

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS JABOTICABAL**

**INTERAÇÃO ENTRE AUXINA E ETILENO NAS RESPOSTAS  
DO TOMATEIRO À DEFICIÊNCIA DE FERRO**

**Carolina Cristina Monteiro**  
Engenheira agrônoma

**2016**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS JABOTICABAL**

**INTERAÇÃO ENTRE AUXINA E ETILENO NAS RESPOSTAS  
DO TOMATEIRO À DEFICIÊNCIA DE FERRO**

**Carolina Cristina Monteiro**

**Orientador: Prof. Dr. Rogério Falleiros Carvalho**

**Coorientador: Prof. Dr. Renato de Melo Prado**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal)**

**2016**

Monteiro, Carolina Cristina  
M775i Interação entre auxina e etileno nas respostas do tomateiro à  
deficiência de ferro / Carolina Cristina Monteiro. -- Jaboticabal, 2016  
vi, 115 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Rogério Falleiros Carvalho

Coorientador: Renato de Melo Prado

Banca examinadora: Ricardo Antunes de Azevedo, Luciano  
Freschi, Tiago Santana Balbuena, Priscila Lupino Gratão

Bibliografia

1. Estresse oxidativo. 2. Fitormônios. 3. Micronutrientes. I. Título.  
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.81:635.64

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

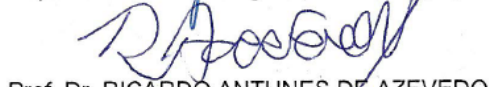
**TÍTULO DA TESE: INTERAÇÃO ENTRE AUXINA E ETILENO NAS RESPOSTAS DO TOMATEIRO  
À DEFICIÊNCIA DE FERRO**

**AUTORA: CAROLINA CRISTINA MONTEIRO**  
**ORIENTADOR: ROGÉRIO FALLEIROS CARVALHO**  
**COORIENTADOR: RENATO DE MELLO PRADO**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA  
(PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ROGÉRIO FALLEIROS CARVALHO  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO  
ESALQ - USP - Piracicaba/SP



Prof. Dr. LUCIANO FRESCHI  
IB - USP - São Paulo/SP  
Participação por Videoconferência



Pesquisador TIAGO SANTANA BALBUENA  
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dra. PRISCILA LUPINO GRATÃO  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 10 de outubro de 2016



## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Carolina Cristina Monteiro nascida em 12 de setembro de 1984 em Sorocaba/SP, possui graduação em Engenharia Agrônômica pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) (2007) e mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas pela mesma instituição (2010). Durante a graduação, participou de diversos estudos voltados a estresses abióticos por metais pesados em plantas cultivadas, no Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas (ESALQ/USP) sob coordenação do Professor Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, e foi contemplada com uma bolsa de estudos FAPESP com o projeto “Análise morfológica e bioquímica em mutantes hormonais de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) submetidos ao metal pesado cádmio (Cd)”. No mestrado, realizado no mesmo laboratório, também foi contemplada com uma bolsa de estudos FAPESP com o projeto “Análise bioquímica do mutante hormonal de tomateiro *Never ripe (Nr)* submetido a diferentes estresses”. Nesses seis anos de aprendizado no laboratório do Professor Ricardo, participou de diversos artigos científicos publicados em revistas com alto impacto no meio científico. Após a conclusão do mestrado, surgiu a oportunidade de trabalhar como coordenadora do laboratório de cultura de tecidos vegetais da empresa Agromillora Produção Brasil em Brotas. Após dois anos na empresa, decidiu retomar os estudos e voltou a Universidade para realizar seu doutoramento. Em agosto de 2012 foi aceita como aluna de doutorado pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Jaboticabal, no curso de Agronomia (Produção Vegetal), sob orientação do Professor Dr. Rogério Falleiros Carvalho. Durante o doutorado, teve a oportunidade de realizar três meses de doutorado sanduíche (PDSE-CAPES) na Universidade de Córdoba-Espanha, sob orientação do Professor Dr. Francisco Javier Romera Ruiz. Nesses anos trabalhando com Bioquímica e Fisiologia de Plantas, foi possível adquirir experiência nos temas de enzimologia, estresse vegetal, fitormônios vegetais, nutrição vegetal, produção de plantas in vitro e genética molecular.





Aos meus queridos pais e as minhas irmãs  
que sempre me apoiaram

*Dedico*

A meu amado Tiago e ao nosso filho Joaquim

*Ofereço*



## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias pela oportunidade de cursar o doutorado.

Ao CNPq e à FAPESP (2013/04316-2) pelo auxílio financeiro durante todo o curso de doutorado.

Ao Prof. Dr. Rogério Falleiros Carvalho pela orientação, paciência e amizade.

Ao Prof. Dr. Renato de Melo Prado pela coorientação e amizade.

À Profa. Dra. Priscila Lupino Gratão pela amizade verdadeira e ajuda imprescindível durante toda minha carreira acadêmica.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo por me ajudar novamente nessa etapa e me ceder seu laboratório para as análises em Piracicaba.

Ao Prof. Francisco Javier Romera Ruiz, da Universidade de Córdoba-Espanha, pela orientação durante o doutorado sanduíche da CAPES.

À Prof. Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos por me deixar utilizar a sala de crescimento de plantas.

À Prof. Dra. Durvalina Maria Mathias dos Santos pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves por me ajudar a reestruturar a casa de vegetação.

À Soninha (Sônia Maria!) pela ajuda super importante, por seus conselhos no trabalho e principalmente na vida! Muito obrigada! Vou levar para sempre seus ensinamentos!

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Vegetal da Unesp: Jamil, Marina, Flávio, Lucas, Letícia, Denise, Priscilinha, Leonardo, Luiz, Rafael, Joel, Antônio, Rita, Victor, e tantos outros que passaram e sempre deixaram algum ensinamento.

À Salete que me ajudou desde o início da minha iniciação científica e agora no doutorado. E também por nossos bons almoços e conversas animadas!

Aos amigos do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas da Esalq-USP, que há tantos anos vem me acompanhando: Tiago Tezotto (agora Professor Dr.), Leila, Gicka, Karina, Berenice, Mônica, Fabiana, Fernando, Fernanda (palhacinha!), Dai, e mais alguns que estiveram comigo e me ajudaram nessa etapa.

A todos os professores que me ensinaram muito durante o curso de doutorado dessa Universidade.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	v
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. O elemento ferro nos solos .....	3
2.2. O Fe nas plantas .....	5
2.3. As respostas da planta à deficiência de Fe .....	10
2.3.1. Auxina e deficiência de Fe em plantas .....	13
2.3.2. Etileno e deficiência de Fe em plantas .....	14
2.3.3. Interação entre auxina e etileno em plantas .....	15
2.4. As enzimas antioxidantes relacionadas ao Fe .....	16
2.4.1. Superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1) .....	16
2.4.2. Catalase (CAT – EC 1.11.1.6) .....	18
2.4.3. Ascorbato peroxidase (APX – EC 1.11.1.11) .....	20
2.5. O tomateiro Micro-Tom e seus mutantes como modelo biológico de estudos ...	21
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
3.1. Material vegetal .....	25
3.1.1. Cultivo das plantas para multiplicação de sementes .....	25
3.1.2. Obtenção de duplos mutantes hormonais .....	26
3.2. Análises fenotípica e genotípicas para confirmação da presença das duplas mutações .....	27
3.2.1. Confirmação fenotípica da presença das duplas mutações .....	27
3.2.2. Confirmação genotípica da presença das duplas mutações <i>epi dgt</i> e <i>Nr dgt</i> por PCR .....	27
3.2.3. Confirmação genotípica da presença das duplas mutações <i>epi dgt</i> e <i>Nr dgt</i> por sequenciamento .....	29
3.3. Cultivo em condições de deficiência de ferro .....	29
3.4. Análises de crescimento .....	32
3.5. Análises bioquímicas .....	33
3.6. Análises de qRT-PCR .....	37

3.7. Delineamento experimental e análise estatística dos dados .....	40
4. RESULTADOS .....	41
4.1. Obtenção e confirmação fenotípica dos duplos mutantes hormonais.....	41
4.2. Confirmação genotípica da presença das duplas mutações <i>epi dgt</i> e <i>Nr dgt</i> por PCR .....	46
4.3. Confirmação genotípica da presença das duplas mutações <i>epi dgt</i> e <i>Nr dgt</i> por sequenciamento .....	49
4.5. Análises de crescimento .....	52
4.6. Análises bioquímicas .....	66
4.7. Análises de qRT-PCR.....	78
5. DISCUSSÃO.....	83
6. CONCLUSÕES.....	93
7. REFERÊNCIAS .....	95
8. IMPLICAÇÕES .....	115

## INTERAÇÃO ENTRE AUXINA E ETILENO NAS RESPOSTAS DO TOMATEIRO À DEFICIÊNCIA DE FERRO

**RESUMO** - As alterações morfológicas e bioquímicas das plantas sob deficiência de Fe são muito importantes para a sobrevivência em ambientes limitantes de Fe, sendo que estas alterações são controladas pela auxina e o etileno. Entretanto, a interação desses dois fitormônios nas respostas à deficiência de Fe ainda é pouco conhecida. Para isso, o presente estudo avaliou respostas morfológicas, bioquímicas e de qRT-PCR em mutantes hormonais de tomateiro, sendo eles mutantes em baixa sensibilidade à auxina (*dgt*, AUX<sup>-</sup>) e baixa sensibilidade ao etileno (*Nr*, ET<sup>-</sup>) e superprodução de etileno (*epi*, ET<sup>+</sup>) e seus duplos mutantes (*Nr dgt* e *epi dgt*), bem como o controle Micro-Tom (MT), submetidos à de Fe. As plantas foram germinadas e transplantadas para vasos com solução nutritiva completa até aclimação, e posteriormente o Fe foi retirado da solução em 50% dos vasos. Os tempos estudados foram T0 - quando ainda todas as plantas estavam com Fe, T1 - com quatro dias sem Fe, e T2 - com 24 dias sem Fe. O delineamento experimental foi em blocos casualizados (DBC) com seis genótipos (MT, *dgt*, *Nr*, *epi*, *Nr dgt* e *epi dgt*) e dois tratamentos (com e sem Fe), com três repetições (n=3), utilizando a análise de variância (ANOVA) e o Teste de Média (Duncan) a 5% de probabilidade. Nos resultados morfológicos da raiz, como comprimento, densidade, diâmetro, área e massa de matéria seca da raiz, pode-se observar que a auxina apresentou respostas epistáticas sobre o etileno. Contudo, para as análises bioquímicas no sistema radicular e na parte aérea, como clorofilas totais, enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX), conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA, o efeito do tempo de exposição à ausência de Fe manifestaram outros tipos de interação, como a aditiva e a sinérgica, mostrando vias independentes da ação da auxina e etileno para essas respostas. Já para os níveis de transcritos do gene da redutase férrica (*SIFRO1*), foi possível identificar a interação sinérgica entre auxina e etileno, proporcionando aumento da expressão nos duplos mutantes em relação aos simples mutantes. Contudo, para o transportador de Fe da membrana da raiz (*SIIRT1*), o *Nr dgt* apresentou interação aditiva e o *epi dgt* apresentou efeito epistático do *epi* sobre o *dgt*. Com esses resultados, pode-se concluir que existe a interação entre auxina e etileno nas respostas à deficiência de Fe em tomateiro, e é dependente do tempo de exposição à deficiência bem como do órgão analisado.

**Palavras-chave:** Estresse oxidativo, fitormônios, micronutriente, redutase férrica, transportador de ferro





## INTERACTION BETWEEN AUXIN AND ETHYLENE IN IRON DEFICIENCY RESPONSES IN TOMATO

**ABSTRACT** - Morphological and biochemical changes under Fe deficiency are very important for plants survival in Fe-limited environments. These changes are controlled by plant hormones, including auxin and ethylene. However, the interaction of these hormones in response to Fe deficiency still not well known. In this study, we evaluated the morphological, biochemical and qRT-PCR in hormonal mutant tomatoes, by using low auxin sensitivity (*dgt* - AUX<sup>-</sup>), low ethylene sensitivity. (*Nr* - ET<sup>-</sup>) and ethylene overproduction (*epi* - ET<sup>+</sup>) and their double mutants (*Nr dgt* and *epi dgt*), as well as the Micro-Tom control (MT), both submitted to Fe deficiency. The plants were germinated and transplanted to pots with nutrition solution until acclimatization, and then half of the plants were grown without iron. The harvest times were: T0 (when all the plants were still with Fe), T1 (four days without Fe) and T2 (24 days without Fe). The experimental design was randomized block, with six genotypes (MT, *dgt*, *Nr*, *epi*, *Nr dgt* and *epi dgt*), two treatments (with and without Fe) and three repetitions (n = 3), using. A multiple comparison between means by the Duncan test followed and individual ANOVA for each time, at a 5% level of significance. The root morphological results, such as length, density, diameter, area and dry mass, exhibited auxin epistatic interaction about ethylene. However, regarding biochemical analysis on root system and leaves, such as chlorophylls, antioxidant enzymes (SOD, CAT and APX), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA contents, the effect of exposure time to Fe absence expressed other types of interaction, such as additive and synergistic, showing independent pathways of auxin and ethylene to those answers. Transcription levels of the Fe-chelate reductase (*SIFRO1*) exhibited synergistic interaction between auxin and ethylene, increasing more gene expression in double mutants than in single mutants. However, for the Fe-transporter (*SIIRT1*), *Nr dgt* showed additive interaction and *epi dgt* presented *epi* epistatic interaction about *dgt*. With these results, we can conclude that in Fe deficiency responses there is interaction between auxin and ethylene in tomato plant, and is dependent on the time of exposure to Fe deficiency as well as the organ analyzed.

**Key words:** Oxidative stress, plant hormones, micronutrient, Fe-chelate reductase, Fe-transporter



## 1. INTRODUÇÃO

O elemento ferro (Fe) é um micronutriente de plantas com alta capacidade de promover a transferência de elétrons nas reações de oxi-redução em diversas organelas celulares. Atua como componente de enzimas importantes na fotossíntese, respiração celular, respostas antioxidantes, bem como na assimilação e redução química de outros nutrientes da planta. Visto que esses processos são fundamentais para o desenvolvimento da planta, em casos de deficiência de Fe podem ocorrer mudanças adaptativas principalmente nas raízes, para maior absorção desse elemento.

Essas adaptações iniciam-se por alteração nas rotas de transdução de sinais que envolvem diversas moléculas sinalizadoras, entre elas o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e fitormônios, como auxina e etileno, entre outras. Assim sendo, pode ocorrer a alteração na transcrição de genes relacionados ao estresse causado por essa nova condição. A partir de então, podem surgir adaptações morfológicas, como crescimento de pelos radiculares para maior superfície de absorção, e bioquímicos, através da exsudação de prótons acidificando o meio que favorece a solubilidade do Fe. Se a deficiência persistir por um período maior, a planta tende a reduzir seu metabolismo para evitar aumento do estresse oxidativo que pode ser gerado pela falta desse micronutriente. Uma vez que o Fe faz parte do centro de reação de diversas enzimas do sistema antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), entre outras.

Em dicotiledôneas, essas estratégias consistem em aumentar a disponibilidade do Fe em solução na região da rizosfera, bem como aumentar a absorção através de transportadores de membranas específicos para esse íon. Em condições de deficiência de Fe, os mecanismos relacionados ao aumento de transcrição de genes relacionados às adaptações radiculares foram relacionados à auxina (CHEN et al., 2010; WU et al., 2011; LIN et al., 2016) e ao etileno (ROMERA et al., 1999; LUCENA et al., 2006; KABIR et al., 2012). Entretanto, a interação entre os dois fitormônios e a deficiência de Fe ainda foi pouco explorada, e muitas vezes os trabalhos são apenas com aplicações exógenas dos fitormônios separadamente, não conseguindo reproduzir as condições naturais de sua síntese e atuação no metabolismo da planta.

