

Grace P. Keiler, Jusceley F. P. Oliveira, Elzira E. Saviani, Sandra M. C. Guerreiro, Ione Salgado

Departamento de Biologia Vegetal, Bloco E, Instituto de Biologia – UNICAMP, CEP 13083-970, Campinas-SP, Brasil, fone (19) 3521-6149

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Palavras – chave : *Arabidopsis thaliana*, óxido nítrico, indução floral, crescimento de raízes

## INTRODUÇÃO

Estudos mostraram que o radical óxido nítrico regula inúmeros processos de crescimento e desenvolvimento vegetal, promovendo, entre outras ações, a diferenciação de raízes e a repressão da transição floral. Muitos mutantes de *Arabidopsis thaliana* já foram isolados, dentre eles estão *ttg*, *rhd6* e *gl2* que apresentam alterações no crescimento e diferenciação de raízes adventícias. O mutante recessivo *rhd6* apresenta 15-17% do número de raízes adventícias do tipo selvagem e o fenótipo selvagem pode ser recuperado pela aplicação exógena de um precursor de etileno ou de auxina. Já os mutantes *ttg* (transparent testa glabra) e *gl2* (glabra2) apresentam pelos radiculares em praticamente todas as células epidérmicas da raiz. Esse projeto teve como objetivo avaliar a sinalização do NO em dois diferentes processos de desenvolvimento vegetal: crescimento e diferenciação de raízes e indução floral.

## MATERIAIS E MÉTODOS

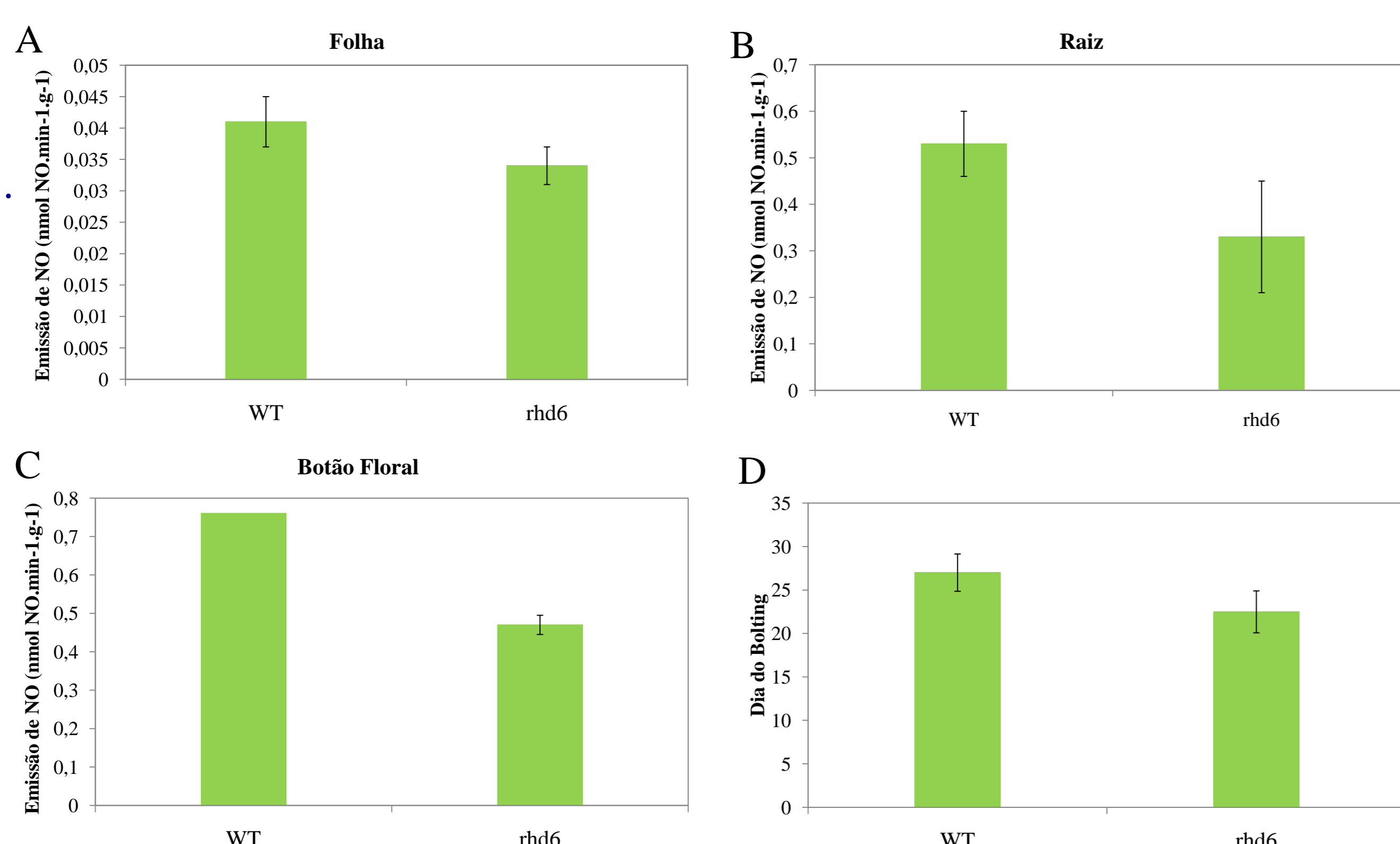
**Cultivo de *A. thaliana*:** Plantas de *Arabidopsis thaliana* L. ecotipo Columbia-0 e mutantes da mesma linhagem com alterações na formação de raízes, a saber, *ttg*, *rhd6* e *gl2* foram utilizadas. As sementes foram esterilizadas e semeadas em vasos com vermiculita/perlita (1:1) ou em frascos contendo Phytigel 2,8%, acrescido de sacarose 1% e 0,1 g/L de mioinositol. Em alguns destes ensaios *in vitro* do mutante *rhd6*, foi acrescentado ao meio de reação a auxina, ácido indol acético (AIA).

