado pela liberação de um  $IP_3$ , uma CaDPK é ativada e converte a proteína X a sua forma fosforilada resultando em inibição da expressão do gene da ACS5. Na presença de Li, no entanto, a liberação do  $IP_3$  é inibida, isto previne a ativação de CaDPK por cálcio. Conseqüentemente, a proteína X não é fosforilada, mantendo ativada a expressão do gene da ACS5. Por outro lado, a ciclohexamida (CHX) mediadora da expressão do ACS2 requer um

fator Y fosforilado o qual é também alvo de uma CaDPK. Inibição indireta da CaDPK por Li, via uma inibição da mobilização de cálcio, mediada pelo IP<sub>3</sub>, resulta na inibição da indução da ACS2 pela CHX. De acordo com este modelo, cálcio é um efector negativo da expressão do gene da ACS5, bem como um efector positivo da indução do gene da ACS2, possuindo então um efeito duplo complexo na expressão de diferentes genes de proteínas que controlam a síntese de etileno, o qual ainda não está esclarecido.



**Figura 2.** Resumo de alguns mecanismos propostos pelos quais inositol fosfato controla a entrada de cálcio dentro das células. *a)*  $Ins(1,4,5)P_3$  controla um canal de cálcio na membrana plasmática; *b)* Modelo no qual  $Ins(1,4,5)P_3$  controla um canal em uma membrana interna de um compartimento regulando indiretamente a entrada de cálcio através da membrana plasmática por um mecanismo de retroalimentação. (modificado de Berridge & Irvine, 1996).

Segundo Woeste et al. (1999), a expressão do gene da ACS2 é mais alta em folhas e flores jovens em desenvolvimento do que em tecidos mais maduros. De acordo com estes autores, a ACS2 também está correlacionada com os estágios iniciais de formação de raízes laterais. Já a ACS5 está envolvida diretamente na biossíntese do etileno. De acordo com Woeste et al. (1999) o mutante da ACS5 (*cin5*) produziu menores quantidades de etileno na presença de brassinoesteróides, sugerindo o papel desta isoforma da ACS em mediar esta resposta. Outros pesquisadores trabalhando com a espécie *Oryza sativa*, verificaram que a ACS5 também está envolvida na rápida elongação do arroz irrigado pela contribuição do aumento dos níveis endógenos de etileno (Van Der Straeten et al., 2001). Liang et al. (1996) trabalhando com *Arabidopsis thaliana*, verificaram que dentre as ACS que eles analisaram (ACS1, ACS2, ACS4 e ACS5), somente a ACS5 foi a que apresentou acúmulo de mRNA sob 50 mM de LiCl.

Bueso et al. (2007), mostraram que a toxicidade causada pelo lítio em *Arabidopsis* é mediada pelo aumento da produção de etileno, sendo que o inibidor da síntese deste hormônio, o ácido 2-aminoisobutírico (AIB) ofereceu uma proteção significativa às plantas de *Arabidopsis* contra os efeitos inibitórios do lítio no crescimento das plântulas. Naranjo et al. (2003), também verificaram que o lítio promove aumento da produção de etileno em plantas de tabaco. Segundo estes autores o lítio desencadeia uma resposta hipersensitiva em tabaco, sendo que a sinalização por etileno é essencial, uma vez que o uso de inibidor do etileno aminoetoxivilglicina (AVG), não produziu a resposta hipersensitiva não sendo observada nenhuma necrose nas folhas, bem como foi verificado o decréscimo nos níveis de etileno destas plantas.

Uma vez que lítio funciona principalmente interferindo na geração de mensageiros secundários como IP<sub>3</sub>, produzidos pelo ciclo do inositol fosfato e que liberam Ca<sup>2+</sup> para a ativação de CaDPKs (Neill et al., 2002), que tem a função de regular a expressão da ACS5 através da atuação do Ca<sup>2+</sup>, seu efeito pode ser revertido pela aplicação externa deste íon, diminuindo a expressão do gene da ACS5 e induzindo a ACS2 (Liang et al., 1996). Kifor et al. (1992), verificaram que altas concentrações extracelulares de Ca<sup>2+</sup> foram capazes de provocar modificação do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato resultando em elevados níveis de IP<sub>3</sub> e IP<sub>4</sub>.

Outra resposta expressiva do ciclo do inositol fosfato é a de produzir importantes mensageiros secundários em transdução de sinais por frio (Xiong et al., 2004). Xiong et al. (2001), mostraram que a mutação causada no mutante *fiery1* foi capaz de afetar positivamente o catabolismo do IP<sub>3</sub>, sendo que plântulas deste mutante apresentaram aumento na indução de genes responsivos a estresses como frio, seca, salinidade ou ABA. Isto apóia o fato de que níveis de IP<sub>3</sub> podem contribuir para aumentar a expressão de genes responsivos a frio, seca ou estresse salino.

De acordo com Xiong et al. (2004), baixas temperaturas induzem a expressão de muitos genes por rotas desconhecidas em plantas. O gene FIERY1 é um regulador negativo geral que controla frio, estresse osmótico, transdução de sinal de ácido abscísico (ABA) e possui atividade inositol polifosfato 1-fosfatase. O gene FIERY1 é idêntico ao HOS2 (regula o fator específico a frio CBF), cujo mutante *hos2* é extremamente tolerante ao lítio (Xiong et al., 2004).

Baseado nestas informações, um grande número de experimentos foi desenvolvido para se determinar:

- 1) Quais os melhores fenótipos mutantes a serem utilizados no estudo;
- 2) Entender como o mutante “132:31” se comporta fisiologicamente em relação ao seu tipo selvagem “Col-0” sob 15 mM de LiCl;
- 3) Qual(is) gene(s) está(ão) relacionado(s) com o fenótipo mutante;

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – Caracterização do fenótipo mutante

Este experimento foi conduzido *in vitro*, primeiramente, crescendo as plantas em meio Murashige e Skoog (MS) força total (MSP001, CAISSON Laboratories, Inc./www.caissonlabs.com), com 2% de sacarose, contendo ainda a adição de vitaminas (MSVL1001, CAISSON Laboratories, Inc) e 1.2% de Ágar (ACUMEDIA Manufactures, Inc.). Dois genótipos de *A. thaliana* foram avaliados (mutante “132:31” e o Col-0) sob diferentes concentrações de LiCl (0, 15, 20, 40 e 80 mM). Foram avaliadas quatro repetições por genótipo sendo avaliadas cinco plantas por repetição. Para as avaliações de porcentagem de germinação e de plântulas, foram avaliadas 20 sementes por repetição, sendo analisadas 4 repetições por genótipo. Na mesma placa, foram crescidos o mutante e o Col-0. Depois de três dias na câmara fria para estratificação (4°C, escuro), as placas foram transferidas para a sala de crescimento e dispostas na posição vertical (22°C/19°C e 16h luz/8h escuro, 100  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Sete dias após a estratificação, as porcentagens de germinação (% de germinação) e de plântulas (% de plântulas) de cada um dos genótipos em estudo foram determinadas. Depois de dezesseis dias da estratificação (para ambos os genótipos e sob todas as concentrações em estudo), determinou-se a porcentagem de plantas sobreviventes, onde: % de sobreviventes = (número de plantas vivas/número de sementes germinadas)\*100. Logo após, mediu-se o comprimento da parte aérea e do sistema radicular das plantas. Depois das medidas, as plantas foram separadas em parte aérea e raiz, sendo analisado o conteúdo de Li nas plantas através do ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry* - Elan DRCe; PerkinElmer). Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey, em nível de 5% de significância.

### 2.2 - Caracterização fisiológica do mutante

#### 2.2.1 - Uso da enxertia para desvendar o papel da parte aérea e do sistema radicular na sensibilidade ao lítio do mutante “132:31”

Sementes foram esterilizadas superficialmente (água sanitária 10% (v/v)/ Tween 20 0.1% (v/v) e Etanol 70% (v/v)) e lavadas seis vezes com água deionizada esterilizada. As sementes foram semeadas sobre a superfície do meio salino (MS) força total (MSP001,

CAISSON Laboratories, Inc./www.caissonlabs.com), contendo ainda, a adição de vitaminas (MSVL1001, CAISSON Laboratories, Inc) e 1.2% de Ágar (ACUMEDIA Manufactures, Inc.) em placas de petri de poliestireno (100 x 15 mm). Após a semeadura, as placas foram colocadas, por três dias, em câmara fria (4°C, escuro). Após os três dias, as placas foram transferidas para a sala de crescimento (16 h de luz/8 h de escuro; 100  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ; 22-19 °C), onde permaneceram até a germinação e posterior crescimento. Sete dias após a transferência das plantas para a sala de crescimento, as plântulas foram enxertadas, como detalhado por Rus et al. (2006). Os tratamentos avaliados foram: plantas enxertadas (Col-0 enxertado sobre Col-0 - Col-0/Col-0; mutante (132:31) enxertado sobre mutante - 132:31/132:31; parte aérea do Col-0 enxertada sobre o sistema radicular do mutante - Col-0/132:31; parte aérea do mutante enxertada sobre o sistema radicular de Col-0 - 132:31/Col-0) e não enxertadas - Col-0 e 132:31. Depois de sete dias da realização da enxertia, metade das plantas enxertadas (sem raízes adventícias e com a união entre a parte aérea e o sistema radicular realizada com sucesso) para cada tratamento, foram transferidas para meio MS força total com sacarose 2% (controle) e a outra metade, para meio MS força total com sacarose 2% e com o tratamento contendo 15 mM de LiCl. Foram realizadas cinco repetições, tanto para o controle, como para o tratamento com lítio. Foram avaliadas cinco plantas de cada conjunto (enxertada ou não enxertada) por repetição. Na mesma placa foram crescidas as plantas enxertadas e não enxertadas do mutante e do Col-0. Depois de dez dias da transferência das plantas para o controle e para o meio enriquecido com lítio, mediu-se o comprimento da parte aérea das plantas e o comprimento do sistema radicular. Depois de medidas, as plantas foram separadas em parte aérea e raiz, sendo analisado o conteúdo de Li nas plantas utilizando o ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*). As amostras foram secas por 24 h a 92°C e pesadas, após atingirem temperatura ambiente. Todas as amostras foram digeridas usando 0.7 ml de ácido nítrico concentrado (AR Select grade; Mallinckrodt) a 110°C por 4 h, e diluídas para 6.0 ml com água. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste Tukey, em nível de 5% de significância.

### ***2.2.2 - Quantificação do etileno produzido por plantas de Arabidopsis submetidas a 15 mM de LiCl***

Este experimento foi conduzido *in vitro*, primeiro crescendo as plantas em meio MS completo (1X) com 2% de sacarose. Dois genótipos de *A. thaliana* foram avaliados (mutante

“132:31” e o Col-0) sob diferentes concentrações de LiCl (0 e 15 mM). Foram avaliadas quatro repetições por genótipo. Depois de três dias na câmara fria para estratificação (4°C, escuro), as placas foram transferidas para a sala de crescimento e dispostas na posição vertical (22°C/19°C e 16h de luz/8h de escuro, 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Sete dias após a estratificação, as plântulas foram transferidas para erlenmeyers de 60 ml preenchidos com 15 ml de meio MS completo (1X), com 2% de sacarose (plantas controle) e meio MS completo (1X), com 2% de sacarose e 15 mM de LiCl (plantas do tratamento). Foram transferidas quatro plantas por frasco, sendo realizadas quatro repetições por genótipo por tratamento. Após a transferência das plantas, os frascos foram hermeticamente fechados para evitar a troca gasosa com o meio externo. Quatro dias após a transferência das plantas para os novos meios, foi realizada a primeira amostragem do gás acumulado no interior dos frascos. Para isso, a atmosfera interna dos frascos foi homogeneizada, utilizando-se uma seringa de 3,0  $\text{cm}^3$ , provida de agulha longa, e retirada uma amostra de 1,0  $\text{cm}^3$  da atmosfera dos frascos, utilizando-se agora seringas descartáveis *ultrafine* (agulhas 29 G  $\frac{1}{2}$  “). Foram realizadas ainda outras duas amostragens, ao sexto e ao oitavo dias após a transferência das plantas para os novos meios. As amostras gasosas coletadas foram injetadas em cromatógrafo a gás (Hewlett-Packard 5890, série II, USA), equipado com detector de ionização de chama, e coluna de aço inoxidável (1,0 m x 6,0 mm), empacotada com Porapak-N (80-100 mesh). O gás de arraste foi o dinitrogênio, com fluxo de 30  $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ . Os fluxos de hidrogênio e do ar foram mantidos em 30 e 320  $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ , respectivamente. As temperaturas da coluna do injetor e do detector foram mantidas em 60, 110 e 150 °C, respectivamente. A quantificação do etileno foi feita pela comparação das áreas dos picos das amostras obtidas em integrador (Hewlett-Packard 3395, USA) acoplado ao cromatógrafo, com áreas de picos de mistura padrão de etileno de concentração conhecida. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey, em nível de 5% de significância.

### ***2.2.3 - Efeito do precursor de etileno (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano - ACC) na germinação de sementes submetidas a 40 mM de LiCl***

Este experimento foi conduzido *in vitro*, em meio Murashigue e Skoog completo (1X) com 2% de sacarose. Dois genótipos de *A. thaliana* foram avaliados (mutante “132:31” e Col-0) sob diferentes concentrações de ACC/LiCl (0/0, 0/40, 25/40, 50/40, 75/40 e 100/40  $\mu\text{M}/\text{mM}$ ). Foram realizadas cinco repetições por genótipo, sendo utilizadas vinte sementes por repetição. Na mesma placa foram semeadas o mutante e o Col-0. Depois de três dias de

estratificação na câmara fria (4°C, escuro), as placas foram transferidas para a sala de crescimento (19°C/22°C e 16h de luz/8h de escuro, 100  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e colocadas na posição vertical, de forma a permitir o melhor crescimento das raízes, e assim permitir melhor observação dos fenótipos radiculares relativos ao crescimento da planta. Depois de sete dias da estratificação, a porcentagem de germinação (% de germinação) foi determinada para cada um dos genótipos em estudo dentro de cada um dos tratamentos realizados. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey, em nível de 5% de significância.

#### **2.2.4 - Efeito do $\text{CaCl}_2$ no crescimento das plantas de *Arabidopsis* submetidas a 15 mM de $\text{LiCl}$**

Este experimento foi conduzido *in vitro*, em meio Murashigue e Skoog completo (1X) com 2% de sacarose. Dois genótipos de *A. thaliana* foram avaliados (mutante “132:31” e Col-0) sob diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2/\text{LiCl}$  (0/0, 0/15, 0.1/15, 1.0/15, 10/15 e 100/15 mM/mM). Foram realizadas cinco repetições por genótipo, sendo utilizadas vinte sementes por repetição. Na mesma placa foi semeado o mutante e o Col-0. Depois de três dias de estratificação na câmara fria (4°C, escuro), as placas foram transferidas para a sala de crescimento (19°C/22°C e 16h de luz/8h de escuro, 100  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e disposta na posição vertical. Depois de quatorze dias da estratificação mediu-se a parte aérea e o sistema radicular dos genótipos em estudo, bem como determinou-se a porcentagem de sobreviventes (% de sobreviventes) em relação ao número de sementes germinadas. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey, em nível de 5% de significância.

#### **2.2.5 - Quantificação de pigmentos de plantas de *Arabidopsis* submetidas a 15 mM de $\text{LiCl}$**

Este experimento foi conduzido *in vitro*, primeiro crescendo as plantas em meio MS completo (1X) com 2% de sacarose. Dois genótipos de *A. thaliana* foram avaliados (mutante “132:31” e o Col-0) sob diferentes concentrações de  $\text{LiCl}$  (0 e 15 mM). Foram avaliadas quatro repetições por genótipo. Depois de três dias na câmara fria para estratificação (4°C, escuro), as placas foram transferidas para a sala de crescimento e dispostas na posição vertical (19°C/22°C e 16h de luz/8h de escuro, 100  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Sete dias após a estratificação, as plântulas foram transferidas para erlenmeyers de 60 mL preenchidos com 15 mL de meio MS completo (1X) com 2% de sacarose (plantas controle) e meio MS completo (1X), com 2% de

sacarose e 15 mM de LiCl (plantas tratamento). Foram transferidas quatro plantas por frasco, sendo realizadas quatro repetições por genótipo por tratamento. Após a transferência das plantas, os frascos foram hermeticamente fechados para evitar a troca gasosa com o meio externo. Vinte dias após a transferência das plantas para os novos meios, as plantas foram coletadas e os pigmentos extraídos segundo Hiscox e Israelstam (1978), com adaptações (Wellburn, 1994). Aproximadamente 0,01 g de tecido fresco da parte aérea foi pesado e em seguida, transferido para tubos de 2 mL, contendo uma pérola de vidro e 300 µL de dimetilsufóxido (DMSO) saturado com CaCO<sub>3</sub>. Para a maceração das amostras, utilizou-se o equipamento Mini-Bead Beater, que durante 20 segundos, através de agitação mecânica, triturou o tecido vegetal e homogeneizou as amostras, que foram processadas ao mesmo tempo. Em seguida, adicionou-se 1100 µL de DMSO saturado com CaCO<sub>3</sub>. O material foi homogeneizado e transferido para o escuro, em “banho-maria” a 65°C por um período de 30 minutos. Com auxílio de uma micropipeta (GILSON P100), transferiu-se 300 µL do sobrenadante às placas de ELISA, realizando três replicatas de cada amostra e fazendo-se a leitura das densidades ópticas a 665, 649 e 480 nm.

A determinação do teor de pigmentos foi realizada de acordo com Wellburn (1994), a partir das seguintes equações:

1. *Clorofila a (Chla)* =  $12,47 * A_{665.1} - 3,62 * A_{649.1}$
2. *Clorofila b (Chlb)* =  $25,06 * A_{649.1} - 6,5 * A_{665.1}$
3. *Clorofilas totais (Chla + Chlb)* =  $7,15 * A_{665.1} + 18,71 * A_{649.1}$
4. *Carotenóides* =  $(1000 * A_{480} - 1,29 * Chla - 53,78 * Chlb) / 220$

Os teores de pigmentos foram expressos em µg.g<sup>-1</sup> de matéria fresca (MF). Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey, em nível de 5% de significância.

#### **2.2.6 - Determinação da peroxidação de lipídeos de plantas de *Arabidopsis* submetidas a 15 mM de LiCl**

Este experimento foi conduzido *in vitro*, primeiro crescendo-se as plantas em meio MS completo (1X) com 2% de sacarose. Dois genótipos de *A. thaliana* foram avaliados (mutante “132:31” e o Col-0) sob diferentes concentrações de LiCl (0 e 15 mM). Foram avaliadas

quatro repetições por genótipo. Depois de três dias na câmara fria para estratificação (4°C, escuro), as placas foram transferidas para a sala de crescimento e dispostas na posição vertical (19°C/22°C e 16h de luz/8h de escuro, 100  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Sete dias após a estratificação, as plântulas foram transferidas para erlenmeyers de 60 ml preenchidos com 15 ml de meio Murashigue e Skoog completo (1X) com 2% de sacarose (plantas controle) e meio Murashigue e Skoog completo (1X), com 2% de sacarose e 15 mM de LiCl (plantas tratamento). Foram transferidas quatro plantas por frasco, sendo realizadas quatro repetições por genótipo por tratamento. Após a transferência das plantas, os frascos foram hermeticamente fechados para evitar a troca gasosa com o meio externo. Vinte dias após a transferência das plantas para os novos meios, as plantas foram coletadas e a peroxidação de lipídio foi avaliada por meio da produção de metabólitos reativos ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), aldeído malônico (MDA), baseado no trabalho de Hodges et al. (1999). Amostras congeladas de aproximadamente 0,1 g foram homogeneizadas com N<sub>2</sub> líquido durante 30 segundos em Mini-Bead Beater. Posteriormente foram adicionados 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (v/v). O homogenato foi centrifugado a 15.000x g, durante 10 minutos, sendo 0,5 mL do sobrenadante transferido para tubo de 2 mL. Ao sobrenadante foram acrescentados 1,5 mL de TBA 0,5% (v/v) em TCA 20% (v/v). O meio foi incubado em “banho-maria” sob agitação, a 90°C por 40 minutos. Logo após ser retirada do banho, os tubos foram transferidos para banho-de-gelo, paralizando-se a reação. Após o resfriamento, realizou-se a centrifugação a 10.000 x g durante 5 minutos a 4°C, com o intuito de separar algum resíduo formado durante o aquecimento. Com auxílio de uma micropipeta (GILSON P1000), transferiu-se 300  $\mu\text{L}$  do sobrenadante às placas de ELISA, realizando-se três replicatas para cada amostra e a leitura das densidades ópticas 440, 532 e 600 nm.