Desse modo, o uso de mutantes hormonais pode ser uma ferramenta no estudo dessas interações hormonais e a deficiência nutricional. Uma vez bem caracterizado, o mutante hormonal poderá ser utilizado em cruzamentos para obtenção de duplos mutantes hormonais em uma só planta.

Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo mostrar a interação entre os fitormônios auxina e etileno sobre as respostas à deficiência de Fe. Tendo como hipóteses: a) a interação entre auxina e etileno pode provocar mudanças morfológicas e no crescimento das raízes e na parte aérea na deficiência de Fe; b) a interação entre a auxina e o etileno pode alterar o metabolismo bioquímico de resposta enzimática contra o estresse gerado pela deficiência de Fe na planta; c) ocorre alteração nos níveis de transcritos da ferro redutase e do transportador de Fe nas membranas de duplos mutantes em auxina e etileno na deficiência de Fe. Para isso, foi utilizado como modelo de estudo o tomateiro Micro-Tom (MT) e seus mutantes hormonais em auxina e etileno. A partir de então, foi realizado o cruzamento e a obtenção de duplos mutantes hormonais em auxina e etileno. Em sequência, os duplos mutantes, seus parentais e o MT foram submetidos à deficiência de Fe em solução nutritiva e as análises de crescimento, bioquímicas e de qRT-PCR para os genes da ferro redutase e do transportador de Fe nas membranas foram realizadas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O elemento ferro nos solos

Nutrientes essenciais podem ser definidos como aqueles que estão envolvidos diretamente no metabolismo e são insubstituíveis por outros elementos, sem os quais a planta não consegue completar seu ciclo de vida (FAGERIA; BALIGAR; CLARK, 2002; SHAHID et al., 2016). O elemento ferro (Fe) é considerado um micronutriente para as plantas, pois é necessário em pequenas quantidades para que o metabolismo vegetal realize suas funções adequadamente. Além disso, a aquisição de micronutrientes pelas plantas é afetada pela composição natural dos solos, microrganismos de solo, fatores ambientais e a própria planta (FAGERIA; BALIGAR; CLARK, 2002; MIRANSARI, 2013).

O Fe é um elemento relativamente abundante na maioria dos solos cultivados, com uma concentração total de 20 a 40 g kg<sup>-1</sup> (CORNELL; SCHAWERTMANN, 2003), porém em quantidades muito pequenas disponíveis às plantas. Esse Fe dos solos está presente em sua forma primária mineral como Fe<sup>2+</sup> e quando sofre processos pedogenéticos de oxidação muda para formas de óxidos de Fe na forma Fe<sup>3+</sup>, pouco disponível às plantas (COLOMBO et al., 2014). As formas mais abundantes de óxidos de Fe encontradas nos solos bem drenados e aerados são goetita (Fe-OOH) e hematita (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>); sendo as outras formas de óxidos de Fe menos abundantes como magnetita e maguemite (COLOMBO et al., 2014; JIANG et al., 2016).

A dissolução e precipitação de óxidos de Fe são os maiores fatores que controlam a solubilidade do Fe nos solos, e são altamente dependentes do pH. A solubilidade do Fe<sup>3+</sup> diminui 100 vezes a cada unidade que aumenta de pH (LINDSAY; SCHWAB, 1982). Enquanto que Fe<sup>3+</sup> é solúvel acima de 10<sup>-6</sup> M em pH 3,3, essa concentração é de apenas 10<sup>-17</sup> M em pH 7,0 (HELL; STEPHAN, 2003). O óxido de Fe<sup>3+</sup> tem diferentes solubilidades dependentes da forma que estão nos solos: Fe(OH)<sub>3</sub> (amorfo) > Fe<sub>2</sub>(OH)<sub>3</sub> (solo) > Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (magnetita) > Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (hematita) > FeOOH (goetita). Em solos mais ácidos, uma pequena quantidade de Fe pode estar na sua forma insolúvel de pirita (FeS<sub>2</sub>), e em solos alcalinos na forma de siderita (FeCO<sub>3</sub>) (COLOMBO et al., 2014). Em solos bem aerados, o Fe<sub>2</sub>(OH)<sub>3</sub> torna-se solúvel e se

dissocia em:  $\text{Fe}_2(\text{OH})_3 + 3\text{H}^+ \leftrightarrow \text{Fe}^{3+} + 3 \text{H}_2\text{O}$ . Além dos óxidos, o Fe também forma complexos com outros ânions em solução como  $\text{FeH}_2\text{PO}_4^{2+}$ ,  $\text{FeHPO}_4^+$ ,  $\text{FeCl}^{2+}$ ,  $\text{Fe}(\text{SO}_4)^{2-}$ ,  $\text{FeNO}_3^{2+}$ ,  $\text{FeBr}^{2+}$ . Isso é importante porque alguns complexos podem aumentar ou diminuir a solubilidade do Fe (LINDSAY; SCHWAB, 1982).

A deficiência de Fe é um problema frequente em muitos campos cultiváveis, particularmente em solos calcários ou alcalinos (COLOMBO et al., 2014), pois com o pH mais elevado, o  $\text{Fe}^{3+}$  pode se tornar insolúvel por hidrólise, polimerização ou precipitação com ânions orgânicos no solo (HELL; STEPHAN, 2003). Além disso, em solos com drenagem deficiente, onde ocorre condições anóxicas frequentes por longos períodos, ocorre a oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  para  $\text{Fe}^{3+}$ , que por sua vez favorece a formação de óxidos alcalinos pouco disponíveis às plantas (COLOMBO et al., 2014).

Ao mesmo tempo, níveis elevados de diversos minerais como cálcio (Ca), fósforo (P), nitrogênio (N), manganês (Mn), cobre (Cu) e zinco (Zn), além dos metais pesados tóxicos cromo (Cr) e cádmio (Cd) podem contribuir para a indução de deficiência de Fe em muitas plantas (TANDON, 1998; FAGERIA; BALIGAR; CLARK, 2002). Solos com baixas quantidades de Zn podem aumentar a absorção de Fe, especialmente quando o solo está com pH abaixo de 7,0 (FAGERIA; BALIGAR; CLARK, 2002). Altos níveis de P no solo pode imobilizar o Fe e ao mesmo tempo inibir sua absorção pelas raízes, e subsequente transporte até a parte aérea (FAGERIA; BALIGAR; CLARK, 2002). O nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) pode agravar a deficiência de Fe pela elevação do pH na rizosfera, através da liberação de  $\text{HCO}_3^-$  (FAGERIA; BALIGAR; CLARK, 2002).

Para tentar contornar a deficiência de Fe nos solos, alguns quelatos naturais ou sintéticos foram desenvolvidos para manter a forma do Fe disponível para as plantas sob pHs mais elevados. A habilidade do agente quelante de manter o quelato de Fe em solução varia na ordem crescente de: Fe-ácido cítrico > Fe-ácido oxálico > Fe-EGTA > FE-EDTA > FE-DTPA > Fe-CDTA > Fe-EDDHA (LINDSAY; SCHWAB, 1982; COLOMBO et al., 2014).

## 2.2. O Fe nas plantas

A importância do Fe na biologia deve-se tanto a sua versatilidade química como sua capacidade de mudar de valência. Por exemplo, este elemento é componente importante de enzimas envolvidas na transferência de elétrons (reações-redox reversíveis) (HELL; STEPHAN, 2003), atua na rota da síntese de clorofila (NAGANE et al., 2010), na fotossíntese (HÄNSCH; MENDEL, 2009), na redução química do nitrato e sulfato (MENDEL; KRUSE, 2012; HANKE; MULO, 2012), bem como na assimilação de nitrogênio pelos rizóbios (TAIZ; ZEIGER, 2006; MENDEL; KRUSE, 2012), na respiração, na biossíntese de fitormônios (etileno, ácido giberélico e ácido jasmônico), na produção e na eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO), na osmoproteção e na defesa de patógenos (HÄNSCH; MENDEL, 2009). Em sua forma iônica, o  $Fe^{2+}$  é muito reativo e potencialmente uma espécie química tóxica porque pode catalisar elétrons de transferência de ERO em uma série de reações de oxirredução, produzindo um oxidante potente como o radical livre hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) (WELCH; SHUMAN, 1995). Essa capacidade pode ser modificada por uma variedade de ligantes orgânicos como proteínas de transporte de elétrons com ampla gama de potenciais redox, e em centros ativos de muitas enzimas (HARRISON; AROSIO, 1996).

Portanto, uma vez que este metal alcança o citoplasma, deve ser vinculado a quelatos ou complexado para diminuir seu potencial tóxico (WELCH; SHUMAN, 1995). A maioria do Fe presente nos organismos vivos está firmemente ligado a proteínas ou a agentes quelantes de baixa massa molecular que complexam o Fe no citoplasma como a nicotianamina. A nicotianamina é um aminoácido não protéico e é sintetizada nas plantas através da L-metionina via intermédio da S-adenosil-L-metionina (SAM) (WELCH; SHUMAN, 1995). Em tomateiro, a nicotianamina pode atuar como um transportador de  $Fe^{2+}$  no citosol, e um sensor que induz a síntese de transportadores de Fe na célula (SCHOLAZ et al.; 1988). Outro quelante de metal já conhecido e sintetizado nas células é a fitoquelatina, e sua biossíntese é regulada por enzimas constitutivas do ciclo da glutatona (WELCH; SHUMAN, 1995). Além disso, o Fe pode estar ligado a citrato férrico, ATP e a enzimas como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (HARRISON; AROSIO, 1996).

O caminho do Fe até onde se inicia pelo apoplasto das células epidermais da raiz; e sob condições aeróbicas, parte desse Fe é oxidado e precipita como hidróxido ou sal fosfato, formando um “pool” de Fe no apoplasto (HELL; STEPHAN, 2003). Esse estoque de Fe no apoplasto corresponde a mais de 95% do Fe na raiz, que pode ser utilizado em casos de deficiência de Fe (HELL; STEPHAN, 2003). Uma vez que o Fe entrou na raiz, inicia-se seu caminho via simplasto, dependente de um sistema de transportador de membrana de alta afinidade por Fe, e para isso as plantas reduzem o Fe<sup>3+</sup>-quelatos a Fe<sup>2+</sup> (CURIE; BRIAT, 2003).

O transporte radial do Fe a partir da epiderme da raiz até os vasos do xilema é realizado pela via simplástica, via Fe<sup>2+</sup>-nicotianamina (STEPHAN et al., 1996; HELL; STEPHAN, 2003). O transporte pelo xilema é realizado pelo complexo Fe-ácido cítrico (citrato) e afetado pelo pH e o gradiente de potencial da água (WELCH; SHUMAN, 1995; CURIE; BRIAT, 2003; KIM; GUERINOT, 2007). O pH do xilema na maioria das plantas varia de 5,4 a 6,5 e é determinado pelos exsudatos da raiz, pelo vácuo de extração dos nutrientes do solo pelas raízes ou pela pressão de transpiração da parte aérea (WELCH; SHUMAN, 1995). No mesofilo das folhas, onde ocorre o processo de fotorredução, o Fe é liberado do complexo com o ácido cítrico e absorvido através da membrana das células (WELCH; SHUMAN, 1995).

No floema, o Fe pode estar ligado à ácidos orgânicos ou aminoácidos. Scholz (1989) relatou que a nicotianamina foi essencial para o transporte de Fe na seiva do floema do tomateiro mutante *chloronerva* (mutante defectivo constitutivo em produção da nicotianamina), até o sistema radicular para formação de novas raízes adventícias. O transporte no floema é influenciado pela força iônica, pH e constituintes orgânicos. A seiva do floema sofre pressão positiva do gradiente de potencial da água e suas células são vivas e metabolicamente ativas, ao contrário do xilema (WELCH; SHUMAN, 1995; CURIE; BRIAT, 2003). O pH da seiva do floema é geralmente maior de oito e contém maiores concentrações de soluto que o xilema; e a força iônica corresponde principalmente a sacarose e K<sup>+</sup> (WELCH; SHUMAN, 1995).

Após percorrer todo o caminho de vasos pela planta, o Fe entra nas células das folhas e é direcionado a diversas organelas, como a mitocôndria e o cloroplasto, que contém mais de 80% do Fe das folhas com sua importante função na fotossíntese; e o excesso de Fe é direcionado ao vacúolo (CURIE; BRIAT, 2003; HÄNSCH;



MENDEL, 2009; THOMINE; VERT, 2013). As proteínas ligantes ao Fe podem ser definidas em quatro tipos (Figura 2.1), dependendo do tipo de ligante de Fe: proteínas mononuclear de Fe, proteínas diferro carboxiladas, proteínas com aglomerados de ferro-enxofre (Fe-S) e proteínas contendo Fe-heme (SZACILOWSKI; CHMURA; STASICKA, 2005; HÄNSCH; MENDEL, 2009).

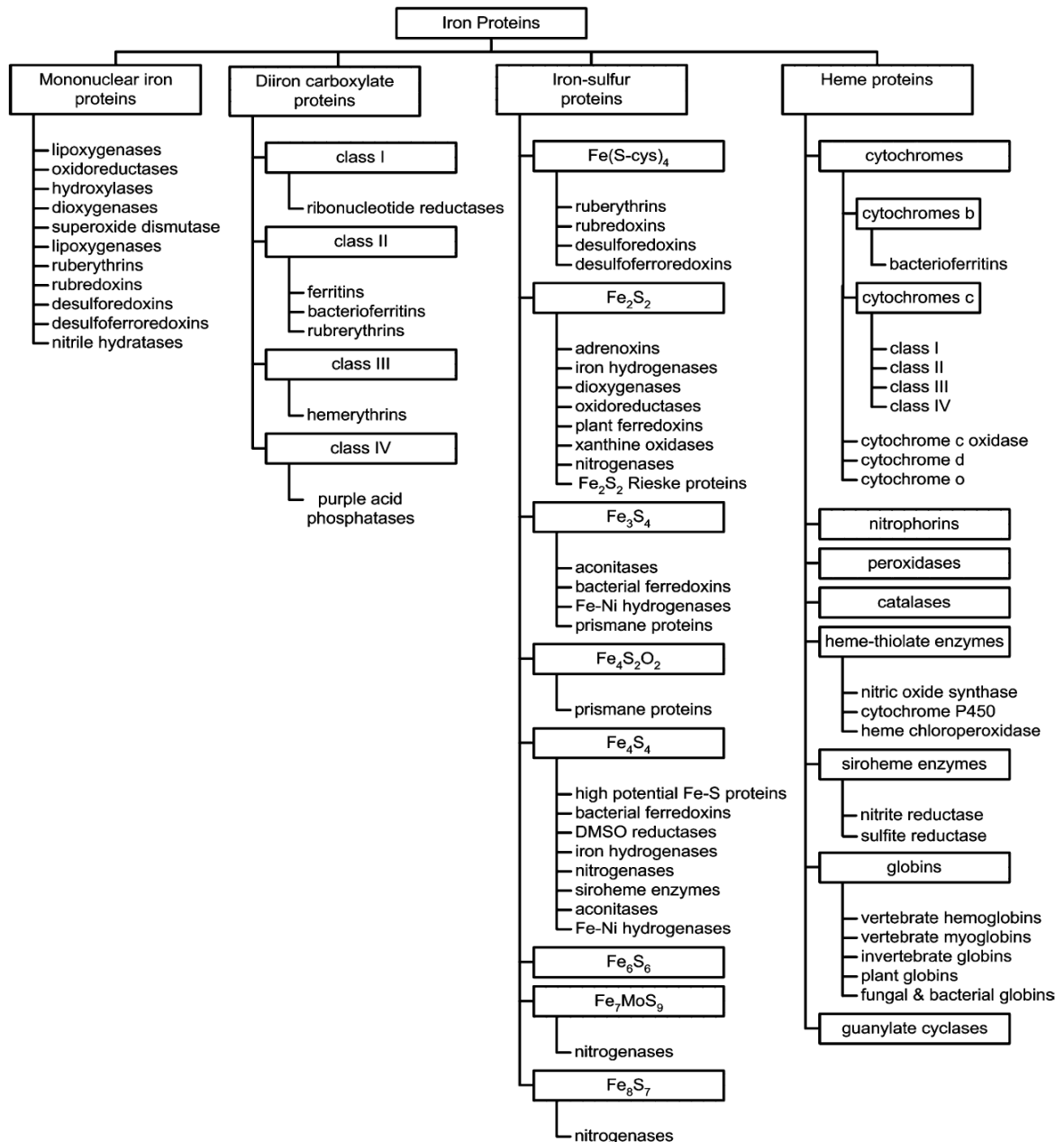


Figura 2.1. Classificação das principais proteínas contendo Fe (SZACILOWSKI; CHMURA; STASICKA, 2005).