**Quantificação da produção de NO por fluorimetria:** Amostras de folhas, raízes e botões florais de *A. thaliana* dos diferentes genótipos foram incubadas em solução contendo o indicador 4,5-diaminofluoresceína na sua forma livre (DAF-2), a 25  $\mu$ M (dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2). A emissão de fluorescência (varredura entre 500-550 nm) da solução foi monitorada sob excitação de 495 nm em espectrofluorímetro.

**Parâmetros de indução floral:** A indução floral foi determinada pelo número de dias, desde a germinação até o aparecimento do primeiro botão floral. Foram utilizados, tanto para o cultivo na terra como para o cultivo *in vitro*, 36 plantas para a análise.

**Imagem das raízes:** As raízes foram coradas com Azul de Toluidina em tampão citrato 0,05%, pH 7,5 0,01M durante 3 minutos. Em seguida foram lavadas em água destilada e colocadas nas lâminas. As fotos foram tiradas com auxílio do microscópio Olympus BX51, com câmera Olympus DP71 acoplada.

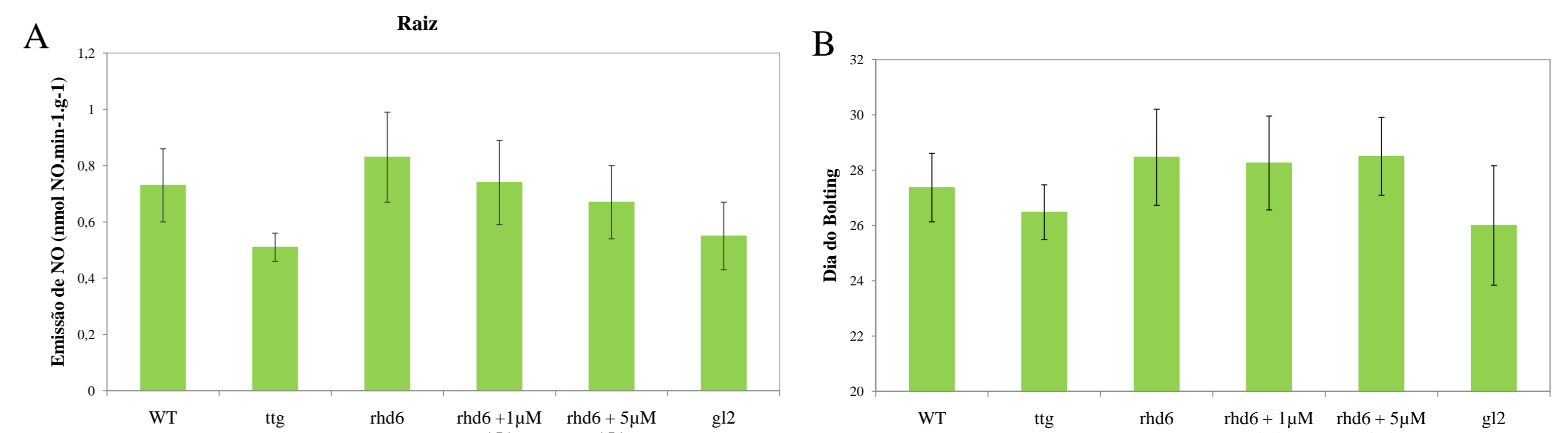
## RESULTADOS



**Figura 1:** Emissão de NO por folha (A), raiz (B) e botão floral (C) e indução floral (D) de plantas *A. thaliana* selvagens (WT) e mutantes *rhd6* cultivadas na terra.

**Tabela 1:** Valores comparados de emissão de NO nos três tecidos, referentes à figura 1.

	WT	rhd6
<b>Raiz</b>	0,53 ± 0,07	0,33 ± 0,12
<b>Folha</b>	0,041 ± 0,004	0,034 ± 0,003
<b>Botão Floral</b>	0,76 ± 0	0,47 ± 0,025