A determinação da peroxidação de lipídeos através da formação de MDA foi realizada de acordo com Hodges et al. (1999), a partir das seguintes equações:

1.  $[(A_{532}+TBA) - (A_{600}+TBA)] - [(A_{532}-TBA) - (A_{600}-TBA)] = A$
2.  $[(A_{440}+TBA) - (A_{600}+TBA)] \times 0,057 = B$
3.  $Eq.MDA = (A-B/157000) \times 10^6$

Os teores de MDA foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de MDA  $\mu\text{g}^{-1}$  de proteína. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey, em nível de 5% de significância.

### **2.2.7 - Exposição ao frio**

Foi conduzido em solo. Dois genótipos de *A. thaliana* foram avaliados (mutante “132:31” e o Col-0). Foram realizadas quatro repetições por genótipo, sendo mantidas quatro plantas de cada genótipo por repetição por vaso. As sementes de cada um dos acessos foram estratificadas por quatro dias (4°C, escuro). Após a estratificação, as sementes foram semeadas na superfície de solo umedecido (Premier Promix PGX, Canada), com vários elementos minerais adicionados em concentrações não tóxicas. As plantas foram irrigadas duas vezes por semana com solução nutritiva produzida nas estufas da Universidade de Purdue, sendo a dosagem dos nutrientes (em mg por litro) a seguinte: 200 N, 29 P, 167 K, 67 Ca, 30 Mg. O suprimento de micronutrientes proveio de uma formulação comercial (MiracleGro® Excel® 15-5-15 Cal-Mag; The Scotts Co., Marysville, Ohio). O pH foi ajustado para uma faixa que variou entre 5.7 - 6.0 e a redução da alcalinidade foi alcançada via adição de ácido sulfúrico 93% (v/v) (Ulrich Chemical, Indianapolis) com a adição de 0.08 ml por litro (Aschenbeck & Eddy, 2004). Depois disso, as plantas foram transferidas para ambiente controlado (19°C/22°C e 16 h luz/8 h escuro, 200  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Quando as plantas alcançaram cerca de três pares de folhas definitivas, elas foram transferidas para a câmara fria (4°C, 8h luz/16h escuro - 100  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Depois de quatro meses, as plantas mutante e Col-0 foram visualmente comparadas.

### **2.3 - Caracterização do gene(s) responsável(is) pelo fenótipo mutante**

Para todos os oito genes (At2g17360, At2g17370, At2g17380, At2g17390, At2g17410, At2g17420, At2g17430 e At2g17440) identificados como ausentes no mutante “132:31”, foram obtidos mutantes por inserção de T-DNA do Instituto Salk (Salk-lines), para o genótipo (Col-0) de *A. thaliana*. Na tabela 1 estão correlacionados os genes, seus respectivos números de acesso no banco de dados do Instituto Salk, o tamanho em pares de base de cada gene e o nome do gene em inglês.

Para a realização dos experimentos, primeiramente, identificou-se as plantas homocigotas dentro de cada um dos acessos utilizados. Para isso, as sementes de cada um dos acessos foram estratificadas por quatro dias (4°C, escuro). Após a estratificação, as sementes foram semeadas na superfície de solo umedecido (Premier Promix PGX, Canada), com vários elementos minerais adicionados em concentrações não tóxicas. As plantas foram irrigadas

duas vezes por semana com solução nutritiva produzida nas estufas da Universidade de Purdue, sendo a dosagem dos nutrientes (em mg por litro): 200 N, 29 P, 167 K, 67 Ca, 30 Mg. O suprimento de micronutrientes proveio de uma formulação comercial (MiracleGro® Excel® 15-5-15 Cal-Mag; The Scotts Co., Marysville, Ohio). O pH foi ajustado para uma faixa que variou entre 5.7 - 6.0 e a redução da alcalinidade foi alcançada via adição de ácido sulfúrico 93% (v/v) (Ulrich Chemical, Indianapolis) com a adição de 0.08 ml por litro (Aschenbeck & Eddy, 2004).

**Tabela 1.** Linhagens Salk com inserções de T-DNA para cada um dos genes que foram removidos da planta de *A. thaliana* (Col-0) originando o mutante “132:31”. Universidade de Purdue, 2008.

Linhagem Salk	Gene	Tamanho do gene	Nome do gene
SALK_105846	At2g17360	1834	40S ribossomal protein S4 (RPS4A)
SALK_073557	At2g17370	2427	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coa Reductase 2
SALK_049615	At2g17380	2044	Associated Protein 19
SALK_023700	At2g17390	2409	Ankyrin repeat family protein
SALK_026835	At2g17410	4755	ARID/BRIGHT DNA-binding domain-containing protein
SALK_014076	At2g17420	2195	NADPH-Dependent Thioredoxin Reductase 2
SALK_027128	At2g17430	2823	Mildew Resistance Locus O 7
SALK_127540	At2g17440	2660	Leucine-rich repeat family protein

Quando as plantas alcançaram cerca de cinco pares de folhas definitivas, três folhas de cada planta foram coletadas, instantaneamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo mantidas nesta condição até a realização da extração do DNA utilizando-se o protocolo CTAB (Brometo de cetil-trimetilamônio). Depois da extração do DNA, as linhagens homozigotas foram identificadas por PCR, para isso, utilizou-se iniciadores específicos para cada gene e para a inserção do T-DNA (Tabela 2).

### **2.3.1 - Avaliação fenotípica comparativa das linhagens Salk em relação ao mutante e ao Col-0 em meio enriquecido com 40 mM de LiCl.**

Este experimento foi conduzido in vitro, em meio MS (1X), com 2% de sacarose, e 0 ou 40 mM de LiCl. Dez genótipos de *A. thaliana* foram avaliados: Salk\_105846 (At2g17360), Salk\_073557 (At2g17370), Salk\_049615 (At2g17380), Salk\_023700 (At2g17390), Salk\_026835 (At2g17410), Salk\_014076 (At2g17420), Salk\_027128 (At2g17430), Salk\_127540 (At2g17440), mutante “132:31” e Col-0. Foram avaliadas 20 sementes por

repetição, sendo analisadas 4 repetições por genótipo. Na mesma placa foram germinadas as linhagens Salk, o mutante e o Col-0. Depois de três dias na câmara fria para estratificação (4°C, escuro), as placas foram transferidas para a sala de crescimento e disposta na posição vertical (19°C/22°C e 16h de luz/8h de escuro, 100  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Sete dias após a estratificação a porcentagem de germinação (% de germinação) de cada um dos genótipos em estudo foi determinada. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey, em nível de 5% de significância.

**Tabela 2.** Sequência dos iniciadores utilizados para a busca de plantas homozigotas dentro de cada linhagem mutante obtida do Instituto Salk. As siglas LP (left primer) e RP (right primer) significam iniciador localizado à esquerda e iniciador localizado à direita, respectivamente.

Iniciador do gene	Sequência do iniciador	Linhagem Salk
At2g17360LP1	CCCACACCGAAATATGACATC	SALK_105846
At2g17360RP1	TTGATGGGAAAAGTGAGGACTG	
At2g17370LP1	TGGCTTTAAAGCTTAAACCGC	SALK_073557
At2g17370RP1	GATGCTATGGGGATGAACATG	
At2g17380LP	GCAATCAGTCTTAAAGTTTGGG	SALK_049615
At2g17380RP	CTACGTCGAGATTCTTGACCG	
At2g17390LP1	AAGAAGCATTCATCGTTTTGG	SALK_023700
At2g17390RP1	ATTGAAATCAAGCCCAGGATC	
At2g17410LP1	CGTCTTCTTTATCAAGGTGCG	SALK_026835
At2g17410RP1	GCATCTCCGTCATCTTTCAAG	
At2g17420LP	GATTTGTTTTCTGTGGCAGTG	SALK_014076
At2g17420RP	GACGTTTAGCAACAGCTCCAG	
At2g17430LP1	TCGCGTCCTTATCTGTTTAGC	SALK_027128
At2g17430RP1	TTTGGTTCGACTGTCCTCAAC	
At2g17440LP2	GTAGGGAAGGAAACGGATCTG	SALK_127540
At2g17440RP2	GCTAAGAACGTTGCAGGTGAG	
SALKLBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	T-DNA
SALKLBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	T-DNA
SALKLBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	T-DNA

### 2.3.2 - Avaliação fenotípica comparativa das linhagens Salk em relação ao mutante e ao Col-0 em meio enriquecido com 15 mM de LiCl

Este experimento foi conduzido in vitro, primeiramente em meio MS (1X), com 2% de sacarose. Dez genótipos de *A. thaliana* foram avaliados Salk\_105846 (At2g17360), Salk\_073557 (At2g17370), Salk\_049615 (At2g17380), Salk\_023700 (At2g17390),

Salk\_026835 (At2g17410), Salk\_014076 (At2g17420), Salk\_027128 (At2g17430), Salk\_127540 (At2g17440), mutante “132:31” e Col-0. Foram avaliadas 20 sementes por repetição, sendo analisadas 4 repetições por genótipo. Na mesma placa, foram germinadas as linhagens Salk, o mutante e o Col-0. Depois de três dias na câmara fria para estratificação (4°C, escuro), as placas foram transferidas para a sala de crescimento e disposta na posição vertical (19°C/22°C e 16h de luz/8h de escuro, 100  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Quatro dias após a estratificação das sementes, cinco plântulas de cada repetição e de cada genótipo, foram transferidas para uma nova placa contendo meio Murashigue e Skoog força total, com 2% de sacarose e 15 mM de LiCl. Depois de treze dias da estratificação, mediu-se o comprimento da parte aérea e do sistema radicular das plantas. Depois de medidas, as plantas foram separadas em parte aérea e raiz, sendo analisado o conteúdo de Li das plantas através do equipamento chamado de ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*). Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey (5% de significância).

### ***2.3.3 - PCR semi-quantitativo para avaliação da expressão gênica das linhagens Salk em comparação ao genótipo mutante e Col-0 em meio enriquecido com 15 mM de LiCl***

Este experimento foi conduzido in vitro, primeiramente em meio MS (1X), com 2% de sacarose. Dez genótipos de *A. thaliana* foram avaliados: Salk\_105846 (At2g17360), Salk\_073557 (At2g17370), Salk\_049615 (At2g17380), Salk\_023700 (At2g17390), Salk\_026835 (At2g17410), Salk\_014076 (At2g17420), Salk\_027128 (At2g17430), Salk\_127540 (At2g17440), mutante “132:31” e Col-0. Foram semeadas 20 sementes por repetição, sendo analisadas 4 repetições por genótipo. Na mesma placa foram germinadas as linhagens Salk, o mutante e o Col-0. Depois de três dias na câmara fria para estratificação (4°C, escuro), as placas foram transferidas para a sala de crescimento e disposta na posição vertical (19°C/22°C e 16h de luz/8h de escuro, 100  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Quatro dias após a estratificação das sementes cinco plântulas de cada repetição e de cada genótipo, foram transferidas para uma nova placa contendo meio Murashigue e Skoog força total, com 2% de sacarose e 15 mM de LiCl. Depois de doze dias da estratificação duas plantas de cada genótipo foram coletadas e o RNA total destas foi extraído utilizando-se o RNase mini Kit (Qiagen). O RNA extraído de cada genótipo foi utilizado para sintetizar cDNA usando o *Superscript II* (Invitrogen). Depois da síntese do cDNA foi realizado PCR para avaliar a expressão dos genes com inserção de T-DNA. Para verificar a qualidade do cDNA produzido de cada genótipo,

utilizou-se como padrão a expressão do gene constitutivo da Actina 3. A lista dos iniciadores utilizados para a realização do PCR está disposta na tabela 3.

**Tabela 3.** Sequência de iniciadores utilizados para se determinar a expressão de cada linhagem Salk na região de inserção do T-DNA.

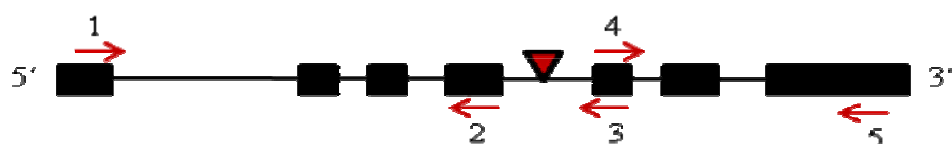
Iniciador do gene	Sequência do iniciador	Linhagem Salk
AT2G17360 (1)	AAAAACTTAAAATTAGGGCTTTGTG	SALK_105846BLP
AT2G17360 (2)	GTCATACAAAAGACGGAAGTTCTC	SALK_105846BRP
AT2G17360 (3)	AATCTTGTTCTCCTCAAGGTC	SALK_105846MRP
AT2G17360 (4)	AGGGTATCCCTACTTGAACACATA	SALK_105846ALP
AT2G17360 (5)	TCCAAAATATAGCTCATAACAATCC	SALK_105846ARP



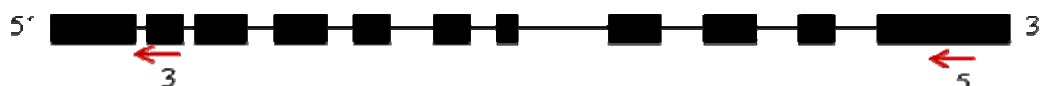
Iniciador do gene	Sequência do iniciador	Linhagem Salk
AT2G17370 (1)	TCTTCTTCTCTCTCTCACATA	SALK_073557BLP
AT2G17370 (2)	TGTAATACTCTGAAGCCTAGCAAAT	SALK_073557BRP
AT2G17370 (3)	GCTGACAATATTGCTTGAATGAG	SALK_073557MRP
AT2G17370 (4)	GTAGAGCTTAACACGCTCAAGAAT	SALK_073557ALP
AT2G17370 (5)	ATATAAGCCATAAAGATGGAAGGAC	SALK_073557ARP



Iniciador do gene	Sequência do iniciador	Linhagem Salk
AT2G17380 (1)	AACAAACTTATATGTGTATCGGACA	SALK_049615BLP
AT2G17380 (2)	CAAAGTAGCGGTCAAGAATCTC	SALK_049615BRP
AT2G17380 (3)	CTGATATTATCCTTGCAACTGTTTT	SALK_049615MRP
AT2G17380 (4)	GTGTGTGTGAACCTCGATTTGATT	SALK_049615ALP
AT2G17380 (5)	AAACCCAAAACGATGAATGCT	SALK_049615ARP



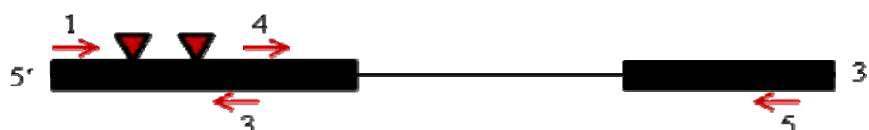
Iniciador do gene	Sequência do iniciador	Linhagem Salk
AT2G17390 (1)	ATATCCGTTTCTTTGCCACA	SALK_023700BLP
AT2G17390 (3)	GGAGAAATCAAAAAGCATTGAAA	SALK_023700MRP
AT2G17390 (4)	ATAGGGTTTTAGTAATTTTCCGATG	SALK_023700ALP
AT2G17390 (5)	GACAGAGAAGAAACATATCCTTCAA	SALK_023700ARP



Iniciador do gene	Sequência do iniciador	Linhagem Salk
AT2G17410 (1)	ATTCGATAGACGCTGGGTA AAA	SALK_026835BLP
AT2G17410 (2)	CAAATTCTCCATTGTTGATTCC	SALK_026835BRP
AT2G17410 (3)	GTTCAACTCTCTCACTCTCCATTT	SALK_026835MRP
AT2G17410 (4)	AATCCTGATAACAAAACACTCTGAA G	SALK_026835ALP
AT2G17410 (5)	TAGATTTAGATACATGGATGGCATT	SALK_026835ARP



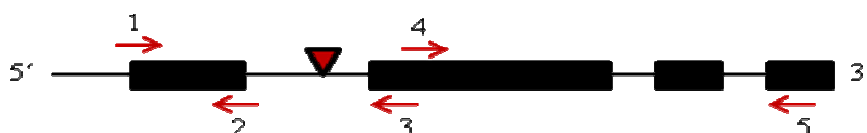
Iniciador do gene	Sequência do iniciador	Linhagem Salk
AT2G17420 (1)	TCTCAATGAGCCAGTCAAGATTCA	SALK_014076BLP
AT2G17420 (3)	TGTTTTCTGAATTTCTCAACGATA	SALK_014076MRP
AT2G17420 (4)	ATATCGTTGAGAAAATTCAGAAAACA	SALK_014076ALP
AT2G17420 (5)	AAAGTATGAAAAAGTCTCTCACCT	SALK_014076ARP



Iniciador do gene	Sequência do iniciador	Linhagem Salk
AT2G17430 (1)	TCTTTGTTATGGTTTCTAGTGTCC	SALK_027128BLP
AT2G17430 (2)	GCAAAGTGGATAAGATGAAGAAGTA	SALK_027128BRP
AT2G17430 (3)	TACCTTTCTTCAATTTGATGTCTTT	SALK_027128MRP
AT2G17430 (4)	AGCTACATCACTCTCCCATTGTA	SALK_027128ALP
AT2G17430 (5)	GTTAGTAAACAGCATCGTTTCATTT	SALK_027128ARP



Iniciador do gene	Sequência do iniciador	Linhagem Salk
AT2G17440 (1)	ATGAGAAGACGAAGAAAGAGAAAAC	SALK_127540BLP
AT2G17440 (2)	GAGCTAACAACCCATCACTATAAAA	SALK_127540BRP
AT2G17440 (3)	ACCATGATACAATTCTCAGACAGAT	SALK_127540MRP
AT2G17440 (4)	AGGCTAGATCTGTCTGAGAATTGTA	SALK_127540ALP
AT2G17440 (5)	GACGAAGAGTAAAGTGAAATTGTGT	SALK_127540ARP



Caixas pretas indicam exóons, linhas pretas indicam íntrons, setas vermelhas indica iniciadores e triângulos vermelhos invertidos indicam inserções de T-DNA. As siglas BLP (before of the T-DNA insertion left primer) representa o iniciador representado pelo número 1 nos diferentes genes, BRP (before of the T-DNA insertion right primer) representa o iniciador representado pelo número 2 nos diferentes genes, MRP (after of the T-DNA insertion right primer) representa o iniciador representado pelo número 3 nos diferentes genes, ALP (after of the T-DNA insertion left primer) representa o iniciador representado pelo número 4 nos diferentes genes e ARP (after of the T-DNA insertion right primer) representa o iniciador representado pelo número 5 nos diferentes genes.

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 – Caracterização do fenótipo mutante

Verificou-se diferença de comportamento entre o 132:31 e o Col-0 para o comprimento da parte aérea, confirmando as observações feitas anteriormente (Rus, comentários pessoais) de que o mutante apresentava menor tamanho da parte aérea (0,25 cm) quando comparado com o Col-0 (0,55 cm). As demais características observadas sob condições de controle não apresentaram nenhuma diferença entre o mutante e o Col-0 (Tabela 4). Plantas mutantes apresentaram maiores % de germinação do que o Col-0, tanto sob 40 mM (98 e 43%, respectivamente) quanto sob 80 mM de LiCl (66 e 8%, respectivamente; Tabela 4). O percentual de plântulas observadas após a germinação na presença de 40 mM de LiCl foi maior para o mutante (32%) do que para o Col-0 que não apresentou a formação de nenhuma plântula.

**Tabela 4.** Características avaliadas na comparação entre o 132:31 e o Col-0 submetidos às diferentes concentrações de lítio (Universidade de Purdue, 2008).

Tratamento de Li (mM)	0		15		20		40		80	
	Col-0	Mut	Col-0	Mut	Col-0	Mut	Col-0	Mut	Col-0	Mut
% de germinação	98 a	100 a	100 a	100 a	88 a	95 a	43 b	98 a	8 b	66 a
% plântulas	100 a	98 a	95 a	93 a	72 a	74 a	0	32	0	0
% de sobreviventes	100 a	100 a	88 a	66 b	40 a	9 b	0	0	0	0
Parte aérea (cm)	0.55 a	0.25 b	0.37 a	0.20 b	0.40 a	0.15 b	0	0	0	0
Raiz (cm)	8.85 a	8.57 a	4.43 a	1.69 b	1.62 a	0.18 b	0	0	0	0
Comprimento da planta (cm)	9.40 a	8.82 a	4.80 a	1.89 b	2.02 a	0.33 b	0	0	0	0
[Li] na parte aérea ( $\mu\text{g(Li).g(MS)}^{-1}$ )	3 a	4 a	2629 a	2266 b	2973 a	2322 b	0	0	0	0
[Li] na raiz ( $\mu\text{g(Li).g(MS)}^{-1}$ )	1 a	2 a	559 a	461 b	702	0	0	0	0	0

Abreviações utilizadas: [Li] na parte aérea (concentração de Li na parte aérea,  $\mu\text{g(Li).g(MS)}^{-1}$ ) e [Li] na raiz (concentração de lítio na raiz,  $\mu\text{g(Li).g(MS)}^{-1}$ ) das plantas de dois genótipos de *Arabidopsis thaliana* (Col-0 e 132:31), crescidas em diferentes concentrações de LiCl (0, 15, 20, 40 e 80 mM). Letras diferentes indicam diferença estatística entre Col-0 e o 132:31, dentro dos tratamentos, ao nível de 5% de probabilidade, de acordo com o teste de Tukey.