As proteínas Fe-S têm funções cruciais na transferência de elétrons, que constituem parte do substrato dos sítios de ligação em enzimas, formam partes de armazenamento de ferro, estão envolvidas na regulação da transcrição e tradução e podem controlar a estrutura de proteínas (HÄNSCH; MENDEL, 2009). Portanto, as proteínas Fe-S têm funções como enzimas, carreadoras de elétrons (ferredoxina, Figura 2.2) e como regulador de proteínas (HÄNSCH; MENDEL, 2009). Esses aglomerados são formados de sulfeto e ferro inorgânico, e podem formar-se espontaneamente *in vitro* sob condições anaeróbicas; nas células, são formadas nas mitocôndrias (HÄNSCH; MENDEL, 2009; THOMINE; VERT, 2013).

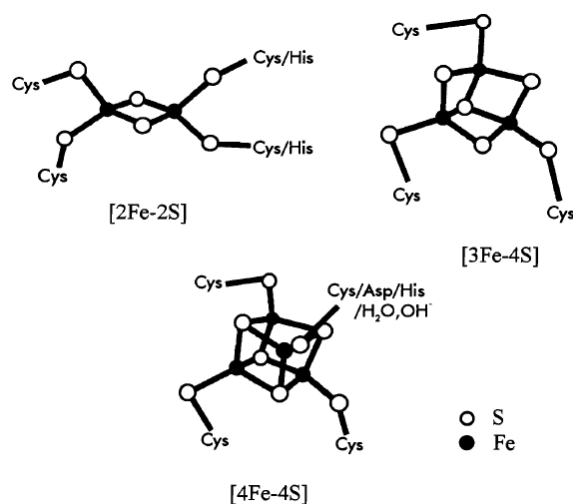


Figura 2.2. Estruturas básicas dos agregados [Fe-S] em ferredoxinas (Fd) (RODRIGUES, 1999).

Fe-heme proteínas mais conhecidas são os citocromos fotossintéticos e respiratórios, envolvidos na transferência de elétrons e na ligação com oxigênio (HÄNSCH; MENDEL, 2009). Outros exemplos incluem as enzimas antioxidantes catalase, peroxidase e NADPH oxidase, envolvidas na produção/eliminação de radicais livres. Essas proteínas são sintetizadas tanto nas mitocôndrias quanto nos cloroplastos, e são distribuídas em todos os locais subcelulares (HÄNSCH; MENDEL, 2009; THOMINE; VERT, 2013).

Nas outras proteínas os íons de Fe estão ligados diretamente, e dentre essas proteínas, as predominantes são as ferritinas (Figura 2.3). As ferritinas são proteínas de armazenamento de Fe e controlam a interação entre homeostase de Fe e o

estresse oxidativo (HÄNSCH; MENDEL, 2009; YRUELA, 2013). Essas proteínas tem alta massa molecular e podem estocar mais de 4500 átomos de Fe na forma solúvel e biodisponível. Estão presentes nos plastídeos, mas não em cloroplastos maduros (HÄNSCH; MENDEL, 2009).

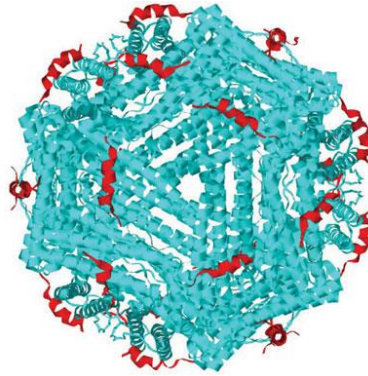


Figura 2.3. Estrutura tridimensional da ferritina de plantas, sendo as estruturas em vermelho peptídeos que atuam como reguladores da liberação do ferro e o centro da proteína um poro pelo qual as moléculas de Fe ficam armazenadas (LIAO; YUN; ZHAO, 2014).

Nos cloroplastos, o Fe tem papel na fixação fotossintética de CO<sub>2</sub>, pois é essencial para a estrutura e/ou na função da cadeia de transferência de elétrons, onde é encontrado nos três grandes complexos do aparelho fotossintético. Dois átomos de Fe estão presentes no fotossistema II (PSII): um Fe não-heme é rodeado por quatro histidinas e um bicarbonato, e o segundo Fe-heme está presente no citocromo b559 (BRIAT; DUBOS; GAYMARD, 2015). Esse fotossistema II é responsável pela oxidação da água e redução da plastoquinoma, onde ocorre a transformação da luz em energia eletroquímica (YRUELA, 2013). O complexo citocromo b6f (b6f Cyt) fornece a conexão eletroquímica entre os centros de reação PSII e PSI, e contém quatro átomos de Fe-heme e dois átomos de Fe no aglomerado da proteína Rieske (2Fe-2S) (YRUELA, 2013; BRIAT; DUBOS; GAYMARD, 2015). No fotossistema I (PSI) encontram-se três aglomerados de Fe-S (4Fe-4S): um aglomerado (2Fe-2S) encontra-se na ferredoxina solúvel e sua principal função é carregar um elétron do complexo PSI-(Fe-S) para a ferredoxina-NADP + redutase (FNR), que é o primeiro receptor de elétrons no lado do estroma dos cloroplastos (YRUELA, 2013; BRIAT; DUBOS; GAYMARD, 2015). Esses aglomerados estão incorporados nas membranas dos tilacóides, e suas subunidades são codificadas no genoma do cloroplasto e no

nuclear, e geram um potencial redox altamente negativo (YRUELA, 2013). Os dois complexos fotossintéticos contêm clorofilas, cuja síntese também depende do Fe (BRIAT; DUBOS; GAYMARD, 2015) (Figura 2.4).

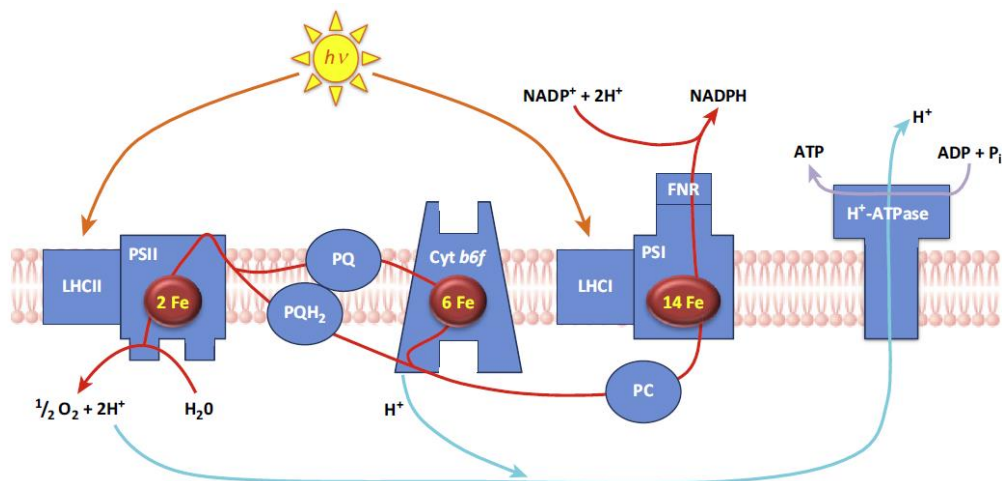


Figura 2.4. Os átomos de Fe nos fotossistemas (PSII e PSI) do cloroplasto (BRIAT; DUBOS; GAYMARD, 2015).

### 2.3. As respostas da planta à deficiência de Fe

Na maioria dos solos, a concentração total de Fe solúvel na rizosfera é quase sempre abaixo do nível necessário para o crescimento adequado das plantas (FAGERIA; BALIGAR; CLARK, 2002; MARSCHNER, 2011). Um dos sintomas da carência de Fe é a clorose internerval, a qual aparece principalmente em folhas jovens (Figura 2.5). Em casos severos de deficiência, as folhas podem se tornar bastante cloróticas devido à diminuição da produção de clorofila, reduzindo inclusive a capacidade fotossintética da planta (BIENFAIT, 1985; BRIAT; DUBOS; GAYMARD, 2015).

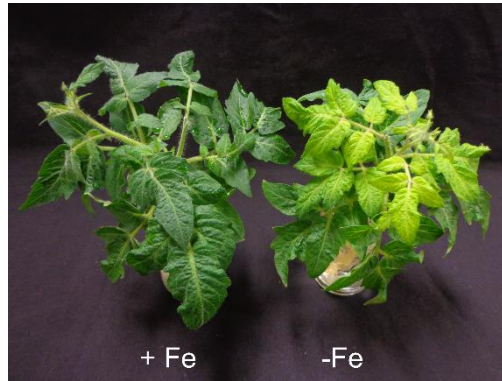


Figura 2.5. Tomateiro jovem (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom) com sintomas de deficiência de Fe nas folhas mais novas.

Dessa forma, não é surpresa que uma série de mudanças bioquímicas é induzida durante a deficiência de Fe. Por exemplo, a redução dos níveis de ferredoxina pode causar um decréscimo na assimilação do nitrogênio nos tecidos visto que esta proteína atua como um doador de elétrons para a redução do nitrito a amônia (BEEVERS; HAGEMAN, 1969; MENDEL; KRUSE, 2012). Além disso, a deficiência de Fe desencadeia alteração no sistema oxidativo. Nesta condição, o aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) pode resultar na indução de importantes enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (ASENSIO et al., 2012).

Deste modo, as raízes das plantas desenvolveram várias estratégias para modificar o ambiente em torno da rizosfera visando aumentar e absorver quantidades suficientes de Fe para atender suas exigências metabólicas, mesmo em solos com baixos níveis de Fe solúvel (WELCH; SHUMAN, 1995). Tais mecanismos são conhecidos como “Estratégias”, sendo a Estratégia I (Figura 2.6) a mais caracterizada para dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramíneas (COLANGELO; GUERINOT, 2004; ROMERA et al., 2011; GARCÍA et al., 2015). Este mecanismo consiste em três principais etapas: (i) acidificação da rizosfera pela liberação de prótons  $H^+$  através da  $H^+$ -ATPase das raízes, aumentando a disponibilidade de Fe no solo através do aumento da solubilidade do  $Fe^{3+}$ ; (ii) indução da redutase férrica, uma importante enzima que atua na redução do  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  na superfície da raiz (GARCÍA et al., 2011, 2015), pois o  $Fe^{2+}$  é a forma catiônica mais absorvida pelas raízes das plantas, e a absorção do  $Fe^{3+}$  é quase insignificante (LINDSAY; SCHWAB, 1982; WELCH;

SHUMAN, 1995); e (iii) transporte de  $\text{Fe}^{+2}$  para células da raiz através da indução de transportadores específicos de Fe (WELCH; SHUMAN, 1995; ROMERA et al., 2011).

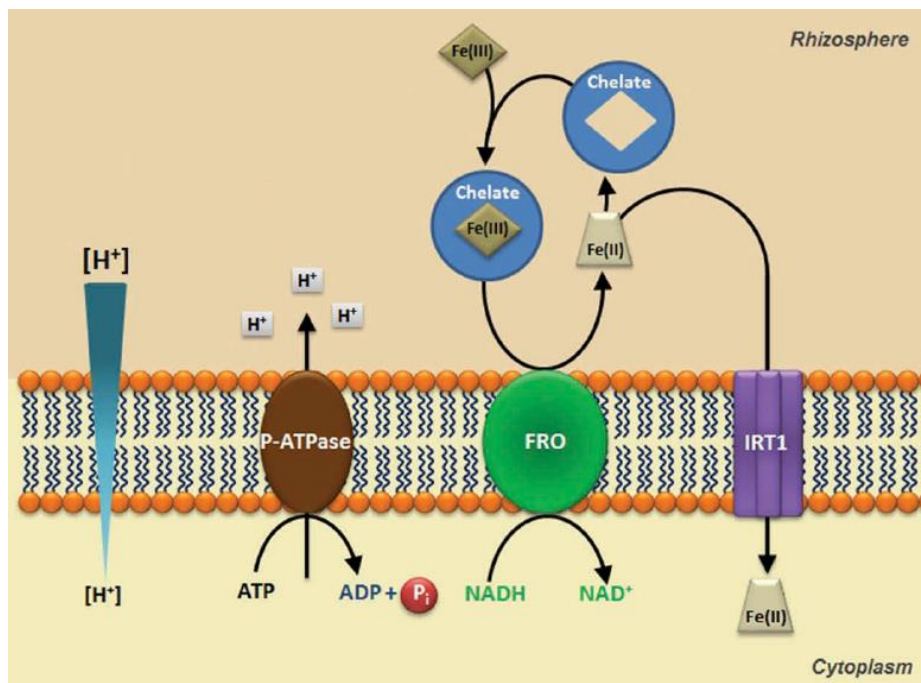


Figura 2.6. Esquema do mecanismo da Estratégia I em plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramíneas, mostrando a absorção do Fe na rizosfera (KROHLING et al., 2016).

Nesse processo, os dois genes dominantes e responsáveis pela aquisição do Fe na rizosfera foram descritos em *Arabidopsis* nos anos 1990, sendo eles o gene da redutase férrica ou ferro-redutase (FRO) e do gene transportador de ferro (IRT1) (KOBAYASHI; NISHIZAWA, 2012). Desde então, esses genes foram clonados e descritos em diferentes espécies. Além disso, mudanças morfológicas, como o desenvolvimento de maior quantidade de pêlos radiculares e aumento de tamanho das células de transferência, são também importantes respostas que facilitam a mobilização e absorção do Fe (ROMERA et al., 2011).

Em *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* L.) foi descrito o gene *AtFRO2* que codifica a redutase férrica (ROBINSON et al., 1999) e seu homólogo *SIFRO1* em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) (LI; CHENG; LING, 2004); bem como os genes *AtIRT1* (EIDE et al., 1996), *SIIRT1* (ECKHARDT et al., 2001) e *SIITR2* (VERT et al., 2001), os quais codificam o transportador de Fe. Ambos os mecanismos são regulados por fatores de transcrição, bHLH, conhecidos como AtFIT, AtbHLH38 e

AtbHLH39 em *Arabidopsis*, e SIFER em tomateiro (BRUMBAROVA; BAUER, 2005), ativados em condições de deficiência de ferro. Além disso, a exploração de genes para H<sup>+</sup>-ATPase, tal como *AHA2* (FOX; GUERINOT, 1998) e o *AHA7* (COLANGELO; GUERINOT, 2004) em *Arabidopsis* também são importantes nos estudos que envolvem a limitação de Fe.