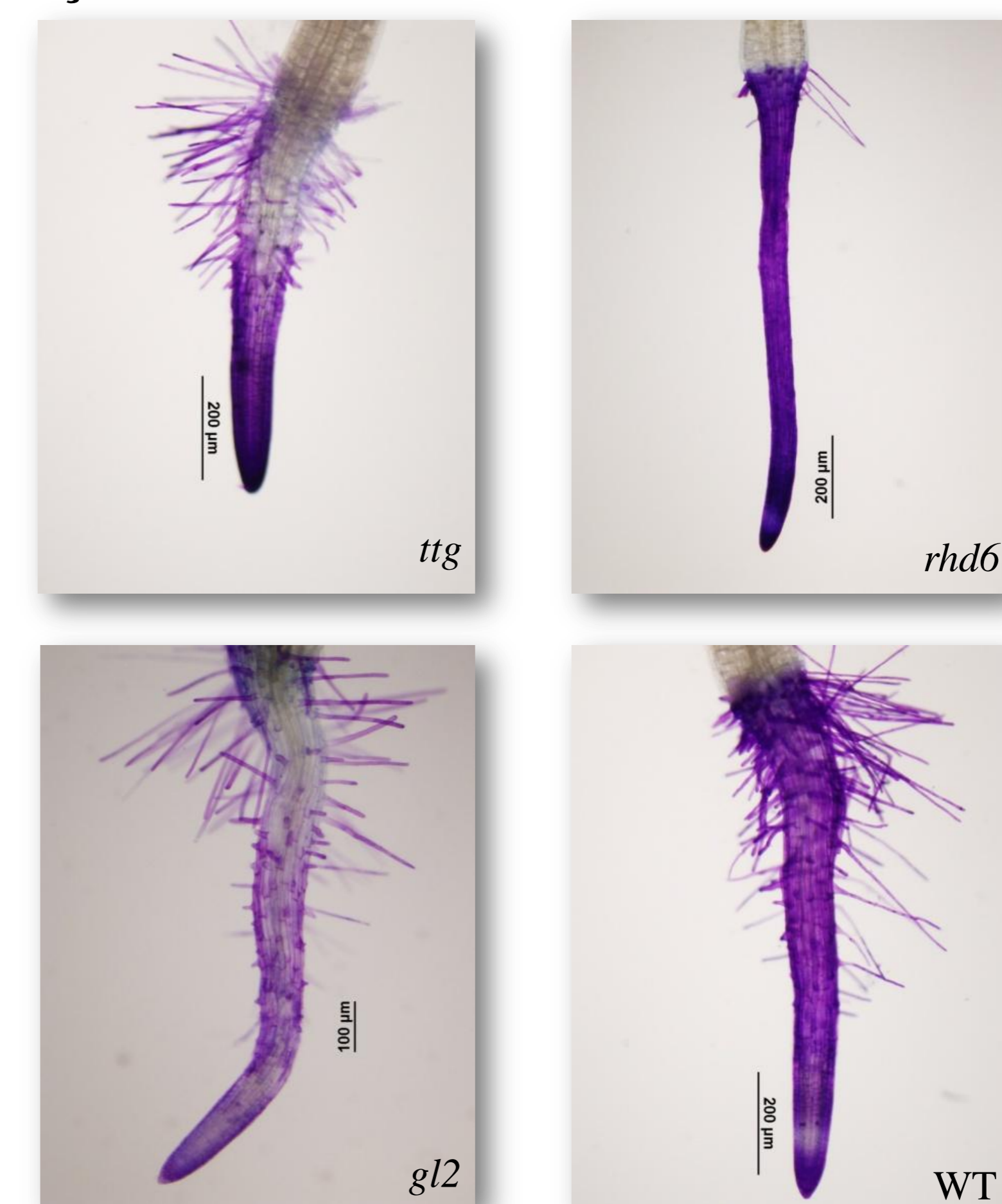


**Figura 2:** Emissão de NO por raiz (A) e indução floral (B) em plantas selvagens (WT) e nos mutantes *rhd6*, *ttg* e *gl2*, cultivadas *in vitro*. Efeito de IAA na emissão de NO e indução floral no mutante *rhd6*.

**Tabela 2:** Valores das médias e dos desvios da emissão de NO e da floração referentes à figura 2.

		WT	ttg	rhd6	rhd6 + 1 $\mu$ M AIA	rhd6 + 5 $\mu$ M AIA	gl2
<b>Emissão de NO</b>	<b>Média</b>	0,73	0,51	0,83	0,74	0,67	0,55
	<b>Desvio</b>	0,13	0,05	0,16	0,15	0,13	0,12
<b>Floração</b>	<b>Média</b>	27,37	26,48	28,47	28,26	28,5	26
	<b>Desvio</b>	1,24	0,99	1,74	1,7	1,41	2,16

## Padrão de diferenciação de raízes:



**Figura 3:** Imagens de raízes dos mutantes *ttg*, *rhd6*, *gl2* e da planta selvagem (WT), cultivadas *in vitro* com 3 dias de idade.

## CONCLUSÕES

### Cultivo em terra:

O mutante *rhd6* apresentou menor emissão de óxido nítrico, tanto em raiz, como em folha e em botões florais, em relação ao genótipo selvagem. A floração do mutante *rhd6* é precoce em relação ao genótipo selvagem.

### Cultivo in vitro:

A menor emissão de NO pelos mutantes *ttg* e *gl2* foi correlacionada a uma floração precoce em relação ao genótipo selvagem.

A maior emissão de NO pelo mutante *rhd6*, em relação ao genótipo selvagem, foi relacionada a uma floração mais tardia.

### Padrão de Diferenciação :

O padrão de desenvolvimento radicular dos mutantes se apresentou como o esperado, com intensa formação de pelos radiculares nos mutantes *ttg* e *gl2* em relação ao tipo selvagem e ausência de pelos radiculares em *rhd6*.