Para as características % de sobreviventes, raiz, comprimento da planta, [Li] na parte aérea e [Li] no sistema radicular, foi verificada diferença significativa entre o mutante e o Col-0 a partir da concentração de 15 mM de LiCl (Tabela 4). A taxa de sobreviventes foi menor para o mutante (66%) quando comparado com o Col-0 (88%). A raiz e o comprimento de 132:31, foram menores (1,69 e 1,89 cm, respectivamente), quando comparadas ao Col-0 (4,43 e 4,80 cm, respectivamente). A concentração de lítio na parte aérea e no sistema radicular foi inferior no 132:31 (2266 e 461  $\mu\text{g}(\text{Li}).\text{g}(\text{MS})^{-1}$ , respectivamente) quando comparado ao Col-0 (2629 e 559  $\mu\text{g}(\text{Li}).\text{g}(\text{MS})^{-1}$ , respectivamente).

Verificamos que para ambos os genótipos, o aumento da concentração de LiCl no meio leva a reduções nos valores das características apresentadas na Tabela 4. Li et al. (2009), mostraram queda na porcentagem de germinação de sementes e no comprimento do sistema radicular das plantas de *Brassica carinata*, com o aumento nas concentrações de Li. No entanto, diferentemente do observado por estes autores, que verificaram acúmulo crescente de Li nas plantas de *B. carinata*, os genótipos em estudo (mutante “132:31” e Col-0) não apresentaram diferença significativa no acúmulo deste íon quando eram expostos a concentrações crescentes de LiCl.

Os resultados obtidos possibilitaram determinar as concentrações de 40 mM de LiCl, como a ideal para discriminação dos fenótipos taxa de germinação e taxa de plântulas entre o 132:31 e o Col-0, e a concentração de 15 mM como a ideal para discriminarmos os fenótipos taxa de sobreviventes, comprimento da raiz, comprimento da planta, [Li] na parte aérea e [Li] na raiz entre 132:31 e o Col-0.

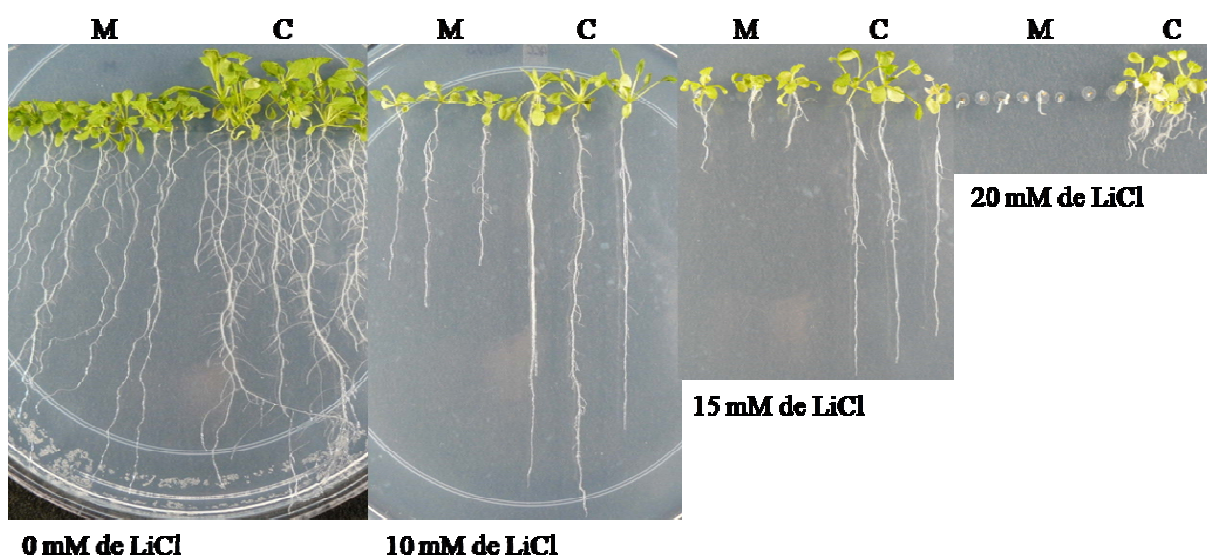
É importante observar que, apesar de não termos quantificado o número de raízes secundárias emitidas, se observarmos este fenótipo na figura 3, fica evidente o menor número de raízes secundárias emitidas por 132:31 quando comparado com o Col-0.

### ***3.2 - Caracterização fisiológica do mutante***

#### ***3.2.1 - Uso da enxertia para avaliar o efeito relativo da toxidez por lítio na parte aérea e no sistema radicular***

O estudo das interações entre a raiz e a parte aérea das plantas, para melhor compreender como estes se comunicam, tem sido realizado nas últimas duas décadas utilizando-se da técnica chamada enxertia (Bradford & Yang, 1980; Schurr et al., 1992;

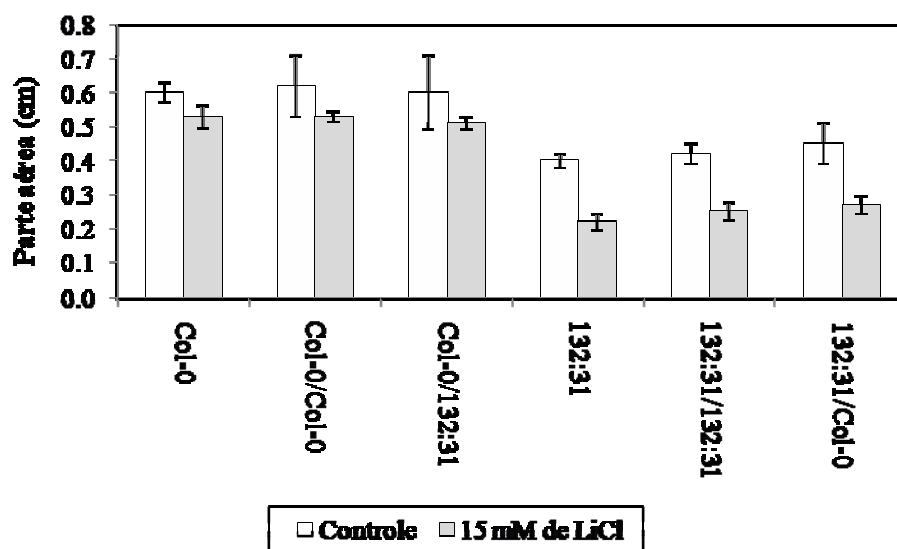
Turnbull et al., 2002). Esta técnica tem gerado importantes evidências que envolvem a sinalização a longa distância em muitos processos em *Arabidopsis*, incluindo regulação do tempo de florescimento e ramificação da parte aérea (Turnbull et al., 2002). Baseado nestas informações, nós decidimos utilizar a técnica da micro-enxertia recíproca (Turnbull *et al.*, 2002) para comparar o efeito tóxico em raízes e folhas, e talvez identificar a presença de algum processo de sinalização a longa distância entre a raiz e a parte aérea de *Arabidopsis* submetida a LiCl.



**Figura 3.** Dois genótipos de *A. thaliana* (Mutante e Col-0, respectivamente), submetidos a diferentes concentrações de LiCl (0, 10, 15 e 20 mM). Fotos foram tiradas 19 dias após a semeadura. M (mutante “132:31”) e C (tipo selvagem “Col-0”)

A auto-enxertia não afetou o crescimento da parte aérea de Col-0 e de 132:31 no meio com ou sem 15 mM de LiCl, excluindo a possibilidade de que a enxertia afete algum fenótipo neste experimento. Na figura 4 podemos verificar que as plantas 132:31 enxertadas e não enxertadas, apresentaram tamanho final da parte aérea superior ao das plantas submetidas a 15 mM de LiCl, o que não foi observado para Col-0. Este resultado confirma a sensibilidade do mutante ao lítio (Tabela 4). Quando comparamos as plantas com parte aérea proveniente de Col-0 com parte aérea proveniente do 132:31, verificamos que as primeiras apresentaram tamanho final superior tanto para o controle, como para o tratamento de 15 mM de LiCl. O fato de os conjuntos Col-0/Col-0 e Col-0/132:31 não diferirem entre si, mostrando pequena sensibilidade ao lítio, contrastam com os resultados do conjunto 132:31/Col-0, o qual teve uma grande redução da parte aérea (em torno de 40%). Este fato indica que no mutante não há

aumento de transporte de lítio para a parte aérea. Os conjuntos 132:31/132:31 e 132:31/Col-0 não diferem entre si quanto a sua sensibilidade ao lítio, mas diferem do conjunto Col-0/132:31, indicando que a sensibilidade do mutante a este metal é mais alta na parte aérea do que no sistema radicular do mesmo.

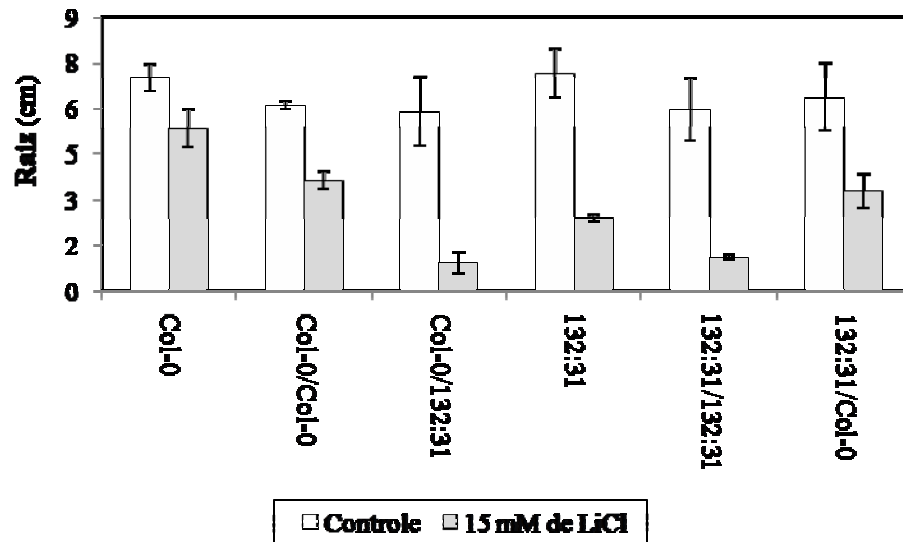


**Figura 4.** Comprimento da parte aérea de dois genótipos de *A. thaliana* (Col-0 e 132:31), seus auto-enxertos e seus enxertos recíprocos, crescidas em ausência ou presença de 15 mM de LiCl. Os dados são médias de cinco repetições e as barras representam  $\pm$  erro padrão médio. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey (5% de significância). Universidade de Purdue, 2008.

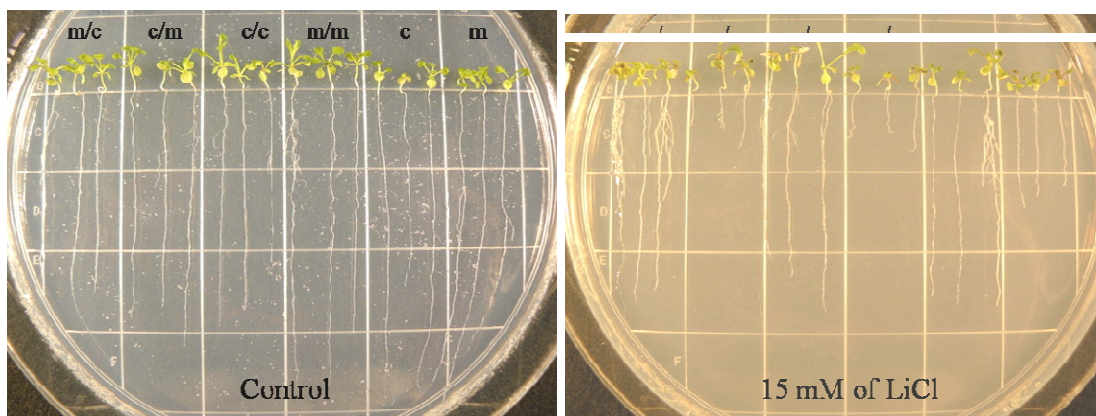
Observou-se para todos os conjuntos de plantas, enxertados ou não, uma redução no comprimento de raiz quando submetidos ao tratamento de 15 mM de LiCl em comparação ao controle. Estes resultados concordam com os observados por Li et al. (2009), que verificaram decréscimo no comprimento de raízes da espécie *B. carinata* quando submetida a concentrações acima de 0,3 mM de LiCl.

A enxertia não afetou o comprimento final do sistema radicular do 132:31 e de Col-0 na ausência de lítio. Entretanto, com 15 mM de LiCl, verificamos que os auto-enxertos apresentaram tamanho final inferior, quando comparados aos seus respectivos pés-francos (Figuras 5 e 6). A enxertia pode reduzir a condutância hidráulica, visto que a cicatrização pode não reconstituir o mesmo número de elementos condutores nos feixes vasculares na região do enxerto, o que pode além de afetar o desenvolvimento de uma forma geral, contribuir para uma maior concentração de lítio nas raízes dos tratamentos enxertados, quando comparado com as

plantas pé-franco. Surpreendentemente, o mutante enxertado sobre Col-0 apresentou tamanho do sistema radicular similar ao tratamento Col-0 auto-enxertado. Este resultado mostra que o sistema radicular do 132:31, apresenta maior sensibilidade ao lítio do que o sistema radicular de plantas Col-0 e que a menor sensibilidade do enxerto Col-0 não consegue atenuar a toxicidade do lítio no porta-enxerto mutante.

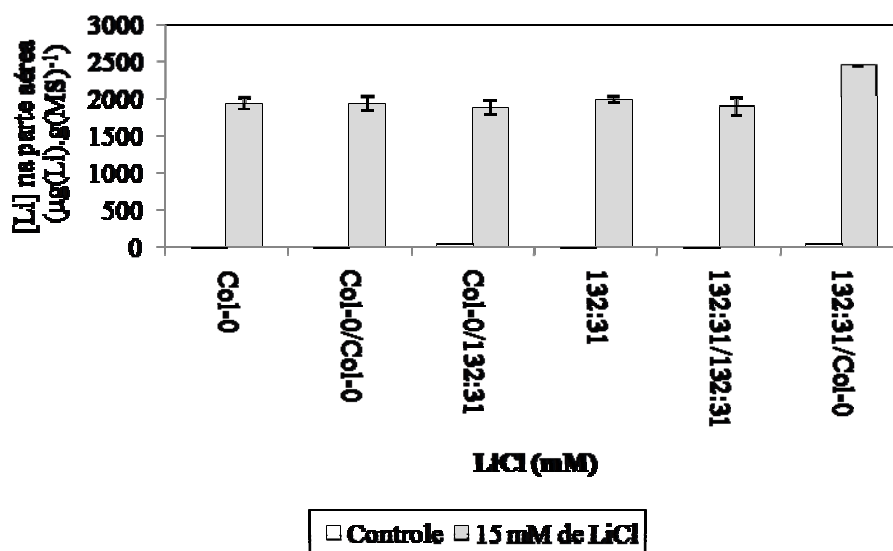


**Figura 5.** Comprimento da raiz principal de dois genótipos de *A. thaliana* (Col-0 e 132:31), seus auto-enxertos e seus enxertos recíprocos, crescidas em controle ou na presença de 15 mM de LiCl. Os dados são médias de cinco repetições e as barras representam  $\pm$  erro padrão médio. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey (5% de significância). Universidade de Purdue, 2008.



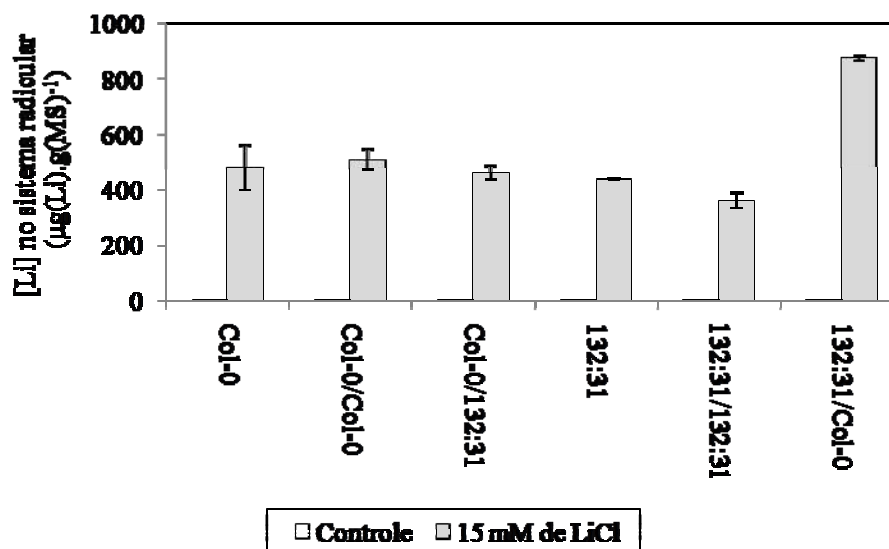
**Figura 6.** Plantas enxertadas e não enxertadas de dois genótipos de *Arabidopsis thaliana* (Col-0 e 132:31), crescidas na presença ou ausência de 15 mM de LiCl. Universidade de Purdue, 2008.

A enxertia não afetou o acúmulo de lítio na parte aérea (Figura 7) ou no sistema radicular (Figura 8) dos genótipos avaliados. Este resultado é diferente do apresentado na Tabela 4, que mostrou diferença no acúmulo de lítio entre o mutante e o Col-0. Esta diferença de resultados, deve-se a dois fatores: 1) No experimento para a determinação do fenótipo mutante (Tabela 4), as plantas conduzidas durante todo o tempo sob o tratamento com LiCl, o que possivelmente condicionou a uma maior absorção de Li por ambos os genótipos; 2) No experimento de enxertia (Figuras 7 e 8), o período de exposição dos genótipos ao LiCl foi inferior (10 dias) ao realizado para a determinação do fenótipo (19 dias). No entanto, quando enxertou-se a parte aérea mutante sobre o sistema radicular do Col-0, verificou-se aumento no acúmulo de lítio, tanto na parte aérea (mutante), quanto no sistema radicular (Col-0). Esta observação pode ser resultado da menor sensibilidade do sistema radicular de Col-0 ao lítio, fazendo com que a absorção e transporte de íons nutrientes ou tóxicos não tenham sido reduzidos como seriam no mutante. A parte aérea do 132:31, quando enxertada sobre o Col-0, acumulou Li em concentrações superiores aos demais enxertos e pés francos. Estes resultados podem ser um indicativo de que, apesar do mutante apresentar um tamanho relativamente inferior para a parte aérea, esta característica provavelmente não está relacionada com a sensibilidade deste genótipo ao Li.



**Figura 7.** Concentração de Li ( $\mu\text{g}(\text{Li}).\text{g}(\text{MS})^{-1}$ ) na parte aérea de plantas enxertadas e não enxertadas de *A. thaliana* (Col-0 e mutante “132:31”), crescidas em controle ou na presença de 15 mM de LiCl. Os dados são médias de cinco repetições e as barras representam  $\pm$  erro padrão médio. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey (5% de significância). Universidade de Purdue, 2008.

Outro ponto extremamente importante a ser observado para este enxerto recíproco é o fato de que o sistema radicular composto pelo Col-0 foi capaz de acumular Li em concentrações superiores aos enxertos e pés-francos do mutante. Sendo assim, o maior acúmulo de Li verificado para o Col-0 quando comparado ao mutante (Tabela 4) foi devido principalmente ao sistema radicular do que a sua parte aérea.

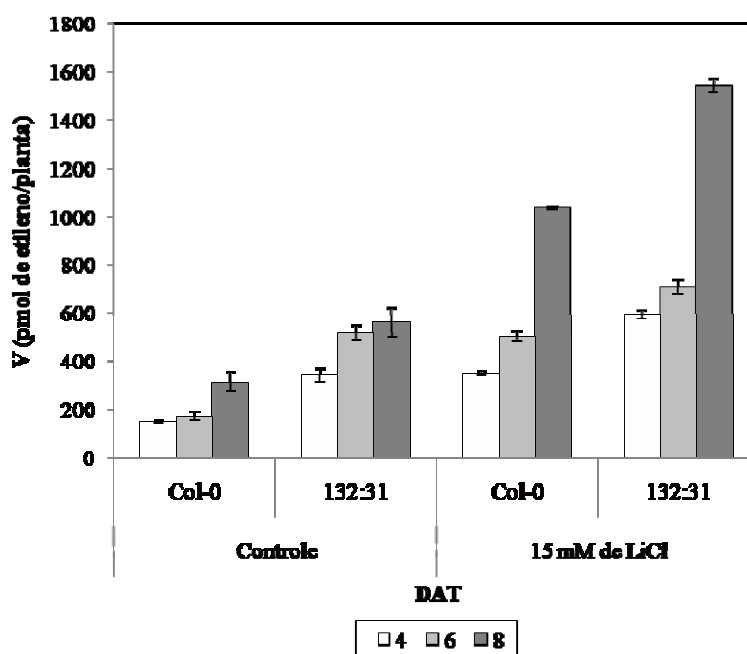


**Figura 8.** Concentração de Li ( $\mu\text{g}(\text{Li}).\text{g}(\text{MS})^{-1}$ ) no sistema radicular de plantas enxertadas e não enxertadas de *A. thaliana* (Col-0 e mutante “132:31”), crescidas em controle ou na presença de 15 mM de LiCl. Os dados são médias de cinco repetições e as barras representam  $\pm$  erro padrão médio. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey (5% de significância). Universidade de Purdue, 2008.