Já a Estratégia II é específica de gramíneas, como milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum spp.*), cevada (*Hordeum vulgare*), entre outras. Essa Estratégia consiste em duas etapas: (i) primeiro, um transportador de membranas específico (TOM1) exporta um fitosideróforo (PS) para a rizosfera para solubilizar e quelatar íons de Fe<sup>3+</sup>, sendo os principais fitosideróforos os ácidos muginéico e avênico, assim como a nicotianamina; (ii) o complexo Fe<sup>3+</sup>/PS é transportado para o interior da membrana da raiz através de uma proteína chamada Yellow Strip 1 (YS1) em milho e Yellow Stripe 1-like (YSL) para as outras gramíneas (NARANJO ARCOS; BAUER, 2016).

Embora haja um melhor conhecimento das bases bioquímicas e moleculares através do qual as plantas respondem à deficiência de Fe, os mecanismos de controle dessas repostas parecem ainda ser bastante complexos, visto o envolvimento de uma série de moléculas. Por exemplo, fortes evidências mostram que os fitormônios são importantes fatores que modulam as respostas a limitação de Fe, sendo a auxina e o etileno as classes hormonais melhores caracterizadas.

### **2.3.1. Auxina e deficiência de Fe nas plantas**

Em um dos trabalhos pioneiros, no que diz respeito ao controle hormonal das respostas à limitação de Fe, Römheld e Marschner (1986) relataram que as raízes de plantas de girassol com deficiência de Fe produziram maiores quantidades de auxina comparadas às plantas não deficientes. Além do fato que a aplicação exógena deste hormônio pôde induzir mudanças morfológicas nas raízes, semelhantes àquelas em condição de deficiência deste elemento. Em trabalhos mais recentes, a deficiência de Fe em *Arabidopsis* (CHEN et al., 2010) e maçã (*Malus sp*) (WU et al., 2011) também induziu a produção de auxina, evidenciando o forte controle deste hormônio nas respostas à carência de Fe. De fato, o mutante *aux1-7* de *Arabidopsis*, o qual apresenta baixa sensibilidade à auxina, diminuiu a atividade da redutase férrica na

ausência de Fe (CHEN et al., 2010). De acordo com isto, em plantas de maçã, a redutase férrica foi induzida na concomitante presença de auxina e ausência de Fe (WU et al., 2011).

Wu et al. (2012) relataram que tanto a auxina quanto o óxido nítrico (NO) acumularam em maiores níveis em plantas deficientes em Fe, sendo que ambas moléculas estão sendo descritas como controlando o início das adaptações da Estratégia I nas plantas. O NO atua como controle positivo do fator de transcrição FIT para desencadear as respostas à deficiência de Fe (MEISER; LINGAM; BAUER, 2011). Enquanto que a elevação dos níveis de auxina são necessários para a regulação da síntese de NO sob deficiência de Fe (JIN et al., 2011). Portanto, a auxina regularia a produção e concentração de NO, que por sua vez regularia a transcrição de FIT no núcleo da célula, de forma a desencadear a cascata de sinalização à deficiência de Fe (LIN et al., 2016).

### 2.3.2. Etileno e deficiência de Fe nas plantas

Diversos trabalhos demonstram que o etileno é parte fundamental das respostas à deficiência de Fe. Foi mostrado que o uso deste hormônio exógeno em tomateiro (SCHMIDT; TITTLE; SCHIKORA, 2000) e ervilha (*Pisum sativum* L.) (SCHMIDT; SCHIKORA, 2001) induziu respostas adaptativas da raiz semelhantes àquelas observadas na ausência de Fe. Em pepino (*Cucumis sativus*) e ervilha, a deficiência de Fe induziu a produção de etileno concomitante ao aumento da redução do  $Fe^{+3}$  (ROMERA et al., 1999); bem como o uso de inibidores da síntese de etileno reduziu a atividade desta enzima em plantas de ervilha (KABIR et al., 2012). De acordo com esses dados, o uso etileno exógeno em tomateiro induziu a expressão do gene *SIFRO1*, o qual codifica para a redutase férrica (LUCENA et al, 2006). Além disso, o uso de inibidores de etileno, na ausência de Fe, reduziu a expressão de *SIFRO1*.

O aminoácido metionina (Met) é o precursor do etileno, que por sua vez é convertido em S-adenosilmetionina (AdoMet) pela enzima AdoMet sintase (SAMS), e em 1-aminociclopropano-e-carboxílico (ACC) pela enzima ACC sintase (ACS), sendo o ACC oxidado a etileno pela enzima ACC oxidase (ACO) (KENDE, 1993; SAUTER et al., 2013). Os genes que codificam essas enzimas, SAMS, ACS e ACO, são mais



expressos em condições de deficiência de Fe (ROMERA et al., 2015). Além da rota da síntese, a deficiência de Fe pode ter efeito nas respostas do etileno na planta, através da ligação da molécula ao receptor; uma vez que os genes desses receptores podem estar mais expressos ou não quando ocorre a falta do nutriente (GARCÍA et al., 2015).

### **2.3.3. Interação entre auxina e etileno nas plantas**

Auxina e etileno regulam diversas etapas do crescimento e desenvolvimento da planta, tanto alterações fisiológicas como moleculares (STEPANOVA et al., 2007). Tais fitormônios apresentam efeitos sinérgico da regulação do alongamento radicular, formação dos pelos radiculares e crescimento da planta (SWARUP et al., 2007), bem como na absorção de nutrientes pelo sistema radicular (GARCÍA et al., 2015). Há também fortes indícios da interação entre auxina e etileno na regulação das respostas à deficiência nutricional, dentre elas o Fe. Dentre os quais a regulação de um fator de transcrição FER, em tomateiro, o qual é responsável por ativar as resposta da Estratégia I (LIN et al., 2016), sendo regulado tanto por etileno quanto por auxina (GARCÍA et al., 2015).

Além da interação entre fitormônios, a auxina e as ERO geralmente acumulam-se nas raízes sob deficiência de nutrientes e podem interagir positivamente com o etileno para regular respostas de deficiência nutricional (GARCÍA et al., 2011). A auxina pode estimular a produção do etileno, e o etileno pode afetar o transporte e o acúmulo de auxina, assim como as ERO podem estimular a produção de etileno (GARCÍA et al., 2015). De acordo com Piotrowska- Niczyporuk e Bajguz (2014), a auxina promoveu o aumento da atividade de enzimas antioxidantes, reguladas pelos níveis das ERO. Contudo, o etileno promoveu o aumento da peroxidação lipídica e diminuição da atividade das enzimas antioxidantes em pereira (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) (LIU et al., 2015).

## 2.4. As enzimas antioxidantes relacionadas ao Fe

Enquanto o oxigênio molecular tem baixa reatividade dentro da célula, as formas parcialmente reduzidas de oxigênio atmosférico, chamadas de ERO, podem reagir com muitas substâncias celulares e são potencialmente destrutivas para as células (SCANDALIOS; GUAN; POLIDOROS, 1997; RIZHSKY et al., 2002; GRATÃO et al., 2005). Em condições ambientais adequadas às plantas, essas ERO são produzidas naturalmente em baixas concentrações e estão envolvidas na sinalização celular, como reguladoras da expressão gênica (SCANDALIOS; GUAN; POLIDOROS, 1997; RIZHSKY et al., 2002). Porém, quando as plantas passam por estresses ambientais como alta intensidade de luz, ataque de patógenos, seca, alagamento, salinidade e altas concentrações de metais pesados, ocorre aumento dessas ERO nas células podendo causar danos às proteínas, aos lipídios de membranas e aos ácidos nucleicos (YU; RENGEL, 1999). Além desses fatores de estresse, a deficiência nutricional também pode modular a atividade das enzimas antioxidantes envolvidas no processo detoxificação das células (YU; RENGEL, 1999; ASENSIO et al., 2012).

Para diminuir os danos dessas ERO nas células, as plantas possuem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutatona redutase (GR), e compostos antioxidantes de baixa massa molecular como o ascorbato, tocoferol, glutatona e carotenóides (YU; RENGEL, 1999; CHOUDHURY et al., 2013).

### 2.4.1. Superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1)

A superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima de defesa contra danos provocados por ERO nas células, sendo largamente distribuída entre os organismos que utilizam oxigênio ( $O_2$ ) (BOWLER et al., 1994; LIN; LAI, 2013). A SOD é responsável pela dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$ , influenciando as suas concentrações. Os radicais  $O_2^{\bullet-}$  são produzidos naturalmente nas células, principalmente na cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias e nos cloroplastos (RIZHSKY et al., 2002). Durante a respiração, o oxigênio molecular aceita quatro elétrons para produzir duas moléculas de  $H_2O$ . No entanto, devido à restrições de rotação da molécula, o  $O_2$

não consegue aceitar os quatro elétrons de uma só vez. Assim, durante a redução de um-elétron do  $O_2$ , intermediários instáveis são formados, dentre eles  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^{\bullet}$  (SCANDALIOS; GUAN; POLIDOROS, 1997; GRATÃO et al., 2005) (Figura 2.7). Nos cloroplastos, estima-se que entre 10 e 20% dos elétrons que fluem através dos fotossistemas podem reduzir o  $O_2$  a  $O_2^{\bullet-}$  (SCANDALIOS; GUAN; POLIDOROS, 1997).

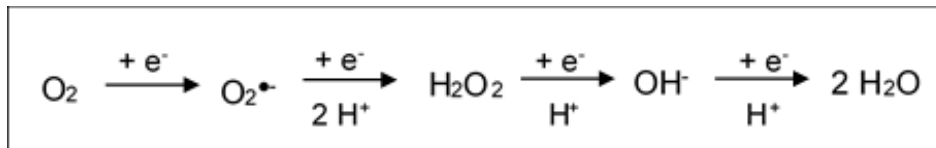


Figura 2.7. Via da redução do oxigênio até água e a formação de várias ERO intermediárias (adaptado de SCANDALIOS; GUAN; POLIDOROS, 1997).

A SOD é uma enzima que possui cofatores metálicos no seu centro de reação e é classificada de acordo com esses metais. A Mn-SOD localiza-se nas mitocôndrias e peroxissomos, possui massa molecular que varia de 40 a 90 kDa, dependendo da origem, e um número de subunidades entre dois e quatro, com um a quatro átomos de Mn por molécula (CORPAS et al., 2006; HOUMANI et al., 2016). A Fe-SOD está associada aos cloroplastos e peroxissomos, tendo massa molecular de aproximadamente 40 kDa, com um ou dois átomos de Fe por molécula (ALMANSA et al., 1991; CORPAS et al., 2006; HOUMANI et al., 2016). A Cu/Zn-SOD encontrada no citosol, cloroplastos, peroxissomos e apoplasto (HOUMANI et al., 2016), é a isoenzima mais estudada em plantas, com uma massa molecular de cerca de 32 kDa, que consiste em duas subunidades idênticas e um átomo de Cu e um de Zn por subunidade (PALMA et al., 1997; HOUMANI et al., 2016). Já a Ni-SOD foi descrita apenas em *Streptomyces* e cianobactérias (BAFANA et al., 2011). A reação global da SOD é realizada em duas etapas pelos cofatores metálicos (Figura 2.8).

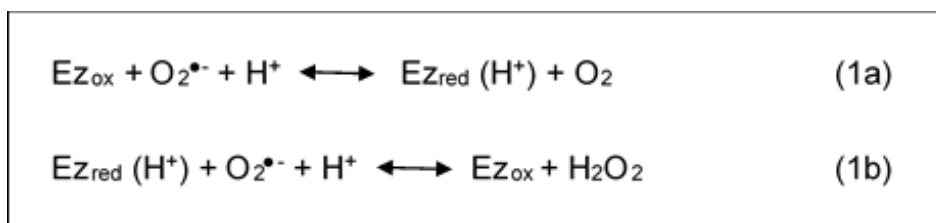


Figura 2.8. Reação global da SOD em duas etapas (MILLER, 2004).

Onde  $E_{Z_{ox}}$  (oxidado) e  $E_{Z_{red}}$  (reduzido) são os cofatores metálicos, respectivamente:  $Cu^{2+}Zn^{2+}$  e  $Cu^+Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  e  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{3+}$  e  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{3+}$  e  $Ni^{2+}$  (MILLER, 2004). Em trabalho desenvolvido por Yu e Rengel (1999), a atividade da SOD foi alterada na deficiência dos cofatores metálicos.

#### **2.4.2. Catalase (CAT – EC 1.11.1.6)**

A catalase (CAT) está presente em todas as plantas estudadas até o momento, e é uma enzima fundamental no sistema antioxidante das células por converter o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (SCANDALIOS; GUAN; POLIDOROS, 1997; GRATÃO et al., 2005). O  $H_2O_2$  pode-se difundir através das membranas biológicas, ao contrário dos radicais de oxigênio, e causar danos oxidativos longe do local de formação (SCANDALIOS; GUAN; POLIDOROS, 1997). A CAT é a única entre as enzimas degradantes de  $H_2O_2$  que não consome equivalentes redutores celulares e possui um mecanismo muito eficiente para remover o  $H_2O_2$  formado nas células sob condições de estresse através do seu grupo heme que possui atividade catalítica (MALLICK; MOHN, 2000; CHELIKANI; FITA; LOEWEN, 2004).

O  $H_2O_2$  é produzido em várias organelas subcelulares, dentre elas: nos peroxissomos, cloroplastos, na mitocôndria e outros compartimentos de menor produção (SCANDALIOS; GUAN; POLIDOROS, 1997; GRATÃO et al., 2005). Os peroxissomos são as organelas que mais produzem o  $H_2O_2$  nas células, através de oxidases, envolvidas na oxidação catabólica de várias biomoléculas, que removem dois elétrons do substrato e transferem para o  $O_2$ , formando o  $H_2O_2$  (SCANDALIOS; GUAN; POLIDOROS, 1997; SOFO et al., 2015). Em sementes de plantas, os peroxissomos são conhecidos como “peroxissomos especializados” ou glioxissomos, encontrados nos tecidos que armazenam óleo. Eles estão associados ao ciclo do glioxalato durante a germinação, onde os ácidos graxos são convertidos em hidratos de carbono até a planta estar fotossinteticamente competente; porém, esse ciclo gera  $H_2O_2$  (SCANDALIOS; GUAN; POLIDOROS, 1997). Na mitocôndria, a produção de  $H_2O_2$  está associada à respiração e depende diretamente ao estado metabólico dessa organela. Quanto maior o metabolismo e o fluxo de elétrons na cadeia respiratória,

maior será a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Estima-se que 2% de  $\text{O}_2$  utilizado pelas mitocôndrias é convertido a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , através da SOD, que por sua vez é inativado pela CAT específica de mitocôndrias (SCANDALIOS; GUAN; POLIDOROS, 1997; SOFO et al., 2015). Outras organelas como o retículo endoplasmático e no citosol podem apresentar quantidades pequenas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que podem ser inativadas através da catalase encontrada no citosol (SCANDALIOS; GUAN; POLIDOROS, 1997). Apesar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  ser altamente danoso às células em altas concentrações, essa molécula também é descrita como tendo funções importantes na planta, incluindo rotas de sinalização de transdução de sinais, lignificação da parede celular e na defesa contra o ataque de patógenos (SCANDALIOS; GUAN; POLIDOROS, 1997; KRISHNAMURTHY; RATHINASABAPATHI, 2013).

A CAT atua tanto nas reações peroxidativas como nas catalíticas. Em baixas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $<10^{-6}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ), a CAT atua como peroxidativa, onde uma variedade de doadores de oxigênio, como etanol e ácido ascórbico, pode ser oxidado. Em altas concentrações de substrato, a CAT decompõe o  $\text{H}_2\text{O}_2$  tóxico rapidamente usando a função catalítica, na qual o  $\text{H}_2\text{O}_2$  atua tanto como receptor e doador de hidrogênio (SCANDALIOS; GUAN; POLIDOROS, 1997; CHELIKANI; FITA; LOEWEN, 2004) (Figura 2.9).