### 3.2.2 - Produção de etileno por plantas de *Arabidopsis* submetidas a 15 mM de LiCl

Observou-se que plantas de *A. thaliana* submetidas a 15 mM de LiCl produzem mais etileno. Plantas Col-0 apresentaram aumentos de 235, 295 e 331 %, aos 4, 6 e 8 dias após tratamento, respectivamente, enquanto nos mutantes os aumentos foram da ordem de 174, 137 e 275 %, quando comparados aos mesmos genótipos não expostos (Figura 9). De acordo com Liang et al. (1996), o lítio afeta a indução do gene relacionado a produção da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintase (sintase do ACC) com consequente aumento da produção de etileno (Naranjo et al., 2003). Altas concentrações deste hormônio inibem o crescimento e promovem senescência (Dangl et al., 2000).

Surpreendentemente, na ausência do lítio o mutante produziu concentrações de etileno superiores ao Col-0. Esta pode ser considerada uma evidência de que a alteração genética ocorrida no mutante afeta os níveis de etileno produzido pela planta. Estes dados sugerem que a maior sensibilidade do mutante ao lítio pode ser devida a produção de altos níveis de etileno ou perda de sensibilidade a este na presença deste metal, resultando em senescência das folhas e inibição do crescimento do sistema radicular quando comparado ao Col-0 (Tabela 4).



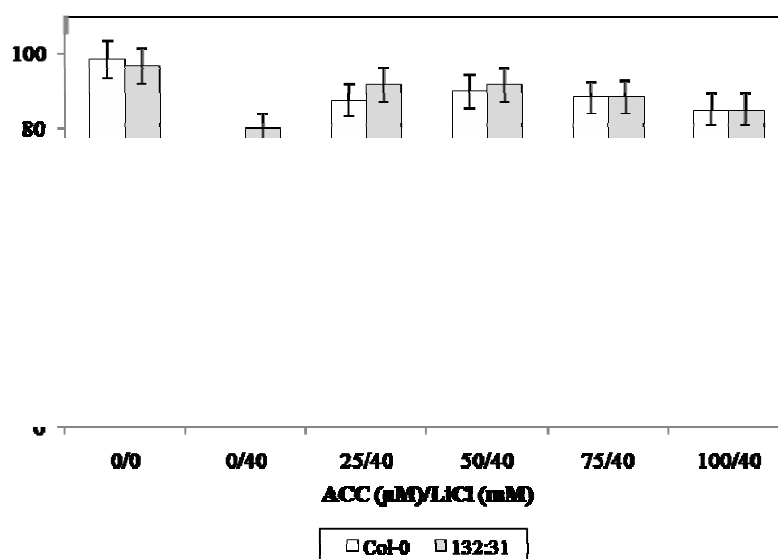
**Figura 9.** Produção de etileno de dois genótipos de *A. thaliana* (Col-0 e 132:31), crescidas em condições de controle ou em concentrações de 15 mM de LiCl. Os dados são médias de quatro repetições e as barras representam  $\pm$  erro médio. Universidade Federal de Viçosa, 2009. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey (5% de significância). Universidade de Purdue, 2008.

O menor número de raízes secundárias, observada nos genótipos em estudo, sob crescentes concentrações de LiCl (Figura 3) pode estar associada com a atuação do Li no ciclo do inositol fosfato. A redução na síntese de IP<sub>3</sub> induzida pelo lítio, inibe a ACS2 a qual é correlacionada com os estágios iniciais de formação de raízes laterais (Woeste et al., 1999). Se compararmos visualmente o Col-0 e o mutante, verificamos que o mutante foi mais deficiente na produção de raízes secundárias na ausência ou presença de LiCl (Figura 3). Postulamos a hipótese de que em 132:31, há uma inibição do ciclo do inositol fosfato, havendo um menor teor de IP<sub>3</sub>, o qual é importante sinal regulador dos níveis de cálcio dentro

da célula. As reduções nos níveis de  $IP_3$  significariam uma menor concentração de cálcio intracelular.

### 3.2.3 - Efeito do precursor de etileno ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) na germinação de sementes submetidas a 40 mM de LiCl

O etileno também está relacionado com a germinação de sementes de *Arabidopsis*, por regular negativamente o ácido abscísico, conhecido inibidor da germinação (Gazzarrini & McCourt, 2001). Outro papel do etileno envolve a resposta tríplice que consiste no intumescimento do hipocótilo, na inibição do alongamento da raiz e no aumento exagerado do gancho plumular. A diferença de germinação na presença de 40 mM de LiCl, onde mutante apresenta quase o dobro do percentual de germinação (80%) do Col-0 (44%), poderia ser explicada pela maior síntese de etileno no mutante (Figura 10).



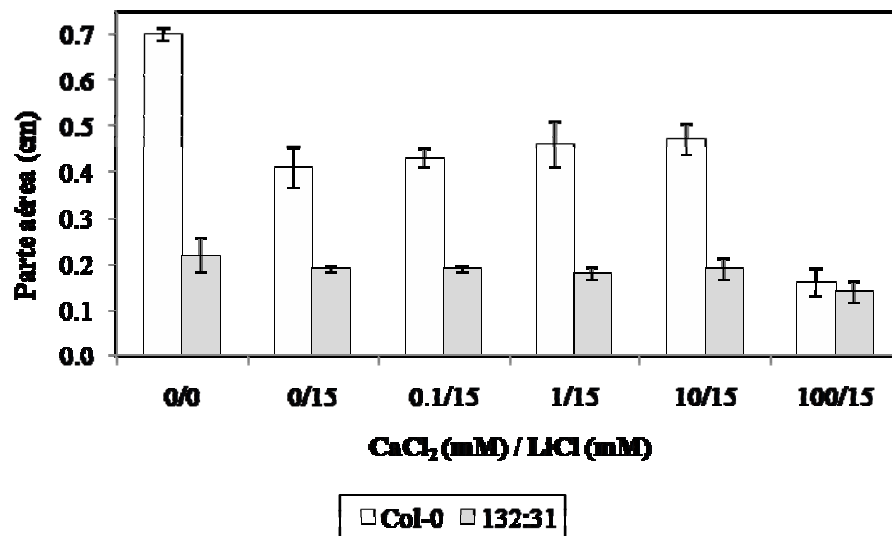
**Figura 10.** Porcentagem de germinação de dois genótipos de *A. thaliana* (Col-0 e 132:31), crescidas em diferentes concentrações de ACC/LiCl ( $\mu\text{M}/\text{mM}$ ). Os dados são médias de cinco repetições e as barras representam  $\pm$  erro padrão médio. Os resultados são a média de dois experimentos conduzidos de forma independente, mas sob as mesmas condições. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey (5% de significância). Universidade de Purdue, 2008. Universidade de Purdue, 2008.

Para comprovar esta hipótese, foi adicionado diferentes concentrações do precursor do etileno ACC, de forma a verificar se esta diferença de germinação na presença do metal

poderia ser reduzida após adição deste precursor. Os resultados permitiram verificar um aumento no percentual de germinação em resposta ao ACC para Col-0, atingindo os mesmos níveis de germinação de 132:31. Estes resultados comprovam a hipótese de que os maiores níveis de germinação do mutante frente ao lítio, devem-se à sua maior síntese de etileno, havendo aumento da germinação em resposta ao ABA endógeno da semente, como descrito para *Arabidopsis* (Gazzarrini & McCourt, 2001).

### 3.2.4 - Efeito do $\text{CaCl}_2$ no crescimento das plantas de *Arabidopsis* submetidas a 15 mM de $\text{LiCl}$

A utilização do  $\text{CaCl}_2$  não influenciou no comprimento final da parte aérea das plantas mutantes e Col-0 quando comparados ao tratamento sem  $\text{CaCl}_2$  (Figura 11).

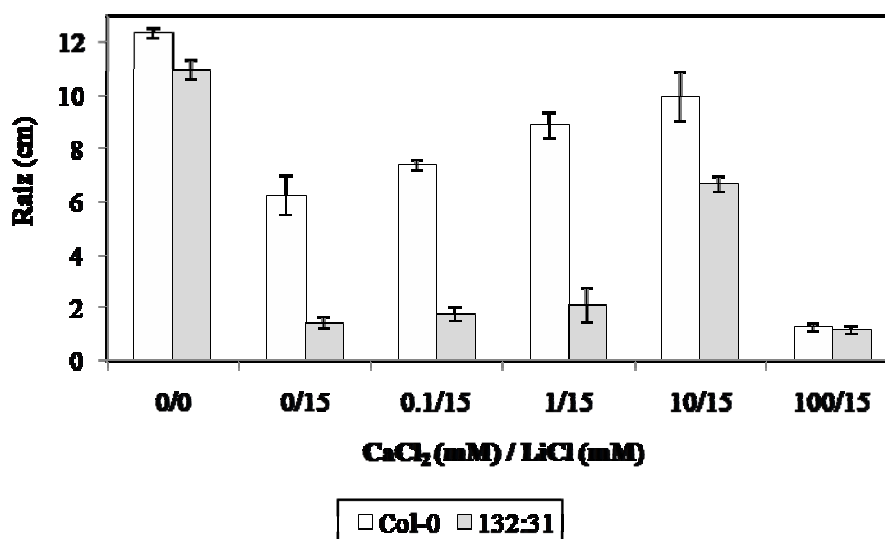


**Figura 11.** Comprimento da parte aérea de dois genótipos de *A. thaliana* (Col-0 e 132:31) submetidas a diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2/\text{LiCl}$  (mM/mM). Os dados são médias de cinco repetições e as barras representam  $\pm$  erro padrão médio. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey (5% de significância). Universidade de Purdue, 2008.

Universidade de Purdue, 2008.

Ao contrário do observado para o efeito do  $\text{Ca}^{2+}$  na parte aérea, seu efeito foi claro na recuperação do comprimento da raiz na presença de lítio, tanto para o mutante quanto para Col-0 (Figura 12). O etileno é necessário para o desenvolvimento das raízes secundárias (Lin et al., 2009). O aumento do cálcio no citosol pode levar a indução do gene ACS2, o qual

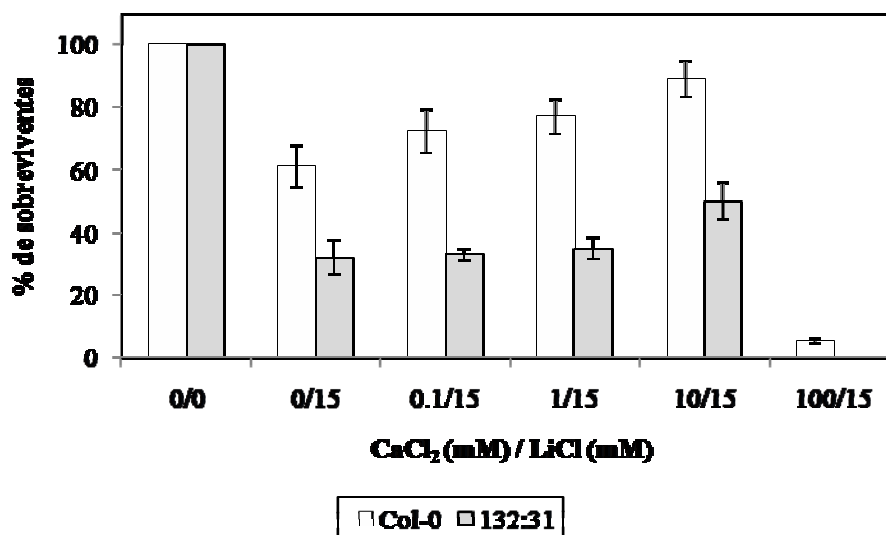
participa na síntese de etileno em raízes (Whoeste et al., 1999). Redução na expressão de algumas ACS em milho podem resultar em grande inibição do desenvolvimento do sistema radicular (Gallie et al., 2009). Os resultados obtidos em nossos experimentos, concordam com os de outros pesquisadores (Kifor et al., 1992; Liang et al., 1996; Bueso et al., 2007), que verificaram que o efeito tóxico do lítio pode ser amenizado quando ocorre elevação dos níveis endógenos de  $\text{Ca}^{2+}$ . De acordo com Bueso et al. (2007) o mutante de *A. thaliana*, *cat2-1*, deficiente no controle do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), foi tolerante ao lítio. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  ativa a absorção de  $\text{Ca}^{2+}$  por canais, possibilitando a elevação do nível citosólico deste íon, o que possivelmente contribuiu para a maior tolerância do mutante *cat2-1* ao lítio. Zonia e Tupý (1995b) também verificaram que a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  ao meio, foi capaz de restaurar a germinação dos pólenes de maçã (*Malus x domestica* Borkh.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) e batata (*Solanum tuberosum* L.), que estavam sendo inibidos pela exposição ao LiCl. Liang et al. (1996), observaram que concentrações crescentes de  $\text{CaCl}_2$  foram capazes de reverter o efeito inibitório causado pelo LiCl a plantas de *Arabidopsis*. Estes pesquisadores verificaram que a expressão da ACS5 decrescia, enquanto a de ACS2 aumentava conforme havia elevação da concentração de  $\text{CaCl}_2$  no meio em que as plantas estavam expostas.



**Figura 12.** Comprimento do sistema radicular de dois genótipos de *A. thaliana* (Col-0 e 132:31) submetidas a diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2/\text{LiCl}$  (mM/mM). Os dados são médias de cinco repetições e as barras representam  $\pm$  erro padrão médio. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey (5% de significância). Universidade de Purdue, 2008.

O fato de que a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  pode reverter parcialmente o efeito prejudicial causado pelo lítio ao sistema radicular, principalmente em plantas Col-0, pode indicar que esteja ocorrendo, nestas plantas, uma menor ativação da ACS (associado ao menor nível de  $\text{IP}_3$ ). Com a adição exógena de cálcio, ocorreria então maior indução de ACS2, maior produção de etileno no sistema radicular, e maior recuperação do comprimento das raízes (Figura 2). Alternativamente, estes resultados podem indicar que o lítio esteja limitando a mobilização necessária de cálcio para o citosol, a qual seria necessária para um desenvolvimento radicular normal. Uma maneira de discernir entre estas duas hipóteses seria a avaliação, em plantas, do controle do efeito da adição de cálcio na produção de etileno.

Quando observamos o percentual de plântulas sobreviventes na presença de 15 mM de LiCl (Figura 13), podemos verificar o efeito positivo do  $\text{Ca}^{2+}$  sobre ambos os genótipos tanto o mutante, quanto Col-0, que apresentaram maior número de plântulas sobreviventes quando estavam submetidos a concentração de 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  e 15 mM de LiCl (52 e 90%, respectivamente), quando comparado ao controle com 15 mM de LiCl sem  $\text{CaCl}_2$  (35 e 61%, respectivamente). Em ambos os casos o  $\text{Ca}^{2+}$  provavelmente contribui com a diminuição da concentração endógena do etileno, o qual é possivelmente o maior responsável pela morte das plantas após a germinação das sementes.

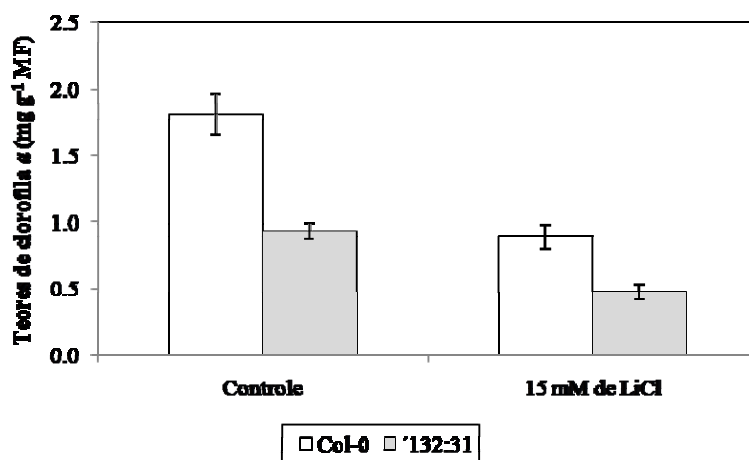


**Figura 13.** Porcentagem de sobreviventes de dois genótipos de *A. thaliana* (Col-0 e 132:31), crescidas em diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2/\text{LiCl}$  (mM/mM). Os dados são médias de cinco repetições e as barras representam  $\pm$  erro padrão médio. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey (5% de significância). Universidade de Purdue, 2008.

### 3.2.5 - Quantificação de pigmentos de plantas de *Arabidopsis* submetidas a 15 mM de LiCl

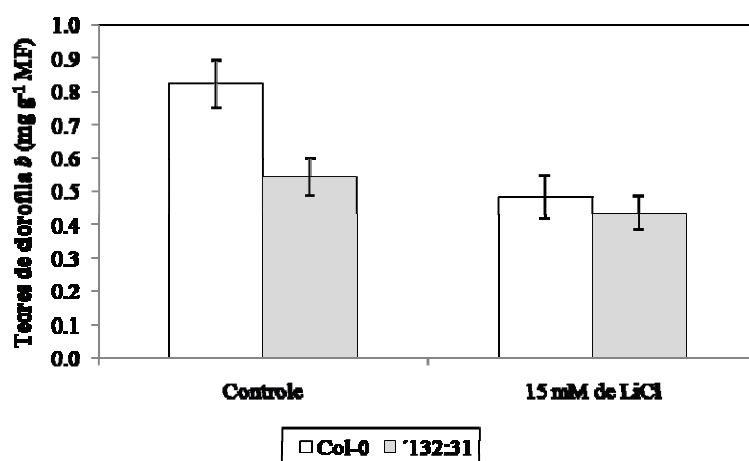
Como o lítio aumenta a produção de etileno, e nosso mutante apresenta maiores níveis deste hormônio, na presença ou ausência do lítio, procuramos verificar se haveria alguma evidência de indução de processos de senescência neste mutante. Apesar da ausência de fenótipos visuais, observamos que mesmo na ausência de lítio, o teor de clorofila *a* do mutante é cerca de 52% daquela observada para o Col-0 (Figura 14). O lítio, decresceu dramaticamente o teor de clorofila *a*, tanto em plantas Col-0 como mutantes (50 e 51%, respectivamente). Nossos resultados concordam com os obtidos por Li et al. (2009) que para a espécie *B. carinata*, que sob 30 mM de LiCl, apresentou decréscimo no teor de clorofila *a*.

No mutante, os teores de clorofila *b* foram menores na ausência de lítio (Figura 15), como também observado para a clorofila *a* quando comparado ao Col-0. No entanto, não foi observada diferença significativa entre o mutante conduzido na condição de controle em comparação ao tratamento de 15 mM de LiCl.



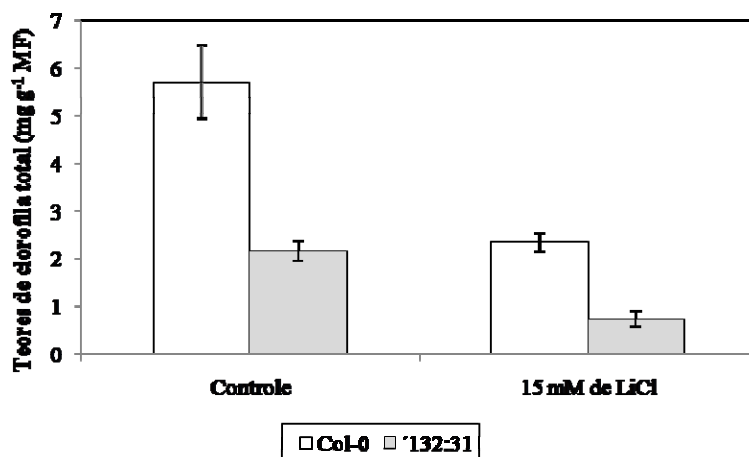
**Figura 14.** Teor de clorofila *a* de dois genótipos de *A. thaliana* (Col-0 e 132:31), crescidas em condições de controle ou em concentrações de 15 mM de LiCl. Os dados são médias de quatro repetições e as barras representam  $\pm$  erro padrão médio. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey (5% de significância). Universidade Federal de Viçosa, 2009.

Em consequência das grandes variações observadas para a clorofila *a*, o padrão observado para as clorofilas totais foi semelhante, apresentando o mutante menor teor de clorofilas tanto na ausência como na presença de lítio.



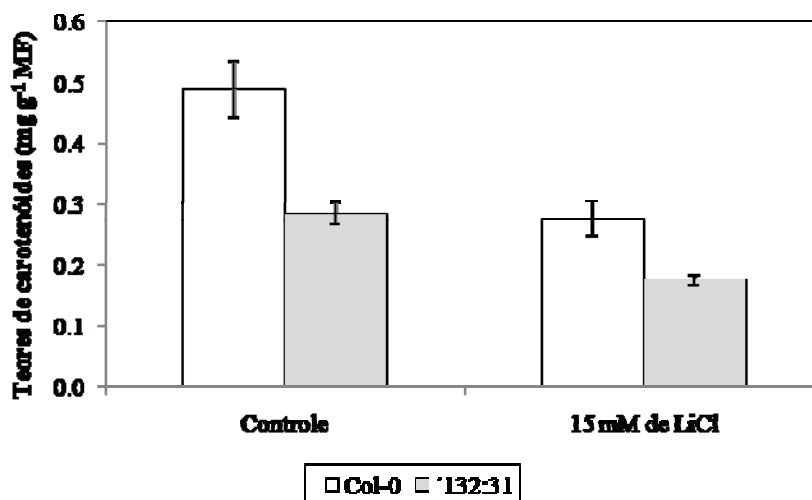
**Figura 15.** Teor de clorofila *b* de dois genótipos de *A. thaliana* (Col-0 e 132:31), crescidas em condições de controle ou em concentrações de 15 mM de LiCl. Os dados são médias de quatro repetições e as barras representam  $\pm$  erro padrão médio. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey (5% de significância). Universidade Federal de Viçosa, 2009.

Para o teor de carotenóides, observaram-se as mesmas tendências observadas para a clorofila *a* e clorofila total, possuindo o mutante menor conteúdo destes pigmentos cloroplastídicos, tanto na ausência como na presença do lítio.



**Figura 16.** Teor de clorofilas totais de dois genótipos de *A. thaliana* (Col-0 e 132:31), crescidas em condições de controle ou em concentrações de 15 mM de LiCl. Os dados são médias de quatro repetições e as barras representam  $\pm$  erro padrão médio. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey (5% de significância). Universidade Federal de Viçosa, 2009.

Estes resultados associados aos da quantificação de etileno, observados anteriormente (Figura 10), sugerem que o aumento na produção deste hormônio na presença de lítio, pode contribuir para a queda no conteúdo de pigmentos nos dois genótipos. A maior produção de etileno no 132:31 em relação ao Col-0, na presença ou não de lítio, se correlaciona com os menores teores de pigmentos.



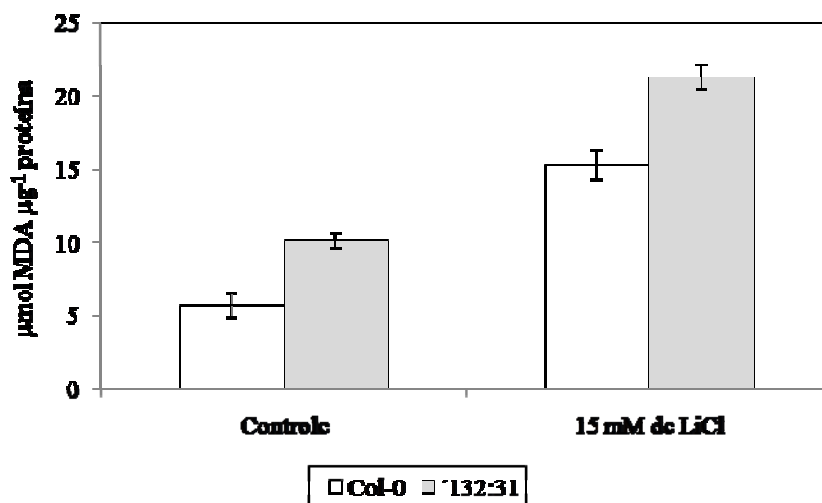
**Figura 17.** Teor de carotenóides de dois genótipos de *A. thaliana* (Col-0 e 132:31), crescidas em condições de controle ou em concentrações de 15 mM de LiCl. Os dados são médias de quatro repetições e as barras representam  $\pm$  erro padrão médio. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey (5% de significância). Universidade Federal de Viçosa, 2009.

Taiz e Zeiger (2004), associam o aumento da produção de etileno à perda da clorofila, e consequentemente ao desaparecimento gradual da cor, que são aspectos característicos da senescência das folhas. Da mesma forma Abeles et al. (1992, citado por Matilla, 2000) citam que em alguns tecidos fotossintéticos, o etileno afeta o metabolismo da clorofila. Desta forma, pode-se associar o aumento da sensibilidade ao lítio do 132:31, aos efeitos deletérios do incremento dos níveis de etileno no metabolismo das clorofilas.

### ***3.2.6 - Quantificação de aldeído malônico (MDA) em plantas de Arabidopsis submetidas a 15 mM de LiCl***

O genótipo 132:31, possui nível de peroxidação lipídica em torno de 100% maior que Col-0 na presença e ausência de lítio. Este é o terceiro fenótipo primário atribuído ao 132:31,

somado à maior sensibilidade ao lítio e à maior produção de etileno (Figura 18). O MDA é formado através da auto-oxidação e degradação enzimática de ácidos graxos polinsaturados (Sevanian & Hochstein, 1985; Hodges et al., 1999), ou seja, é um produto da peroxidação de lipídios, indicativo da ocorrência de danos oxidativos nas membranas (Gutteridge & Halliwell, 1990), o que evidencia a ocorrência de estresse oxidativo. Sendo assim, o maior acúmulo do MDA, em nossas condições de cultivo, mostra claramente a ocorrência de dano oxidativo na presença de lítio para ambos os genótipos estudados. O maior acúmulo de MDA no mutante evidencia que, pelo menos um dos genes deletados em 132:31, participa de forma a dar proteção as plantas de *Arabidopsis* contra danos oxidativos nas membranas gerados pelo lítio.



**Figura 18.** Concentração de aldeído malônico (MDA) de dois genótipos de *A. thaliana* (Col-0 e 132:31), crescidas em condições de controle ou em concentrações de 15 mM de LiCl. Os dados são médias de quatro repetições e as barras representam  $\pm$  erro padrão médio. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey (5% de significância). Universidade Federal de Viçosa, 2009.

Nós aventamos uma primeira hipótese para os resultados obtidos, baseando-nos nas observações realizadas por Larkindale e Knight (2002). Segundo estes pesquisadores, a aplicação de  $\text{CaCl}_2$  a plantas de *Arabidopsis*, diminuiu a produção de MDA evidenciando um papel de sinalização por  $\text{Ca}^{2+}$ , na defesa a danos oxidativos em suas membranas. Corroborando esta hipótese a observação de que o lítio, provavelmente por inibir o ciclo do inositol fosfato, reduzindo a sinalização por  $\text{Ca}^{2+}$  como, a que pode causar aumento nos danos oxidativos.

Outra hipótese, baseia-se na possibilidade do desbalanço na produção do hormônio etileno em 132:31 (Figura 10) poder estar causando o maior acúmulo de MDA neste genótipo, quando comparado ao Col-0. Mondal et al. (2004), verificaram aumento no conteúdo de MDA durante o amadurecimento de frutos de tomate, sendo que, durante este período, ocorrem as maiores concentrações endógenas do hormônio etileno (Taiz & Zeiger, 2004).

### **3.2.7 - Exposição ao frio**

Como os níveis de IP<sub>3</sub> possuem importante papel nos mecanismos de tolerância ao frio, testamos a sensibilidade do mutante “132:31” a 4°C. Nós verificamos que, após 1 mês de cultivo das plantas a 23°C, o crescimento do 132:31 foi pouco menor que o Col-0. No entanto, quando as plantas foram colocadas em câmara fria por 4 meses, o Col-0 apresentou crescimento visualmente superior a 132:31 (Figura 19).

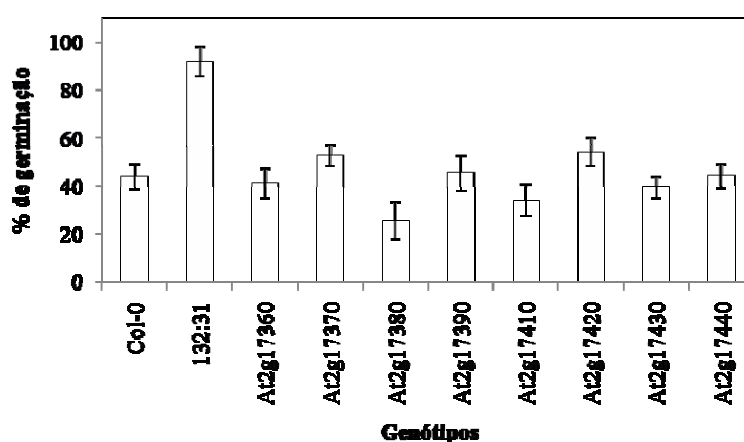
**Figura 19.** Col-0 (à esquerda) e mutante (132:31, a direita) mantidos por 4 meses sob 4°C 8h de luz/16h de escuro - 100  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Universidade de Purdue, 2008.

O menor tamanho apresentado pelo mutante “132:31” em nosso experimento, pode indicar que não ocorre a atuação da expressão de genes responsivos ao frio. Uma possível explicação para esta observação é que o ciclo do inositol fosfato não esteja funcionando de forma eficaz na produção de mensageiros secundários como o IP<sub>3</sub>. De acordo com Xiong et al. (2001) o aumento dos níveis de IP<sub>3</sub> observado para o mutante *fiery1* em relação ao tipo selvagem submetidos a tratamentos de ABA, mostram que o ciclo do inositol fosfato, através da produção do mensageiro secundário IP<sub>3</sub>, pode contribuir para aumentar a expressão de genes responsivos a frio, seca ou estresse salino.

### 3.3 - Determinação do gene(s) responsável(is) pelo fenótipo mutante

#### 3.3.1 - Avaliação fenotípica comparativa das linhagens Salk em relação ao mutante e ao Col-0 em meio enriquecido com 40 mM de LiCl.

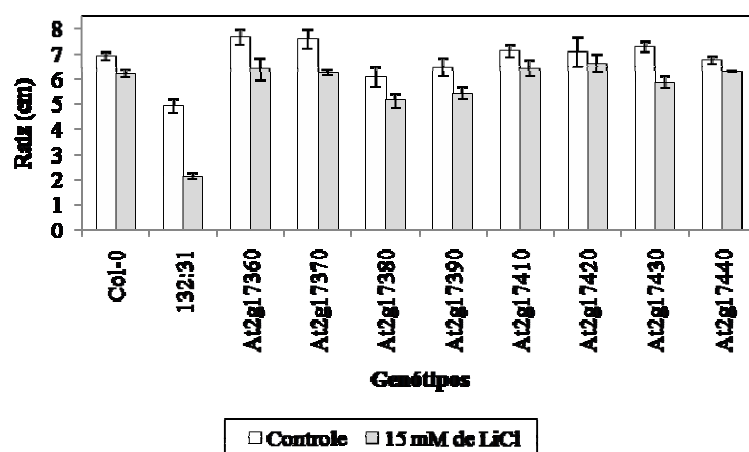
Podemos observar na figura 20, que todas as linhagens mutantes utilizadas, apresentaram % de germinação semelhante a Col-0, não apresentando aumento deste percentual na presença de 40 mM de lítio, como o 132:31.



**Figura 20.** Porcentagem de germinação de dez genótipos de *A. thaliana* germinadas em 40 mM de LiCl. Os dados são médias de quatro repetições e as barras representam  $\pm$  erro padrão médio. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey (5% de significância). Universidade de Purdue (2008).

#### 3.3.2 - Avaliação fenotípica comparativa das linhagens Salk em relação ao mutante e ao Col-0 em meio enriquecido com 15 mM de LiCl

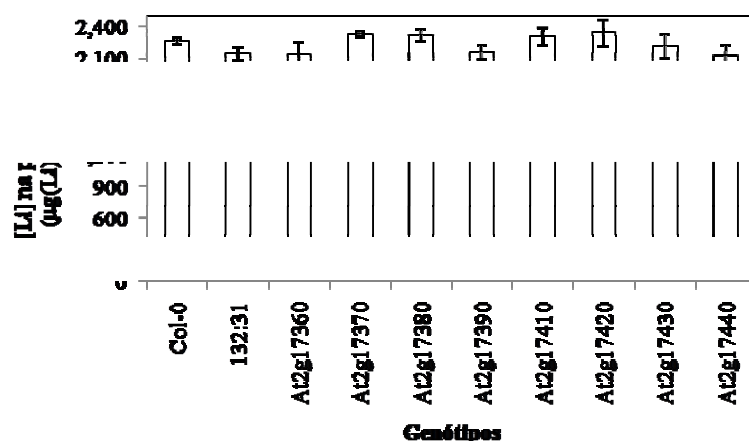
Observamos na figura 21, que todas as linhagens utilizadas apresentaram desenvolvimento radicular semelhante a Col-0, na presença de 15 mM de LiCl, diferenciando-se significativamente do mutante “132:31”, que além de exibir maior sensibilidade a este metal em relação aos demais genótipos, também apresentou menor comprimento do sistema radicular.



**Figura 21.** Comprimento do sistema radicular de plantas crescidas em ausência ou na presença de 15 mM de LiCl. Os dados são médias de quatro repetições e as barras representam  $\pm$  erro padrão médio. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey (5% de significância). Universidade de Purdue (2008).

### 3.3.3 - Avaliação fenotípica comparativa dos mutantes dos genes candidatos quanto ao teor de lítio nas folhas e raízes

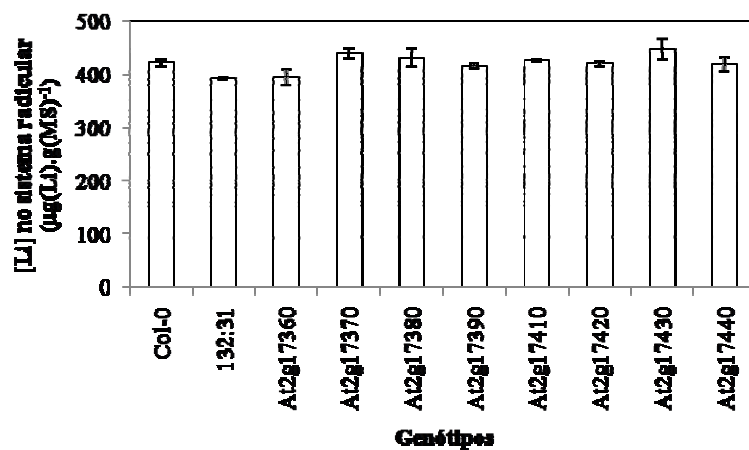
Nenhum dos 10 genótipos avaliados apresentou diferença no acúmulo de lítio tanto na parte aérea (Figura 22) quanto no sistema radicular (Figura 23), tornando esta avaliação não discriminatória para diferenciar o fenótipo entre o mutante, o Col-0 e as linhagens.



**Figura 22.** Concentração de Li ( $\mu\text{g(Li).g(MS)}^{-1}$ ) na parte aérea de plantas mutantes Salk de *A. thaliana*, crescidas em ausência ou 15 mM de LiCl. Os dados são médias de cinco repetições e

as barras representam  $\pm$  erro padrão médio. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey (5% de significância). Universidade de Purdue (2008).

Este resultado difere do anteriormente obtido durante a caracterização fenotípica do 132:31 em relação ao Col-0 (Tabela 4), que mostrou diferença no acúmulo de lítio entre os genótipos. Esta diferença de resultados, pode ser explicada de duas formas: 1) O experimento realizado anteriormente foi todo conduzido sob os tratamentos de LiCl, o que possivelmente condicionou a uma maior absorção de Li por ambos os genótipos, bem como a maior absorção do Li pelo Col-0 em relação ao mutante; 2) O período de exposição dos genótipos ao LiCl neste experimento (10 dias), foi inferior ao realizado para a caracterização do fenótipo (19 dias).



**Figura 23.** Concentração de Li ( $\mu\text{g}(\text{Li}).\text{g}(\text{MS})^{-1}$ ) no sistema radicular de plantas mutantes Salk de *A. thaliana*, crescidas em ausência ou 15 mM de LiCl. Os dados são médias de cinco repetições e as barras representam  $\pm$  erro padrão médio. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey (5% de significância). Universidade de Purdue (2008).

Todas as linhagens mutantes para os genes candidatos estudados apresentaram fenótipos semelhantes ao tipo selvagem (Col-0) e, frequentemente, diferentes do mutante 132:31. Três hipóteses podem ser elaboradas para explicar ausência do fenótipo para mutações individuais nos genes deletados: 1) O fenótipo mutante observado pode ser resultado da deleção de mais de um gene; 2) As linhagens podem não ser completamente nulas, ou seja, as linhagens mutantes obtidas no Instituto Salk, podem estar produzindo pelo menos parte de seus produtos gênicos, causando efeito semelhante ao do produto gênico completo; 3) A inserção

do T-DNA pode estar ocorrendo em regiões de íntrons dos genes em estudo, não anulando o efeito do produto gênico produzido.

### 3.3.4 - PCR semi-quantitativo para avaliação semi-quantitativa da expressão gênica dos genes candidatos em seus mutantes na presença de 15 mM de LiCl

Verificamos que houve expressão de todos os genes em estudo para o Col-0, ao passo que, para 132:31, não foi detectada a expressão destes genes. Com relação às linhagens, observamos que ocorreu a expressão de pelo menos uma parte de cada um dos genes, ou seja, as linhagens em estudo não são completamente nulas e hipotetiza-se que a porção dos genes expressa seja suficiente para evitar que o fenótipo de sua deleção completa seja detectável nestes mutantes.

**Tabela 5.** Análise da expressão dos mutantes de *Arabidopsis thaliana* através de PCR semi-quantitativo, na presença de 15 mM de LiCl.

<u>Conjunto de Iniciadores</u>	Col-0 15 mM de LiCl/Controle	Mutante "132:31" 15 mM de LiCl/Controle	At2g17370 (Salk_073557) 15 mM de LiCl/Controle
1 e 2			
1 e 3			
4 e 5			
1 e 5			
<u>Actina 3</u>			

<u>Conjunto de Iniciaidores</u>	Col-0 15 mM de LiCl/Controle	Mutante "132:31" 15 mM de LiCl/Controle	At2g17410 (Salk_026835) 15 mM de LiCl/Controle
1 e 2			
1 e 3			
4 e 5			
1 e 5			
<u>Actina 3</u>			

<u>Conjunto de Iniciaidores</u>	Col-0 15 mM de LiCl/Controle	Mutante "132:31" 15 mM de LiCl/Controle	At2g17420 (Salk_014076) 15 mM de LiCl/Controle
1 e 2			
4 e 5			
1 e 5			
<u>Actina 3</u>			

O gene constitutivo Actina 3 de *A. thaliana* foi utilizado como controle normalizador da quantificação relativa realizada em todos os genótipos estudados (Tabela 5). Este procedimento se faz importante por demonstrar que a extração do RNA e a posterior síntese do cDNA foi feita de maneira adequada resultando em cDNA de qualidade permitindo uma avaliação da expressão dos genes em estudo tanto no tipo selvagem (Col-0), no mutante “132:31”, como nas linhagens Salk.

Uma vez que nós não conseguimos identificar uma linhagem Salk com fenótipo semelhante ao do mutante “132:31”, nós identificamos novas linhagens Salk com inserções de T-DNA no promotor ou no primeiro éxon dos oito genes em estudo (At2g17360, At2g17370, At2g17380, At2g17390, At2g17410, At2g17420, At2g17430 e At2g17440), baseados em sequência indexada do T-DNA presente no próprio banco de mutantes (Signal T, Salk Institute, La Jolla, CA, USA).

Na tabela 6 são correlacionados os genes, seus respectivos números de acesso no banco de dados do Instituto Salk, o tamanho em pares de base de cada gene e o nome do gene em inglês.

**Tabela 6.** Linhagens com inserções de T-DNA da coleção Salk de *Arabidopsis* correspondente a cada um dos genes que foram removidos da planta de *A. thaliana* (Col-0) originando o mutante “132:31”. Universidade de Purdue, 2008.