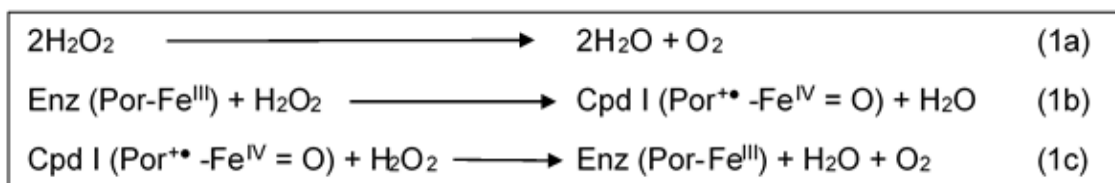


Figura 2.9. Reação global da CAT: 1a. reação global, 1b. uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxida a enzima catalase que contém um grupo heme (porfirina = Por), 1c. a segunda molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é utilizada como redutor do composto I (Cpd I) para regenerar a enzima e produzir água e oxigênio (CHELIKANI; FITA; LOEWEN, 2004).

Há evidências que a CAT utiliza um mecanismo de dois estágios nos dois tipos de reações: no primeiro estágio, o ferro do grupo heme da CAT interage com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  para formar um peróxido de ferro rico em  $\text{O}_2$ . Este peróxido de Fe intermediário (CAT-Fe-OOH) altera as propriedades heme da CAT e serve como indicador celular das concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que em baixas concentrações pode ser reduzido por uma

variedade de doadores de hidrogênio como o etanol. Em elevadas concentrações de  $H_2O_2$ , o peróxido de Fe intermediário reage com uma segunda molécula de  $H_2O_2$  para produzir água e uma molécula de  $O_2$  (SCANDALIOS; GUAN; POLIDOROS, 1997; CHELIKANI; FITA; LOEWEN, 2004).

Existem três tipos distintos de isoenzimas de CAT identificadas: CAT1, CAT2 e CAT3. Em plantas, a CAT1 é encontrada nas células do mesofilo e está mais ativa em folhas, mas não nas raízes; já a CAT2 está localizada no interior dos peroxissomos e seus genes são expressos somente em tecidos foliares sob luz; a CAT3 e seus genes são expressos também em tecidos foliares, raízes, caules e sementes (SU et al., 2014; IANNONE; GROPPA; BENAVIDES, 2014).

Estudos realizados por Tillberg (1977) mostra os efeitos de auxina (AIA) na expressão do gene da catalase em milho durante a germinação. Os resultados mostraram que o AIA aumenta a expressão da CAT em todas as fase do desenvolvimento examinados. Isto implica que o AIA pode desempenhar um papel no controle da expressão da CAT em milho durante a germinação de sementes.

#### **2.4.3. Ascorbato peroxidase (APX – EC 1.11.1.11)**

Em células vegetais, o substrato redutor mais importante para a destoxificação de  $H_2O_2$  é ascorbato (FOYER; NOCTOR, 2005). A ascorbato peroxidase (APX) catalisa a reação em que duas moléculas de ascorbato são oxidadas para reduzir uma molécula de  $H_2O_2$  a água ( $2 \text{ ascorbatos} + H_2O_2 \rightarrow 2 \text{ monodehidroascorbato} + 2 H_2O$ ) (SHARP et al., 2003). A regeneração de ascorbato envolve a oxidação de glutathiona reduzida, que por sua vez é regenerado por ação da glutathiona redutase (GR), constituindo o Ciclo da Ascorbato-Glutathiona (MEHLHORN, 1990; RAMÍREZ; BARTOLI; LAMATTINA, 2013). De acordo com Mittler (2002), a afinidade da APX pelo  $H_2O_2$  sugere que ela é responsável pela modulação fina das ERO para a sinalização celular.

A APX possui cinco diferentes isoformas que estão distribuídas em pelo menos quatro compartimentos celulares distintos: nos cloroplastos, microcorpos e citosol (GRATÃO et al., 2005). As diferentes isoformas são classificadas de acordo com sua localização celular entre: isoformas solúveis que estão distribuídas no citosol (cAPX),

mitocôndria (mitAPX) e estroma do cloroplasto (sAPX), e as isoformas relacionadas a membranas que são encontradas em microcorpos (mAPX) e nos tilacóides do cloroplastos (tAPX) (TEIXEIRA et al., 2006). Em tomateiro, foram identificadas sete genes que codificam a APX, que estão distribuídas em citosol, peroxissomos e cloroplastos (NAJAMI et al., 2008).

A estrutura da enzima APX corresponde a resíduos de aminoácidos e um complexo de porfirina central, que contém um átomo de Fe, por isso é considerada como uma heme proteína (PEKKER; TEL-OR; MITTLER, 2002; SHARP et al., 2003; RAVEN, 2003) (Figura 2.10).

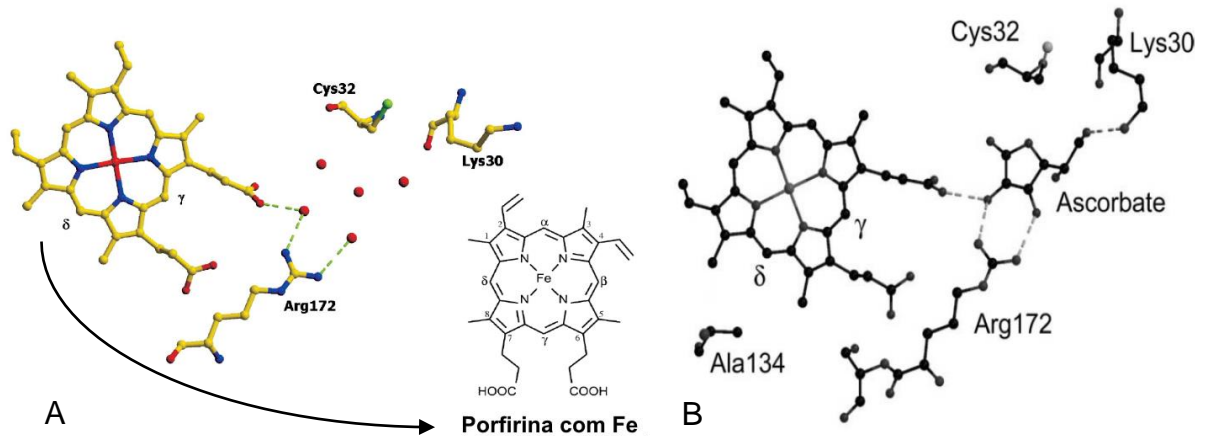


Figura 2.10. Estrutura da APX: A. estrutura da porfirina com um átomo central de Fe e suas ligações com os resíduos de aminoácidos. B. ligação do ascorbato com a enzima APX (adaptado de RAVEN, 2003).

MEHLHORN (1990) realizou um experimento com plantas de feijão e ervilha e pré-tratamento com etileno e observou que esse pré-tratamento fizeram com que as plantas se tornassem mais resistente à fumigação com ozônio. Além disso, concluiu que essa maior resistência das plantas seria pela maior atividade da APX contra o  $H_2O_2$  que aumentou de concentração quando as plantas eram expostas ao ozônio.

## 2.5. O tomateiro Micro-Tom e seus mutantes como modelos biológicos de estudos

O tomateiro tem sido um excelente modelo vegetal complementar à *Arabidopsis* para estudos dos processos biológicos. Isso porque o tomateiro possui

um genoma relativamente pequeno ( $7,1 \times 10^8$  pares de bases), e poucas sequências repetitivas de DNA (LIMA et al., 2004), características que facilitam o conhecimento das estruturas genômicas. Além disso, seus diversos tecidos apresentam uma grande diversidade de metabólitos secundários que facilitam análises bioquímicas e moleculares, o que coloca o tomateiro como um modelo adicional de dicotiledônea em estudos comparativos (PRATT et al., 1997). Diferentemente da *Arabidopsis*, o tomateiro é uma espécie hortícola amplamente cultivada em diversos países, com grande valor agregado e importância econômica.

Um fator limitante para o uso do tomateiro como modelo de estudos vegetais é seu porte grande e ciclo de vida longo que não permitem o cultivo em condições de estrutura mínima como a *Arabidopsis*. Uma alternativa a esse problema é a cultivar miniatura de tomateiro Micro-Tom (MT), uma planta ornamental de porte muito reduzido (SCOTT; HARBAUGH, 1989), que produz frutos e sementes viáveis em vasos de apenas 50-100 mL de substrato, completando seu ciclo de vida entre 70 e 90 dias, podendo crescer em laboratório na mesma estrutura mínima requerida para *Arabidopsis* (LIMA et al., 2004) (Figura 2.11). Em 1997, Meissner et al. propôs a utilização dessa cultivar como modelo de estudos genéticos, e a partir de então diversos trabalhos foram publicados com essa cultivar em estudos genéticos, fisiológicos e bioquímicos.



Figura 2.11. Cultivar Micro-Tom de tomateiro em vasos de 100 mL de substrato e seus frutos.

Além disso, já foram introgrididas diversas mutações hormonais nessa cultivar MT, o que possibilitam os estudos com mutantes hormonais (CARVALHO et al., 2011; MONTEIRO et al., 2012). Os fitormônios vegetais, ou fitormônios, são de grande



importância para regular o desenvolvimento da plantas desde a divisão, expansão e diferenciação celular até amadurecimento de frutos e senescência foliar (ZHANG et al., 1996; BALBI; LOMAX, 2003). Ao mesmo tempo, os fitormônios regulam um processo coordenado de desenvolvimento da planta em condições de estresse, possuindo uma rede de interação entre eles que integram as respostas celulares e as vias de sinalização (GRATÃO et al., 2012). Diversos estudos apontam que os fitormônios (auxina, etileno, ácido jasmônico, ácido salicílico e ácido abscísico) relacionados aos estresses bióticos e abióticos controlam os mecanismos de defesa nos diversos tecidos (BLANCO-ULATE et al., 2013).

Neste contexto, o uso dos mutantes hormonais é uma importante ferramenta de estudo de um fitormônio específico (MUÑOZ-ESPINOZA et al., 2015), ou de interações entre eles, nos duplos mutantes, quando submetidos a um estresse. Dentre os estresses abióticos mais comuns, a deficiência nutricional é uma das mais estudadas, inclusive com ênfase no controle hormonal da nutrição em plantas (OHKAMA-OHTSU; WASAKI, 2010; KROUK et al., 2011). Visto a forte interação entre auxina e etileno em várias respostas de deficiência nutricional (MUDAY; RAHMAN; BINDER, 2012), e o fato que a auxina (BACAICOA et al., 2011) e do etileno (GARCÍA et al., 2010; GARCÍA et al., 2011; ROMERA et al., 2011) serem objetos de estudo nas respostas à deficiência de Fe, fica clara a necessidade de compreender como a interação entre esses dois fitormônios controlam as respostas na planta à deficiência desse elemento.

O mutante *diageotropica* (*dgt*) introgridido na cultivar MT demonstra um fenótipo pleiotrópico que inclui a baixa resposta ao gravitropismo e baixa ramificação lateral nas raízes, com redução na dominância apical e folhas hiponásticas, alteração no desenvolvimento vascular e redução do crescimento dos frutos (OH et al., 2006). Mesmo com a baixa sensibilidade à auxina, o *dgt* não apresentou alteração nos níveis de produção e transporte desse hormônio (RICE; LOMAX, 2000). Segundo Oh et al. (2006), o gene *DGT* codifica uma ciclofilina (CYP), que é uma proteína envolvida na sinalização por auxina. Essa mutação pode ocorrer em três alelos independentes no *dgt*: *dgt<sup>1-1</sup>*, *dgt<sup>1-2</sup>* e *dgt<sup>dp</sup>* e que apresentam o mesmo fenótipo (IVANCHENKO et al., 2006).

Já no mutante *Never ripe (Nr)*, o gene *NR* foi identificado através da homologia com o *ETR1* e isto mostrou que o tomate mutante para amadurecimento *Nr* (RICK; BUTLER, 1956), apresentou uma mutação no domínio de ligação no receptor do NR, o que impossibilita a ligação ao hormônio etileno. A mutação *Nr* é semi-dominante *Etileno-insensível* é uma substituição de bases na região de codificação N-terminal do gene *LeETR3 (NR)*, homólogo *ETR1* em *Arabidopsis* (WILKINSON et al., 1995), o qual sua expressão é maior durante a senescência e abscisão (GRATÃO et al., 2012). Além disso, o mutante apresenta um amadurecimento incompleto do fruto pela baixa sensibilidade ao etileno, de modo que o fruto pode apresentar pigmentação amarelada, e não ocorre a degradação da parede celular, nem há mudanças na maciez ou aumento da síntese de açúcares (WILKINSON et al., 1995). Com essa alteração nas bases, o mutante *Nr* possui baixa capacidade de responder a qualquer estímulo gerado pelo etileno, tanto endógeno quanto exógeno (LANAHAN et al., 1994).

O mutante *epinastic (epi)* em tomateiro é caracterizado por folhas epinásticas e diâmetro de caule aumentado, além de abundância das raízes laterais (FUJINO; BURGER; BRADFORD, 1989). Durante o crescimento e desenvolvimento da planta, o fenótipo *epi* aumenta a concentração de etileno em seus tecidos pelo aumento nos níveis do precursor de etileno ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) (FUJINO et al., 1988). Além disso, plântulas de *epi* crescidas no escuro apresentaram características de tríplice resposta, como encurtamento e espessamento do hipocótilo, que são semelhantes a plântulas do tipo selvagem tratadas com etileno (FUJINO; BURGER; BRADFORD, 1989; BARRY et al., 2001).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) de Jaboticabal e no Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP) de Piracicaba.

#### 3.1. Material vegetal

Para o presente trabalho, três mutantes hormonais presentes na cultivar Micro-Tom (MT) de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) (Tabela 3.1) foram utilizados, os quais permitiram a obtenção dos duplos mutantes, bem como o parental MT.

Tabela 3.1. Mutantes hormonais presentes na cultivar Micro-Tom.

Mutante	Alteração hormonal/função gênica	Referência
<i>diageotropica (dgt)</i>	Baixa sensibilidade à auxina / Gene defeitivo para biossíntese de uma ciclofilina (componente da transdução de sinal)	OH et al., 2006
<i>Never ripe (Nr)</i>	Baixa sensibilidade ao etileno / Gene defeitivo para biossíntese do receptor de etileno LeETR3	WILKINSON et al., 1995
<i>epinastic (epi)</i>	Produção exagerada de etileno / Alteração gênica desconhecida.	FUJINO et al., 1988

##### 3.1.1. Cultivo das plantas para multiplicação de sementes

A multiplicação de sementes dos genótipos MT, *dgt*, *Nr* e *epi* foi necessária para manter o banco de genótipos do laboratório, bem como para obtenção de plantas para cruzamento e obtenção dos duplos mutantes. No interior de uma casa de vegetação, sementes foram postas para germinar em bandejas contendo uma mistura na proporção de 1:1 de substrato comercial (Plantmax HT, Eucatex) com vermiculita expandida, suplementado com 1g L<sup>-1</sup> de NPK 10:10:10 e 4 g L<sup>-1</sup> de calcário dolomítico comercial (Ca + Mg). Após 15 dias, nas mesmas condições de substrato, as plantas

foram transferidas para vasos com capacidade para 150 mL, nos quais permaneceram durante 90 dias a fim de serem colhidas as sementes.

### 3.1.2. Obtenção de duplos mutantes hormonais

Para a obtenção dos duplos mutantes hormonais, flores emasculadas de *dgt* receberam pólenes dos mutantes *Nr* e *epi* com o auxílio de uma pinça (Figura 3.1). A partir da obtenção das sementes oriundas dos cruzamentos (geração F1), as plantas foram cultivadas (conforme descrito no item 3.1.1) e as flores foram autofecundadas. Na geração F2, seguiu-se uma seleção dos genótipos para obtenção das duplas mutações (*Nr dgt* e *epi dgt*).