<b>Linhagem Salk</b>	<b>Gene</b>	<b>Tamanho do gene</b>	<b>Nome do gene</b>
SAIL_208_F01.V1	At2g17360	1834	40S ribosomal protein S4 (RPS4A)
SALK_077006	At2g17370	2427	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coa Reductase 2
SALK_105013	At2g17380	2044	Associated Protein 19
SALK_105011	At2g17380	2044	Associated Protein 19
WISCDXSLOX504G10	At2g17380	2044	Associated Protein 19
SALK_039330	At2g17390	2409	Ankyrin repeat family protein
SALK_081982	At2g17410	4755	ARID/BRIGHT DNA-binding domain-containing protein
WISCDXSLOX353D06	At2g17410	4755	ARID/BRIGHT DNA-binding domain-containing protein
SALK_061271	At2g17420	2195	NADPH-Dependent Thioredoxin Reductase 2
SALK_001549	At2g17420	2195	NADPH-Dependent Thioredoxin Reductase 2
SALK_096215	At2g17430	2823	Mildew Resistance Locus O 7
SALK_096236	At2g17430	2823	Mildew Resistance Locus O 7
SALK_114190	At2g17440	2660	Leucine-rich repeat family protein
SAIL_428_E02.V1	At2g17440	2660	Leucine-rich repeat family protein
SALK_013754	At2g17440	2660	Leucine-rich repeat family protein

#### 4 - CONCLUSÃO

Os estudos de caracterização fenotípica do mutante realizados neste trabalho permitem identificar três fenótipos básicos do mutante: maior sensibilidade ao lítio, maior porcentagem de germinação sob altas concentrações de lítio, maior produção de etileno e maior nível de estresse oxidativo. O lítio afeta com maior severidade o crescimento da parte aérea e raízes do mutante. O cálcio, no entanto reverte este efeito para ambos os genótipos dentro de certos limites. A maior produção de etileno pelo mutante, torna-se mais clara na presença de lítio, o que poderia explicar outros fenótipos secundários como a redução do crescimento da parte aérea e raízes e diminuição dos teores de clorofila *a* e carotenóides. O incremento na produção de etileno, em 132:31 não explica isoladamente o aumento em cerca de 100% no nível oxidativo em relação ao Col-0. São necessárias outras análises fenotípicas e a identificação do gene mutante em homozigotos de forma a construir uma explicação convincente dos mecanismos responsáveis pelos fenótipos encontrados.

## **5 - PERSPECTIVAS FUTURAS**

Em nosso trabalho, é essencial, no momento, caracterizar o(s) gene(s) candidatos da região deletada, possivelmente envolvidos em todos os fenótipos. A identificação do(s) gene(s) responsáveis permitiria escolher, mais especificamente, quais fenótipos moleculares seriam caracterizados, acelerando a montagem de uma hipótese unificadora de dados moleculares e fisiológicos. Dentre os dados fisiológicos ainda prementes, e não analisados, está a determinação do nível de cálcio e IP<sub>3</sub>. Além disso seria interessante avaliar se a aplicação de citocinina, antagonista da ação do etileno, reduziria a sensibilidade ao lítio, revertendo o fenótipo associado a pigmentos, e aos níveis de MDA. A resposta ao estresse oxidativo e ao frio já foi bem estudada em *Arabidopsis*, e o estudo da expressão de genes sinalizadores destas respostas como CBF e FIERY1, poderiam elucidar vários outros fenótipos moleculares que poderiam gerar evidências para a obtenção de uma hipótese capaz de explicar os mecanismos envolvidos na manifestação dos fenótipos encontrados.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES, F.B.; MORGAN, P.W.; SALVEIT, M.E. **Ethylene in plant biology (2nd edition)**. New York, Academic Press, 1992.
- ASCHEBECK, L.; EDDY, R. **Growth of Arabidopsis seedlings under differing irrigation and fertilization methods**. Purdue University, West Lafayette, Indiana. 7p. 2004. <http://www.hort.purdue.edu/hort/facilities/downloads/101materialsMethods.pdf> Accessed in July 9 of 2008.
- BAE, W.; LEE, Y.J.; KIM, D.H.; LEE, J.; KIM, S.; SOHN, E.J.; HWANG, I. AKR2A-mediated import of chloroplast outer membrane proteins is essential for chloroplast biogenesis. **Nature Cell Biology**, 10:220-227, 2008.
- BARAKAT, A.; SZICK-MIRANDA, K.; CHANG, I.F.; GUYOT, R.; BLANC, G.; COOKE, R.; DELSENY, M.; BAILEY-SERRES, J. The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the Arabidopsis genome. **Plant Physiology**, 127:398-415, 2001.
- BERRIDGE, M.J.; IRVINE, R.F. Inositol phosphates and cell signaling. **Nature**, 341:197-205, 1989.
- BIRCH, N.J. **Lithium and the cell: pharmacology and biochemistry**. Academic Press, San Diego. 1991.
- BRADFORD, K.J.; YANG, S.E. Xylem transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor, in waterlogged tomato plants. **Plant Physiology**, 65:322-326, 1980.
- BUESO, E.; ALEJANDRO, S.; CARBONELL, P.; PEREZ-AMADOR, M.A.; FAYOS, J.; BELLES, J.M.; RODRIGUES, P.L.; SERRANO, R. The lithium tolerance of the Arabidopsis cat2 mutant reveals a cross-talk between oxidative stress and ethylene. **The Plant Journal**, 52:1052-1065, 2007.
- CHORY, J.; ECKER, J.R.; BRIGGS, S.; CABOCHE, M.; CORUZZI, G.M.; COOK, D.; DANGL, J.; GRANT, S.; GUERINOT, M.L.; HENIKOFF, S.; MARTIENSSEN, R.; OKADA, K.; RAIKHEL, N.V.; SOMERVILLE, C.R.; WEIGEL, D. National Science Foundation-Sponsored Workshop Report: "The 2010 Project". Functional genomics and the virtual plant. A blueprint for understanding how plants are built and how to improve them. **Plant Physiology**, 123:423-425, 2000.
- DANGL, J.L.; DIETRICH, R.A.; THOMAS, H. Senescence and programmed cell death. In: **Biochemistry and Molecular Biology of Plants** (BUCHANAN, B., GRUISSEM, W.,

- JONES, R., eds) Maryland: American Society of Plant Physiologists, Rockville, 1044-1100, 2000.
- DANGL, J.; COOK, D.; HASELKORN, R.; LAST, R.L.; MARTIENSSEN, R.; MCCOUCH, S.; RETZEL, E.F.; SOMERVILLE, C.R.; WESSLER, S.; YATES, J. The national plant genomics initiative: objectives for 2003-2008. **Plant Physiology**, 130:1741-1744, 2002.
- EMMANUEL, E.; LEVY, A.A. Tomato mutants as tools for functional genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, 5:112-117, 2002.
- ETHERIDGE, N.; HALL, B.P.; SCHALLER, G.E. Progress report: ethylene signaling and responses. **Planta**, 223:387-391, 2006.
- GALLIE, D.R.; GEISLER-LEE, J.; CHEN, J.; JOLLEY, B. Tissue-specific expression of the ethylene biosynthetic machinery regulates root growth in maize. **Plant Molecular Biology**, 69:195-211, 2009.
- GAZZARRINI, S.; McCOURT, P. Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, 4:387-391, 2001.
- GUERINOT, M.L.; SALT, D.E. Fortified foods and phytoremediation: two sides of the same coin. **Plant Physiology**, 125:164-167, 2001.
- GUTTERIDGE, J.C.M.; HALIWELL, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends in Biochemistry Science**, 15:129-135, 1990.
- HISCOX, J.D.; ISRAELSTAM, G.F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, 57:1332-1334, 1978.
- HODGES, D.M.; DELONG, J.M.; FOMEY, C.F.; PRANGE, R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, 207:604-611, 1999.
- KIFOR, O.; KIFOR, I.; BROWN, E.M. Effects of high extracellular calcium concentrations on phosphoinositide turnover and inositol phosphate metabolism in dispersed bovine parathyroid cells. **Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, 7:1327-1336, 1992.
- KLEIN, P.S.; MELTON, D.A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, 93:8455-8459, 1996.
- LAHNER, B.; GONG, J.; MAHMOUDIAN, M.; SMITH, E.L.; ABID, K.B.; ROGERS, E.E.; GUERINOT, M.L.; HARPER, J.F.; WARD, J.M.; MCINTYRE, L.; SCHROEDER, J.I.;

- SALT, D.E. Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Biotechnology**, 21:1215-1221, 2003.
- LARKINDALE, J.; KNIGHT, M.R. Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. **Plant Physiology**, 128:682-695, 2002.
- LI, X.; GAO, P.; GJETVAJ, B.; WESTCOTT, N.; GRUBER, M.Y. Analysis of the metabolome and transcriptome of *Brassica carinata* seedlings after lithium chloride exposure. **Plant Science**, 177:68-80, 2009.
- LIANG, X.; SHEN, N.F. Theologis A. Li<sup>+</sup>-regulated 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, 10:1027-1036, 1996.
- LIN, Z.; ZHONG, S.; GRIERSON, D. Recent advances in ethylene research. **Journal of Experimental Botany**, 60:1-26, 2009.
- MASER, P.; THOMINE, S.; SCHROEDER, J.I.; WARD, J.M.; HIRSCHI, K.; SZE, H.; TALKE, I.N.; AMTMANN, A.; MAATHUIS, F.J.M.; SANDERS, D.; HARPER, J.F.; TCHIEU, J.; GRIBSKOV, M.; PERSANS, M.W.; SALT, D.E.; KIM, S.A.; GUERINOT, M.L. Phylogenetic relationships within cation-transporter families of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, 126:1646-1667, 2001.
- MATILLA, A.J. Ethylene in seed formation and germination. **Seed Science Research**, 10:111-126, 2000.
- MONDAL, K.; SHARMA, N.S.; MALHOTRA, S.P.; DHAWAN, K.; SINGH, R. Antioxidant systems in ripening tomato fruits. **Biology Plant**, 48:49-53, 2004.
- NAHORSKI, S.R.; RAGAN, C.I.; CHALLISS, R.A.J. Lithium and phosphoinositide cycle: an example of uncompetitive inhibition and its pharmacological consequences. **Trends Pharmacology Science**, 12:293-303, 1991.
- NARANJO, M.A.; ROMERO, C.; BELLES, J.M.; MONTESINOS, C.; VICENTE, O.; SERRANO, R. Lithium treatment induces a hypersensitive-like response in tobacco. **Planta**, 217:417-424, 2003.
- NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HANCOCK, J.T. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. **Plant Physiology**, 128:13-16, 2002.
- O'DONNELL, T.; ROTZINGER, S.; NAKASHIMA, T.T.; HANSTOCK, C.C.; ULRICH, M.; SILVERSTONE, P.H. Chronic lithium and sodium valproate both decrease the

- concentration of myo-inositol and increase the concentration of inositol monophosphates in rat brain. **Brain Research**, 880:84-91, 2000.
- RUS, A.; BAXTER, I.; MUTHUKUMAR, B.; GUSTIN, J.; LAHNER, B.; YAKUBOVA, E.; SALT, D.E. Natural variants of AtHKT1 enhance Na<sup>+</sup> accumulation in two wild populations of Arabidopsis. **PlosGenetics**, 2:1964-1973, 2006.
- SEVANI, A.; HOCHSTEIN, P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. **Annual Reviews of Nutrition**, 5:365-390, 1985.
- SALT, D.E. Update on plant ionomics. **Plant Physiology**, 136:2451-2456, 2004.
- SCHURR, U.; GOLLAN, T.; SCHULZE, E.D. Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. **Plant Cell Environmental**, 15:561-567, 1992.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Editora Artmed. 2004. 719 p.
- TURNBULL, C.G.N.; BOOKER, J.P.; LEYSER, H.M.O. Micrografting techniques for testing long-distance signaling in Arabidopsis. **The Plant Journal**, 32:255-262, 2002.
- VAN DER STRAETEN, D.; ZHONGYI, Z.; PRINSEN, E.; VAN ONCKELEN, H.A.; VAN MONTAGU, M.C. A comparative molecular-physiological study of submergence response in lowland and deepwater rice. **Plant Physiology**, 125:955-968, 2001.
- WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, 144:307-313, 1994.
- WHOESTE, K.E.; VOGEL, J.P.; KIEBER, J.J. Factors regulating ethylene biosynthesis in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Physiologia Plantarum**, 105:478-484, 1999.
- XIONG, L.; LEE, H.; ISHITANI, M.; ZHANG, C.; ZHU, J.K. FIERY encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in Arabidopsis. **Genes Developments**, 15:1971-1984, 2001.
- XIONG, L.; LEE, H.; HUANG, R.; ZHU, J.K. A single amino acid substitution in the Arabidopsis FIERY1/HOS2 protein confers cold signaling specificity and lithium tolerance. **The Plant Journal**, 40:536-545, 2004.
- ZONIA, L.E.; TUPY, J. Lithium treatment of *Nicotiana tabacum* microspore blocks polar nuclear migration, disrupts the partitioning of membrane-associated Ca<sup>2+</sup>, and induces symmetrical mitosis. **Sex Plant Reproduction**, 8:152-160, 1995a.

ZONIA, L.E.; TUPY, J. Lithium treatment of *Nicotiana tabacum* microspore blocks polar nuclear migration, disrupts the partitioning of membrane-associated Ca<sup>2+</sup>, and induces symmetrical mitosis. **Journal of Experimental Botany**, 46:973-979, 1995b.

## CAPÍTULO III

### **Efeito de giberelina, temperatura e fotoperíodo no florescimento de *Thlaspi caerulescens***

**Resumo:** *Thlaspi caerulescens* é uma planta muito utilizada em estudos de hiperacumulação de metais como Cd, Ni e Zn. Esta espécie necessita de longo período frio (4°C) para a indução do crescimento do pendão principal e florescimento. Neste trabalho nós desenvolvemos um protocolo para indução de florescimento precoce e abundante de *T. caerulescens*. Para isso, foram estudados diferentes condições como: fotoperíodo (8 ou 12 h de luz ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )), temperatura (4 ou 21°C), semanas de exposição às condições de luz e temperatura citadas anteriormente (6 ou 8 semanas) e a aplicação de diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> (0, 15, 30 e 60  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ). Verificou-se que baixas temperaturas (4°C) são essenciais para a indução ao florescimento e produção de sementes de *T. caerulescens* e que o tempo de exposição das plantas à baixa temperatura (4°C) é muito importante para a potencialização da produção de sementes de *T. caerulescens*, sendo desejados períodos mais longos de exposição. GA<sub>3</sub> juntamente com a condição de dia longo (12 h de luz) proporciona certo grau de florescimento, no entanto, não é eficaz para a produção de sementes de *T. caerulescens*. A aplicação de GA<sub>3</sub> afeta negativamente a produção de sementes de plantas desta espécie quando submetidas a dias curtos (8 h de luz) e dias longos, quando se utiliza a concentração de 60  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  deste hormônio. GA<sub>3</sub> foi capaz de induzir o alongamento do pendão principal, independentemente do fotoperíodo utilizado, sendo este efeito observado somente em plantas de *Thlaspi* que não foram submetidas a baixas temperaturas (21°C).

**Palavras-chave:** Bienal, GA<sub>3</sub>, hiperacumulador, Locus de florecimento C, pendão principal, produção de sementes e vernalização.

## CHAPTER III

### **Gibberellin, temperature and photoperiod effects in the *Thlaspi caerulescens* flowering**

**Abstract:** *Thlaspi caerulescens* is a plant that has been used for Cd, Ni and Zn hyperaccumulation studies. This specie needs a long cold (4°C) period for the growth induction of the main stem. In this work, we have developed a *T. caerulescens* abundant early flowering induction protocol. For this studied, we simulated different conditions: photoperiod (8 or 12 h of light ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )), temperature (4 or 21 °C), weeks under the photoperiod and temperature described before (6 or 8 weeks) and the application of different concentrations of GA<sub>3</sub> (0, 15, 30 and 60  $\mu\text{g}\ \mu\text{l}^{-1}$ ). We found that low temperatures (4°C) are essential for the flowering induction and seed production in *T. caerulescens* and that the long period of exposure to (4°C) is very important to increase *T. caerulescens* seeds production, being required long exposition under this condition. GA<sub>3</sub> together with long day condition (12 h of light) provide flowering at certain degree, however, it is not efficient to promote seed production in *T. caerulescens*. Furthermore, GA<sub>3</sub> application regulates the production of seeds in this specie negatively, under short-days (8 h of light) and long-days, when 60  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  of this hormone were used, down regulates the production of seeds. GA<sub>3</sub> induced main stem elongation when *Thlaspi* plants were not under low temperature (21°C) independently of the photoperiod condition.

**Key words:** Biennial, GA<sub>3</sub>, hiperaccumulator, Flowering Locus C, main stem, seeds production and vernalization.

## 1 - INTRODUÇÃO

O sucesso da reprodução das plantas depende de sua capacidade de florescer no período adequado. Todas as espécies de plantas monitoram o meio ambiente e seus sinais internos com o objetivo de garantir que sua reprodução ocorra no período do ano mais apropriado e no estágio correto de desenvolvimento (Komeda, 2004; Ausín et al., 2005; Bernier & Périlleux, 2005; Kim et al., 2005; Quesada et al., 2005; Balasubramanian et al., 2006; Bouveret et al., 2006). Sendo assim, a propagação e sobrevivência das espécies de plantas dependem criticamente de suas habilidades de regular com precisão, suas fases de transição entre o crescimento vegetativo e o reprodutivo (Henderson & Dean, 2004; Komeda, 2004; Yan et al., 2006).

Diversos estudos tem sido realizados com a espécie *Arabidopsis thaliana*, com o objetivo de se estabelecer rotas de florescimento, o que permite o pleno entendimento dos mecanismos e condições que levam esta espécie ao florescimento (Henderson & Dean, 2004; Komeda, 2004; Ausín et al., 2005; Bernier & Périlleux, 2005; Blazquez, 2000; Quesada et al., 2005; Balasubramanian et al., 2006; Bouveret et al., 2006). No entanto, para outras espécies de plantas, como *Thlaspi caerulescens*, da mesma família da *Arabidopsis* (Brassicaceae), há pouca informação disponível para a simulação das melhores condições ambientais que proporcionem seu florescimento.

A espécie *T. caerulescens* tem ganhado especial atenção nos últimos anos por ter sido selecionada como sistema modelo para estudos de genética molecular do sobre-acúmulo de metais por plantas (Peer et al., 2003). Segundo diversos pesquisadores, essa espécie, pode hiperacumular vários metais como: Cd, Ni e Zn (Reeves & Brooks, 1983; Salt et al., 2000; Schat et al., 2000; Lasat et al., 2000; Pence et al., 2000; Assunção et al., 2001; Assunção et al., 2003; Peer et al., 2003; Prasad & Freitas, 2003; Cobbet, 2003; Nascimento & Xing, 2006). No entanto, possui a grande desvantagem de ter um ciclo de vida longo (planta bienal; Peer et al., 2003), necessitando de uma primeira estação fria para a quebra da dormência das sementes e uma segunda estação fria para a vernalização da planta, com o objetivo de promover o florescimento.

Alguns pesquisadores têm sido capazes de antecipar o florescimento de determinadas espécies como: *A. thaliana*, *T. arvense* e *Brassica napus*, pertencentes à mesma família da espécie *T. caerulescens* (Brassicaceae), através da modificação do fotoperíodo (Dahanayake

& Galwey, 1999), temperatura (Metzger, 1985; Balasubramanian et al., 2006) e aplicação de giberelina (Dahanayake & Galwey, 1999).

No caso do florescimento, induzido pelo fotoperíodo, sabe-se que ele pode ocorrer na espécie *A. thaliana* por sinalização a longas distâncias, entre as folhas e o meristema apical via floema (Bernier & Périlleux, 2005). Entretanto, não é somente o fotoperíodo o mecanismo responsável pela indução ao florescimento, sendo a temperatura outro fator decisivo para o florescimento de um grande número de espécies.

Muitas espécies de clima temperado (caso da *T. caerulescens*), somente florescem depois de terem passado por um período de frio prolongado, processo chamado de vernalização, o qual possibilita um “alinhamento” entre a indução ao florescimento e as condições favoráveis de clima para o seu bom desenvolvimento (Henderson et al., 2003; Henderson & Dean, 2004). De acordo com Hazebroek e Metzger (1990), plantas de *T. arvense* quando submetidas a baixas temperaturas ( $\leq 10^{\circ}\text{C}$ ) apresentam aumento na atividade da enzima ent-caurenóico hidrolase em seus ápices caulinares, local em que também ocorre a percepção do estímulo ao frio (Taiz & Zeiger, 2004), sendo que após esse tratamento e o retorno para altas temperaturas, o ácido ent-caurenóico é convertido em  $\text{GA}_9$ , que através da atuação da  $\text{GA3-oxidase}$ , é convertida na  $\text{GA}_{1/4}$  giberelina ativa na estimulação da resposta ao florescimento. De uma forma geral, as plantas anuais de inverno são vernalizadas já no estágio de plântulas, enquanto as plantas bienais (como *T. caerulescens*) precisam ter um período de desenvolvimento longo a baixas temperaturas, para que haja estímulo ao florescimento. Peer et al. (2003) sugerem que para esta espécie, a vernalização ( $4^{\circ}\text{C}$ ) associada a dias curtos (8 h de luz) por 10 semanas, é fator essencial para a indução ao florescimento.

De acordo com Yamaguchi e Kamiya (2000), os dois fatores ambientais citados anteriormente (fotoperíodo e temperatura), podem alterar os níveis de giberelinas ativas, afetando a transcrição de genes de etapas específicas das rotas biossintéticas deste hormônio. As giberelinas participam da regulação de diversos processos fisiológicos, incluindo: germinação de sementes, estabelecimento do fruto e o desenvolvimento floral. No entanto, a aplicação de giberelinas pode provocar a diminuição da expressão de genes que codificam para síntese de giberelinas ativas, como  $\text{GA20-oxidase}$  ( $\text{GA20ox}$ ) e  $\text{GA3-oxidase}$  ( $\text{GA3ox}$ ) e, opostamente, resultar em um aumento na transcrição de genes de degradação ( $\text{GA2-oxidases}$  ou  $\text{GA2ox}$ ) (Hedden & Phillips, 2000; Elliott et al., 2001), inibindo o florescimento. As enzimas  $\text{GA20ox}$  e  $\text{GA3ox}$ , participam diretamente na rota de formação da  $\text{GA}_{1/4}$  (Giberelinas

ativas, Taiz & Zeiger, 2004). A GA<sub>3</sub>, giberelina utilizada neste trabalho, difere da GA<sub>1</sub> por apresentar uma dupla ligação entre os carbonos 1 e 2 no esqueleto ent-giberelano. No entanto, segundo Taiz e Zeiger (2004), a GA<sub>3</sub> pode substituir a GA<sub>1</sub> na maioria dos bioensaios. A GA<sub>3</sub> já foi utilizada por diversos pesquisadores para estimular o florescimento de espécies como: *T. arvense* (Metzger, 1985), *B. napus* (Dahanayake & Galwey, 1999), dentre outras.

Diante do exposto acima, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo para indução de florescimento precoce e abundante de *T. caerulea*, aumentando a fertilidade e produção de sementes. Para isso, foram simulados diferentes fatores: fotoperíodo, temperatura, tempo de exposição e doses de GA<sub>3</sub>.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - *Material vegetal*

As sementes originais do hiperacumulador *T. caerulescens* St. Félix de Pallières foram recebidas da França, como descrito por Peer *et al.* (2003).

### 2.2 - *Germinação*

Sementes de *T. caerulescens* foram germinadas em placas (100 x 15 mm) contendo 0.5x Murashige e Skoog (MSP001, CAISSON Laboratories, Inc./www.caiissonlabs.com), contendo ainda a adição de vitaminas (MSVL1001, CAISSON Laboratories, Inc), 1.2% de Agar (ACUMEDIA Manufactures, Inc.) e 3 mg L<sup>-1</sup> Benomil (metil 1-(butilcarbomil)-2-benzimidazolcarbamato, (SIGMA, St. Louis, MO). Depois de semeadas nas placas, estas foram incubadas a 4°C por 5 dias, sendo que após este período de estratificação das sementes, as placas foram dispostas de forma vertical em estufa com condições controladas (16 h de luz : 8 h de escuro, com temperatura variando entre 18 a 23 °C). A germinação ocorreu cerca de uma semana após a transferência.

### 2.3 - *Condições de crescimento*

Os experimentos foram realizados nas salas de crescimento e câmaras frias localizadas no Campus da Universidade de Purdue, em West Lafayette, Indiana, Estados Unidos. Plântulas com 20 dias de idade foram transferidas para vasos de 0,3 L preenchidos com substrato (Premier Promix PGX, Canadá) adicionado de vários elementos minerais, em concentrações subtóxicas. As plantas foram irrigadas duas vezes por semana com uma solução nutritiva contendo: 200 mg L<sup>-1</sup> de N, 29 mg L<sup>-1</sup> de P, 167 mg L<sup>-1</sup> de K, 67 mg L<sup>-1</sup> de Ca e 30 mg L<sup>-1</sup> de Mg; supridas com micronutrientes a partir de uma formulação comercial (MiracleGro® Excel® 15-5-15 Cal-Mag; The Scotts Co., Marysville, Ohio). O pH da solução nutritiva foi ajustado para uma faixa de 5,7 a 6,0 com 0,08 mL de ácido sulfúrico 93% (v/v, Ulrich Chemical, Indianapolis) por litro de solução (Aschenbeck & Eddy, 2004). As plantas foram mantidas em estufa, sob condições de ambiente controlado (12 h de luz : 12 h de escuro e a temperatura variou entre 19 a 25°C) por 8 semanas.

## **2.4 - Tratamentos**

Os tratamentos constituíram em: quantidade de horas de luz (8 ou 12 h de luz ( $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), temperatura (4 ou 21 °C), semanas de exposição às condições de luz e temperatura citadas anteriormente (6 ou 8 semanas) e a aplicação de diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> (0, 15, 30 e 60  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ). Foram utilizadas cerca de 20 plantas por tratamento, sendo estas dispostas aleatoriamente no campo experimental. Após o período de 6 e 8 semanas de exposição às condições de luz e temperatura citadas anteriormente, as plantas foram transferidas para a mesma condição de crescimento (21°C/12h de luz/200  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). As soluções de GA<sub>3</sub> (0, 15, 30 ou 60  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ , de GA<sub>3</sub> em 10% v/v, água/acetona, com a adição de 0,05% de Tween 20), foram aplicadas na quantidade de 1  $\mu\text{l}$  no ápice das plantas. Foram realizadas 10 aplicações de cada solução, sendo estas realizadas em dias alternados. Para a avaliação do florescimento, as vinte plantas de cada tratamento foram divididas em quatro parcelas com cinco plantas, sendo a porcentagem de plantas floridas determinada como uma média do percentual das quatro parcelas.

## **2.5 - Características avaliadas**

O florescimento foi avaliado aos 0 e 50 dias após a transferência (DAT) das plantas, das condições de tratamento para 21°C/12h de luz/200  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Sendo avaliado o início do florescimento na parte apical e central das plantas. A altura do pendão principal foi determinada a partir da avaliação do comprimento entre a base da haste principal e o ponto mais alto da referida haste. A massa de sementes foi determinada a partir da coleta das sementes de cada uma das plantas em saco de papel. As sementes foram separadas de outras partes vegetais das plantas (caule, folhas, vagens e outras) e pesadas em g por planta.

## **2.6 - Estatísticas**

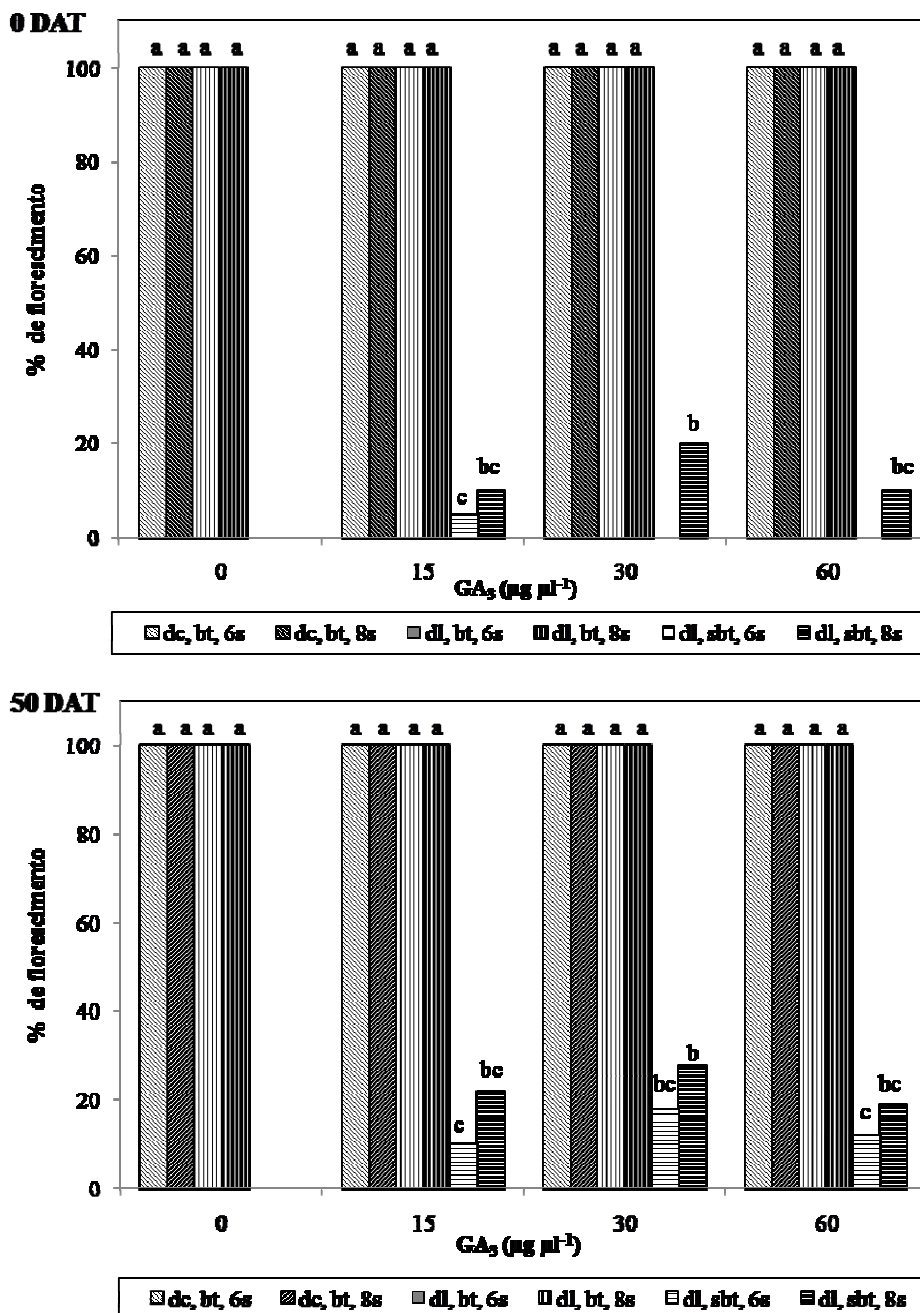
Os dados foram estatisticamente analisados utilizando-se análise de variância (ANOVA), e testados por significância ( $P \leq 0,05$ ) para se determinar a diferença entre os tratamentos. Utilizou-se o teste de Tukey.

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 - Relação entre os diferentes tratamentos e o florescimento

Antes da transferência (0 DAT) das plantas submetidas as diferentes condições de crescimento (8 ou 12 h de luz por dia, 4 ou 21 °C e 6 ou 8 semanas de exposição), às outras condições de crescimento (21°C/12 h de luz/200  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) (Figura 1A), verifica-se que sob baixa temperatura (bt, 4°C), per si, independentemente do tempo de exposição (6 ou 8 semanas), do comprimento do dia (8 ou 12 h de luz) e da concentração de GA<sub>3</sub> aplicado (0, 15, 30 e 60  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ), induz maior porcentagem de florescimento quando comparado aos tratamentos conduzidos sem baixa temperatura (sbt, 21°C). Estes resultados diferem dos apresentados por Peer et al. (2003), que verificaram porcentagens de florescimento entre 90 e 100%, somente quando as plantas de *T. caerulea* ficaram submetidas às condições de bt e de por período de 10 semanas. Nossos resultados sugerem que a vernalização é o principal fator controlador a indução floral na espécie *T. caerulea*, e que a giberelina não substitui a necessidade de baixas temperaturas, para a obtenção das taxas máximas de florescimento. Aos 50 dias após a transferência (50 DAT) das plantas (Figura 1B), foi verificado resultado semelhante ao observado anteriormente, no entanto, apesar de não ser significativo estatisticamente, foi observado ligeiro aumento na porcentagem de florescimento dos tratamentos que não foram submetidos a bt. Isto pode indicar que, a necessidade de vernalização pode reduzir-se com a idade da planta, possuindo os níveis internos de giberelina um papel mais eminente.

O comprimento do dia não interferiu na porcentagem de florescimento das plantas submetidas a bt (100%; Figuras 1A e 1B). No entanto, quando as plantas foram submetidas a condições sbt, verificou-se maior percentual de florescimento das plantas conduzidas sob condições de dia longo e que tiveram aplicação de GA<sub>3</sub>, tanto aos 0 como aos 50 DAT (7,5 e 18,2% em média, respectivamente). Estes resultados contrastam com aqueles de Dahanayake e Galwey (1999), que através da aplicação no ápice das plantas, de 10 ou 40  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  de GA<sub>3</sub>, conseguiram substituir o efeito da baixa temperatura e do dl no florescimento de *Brassica napus*. Para a espécie *T. caerulea*, na ausência de bt, a aplicação de GA<sub>3</sub> e dl juntas, parece ser essencial para a promoção parcial do florescimento, uma vez que quando não estavam associadas, não foi observada nenhuma planta florida. Desta forma, o GA<sub>3</sub> não foi capaz de substituir a exigência de dl e/ou bt para o florescimento desta espécie.



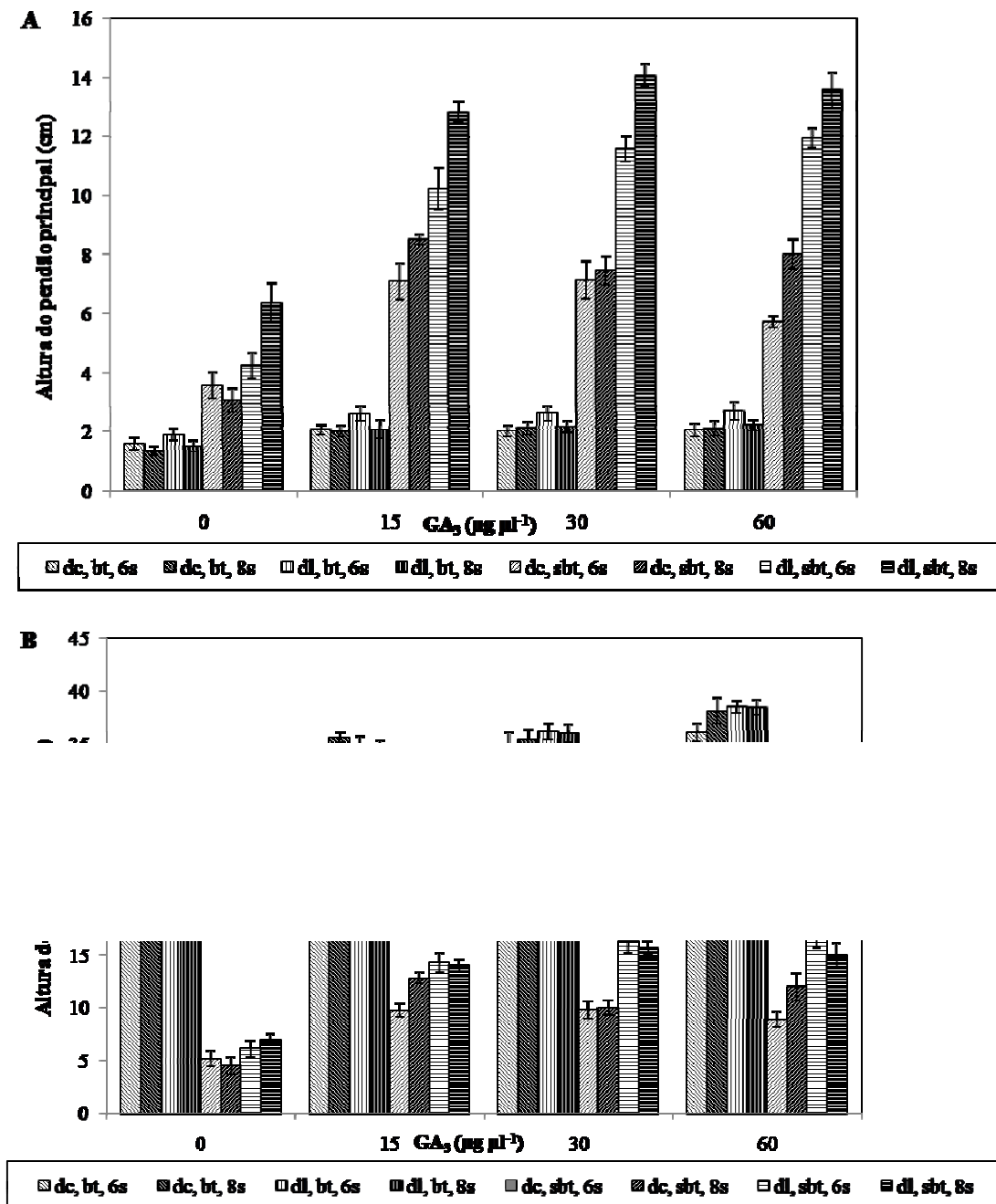
**Figura 1.** Porcentagem de florescimento das plantas de *T. caerulea* submetidas a diferentes tratamentos: A - aos 0 dias após a transferência das plantas (0 DAT) dos diferentes tratamentos para a mesma condição de temperatura (21°C) e comprimento do dia (12 h de luz); B - aos 50 dias após a transferência das plantas (50 DAT) dos diferentes tratamentos para a mesma condição de temperatura (21°C) e comprimento do dia (12 h de luz). dc - dia curto (8 h de luz), dl - dia longo (12 h de luz); bt - baixa temperatura (4°C), sbt - sem baixa temperatura (21°C); 6s - seis semanas sob as condições anteriores, 8s - oito semanas sob as condições anteriores. As diferentes letras indicam diferença estatística entre os tratamentos ao nível de 5% de probabilidade, de acordo com o teste de Tukey.

Uma justificativa para ausência ou baixo florescimento, de *T. caerulescens*, quando não submetida a condições de baixa temperatura (4°C) por determinado tempo, pode estar relacionado a expressão do gene LOCUS C DE FLORESCIMENTO (FLC). Este gene é fortemente expresso em meristemas apicais do caule, não vernalizado, de plantas de *Arabidopsis*, que necessitam de período de frio para o florescimento (Michaels & Amasino, 2000). Diversos pesquisadores verificaram que este gene atua como um repressor do florescimento (Finnegan et al., 1998; Michaels & Amasino, 2000; Sheldon et al., 2000; Ratcliffe et al., 2003; Amasino, 2004; D'Aloia et al., 2008), sendo que após a vernalização, este gene parece ser desligado através da desacetilação de sua cromatina, resultando em uma modificação de sua estrutura (Amasino, 2004). De acordo com Burn et al. (1993) e Finnegan et al. (1998), a metilação do DNA também causa o florescimento tardio, sendo que a vernalização de plantas como *Arabidopsis* e *T. arvense* foi eficaz na promoção da desmetilação destas espécies, promovendo seu florescimento.

### ***3.2 - Relação entre os diferentes tratamentos e a altura do pendão principal***

Aos 0 DAT (Figura 2A), pode ser observado que as plantas submetidas aos tratamentos sbt, foram as que apresentaram a maior altura do pendão principal (8,5 cm, em média), quando comparados as plantas submetidas aos tratamentos de bt (2,1 cm, em média). Este resultado pode ser atribuído principalmente ao fato de que sob a temperatura de 21°C, a atividade metabólica das plantas se mantém alta, não havendo alteração no processo de divisão e diferenciação celular, propiciando o contínuo crescimento e desenvolvimento das plantas, o que não ocorre nas plantas conduzidas sob a temperatura de 4°C, uma vez que sua atividade metabólica é reduzida, tanto devido a redução da atividade fotossintética, como à relacionada a divisão celular, propiciando diminuição na taxa de crescimento e desenvolvimento das plantas (Buchanan et al., 2000; Taiz & Zeiger, 2004). No entanto, aos 50 DAT, todos os tratamentos submetidos a bt, apresentaram maior altura do pendão principal (34,8 cm, em média) do que as plantas que foram mantidas sbt (11.1 cm, em média). Metzger (1985) obteve resultados semelhantes para a espécie *T. arvense*, verificando que tratamentos prolongados de bt eram necessários para o estímulo do crescimento do pendão principal na referida espécie. De acordo com Hazebroek e Metzger (1990), na ausência de frio, ocorre um grande acúmulo de ácido ent-caurenóico nos ápices caulinares, local de percepção do estímulo ao frio. Após esse tratamento e o retorno para as altas temperaturas, o ácido ent-caurenóico é

convertido em giberelina. De acordo com Taiz e Zeiger (2004), as giberelinas estimulam o alongamento e a divisão celular, o que pode estar ocasionando o maior tamanho do pendão principal observado nas plantas de *T. caerulescens* submetidas a bt em relação às do tratamento sbt, que apresentariam menores concentrações endógenas das giberelinas.