Figura 3.1. Esquema do procedimento de cruzamento entre os genótipos. Com o auxílio de uma pinça (A), a partir flores ainda imaturas (B) foram retiradas as sépalas (C) para que pudesse ser realizada a emasculação (D e E). Imediatamente, pólenes foram coletados de flores em antese a partir de um genótipo doador (eg. *dgt*) de pólenes (F) para que pudessem entrar em contato com o estigma receptor de pólenes de outro genótipo (eg. *Nr*) (G).

### **3.2. Análises fenotípica e genotípicas para confirmação da presença das duplas mutações**

As análises de confirmação fenotípica foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP/Jaboticabal e as análises de confirmação genotípica foram realizadas na ESALQ/USP/Piracicaba.

#### **3.2.1. Confirmação fenotípica da presença das duplas mutações**

Para seleção de *epi dgt* em F2, plantas apresentando epinastia foliar e diâmetro do caule aumentado foram observadas, característica do mutante *epi*. Enquanto que para *Nr dgt*, plântulas foram germinadas na presença de 100 mM de ácido 2-cloroetil fosfônico (CEPA - Etefom – Bayer CropScience), um liberador de etileno. Visto que o mutante *Nr* apresenta baixa sensibilidade ao etileno, foram selecionadas plântulas ausentes de inibição do alongamento e expansão lateral do hipocótilo, bem como inibição do alongamento da raiz, evidentes respostas desencadeadas pela presença de etileno. Além disso, nos duplos mutantes foi observada a característica típica da mutação *dgt*, que apresenta raízes com gravitropismo negativo e caules com pouca expansão lateral (OH et al., 2006).

#### **3.2.2. Confirmação genotípica da presença das duplas mutações *epi dgt* e *Nr dgt* por PCR**

A seleção genotípica, primeiramente, foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para confirmar a presença da mutação *dgt*, no Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas do Departamento de Genética da ESALQ/USP/Piracicaba.

a. *Extração e quantificação do DNA genômico*: para a confirmação dos duplos genótipos foram coletadas folhas jovens das plantas previamente selecionadas (item 3.1.2). As folhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e

armazenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento de utilização das mesmas para a extração de DNA. A extração do DNA genômico total das amostras foi realizada de acordo com Ferreira e Grattapaglia (1998). Cerca de 150 mg de tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido em tubos de polipropileno de 1,5 mL, e posteriormente adicionado 700  $\mu\text{L}$  de tampão de extração CTBA (10% CTBA; Tris 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM; NaCl 0,7 mM; PVP; 2%  $\beta$ -mercaptoetanol). Para completa homogeneização os tubos foram vortexados e em seguida colocados em banho-maria a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos, agitando-os manualmente a cada 10 minutos. Após o resfriamento dos tubos, 600  $\mu\text{L}$  de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) foram adicionados ao extrato e os tubos homogeneizados invertendo-os por 2 minutos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 12.000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionado de 400  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado e homogeneizado suavemente, até formar um precipitado. A suspensão foi novamente centrifugada durante 15 minutos a 12.000 g, para a formação dos *pellets*. Os tubos foram vertidos para descartar o sobrenadante e os *pellets* foram lavados duas vezes com 500  $\mu\text{L}$  de etanol a 70% e, em seguida, com etanol a 95%, com centrifugação a 12.000 g por 5 minutos, para a remoção de sais. O DNA precipitado foi seco em câmara de fluxo e em seguida foi ressuspenso em 50  $\mu\text{L}$  de água acrescido de RNase ( $10\text{ }\mu\text{g }\mu\text{L}^{-1}$ ) para eliminação de RNA contaminante após a incubação por 30 minutos em banho-quente a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a análise. Posteriormente, as amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria a 260 nm, e a pureza da molécula determinada pela relação das absorvâncias a 260 e 280 nm (SAMBROOK et al., 1989).

*b. Reação da Polimerase em cadeia (PCR) para identificação da mutação dgt: os DNAs selecionados foram submetidos à PCR com a sequência dos primers iniciador forward – TTTCTTTGACCTTACCATCGG; iniciador reverso – GACCGCAGTCAGCAATAACC (OH et al., 2006). Para a reação de amplificação, foram utilizados 50 ng de DNA, e um “mix” contendo 5,0  $\mu\text{L}$  de tampão para PCR (10X), 2,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 1,0  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (2,5 mM), 1,0  $\mu\text{L}$  do iniciador forward (10  $\mu\text{M}$ ), 1,0  $\mu\text{L}$  do iniciador reverso (10  $\mu\text{M}$ ) e 0,5  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase ( $5\text{ U }\mu\text{L}^{-1}$ ), contemplando volume final de 50  $\mu\text{L}$  com água. Para a reação de PCR, a*

mistura foi colocada em um termociclador com os seguintes passos: denaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, e 30 ciclos de amplificação (94 °C por 15 segundos, 58 °C por 30 segundos, 72 °C por 90 segundos), seguido da extensão final a 72 °C por 10 minutos e 4 °C indefinidamente. Após a reação, foi realizada a digestão com a Taql direto nos tubos de reação, sendo incubados a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, a reação foi visualizada em gel de agarose a 2%.

### **3.2.3. Confirmação genotípica da presença das duplas mutações *epi dgt* e *Nr dgt* por sequenciamento**

A confirmação genotípica para o gene *dgt* através da PCR e digestão pela Taql não apresentou diferenças entre os duplos mutantes. Porém, as mutações foram visualmente notadas, conforme descrito na tabela 4.1. Por isso, para a confirmação exata da mutação, foi realizado o sequenciamento dos PCRs obtidos no item 3.2.2.b., antes de serem digeridos pela Taql. Esse procedimento foi realizado no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas, na Esalq/USP/Piracicaba, sendo enviados 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de cada sequência (MT, *Nr*, *dgt*, *epi*, *epi dgt* e *Nr dgt*) e o primer forward para o gene *dgt*. O equipamento utilizado para o sequenciamento foi o sequenciador automático ABI-3100 (Applied Biosystems); o programa de coleta dos dados foi o Data Collection (Applied Biosystems) e o de análise de dados foi o DNA Sequencing Analysis (Applied Biosystems).

### **3.3. Cultivo em condições de deficiência de ferro**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP/Jaboticabal. Utilizando as condições de cultivo em substrato descritas no item 3.1.1, plântulas dos seis genótipos (MT, *dgt*, *Nr*, *epi*, *Nr dgt* e *epi dgt*) com 20 dias após a semeadura foram transplantadas para um sistema de hidroponia, presente em uma sala de crescimento com temperatura por meio de aparelhos condicionadores de ar ( $25 \pm 3$  °C) e estantes com controle de luminosidade (fotoperíodo de 12 horas, com quatro lâmpadas fluorescentes Philips® de 58 W), sem controle de umidade (Figura 3.2).



Figura 3.2. Imagens da sala de crescimento utilizada no experimento. Pode ser observado o sistema de condução de ar por mangueiras de borracha (A) e o compressor de ar (B), as mangueiras conectadas por agulhas para a saída de ar até os vasos (C e D). Todas as estantes continham oito lâmpadas fluorescentes.

Após o transplante, todo o sistema de aeração das estantes foi instalado para o desenvolvimento experimento, sendo utilizado mangueiras de borracha conectadas entre si, e estas conectadas a um compressor de ar de potência de 35W. O compressor de ar permaneceu ligado o tempo todo durante o experimento, mantendo a aeração constante das raízes. As plantas permaneceram por mais 20 dias em 50% da solução de Hoagland e Arnon (1950) modificada, contendo os sais: 1,25 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1,25 mM  $\text{KNO}_3$ , 0,5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , 0,05  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{MoO}_4$  e 20  $\mu\text{M}$   $\text{FeEDDHA}$  e pH 5,8. As soluções foram substituídas a cada quatro dias. Após esses 20 dias, em parte dos vasos a solução foi substituída por soluções ausentes em Fe. Após a aplicação da solução sem Fe, as plantas permaneceram por mais quatro e 24 dias nessas condições, sendo posteriormente coletadas as folhas e raízes para as avaliações (Figura 3.3). Os tempos de coleta e avaliação foram: T0 - quando ainda todas as plantas estavam com Fe na solução nutritiva, T1 - quando se passaram quatro dias após a retirada do Fe da metade dos vasos, e T2 - com 24 dias sem Fe em metade



dos vasos. A partir dos tempos de coleta foi possível realizar as análises de crescimento, bioquímicas e de qRT-PCR.

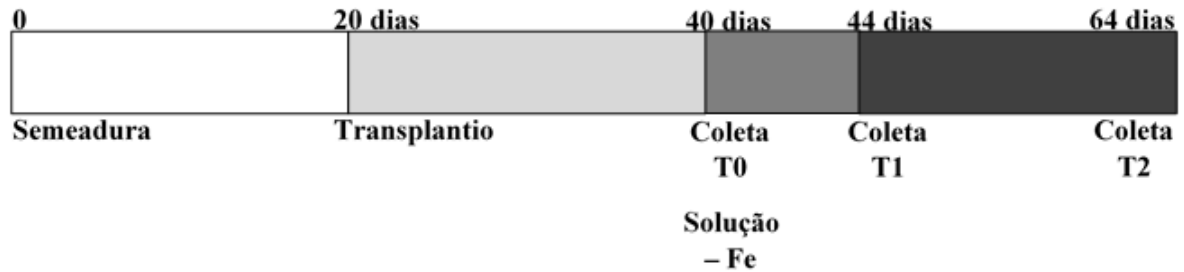


Figura 3.3. Representação do cultivo e indução de deficiência de Fe ao longo do tempo, em dias, desde a sementeira. Aos 20 dias após a sementeira, as plântulas foram transplantadas para vasos contendo solução nutritiva, onde permaneceram por mais 20 dias até o início dos tratamentos. O tempo T0 representa o primeiro dia da retirada do Fe da solução de metade dos vasos do experimento. Aos quatro dias sem Fe na solução (T1), as plantas iniciaram o processo de indução das respostas à deficiência de Fe. Já aos 24 dias sem Fe (T2) representa a fase de estabelecimento da deficiência de Fe nas plantas, apresentando sintomas visuais nas folhas novas.

O tempo de coleta com quatro dias sem Fe (T1) para análise de qRT-PCR foi sugerido pelo Professor Dr. Francisco Javier Romera Ruiz, da Universidade de Córdoba – Espanha, sendo o tempo suficiente para induzir as respostas iniciais à deficiência de Fe. Durante esse período foi possível verificar a expressão dos principais genes de resposta à deficiência de Fe (ECKHARDT et al., 2001; LI; CHENG; LING, 2004; BRUMBAROVA; BAUER, 2005).

No experimento, os vasos foram distribuídos em três blocos, que eram as prateleiras da estante, e estes continham todos os tratamentos. Os vasos utilizados continham quatro plantas, que para as análises de crescimento foi feita a média de cada vaso para obter um valor que foi submetido à análise estatística. Para as análises bioquímicas e de qRT-PCR, as plantas de cada vaso foram reunidas em uma única amostra, sendo uma repetição por bloco.

### 3.4. Análises de crescimento

As avaliações foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP/Jaboticabal. As plantas foram coletadas nos tempos descritos no item 3.3, para que a área foliar, comprimento, área e densidade da raiz, massa da matéria seca da parte aérea e da raiz, além da quantificação de nutrientes pudessem ser analisados seguindo a metodologia abaixo:

*a. Comprimento, área, densidade e diâmetro radicular:* para determinação do comprimento, área e densidade da raiz foi utilizado o sistema de análise de imagem Delta T Devices LTD. Para tanto, o sistema radicular permaneceu em solução de azul de metileno por 30 minutos. Em seguida, as raízes foram dispostas em bandeja com água destilada para o início das leituras de imagem utilizando-se um digitalizador Hewlett Packard modelo 5C. A imagem de cada sistema radicular foi analisada pelo software Delta-T Scan para que os dados fossem obtidos.

*b. Área foliar:* a área foliar total foi obtida através da digitalização das folhas no sistema Delta T Devices LTD e subsequente análise das imagens através do software “Quant” (VALE et al., 2003).

*c. Massa da matéria seca:* o material (parte aérea e raiz) foi mantido em saco de papel e levado à estufa com renovação forçada de ar a 65 °C por 96 horas. Posteriormente, o material foi pesado utilizando-se uma balança analítica (Denver Instrument Company AA-200) com precisão de 0,0001g.

*d. Análise química de nutrientes:* as concentrações de P, K, Ca, Mg, B, Cu, Fe, Mn, Zn em folhas e nas raízes foram determinadas de acordo com metodologia modificada de Chilimba et al. (2011). Aproximadamente 100 mg do material vegetal moído foi digerido sob aquecimento por micro ondas por 1 hora em condição controlada de 20 bar de pressão em 2 mL de HNO<sub>3</sub> (70%), 2 mL H<sub>2</sub>O milli-Q e 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (60%). Após a digestão, as amostras foram diluídas para 10 mL com água Milli-Q e armazenadas

em temperatura ambiente para análise em ICP-OES. As leituras foram realizadas no Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP/Piracicaba.

### 3.5. Análises bioquímicas

As avaliações foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP/Jaboticabal e no Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas do Departamento de Genética da ESALQ/USP/Piracicaba. As plantas foram coletadas nos tempos descritos no item 3.3. Para a quantificação de clorofilas foliares totais foi utilizado material fresco, e para as análises enzimáticas, raízes e folhas foram coletadas e imediatamente conservadas em nitrogênio líquido. Posteriormente, o material vegetal foi armazenado a uma temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  para conservar a atividade das enzimas antioxidantes, bem como não degradar os compostos que foram analisados, como o MDA e o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Abaixo estão descritas as metodologias utilizadas no experimento:

*a. Clorofilas foliares totais:* discos foliares foram retirados com um furador e colocados no interior de tubos eppendorf, envolvidos com papel alumínio, acrescentados com 1,5 mL de acetona 100%. Seguidamente, em condições de penumbra, os tubos permaneceram por 24 horas sob agitação em baixa temperatura ( $4$  a  $7^{\circ}\text{C}$ ). O processo de extração foi realizado em triplicatas. Após a agitação, os tecidos foliares foram retirados e a solução de extração contendo os pigmentos levada para leitura nos seguintes comprimentos de onda: Clorofila a - 662 nm; Clorofila b - 645 nm e Carotenóides (caroteno [c]+ xantofilas [x]) - 470 nm, e para o cálculo da concentração de clorofilas e carotenóides foram utilizados as seguintes fórmulas (LICHTENTHALER, 1987):  $\text{Ca} = 11,24 \text{ A}_{662} - 2,04 \text{ A}_{645}$ ;  $\text{Cb} = 20,13 \text{ A}_{645} - 4,19 \text{ A}_{662}$ ;  $\text{Ca}+\text{b} = 7,05 \text{ A}_{662} + 18,09 \text{ A}_{645}$  e  $\text{Cc}+\text{x} = (1000 \text{ A}_{470} - 1,90\text{Ca} - 63,14\text{Cb})/214$ . O conteúdo de clorofilas dos tecidos foi expresso em  $\mu\text{g}$  do pigmento pela área do disco cotiledonar ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ).

*b. Peroxidação Lipídica:* obtida através do teste de TBA (ácido 2-tiobarbitúrico) descrito por Heath e Packer (1968). Os metabólitos reativos das membranas

celulares, principalmente o malondialdeído (MDA) reagem com o TBA e podem ser quantificados através da espectrofotometria. As amostras frescas foram maceradas com 1 mL de TCA (ácido tricloroacético – 0,1%) juntamente com 20% de PVPP. Após a perfeita homogeneização, foram transferidas para tubos e centrifugados a 12.000 g por 5 minutos. Do sobrenadante, foi retirado 250  $\mu$ L ao qual foi adicionado 1 mL de TCA 20% e TBA 0,5%. A mistura foi colocada em banho seco por 30 minutos, a 95 °C e na sequência resfriada em gelo. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 g. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 535 e 600 nm. A quantidade de MDA foi expressa em nmol g<sup>-1</sup> de massa de matéria fresca.

*c. Conteúdo de Peróxido de Hidrogênio:* o conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinado através da reação com iodeto de potássio (KI), segundo Alexieva et al. (2001). As amostras frescas foram maceradas com 1 mL de TCA 0,1%. Após a perfeita homogeneização, foram transferidas para tubos e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4 °C. Do sobrenadante, foi retirado 200  $\mu$ L ao qual foi adicionado 200  $\mu$ L de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800  $\mu$ L de solução 1 M de KI (a solução foi preparada com água ultrapura). O branco consistiu na mesma mistura descrita acima, porém, ao invés do sobrenadante da amostra, colocou-se 200  $\mu$ L de TCA 0,1%. Os tubos com a reação foram colocados em gelo e permaneceram no escuro durante uma hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 390 nm. A quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi expressa em  $\mu$ mol g<sup>-1</sup> de massa de matéria fresca.

*d. Extração de Proteínas:* os materiais vegetais coletados (raiz e folha), e armazenados em freezer -80 °C, foram colocados em um almofariz gelado com nitrogênio líquido para serem macerados até ficar com um pó fino e homogêneo. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), contendo 1 mM de EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético), 3 mM de DTT (ditiotritol) e 4% de PVPP (p/v – polivinilpolipirrolidona), de acordo com Gomes-Junior et al. (2007), sendo a proporção de material fresco para folha 1 g para 3 mL de tampão de extração e para a raiz 1 g para 1 mL de tampão de extração. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g por 30 minutos a 4 °C, utilizando uma centrífuga refrigerada.

O sobrenadante foi coletado, aliquotado e estocado em freezer -80 °C até o momento das análises.

*e. Determinação de proteína:* as concentrações das proteínas totais nos extratos foram determinadas utilizando-se o BSA (soro albumina bovina) como padrão e utilizando-se do método de Bradford (1976), o qual consiste na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 nas proteínas do extrato (reagente Bio-Rad código 500-0202). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm, e as concentrações de proteínas foram apresentadas em mg ml<sup>-1</sup>.

*f. Superóxido Dismutase - SOD (EC 1.15.1.1):* a atividade da SOD foi determinada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977) e Cembrawska-Lech et al. (2015). A reação foi conduzida em uma câmara de reação (caixa), sob iluminação de lâmpada fluorescente (15 W) a 25 °C. O extrato da amostra extraída e já descongelada foi adicionada em um tubo de ensaio de vidro contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), 13 mM de metionina, 63 µM de NBT, 0,1 mM de EDTA e 1,3 µM de riboflavina, totalizando 1,5 mL de reação. A reação foi colocada na caixa junto com os brancos (claro e escuro), que consistem da mesma reação sem o extrato, sendo que o branco do escuro permaneceu fora da caixa, tampado com papel alumínio, para que não entre luz, e o branco do claro foi colocado na caixa junto com as amostras para ocorrer a reação. A luz ficou acesa por cinco minutos, e o composto blue formazana foi produzido pela fotorreação do NBT. Quando a amostra apresentou maior atividade, a reação se tornou mais clara. A leitura em espectrofotômetro foi realizada a 560 nm. O cálculo da atividade específica da SOD foi realizado com base nos resultados obtidos da proteína total quantificada pelo método de Bradford, sendo os resultados expressos em unidade de SOD por mg de proteína (U SOD mg<sup>-1</sup> proteína), sendo que 1 unidade de SOD corresponde a concentração de SOD necessária para inibir 50% da fotorredução do NBT em formazana. A fórmula utilizada para o cálculo:

$$1 \text{ unidade de SOD} = 1 + K' [\text{SOD}]$$

Onde [SOD] = (ABS da formazana ou branco do claro/ ABS da amostra) - 1, ou seja:

$$\left\{ \left[ \left( \frac{ABS \text{ formazana}}{ABS \text{ amostra}} \right) - 1 \right] \times K' \right\} + 1 \Bigg/ X$$

Onde: K' é a função do NBT e sua afinidade com a molécula de superóxido ( $O_2^-$ ), e o K' em plantas é igual a 0,049.

*g. Catalase - CAT (EC 1.11.1.6):* a atividade da CAT foi determinada segundo Kraus, McKersie e Fletcher (1995), com algumas modificações conforme Azevedo et al. (1998). O ensaio foi realizado a 25 °C em cubetas de quartzo. A reação iniciou-se pela adição de 25 µL de extrato vegetal no tampão A (10 mL tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 e 25 µL  $H_2O_2$  do reagente concentrado a 30%  $H_2O_2$ ). O branco consistiu na mesma reação, adicionando-se o tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 ao invés da amostra. A atividade foi determinada monitorando-se a degradação de  $H_2O_2$  a 240 nm (pico de absorção do  $H_2O_2$ ) durante o período de um minuto e dosagem contínua em intervalos de dez segundos em temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína. O cálculo da atividade específica da CAT foi realizado através do coeficiente de extinção do  $H_2O_2$ : 39,4  $\text{M cm}^{-1}$ , considerando-se a quantificação de proteína total pelo método de Bradford.

*h. Ascorbato peroxidase - APX (EC 1.11.1.11):* a atividade de APX foi determinada como descrito por Moldes et al. (2008), em espectrofotômetro a 290 nm, em cubetas de quartzo, a 30 °C. A reação iniciou-se com a adição de 50 µL de amostra na solução da cubeta contendo 650 µL de tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 7,0) e 100 µL de uma mistura de 5 mM de ascorbato de ascorbato, 1 mM de EDTA e 1 mM de  $H_2O_2$ . Para o branco foi necessário substituir a amostra por tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 7,0). A reação ocorreu durante um minuto e monitorada a cada dez segundos. Os valores de atividade foram expressos em  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína. O cálculo da atividade específica da APX foi realizado através do coeficiente de extinção do ascorbato: 2,8  $\text{mM cm}^{-1}$ , considerando-se a quantificação de proteína total pelo método de Bradford.

### 3.6. Análises de qRT-PCR

Para as análises de qPCR em tempo real foram analisados os genes relacionados ao mecanismo da Estratégia I em tomateiro (Tabela 3.2):

Tabela 3.2. Genes estudados durante a deficiência de Fe em tomateiro.

Gene	Codifica para	Referência
<i>iron-regulated transporter 1 (SIIRT1)</i>	Transportadores de ferro	ECKHARDT et al., 2001
<i>ferric-chelate reductase (SIFRO1)</i>	Enzima redutase férrica	LI; CHENG; LING, 2004
CAC ( <i>endógeno</i> )	Subunidade do complexo de adaptadores da Clatrina	EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al., 2008

a. *Desenho dos primers*: para as análises de qRT-PCR, os primers foram desenhados a partir dos genes obtidos no banco NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e SolGenomics (<http://solgenomics.net/locus/403/view>). A partir das sequências dos genes, foi possível identificar as regiões anotadas dos éxons, ou seja, codificadoras do gene, através do site Phytozome ([phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html](http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html)) ou o mRNA. Sendo assim, o primer foi desenhado sempre nas regiões anotadas dos éxons, de maneira que o alvo analisado, que foi o mRNA, teve essas sequências complementares. Os primers foram desenhados utilizando o software Primer 3 ([primer3plus.com/](http://primer3plus.com/)) (ROZEN et al., 2000) a partir de sequências de mRNA, atendendo os parâmetro: tamanho do produto entre 100 a 250 pares de bases, tamanho do primer entre 20 e 24 pares de bases, temperatura de *Melting* entre 58 e 62 °C e quantidade de CG entre 40 e 60%. As sequências foram alinhadas às sequências com alguma similaridade depositadas no GenBank através da opção “somewhat similar sequences” do software BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). A complementaridade entre os primers foi avaliada com os softwares NetPrimer (Premier Biosoft International; [www.premierbiosoft.com/netprimer](http://www.premierbiosoft.com/netprimer)) e GeneRunner ([www.generunner.net](http://www.generunner.net)) a fim de evitar a formação de estruturas secundárias.

b. *Extração de RNA vegetal*: o RNA foi extraído em solução Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, USA, número catálogo 15596-026) seguindo as recomendações do

fabricante. Em 100 mg de raiz, foi adicionado 1 mL de Trizol, homogeneizado em vortex e incubado por cinco minutos em temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 13.000 g à 4 °C. O sobrenadante foi transferido a outro tubo e adicionado 200 µL de clorofórmio, sendo agitado vigorosamente por 15 segundos e incubados novamente em temperatura ambiente por três minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados durante 15 minutos a 13.000 g à 4 °C. A mistura separou-se em uma fase vermelha ao fundo tubo, que é a fase fenol/clorofórmio, e uma fase aquosa acima, que continha o RNA, com volume de aproximadamente 60% do volume de Trizol utilizado no início. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o RNA foi precipitado utilizando 250 µL de isopropanol gelado e 250 µL de citrato de sódio a 0,8 M com cloreto de sódio a 1,2 M, preparados em água tratada com DEPC 0,01%. As amostras foram misturadas e incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos. Os tubos foram novamente centrifugados a 13.000 g por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi removido e o pellet lavado com 1 mL de etanol gelado a 75%, sendo posteriormente centrifugado a 13.000 g por cinco minutos à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de RNA seco ao ar por 5-15 minutos. Então, o RNA foi ressuspensionado em água tratada com DEPC 0,01% e incubado por 10 minutos a 55 °C.

*c. Quantificação do RNA em espectrofotômetro NanoDrop:* todas as amostras de RNA extraídas foram quantificadas em espectrofotômetro. Para isso, utilizou-se 1 µL do RNA extraído e ressuspensionado em água. Os valores obtidos no equipamentos estão em ng µL<sup>-1</sup>, e as razões A260/A280nm e A260/A230 nm foram anotadas para verificar a qualidade do RNA extraído.

*d. Limpeza de DNA genômico das amostras:* a partir do RNA extraído e quantificado, foi necessária uma etapa de limpeza dessas amostras de uma possível contaminação com DNA genômico. Para isso, foi utilizado o kit da Invitrogen DNase I (número catálogo 18068-015). O protocolo utilizado foi o fornecido pelo fabricante, que consiste em utilizar 1 µg de RNA extraído, 1 µL de DNase I Reaction Buffer 10X, 1 µL de DNase I contendo 1 U µL<sup>-1</sup>, completando o volume de reação para 10 µL final com água DEPC 0,01%. Os tubos foram incubados por 15 minutos a temperatura ambiente, e



imediatamente a DNase I foi inativada pela adição de 1  $\mu\text{L}$  de solução de 25 mM de EDTA. Os tubos foram aquecidos a 65  $^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.

*e. Síntese de cDNA a partir das amostras de RNA extraídas:* as amostras de RNA tratadas com DNase I foram então retrotranscritas, de acordo com Tomasi et al. (2012). O kit utilizado para esse procedimento foi da Applied Biosystems (número catálogo 4368814), seguindo o protocolo do fabricante. O protocolo consiste em adicionar 10  $\mu\text{L}$  do RNA tratado com a DNase I (1  $\mu\text{g}$ ) em 2  $\mu\text{L}$  de tampão RT 10X, 2  $\mu\text{L}$  de Random Primers RT 10X, 0,8  $\mu\text{L}$  de dNTP Mix (100 mM), 1  $\mu\text{L}$  de enzima MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ), completando o volume final com água DEPC 0,01% para 20  $\mu\text{L}$ . Os tubos foram colocados em um termociclador seguindo os passos recomendados pelo fabricantes: 10 minutos a 25  $^{\circ}\text{C}$ , 120 minutos a 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5 minutos a 85  $^{\circ}\text{C}$  e indefinidamente a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Os tubos foram congelados em freezer - 80  $^{\circ}\text{C}$  até o momento das reações de qPCR.

*f. Reações de qRT-PCR:* as reações foram realizadas em termociclador StepOne™ System (Applied Biosystems) usando o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega, número de catálogo A6001) conforme as recomendações do fabricante. As reações consistiram em 4  $\mu\text{L}$  de cDNA (100 ng), 6,25  $\mu\text{L}$  de tampão de amplificação GoTaq Master Mix 1X, 0,25  $\mu\text{L}$  de uma solução 10  $\mu\text{M}$  de cada primer e 3,75  $\mu\text{L}$  de água Nuclease-Free para um volume final de 12,5  $\mu\text{L}$ . O protocolo de amplificação foi: de um ciclo inicial à 95  $^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação à 95  $^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos e anelamento e extensão a 60  $^{\circ}\text{C}$  por 60 segundos, seguido de um ciclo de dissociação (Curva de Melting) de 60 a 95  $^{\circ}\text{C}$  de acordo com as especificações do equipamento. A curva de dissociação foi calculada de acordo com os parâmetros default do equipamento. Todas as reações foram realizadas em triplicata na placa.

*g. Normalização dos dados obtidos pela análise de qRT-PCR e cálculo dos níveis de transcritos:* a normalização consistiu dos resultados obtidos na quantificação dos níveis de transcritos dos genes alvos em relação à expressão do gene CAC (EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al., 2008) e do genótipo controle MT com Fe. A quantidade de cada cDNA, relativa à quantidade do cDNA dos genes alvos e

normalizadores, foi determinada por meio da fórmula:  $ERG = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ , onde  $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ do tratamento} - Ct \text{ do gene de referência}) - (Ct \text{ genótipo controle} - Ct \text{ do gene de referência})$ , ERG= expressão relativa dos genes e Ct = cycle threshold) (adaptado de MOROHASHI; GROTEWOLD, 2009).

### **3.7. Delineamento experimental e análise estatística dos dados**

O delineamento experimental foi em blocos casualizados (DBC), sendo seis genótipos (MT, *dgt*, *Nr*, *epi*, *Nr dgt* e *epi dgt*), dois tratamentos (com e sem Fe) e três tempos (T0, T1 e T2). Cada tratamento foi constituído por três repetições (n=3), compostas por quatro plantas cada repetição. A partir das repetições foi obtida a média e o erro padrão de cada tratamento, apresentados nos gráficos. Aos dados quantitativos foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e o Teste de Média (Duncan) a 5% de probabilidade, utilizando o programa Assistat 7.7 Beta.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Obtenção e confirmação fenotípica dos duplos mutantes hormonais

Conforme descrito no item 3.1.2 e mostrados na figura 3.1, flores do mutante *dgt* foram emasculadas quando ainda estavam imaturas. Paralelamente, pólenes de flores na antese dos genótipos *epi* e *Nr* foram coletados e transferidos para a antera das flores emasculadas de *dgt* (Figura 4.1). Esse processo foi realizado diversas vezes até a obtenção de um grande número de sementes portando a geração F1. Após os cruzamentos, a partir da autofecundação da geração F1, foi obtida a geração F2. A proporção de sementes contendo as duplas mutações foi de 9:3:3:1, sendo necessária, dessa forma, uma propagação intensa dos genótipos selecionados em função da proporção 1/16 das duplas mutações (Figura 4.1).