**Figura 2.** Altura do pendão principal das plantas de *Thlaspi caerulescens* submetidas a diferentes tratamentos: A - aos 0 dias após a transferência das plantas (0 DAT) dos diferentes tratamentos para a mesma condição de temperatura (21°C) e comprimento do dia (12 h de luz); B - aos 50 dias após a transferência das plantas (50 DAT) dos diferentes tratamentos

para a mesma condição de temperatura (21°C) e comprimento do dia (12 h de luz). dc - dia curto (8 h de luz), dl - dia longo (12 h de luz); bt - baixa temperatura (4°C), sbt - sem baixa temperatura (21°C); 6s - seis semanas sob as condições anteriores, 8s - oito semanas sob as condições anteriores. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão médio.

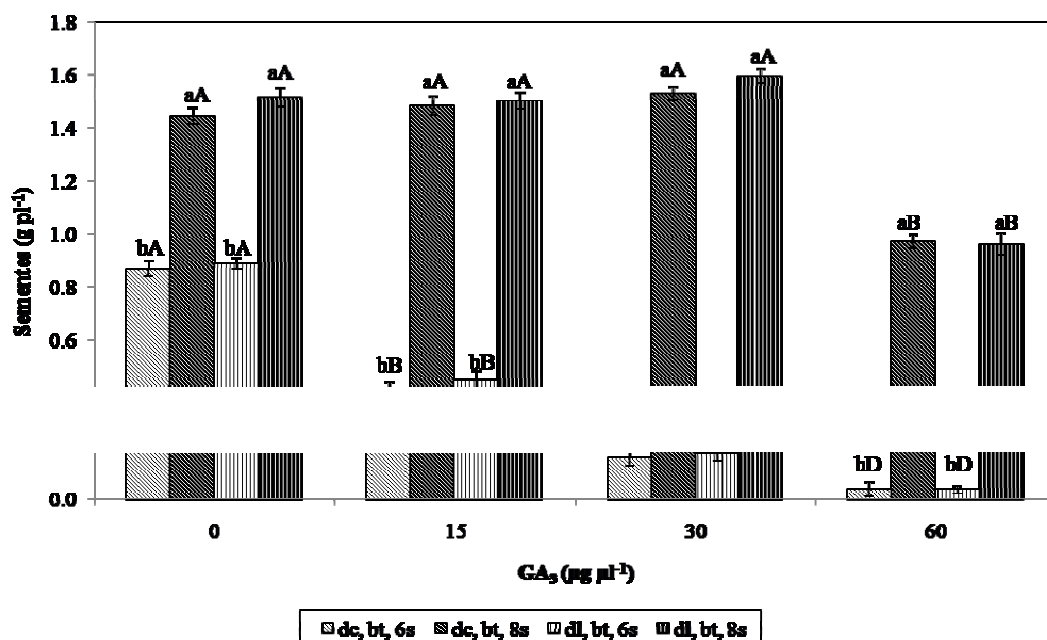
Verifica-se na figura 2A que dl, sbt e GA<sub>3</sub> exercem influência na altura do pendão principal das plantas aos 0 DAT, sendo que as plantas conduzidas sob esta condição, são as que apresentaram maior altura do pendão principal (12,4 cm, em média). As plantas submetidas às condições dc, sbt e GA<sub>3</sub>, apresentaram altura média de 7,3 cm e as que foram submetidas a dc ou dl, bt, com ou sem GA<sub>3</sub> apresentaram altura média de 2,1 cm. Diferentemente do observado ao 0 DAT, aos 50 DAT (Figura 2B), foram observadas maiores alturas de pendão principal para os tratamentos submetidos a bt (34,8 cm, em média), sendo que os tratamentos que tiveram aplicação de GA<sub>3</sub> foram os que apresentaram altura do pendão principal superior aos tratamentos sem GA<sub>3</sub> (36,1 e 30,6 cm, em média, respectivamente).

A maior altura do pendão principal observada para os tratamentos submetidos a bt, aos 50 DAT, foi devido principalmente ao florescimento das plantas de *T. caerulea*, que após terem sido submetidas a bt, possivelmente tiveram suas concentrações endógenas de giberelina aumentada, o que estimulou o alongamento e a divisão celular, bem como a transição do estágio juvenil para o maduro destas plantas (Taiz & Zeiger, 2004). Estes resultados indicam que os estímulos que controlam o nível de florescimento, quando as plantas estão jovens (0 DAT), não funcionam da mesma forma de quando estão mais maduras. Pode-se ver que plantas jovens tem respostas opostas quanto ao efeito dos tratamentos na floração e alongação do pendão, ao passo que aos 50 DAT, os estímulos produzem efeitos semelhantes na floração e extensão do pendão.

### ***3.3 - Relação entre os diferentes tratamentos e a produção de sementes***

Baixa temperatura é um fator essencial para a produção de sementes em *T. caerulea*, haja vista que somente plantas submetidas aos tratamentos bt produziram sementes (Figura 3). Adicionalmente, maior período de exposição a bt resultou em um aumento de 60%, em média, na produção de sementes por planta, em contraste, aplicações de GA não causaram aumento na produção de sementes, sendo que altas dosagens deste

hormônio causaram inibição de sua produção, mesmo sob maiores períodos de exposição ao frio.



**Figura 3.** Produção de sementes de plantas de *Thlaspi caerulescens* submetidas a diferentes tratamentos: dc - dia curto (8 h de luz), dl - dia longo (12 h de luz), bt - baixa temperatura (4°C), 6s - seis semanas sob as condições anteriores, 8s - oito semanas sob as condições anteriores. Diferentes letras minúsculas, denotam diferenças significativas entre as médias dentro da mesma concentração de GA<sub>3</sub>, ao nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey. Diferentes letras maiúsculas, denotam diferenças significativas entre as médias dentro da mesma condição de crescimento, ao nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey (CV = 9,87%). Os dados representam a média ± erro padrão médio.

São poucas as literaturas disponíveis que associam a vernalização e/ou aplicação de giberelinas com o nível de produção de sementes. Walenta et al. (2002), verificaram que a vernalização das espécies *Aegilops cylindrica* L. AEGCY e *Triticum aestivum* L. “Madsen”, produziram maior quantidade de sementes quando submetidas a vernalização por 4°C durante 10 semanas, no entanto, segundo estes pesquisadores, a primeira espécie citada é menos dependente da vernalização para a produção de sementes, sendo considerada uma planta anual de inverno facultativa, diferenciando-se da segunda espécie que é dependente da vernalização para florescimento, sendo considerada uma planta anual de inverno obrigatório. Apesar de não pertencer a mesma família das espécies citadas por Walenta et al., *T. caerulescens* tem

comportamento similar a *T. aestivum*, podendo ser considerada uma planta bienal de inverno obrigatório, já que tanto para germinar, como para florescer, necessita de determinado período a baixa temperatura.

Outros pesquisadores trabalhando com a espécie *Allium cepa*, verificaram que a vernalização da cultivar Crioula com temperatura de  $5^{\circ}\text{C}\pm 1$ , contribuiu para o aumento da produção de sementes desta cultivar (Reghin et al., 2005). Segundo estes autores o maior tempo de exposição a baixa temperatura, também causou efeito aditivo na quantidade final de sementes produzidas. O mesmo foi observado para a espécie em estudo, que apesar de também não pertencer a mesma família da *A. cepa*, nos permitiu levantar a hipótese de que ambas as espécies podem apresentar mecanismos endógenos similares de controle do florescimento. No entanto, mais estudos são necessários para que esta hipótese possa ser confirmada.

#### **4 - CONCLUSÕES**

Podemos dizer que nestes experimentos realizados, as baixas temperaturas não somente são importantes para a indução do florescimento, mas também para a produção de sementes. O crescimento do pendão floral em resposta a dias longos e a aplicação de GAs não se refletem em maior nível de florescimento. Adicionalmente, os dados sugerem que a ação dos diferentes estímulos aqui estudados podem apresentar variações conforme a idade da planta.

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMASINO, R. Take a cold flower. **Nature Genetics**, v. 36, pp. 111-112, 2004.
- ASCHEBECK, L.; EDDY, R. **Growth of Arabidopsis seedlings under differing irrigation and fertilization methods**. Purdue University, West Lafayette, Indiana. <http://www.hort.purdue.edu/hort/facilities/downloads/101materialsMethods.pdf>, 2004. 7p.
- ASSUNÇÃO, A.G.L.; MARTINS, P.D.; De FOLTER, S.; VOOIJS, R.; SCHAT, H.; AARTS, M.G.M. Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant, Cell & Environment**, 24:217-226, 2001.
- ASSUNÇÃO, A.G.L.; SCHAT, H.; AARTS, M.G.M. *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. **New Phytologist**, 159:351-360, 2003.
- AUSÍN, I.; ALONSO-BLANCO, C.; MARTÍNES-ZAPATER, J.M. Environmental regulation of flowering. **International Journal of Developmental Biology**, 49:689-705, 2005.
- BALASUBRAMANIAN, S.; SURESHKUMAR, S.; LEMPE, J.; WEIGEL, D. Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. **PlosGenetics**, 2:980-989, 2006.
- BERNIER, G.; PÉRILLEUX, C. A physiological overview of the genetics of flowering time control. **Plant Biotechnology Journal**, 3:3-16, 2005.
- BLAZQUEZ, M.A. Flower development pathways. **Journal Cell Science**, 113:3547-3548, 2000.
- BOUVERET, R.; SCHÖNROCK, N.; GRUISSEM, W.; HENNIG, L. Regulation of flowering time by Arabidopsis MSI1. **Development**, 133:1693-1702, 2006.
- BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 3ª Imprensa. 2001. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA. 1367 p.
- BURN, J.E.; BAGNALL, D.J.; METZGER, J.D.; DENNIS, E.S.; PEACOCK, W.J. DNA methylation, vernalization, and initiation of flowering. **Proceedings of the National Academy of Science**, 90:287-291, 1993.
- COBBET, C. Heavy metals and plants – model systems and hyperaccumulators. **New Phytologist**, 159:289-293, 2003.

- DAHANAYAKE, S.R.; GALWEY, N.W. Effects of interactions between low-temperature treatments, gibberellins (GA<sub>3</sub>) and photoperiod on flowering and stem height of spring rape (*Brassica napus* var. *annua*). **Annals of Botany**, 84:321-327, 1999.
- D'ALOIA, M.; TOCQUIN, P.; PÉRILLEUX, C. Vernalization-induced repression of FLOWERING LOCUS C stimulates flowering in *Sinapsis alba* and enhances plant responsiveness to photoperiod. **New Phytologist**, 178:755-765, 2008.
- ELLIOTT, R.C.; ROSS, J.J.; SMITH, J.J.; LESTER, D.R. Feed-forward regulation of gibberellins deactivation in pea. **Journal of Plant Growth Regulation**, 20:87-94, 2001.
- FINNEGAN, E.J.; GENGER, R.K.; KOVAC, K.; PEACOCK, W.J.; DENNIS, E.S. DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. **Proceedings of the National Academy of Science**, 95:5824-5829, 1998.
- HAZEBROEK, J.P.; METZGER, J.D. Thermoinductive regulation of gibberellin metabolism in *Thlaspi arvense* L. I. metabolism of [2H]-ent-Kaurenoic acid and [14C] gibberellins A1Z aldehyde. **Plant Physiology**, 94:157-165, 1990.
- HEDDEN, P.; PHILLIPS, A.L. Gibberellins' metabolism: New insights revealed by the genes. **Trends Plant Science**, 5:523-530, 2000.
- HENDERSON, I.R.; SHINDO, C.; DEAN, C. The need for winter in the switch to flowering. **Annual Reviews Genetics**, 37:371-392, 2003.
- HENDERSON, I.R.; GEAN, C. Control of Arabidopsis flowering: the chill before the bloom. **Development**, 131:3829-3838, 2004.
- KIM, S.Y.; HE, Y.; JACOB, Y.; NOH, Y.S.; MICHAELS, S.; AMASINO, R. Establishment of the vernalization-responsive, winter-annual habit in Arabidopsis requires a putative histone H3 methyl transferase. **The Plant Cell**, 17:3301-3310, 2005.
- KOMEDA, Y. Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. **Annual Review of Plant Biology**, 55:521-535, 2004.
- LASAT, M.M.; PENCE, N.S.; GARVIN, D.F.; EBBS, S.D.; KOCHIAN, L.V. Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Journal of Experimental Botany**, 51:71-79, 2000.
- METZGER, J.D. Role of gibberellins in the environmental control of stem growth in *Thlaspi arvense* L. **Plant Physiology**, 78:8-13, 1985.
- MICHAELS, S.D.; AMASINO, R.M. Memories of winter: vernalization and the competence to flower. **Plant, Cell and Environment**, 23:1145-1153, 2000.

- NASCIMENTO, C.W.A.; XING, B. Phytoextraction: A review on enhanced metal availability and plant accumulation. **Scientia Agricola**, 63:299-311, 2006.
- PEER, W.A.; MAMOUDIAN, M.; LAHNER, B.; REEVES, R.D.; MURPHY, A.S.; SALT, D.E. Identifying model metal hyperaccumulating plants: germplasm analysis of 20 Brassicaceae accessions from a wide geographical area. **New Phytologist**, 159:421-430, 2003.
- PENCE, N.S.; LARSEN, P.B.; EBBS, S.D.; LETHAM, D.L.D.; LASAT, M.M.; GAVIN, D.F.; KOCHIAN, L.V. The molecular physiology of heavy metal transporter in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Proceedings of the National Academy of Science**, 97:4956-4960, 2000.
- PRASAD, M.N.V.; FREITAS, H.M.O. Metal hyperaccumulation in plants – Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. **Electronic Journal of Biotechnology**, 6:285-321, 2003.
- QUESADA, V.; DEAN, C.; SIMPSON, G.G. Regulated RNA processing in the control of Arabidopsis flowering. **International Journal of Developmental Biology**, 49:773-780, 2005.
- RATCLIFFE, O.J.; KUMIMOTO, R.W.; WONG, B.J.; RIECHMANN, J.L. Analysis of the Arabidopsis MADS AFFECTING FLOWERING Gene Family: MAF2 prevents vernalization by short periods of cold. **The Plant Cell**, 15:1159-1169, 2003.
- REEVES, R.D.; BROOKS, R.R. European species of *Thlaspi* L. (Cruciferae) as indicators of nickel and zinc. **Journal of Geochemical Exploration**, 18:275-283, 1983.
- REGHIN, M.Y.; OTTO, R.F.; OLINIK, J.R.; JACOBY, C.F.S.; OLIVEIRA, R.P. Vernalização em bulbos e efeito no rendimento e potencial fisiológico de sementes de cebola. **Horticultura Brasileira**, 23:294-298, 2005.
- SALT, D.E.; KRAMER, U.; SMITH, R.D.; RASKIN, I. The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. In: TERRY, N.; BAÑUELOS, G. (Eds). **Phytoremediation of contaminated soil and water**. Boca Raton: Lewis Publishers. p.189-200. 2000.
- SCHAT, H.; LLUGANY, M.; BERNHARD, R. Metal-specific patterns of tolerance, uptake and transport of heavy metals in hyperaccumulating and nonhyperaccumulating metallophytes. In: TERRY N.; BAÑUELOS G. (Eds). **Phytoremediation of contaminated soil and water**. CRC Press LLC, p.171–188. 2000.

- SHELDON, C.C.; ROUSE, D.T.; FINNEGAN, E.J.; PEACOCK, W.J.; DENNIS, E.S. The molecular basis of vernalization: The central role of FLOWERING LOCUS C (FLC). **Proceedings of the National Academy of Science**, 97:3753-3758, 2000.
- TAIZ L.; ZEIGER E. **Fisiologia Vegetal**. 2004. 3<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed. 719 p.
- WALENTA, D.L.; YENISH, J.P.; YOUNG, F.L.; BALL, D.A. Vernalization response of plants grown from spikelets of spring and fall cohorts of jointed goatgrass. **Weed Science**, 50:461-465, 2002.
- YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y. Gibberellin biosynthesis: Its regulation by endogenous and environmental signals. **Plant Cell Physiology**, 41:251-257, 2000.
- YAN, L.; FU, D.; LI, C.; BLECHL, A.; TRANQUILLI, G.; BONAFEDE, M.; SANCHEZ, A.; VALARIK, M.; YASUDA, S. The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. **Proceedings of the National Academy of Science**, 103:19581-19586, 2006.

## 2.8 - APÊNDICE

**Tabela 1.** Porcentagem de florescimento (%) das plantas de *Thlaspi caerulescens* submetidas a diferentes tratamentos: 0 e 50 DAT (aos 0 e 50 dias após a transferência das plantas dos diferentes tratamentos para a mesma condição de temperatura (21°C) e comprimento do dia (12 h de luz).

	0 DAT				50 DAT			
	$GA_3$ ( $\mu g \mu l^{-1}$ )				$GA_3$ ( $\mu g \mu l^{-1}$ )			
	0	15	30	60	0	15	30	60
dc, bt, 6s	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a
dc, bt, 8s	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a
dl, bt, 6s	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a
dl, bt, 8s	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a
dl, sbt, 6s	0	5c	0	0	0	10c	18bc	12c
dl, sbt, 8s	0	10bc	20b	10bc	0	22bc	28b	19bc

dc - dia curto (8 h de luz), dl - dia longo (12 h de luz); bt - baixa temperatura (4°C), sbt - sem baixa temperatura (21°C); 6s - seis semanas sob as condições anteriores, 8s - oito semanas sob as condições anteriores. Diferentes letras, denotam diferenças significativas entre as médias, ao nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey (CV = 11,11%).

**Tabela 2.** Altura do pendão principal (cm) das plantas de *Thlaspi caerulescens* submetidas a diferentes tratamentos: 0 e 50 DAT (aos 0 e 50 dias após a transferência das plantas dos diferentes tratamentos para a mesma condição de temperatura (21°C) e comprimento do dia (12 h de luz).

	0 DAT				50 DAT			
	$GA_3$ ( $\mu g \mu l^{-1}$ )				$GA_3$ ( $\mu g \mu l^{-1}$ )			
	0	15	30	60	0	15	30	60
dc, bt, 6s	1,59dC	2,07eC	2,02dC	2,05eC	31,17aB	34,30aA	35,04aA	36,08bA
dc, bt, 8s	1,35dC	2,01eC	2,11dC	2,10eC	28,01bB	35,61aA	35,47aA	38,10aA
dl, bt, 6s	1,88dC	2,60eC	2,61dC	2,69eC	32,17aB	35,10aAB	36,14aA	38,50aA
dl, bt, 8s	1,51dD	2,08eD	2,17dD	2,22eD	21,17cC	34,85aB	35,98aA	38,39aA
dc, sbt, 6s	3,57bcD	7,09dB	7,12cB	5,71dBC	5,18eC	9,75dA	9,83cA	8,88fA
dc, sbt, 8s	3,07cD	8,50cC	7,46cC	8,01cC	4,55eD	12,80cA	10,03cB	11,97eA
dl, sbt, 6s	4,24bD	10,22bB	11,56bB	11,94bB	6,14deC	14,28bA	16,27bA	16,62cA
dl, sbt, 8s	6,38aC	12,83aB	14,07aAB	13,57aB	7,01dC	13,99bAB	15,67bA	14,99dA

dc - dia curto (8 h de luz), dl - dia longo (12 h de luz), bt - baixa temperatura (4°C), sbt - sem baixa temperatura (21°C), 6s - seis semanas sob as condições anteriores, 8s - oito semanas sob as condições anteriores. Diferentes letras minúsculas, denotam diferenças significativas entre as médias dentro da mesma coluna, ao nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey (CV = 13,13%). Diferentes letras maiúsculas, denotam diferenças significativas entre as médias dentro da mesma linha, ao nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey (CV = 10,71%).

**Tabela 3.** Produção de sementes ( $\text{g pl}^{-1}$ ) de plantas de *Thlaspi caerulescens* submetidas a diferentes tratamentos. Universidade de Purdue, 2008.

	$GA_3$ ( $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ )			
	0	15	30	60
dc, bt, 6s	0,87 <b>bA</b>	0,42 <b>bB</b>	0,16 <b>bC</b>	0,40 <b>bD</b>
dc, bt, 8s	1,45 <b>aA</b>	1,48 <b>aA</b>	1,53 <b>aA</b>	0,97 <b>aB</b>
dl, bt, 6s	0,89 <b>bA</b>	0,45 <b>bB</b>	0,17 <b>bC</b>	0,36 <b>bD</b>
dl, bt, 8s	1,51 <b>aA</b>	1,50 <b>aA</b>	1,60 <b>aA</b>	0,96 <b>aB</b>

dc - dia curto (8 h de luz), dl - dia longo (12 h de luz), bt - baixa temperatura ( $4^\circ\text{C}$ ), 6S - seis semanas sob as condições anteriores, 8S - oito semanas sob as condições anteriores. Diferentes letras minúsculas, denotam diferenças significativas entre as médias dentro da mesma coluna, ao nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey (CV = 10,21%). Diferentes letras maiúsculas, denotam diferenças significativas entre as médias dentro da mesma linha, ao nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey (CV = 9,87%).