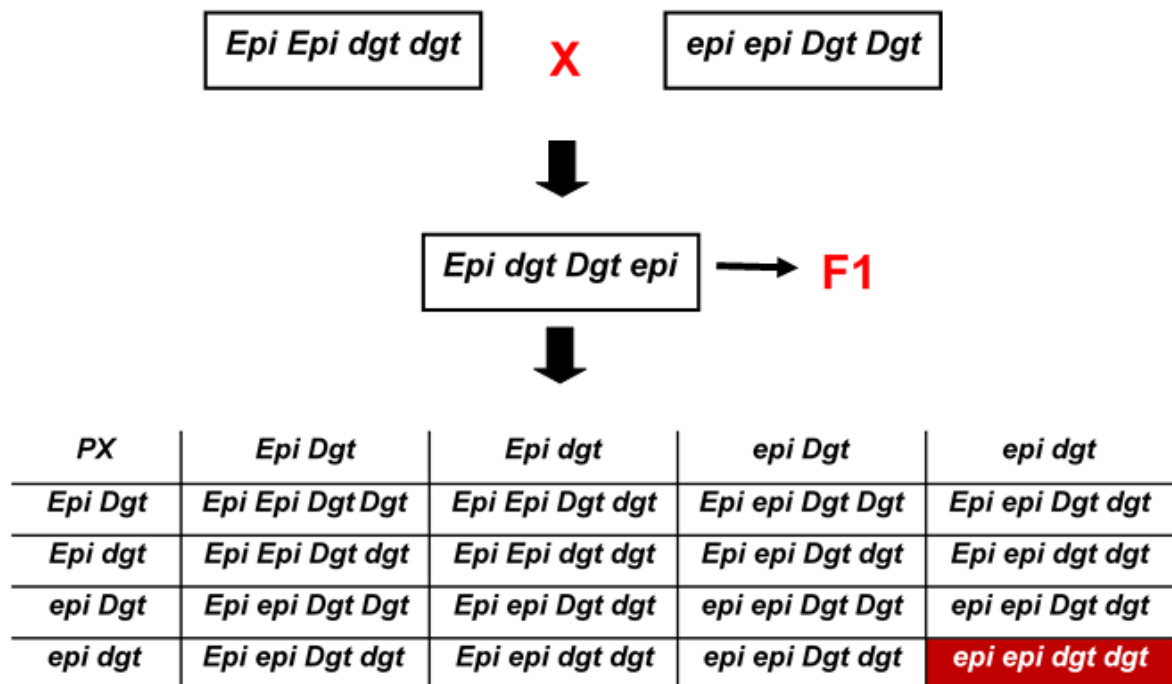


Figura 4.1. Esquema representando o cruzamento e obtenção dos duplos mutantes. Inicialmente (esquema superior), o cruzamento entre *dgt* e *epi* resultou na geração F1, a qual é heterozigota para ambas as mutações. Posteriormente, a autofecundação em F1 (Quadro de Punnett) permitiu a seleção dos genótipos em homozigose (*epi epi dgt dgt*) após a obtenção dos indivíduos na proporção de 9 : 3 : 3 : 1\* (1/16). Foi utilizado no esquema o mutante *epi* para exemplificar a dupla mutação encontrada com *dgt*. Entretanto, o mesmo processo foi utilizado para *Nr*.

Tendo a sensibilidade alterada em relação à auxina, uma das mais evidentes características observadas no mutante *dgt* é a hiponastia dos cotilédones e das folhas (Tabela 4.1). Para o mutante *epi*, o qual apresenta alta produção de etileno, é evidente o desenvolvimento de folhas epinásticas (Tabela 4.1), ao passo que a baixa sensibilidade ao etileno no mutante *Nr* inibe a tríplice resposta induzida na presença do etileno (Figura 4.2). Além disso, frutos de *Nr* não completam a maturação, como mostra a tabela 4.1. Esse evento não é surpresa visto o papel fundamental do etileno nas respostas bioquímicas durante a maturação de frutos de tomateiro (RICK; BUTLER, 1956; WILKINSON et al., 1995).

Dessa forma, os duplos mutantes obtidos apresentaram características muito semelhantes aos simples mutantes. No que diz respeito à seleção do genótipo *epi dgt*, é possível observar folhas jovens epinásticas, espessamento caulinar e frutos semelhantes aos do *epi*, ou seja, com a extremidade estilar ligeiramente pontiaguda. Além disso, as raízes são mais espessas e com pouca ramificação, como encontrado no *dgt* (Tabela 4.1).

Quanto ao duplo mutante *Nr dgt*, a mais evidente resposta pode ser observada no severo atraso na maturação dos frutos, como *Nr*, e as folhas cotiledonares hiponásticas, bem como raízes mais espessas e pouco ramificadas, como *dgt* (Tabela 4.1). Além disso, sementes do genótipo *Nr dgt* foram germinadas na presença de 100 mM de CEPA e, como o simples mutante *Nr*, não apresentaram a tríplice resposta (Figura 4.2).

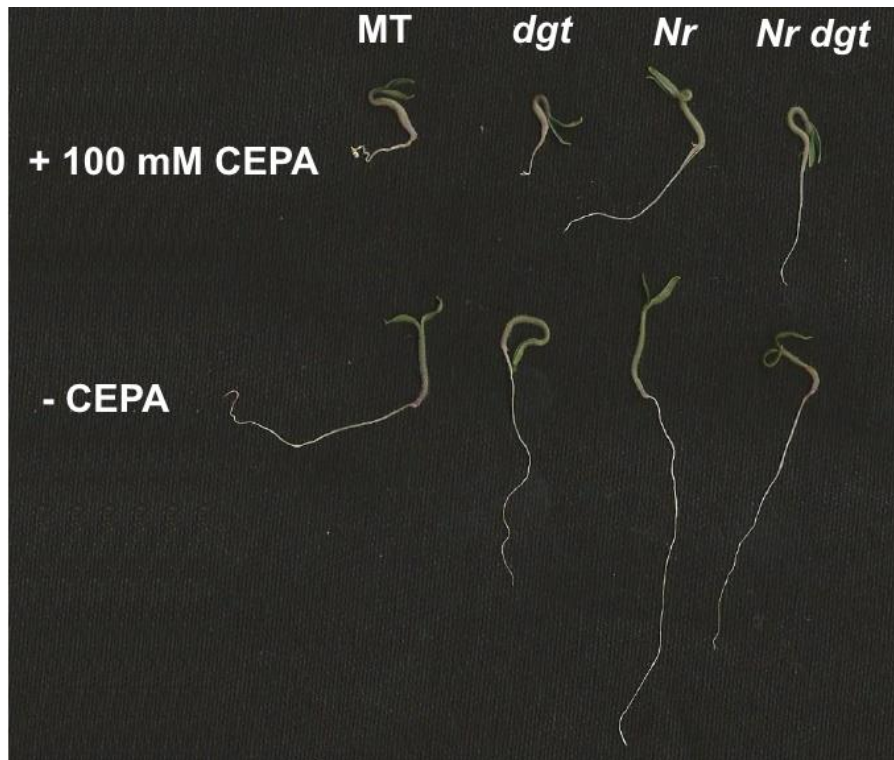


























Figura 4.2. Plantas de MT, *dgt*, *Nr* e *Nr dgt* submetidas a 100 mM de CEPA. Nota-se uma inibição no crescimento das raízes em plântulas crescidas na presença (+) de CEPA para os genótipos MT e *dgt*, e muito pouco para *Nr* e *Nr dgt*. Tais fenótipos podem ser comparados com o crescimento das plântulas na ausência (-) de etileno.

Tabela 4.1. Características morfológicas das folhas, sistema radicular e frutos dos simples e duplos mutantes comparados ao controle MT.

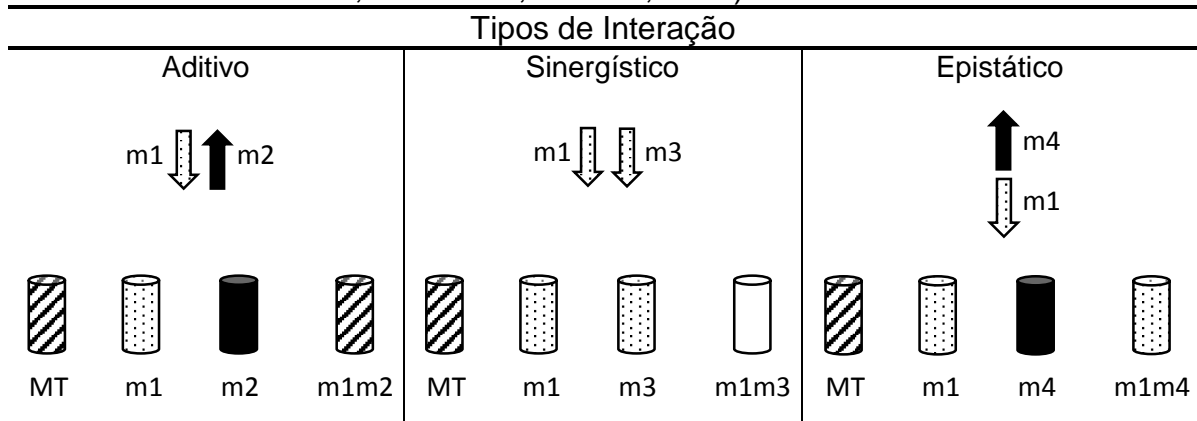
Mutante	Características morfológicas				
MT					—
<i>dgt</i>					Folhas hiponásticas, raízes com pouca ramificação lateral.
<i>Nr</i>					Folhas e sistema radicular muito semelhantes ao MT, porém seus frutos apresentam atraso na maturação.
<i>epi</i>					Folhas epinásticas e frutos com porção inferior pontiagudas.
<i>Nr dgt</i>					Folhas e raízes semelhantes ao <i>dgt</i> , porém seus frutos também apresentam atraso na maturação, como o <i>Nr</i> .
<i>epi dgt</i>					As folhas mais velhas são hiponásticas, como no <i>dgt</i> , porém as folhas mais novas mostram-se epinásticas como no <i>epi</i> , além do fato que o sistema radicular é pouco ramificado, como no <i>dgt</i> , e a porção inferior do frutos é pontiaguda como no <i>epi</i> .

Após a avaliação fenotípica, foi possível a seleção dos duplos mutantes na geração F2 para a propagação dos genótipos e obtenção de sementes suficientes para o teste genotípico e para o experimento proposto.

Na tabela 4.2 pode-se observar as possíveis interações entre os genótipos parentais e seus duplos mutantes. As interações aditivas e sinérgicas indicam vias paralelas independentes entre os fitormônios auxina (AUX) e etileno (ET). Nos dois casos, o duplo mutante combina o efeito de cada parental mutante. Nas interações

epistáticas, o duplo mutante pode ter o fenótipo de apenas um parental mutante, significando que ambas mutações controlam a resposta por meio de vias de sinalização de respostas compartilhadas (CARVALHO; QUECINE; PERES, 2010).

Tabela 4.2. Possíveis interações nos duplos mutantes, sendo m1 o *dgt*, m2, m3 e m4 o *Nr* ou *epi* e o m1m2, m1m3 e m1m4 o *Nr dgt* ou *epi dtg* (adaptado de CARVALHO; QUECINE; PERES, 2010).



Nos duplos mutantes obtidos dos cruzamentos, puderam ser observadas interações epistáticas e sinérgicas, sendo que o *Nr dgt* apresentou interação epistática em folha e raiz para o parental *dgt* e em fruto para o parental *Nr*. Já o duplo mutante *epi dgt* apresentou interação sinérgica nas folhas, sendo caracterizada como uma combinação do efeito dos dois fitormônios, auxina e etileno, apresentado fenótipo diferente dos parentais; e para raiz apresentou interação epistática para o parental *dgt* e nos frutos epistática para o parental *epi* (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Possíveis interações nos duplos mutantes com base nas suas características morfológicas: folha (F), raiz (R) e fruto (Fr), sendo m1 o *dgt*, m2, m3 e m4 o *Nr* ou *epi* e o m1m2, m1m3 e m1m4 o *Nr dgt* ou *epi dtg*. O cruzamento dos mutantes *Nr* (baixa sensibilidade ao etileno - ET<sup>-</sup>) e *dgt* (baixa sensibilidade à auxina -AUX<sup>-</sup>) originou o duplo mutante *Nr dgt*. Já o cruzamento do *dgt* com o *epi* (maior produção de etileno - ET<sup>+</sup>) originou o duplo mutante *epi dgt*.

Características morfológicas		
Genótipo	Tipo de mutação	Tipo de interação
<i>Nr dgt</i>	ET <sup>-</sup> e AUX <sup>-</sup>	F – epistático <i>dgt</i> R – epistático <i>dgt</i> Fr – epistático <i>Nr</i>
<i>epi dgt</i>	ET <sup>+</sup> e AUX <sup>-</sup>	F – sinérgico R – epistático <i>dgt</i> Fr – epistático <i>epi</i>

## 4.2. Confirmação genotípica da presença das duplas mutações *epi dgt* e *Nr dgt* por PCR

A mutação *dgt* ocorre em um único gene, que codifica a ciclofilina (LeCYP), um componente envolvido na sinalização da auxina. Essa mutação pode ocorrer em três diferentes alelos: o alelo *dgt*<sup>1-1</sup> de um aminoácido (G<sub>137</sub>R), o *dgt*<sup>1-2</sup> contém um ponto de mutação no gene gerado por um stop códon (W<sub>128</sub>Stop), enquanto que o alelo *dgt*<sup>dp</sup> ocorre por uma alteração em um aminoácido (W<sub>128</sub>CΔ129-133) procedido de uma deleção de 15 bp (OH et al., 2006) (Figura 4.3 e Tabela 4.4).

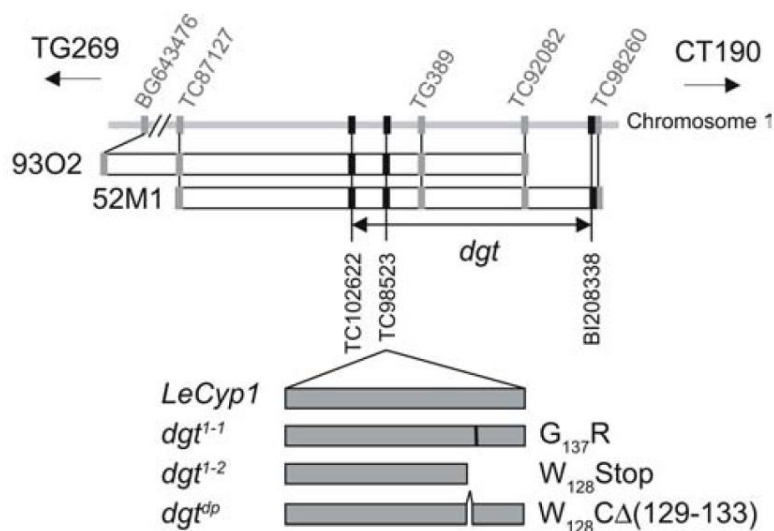


Figura 4.3. O gene *dgt* codifica a ciclofilina (CYP). A mutação pode ocorrer em três diferentes alelos: *dgt*<sup>1-1</sup> (G<sub>137</sub>R), *dgt*<sup>1-2</sup> (W<sub>128</sub>stop) e *dgt*<sup>dp</sup> (W<sub>128</sub>CΔ129-133). Figura adaptada de OH et al. (2006).



Tabela 4.4. Sequência do gene *DGT* para o genótipo selvagem (WT) e para o mutante *dgt*, com suas respectivas traduções em aminoácidos, indicando o sítio de restrição da enzima TaqI (em rosa), região das possíveis mutações (em amarelo) e deleção (em azul). As sequências dos primers para o gene *dgt* estão anotadas em verde. Sequências analisadas e traduzidas pelo NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

<p><i>DGT</i></p> <pre> 1 atggcaaatccaaagggt<b>ttcttcttgaacttaccatccgg</b>tggtgca M A N P K V F P D L T I G G A 46 ccagctgggtcgtgtgggtgatggagctcttcccgataaccactccc P A G R V V M E L F A D T T P 91 aaaaecgctgagaaacttccgagctcttctgtaaccggtgagaaggt K T A E N F R A L C T G E K G 136 gttggaagaatggggagccttctgcaacaagggtctcaactctc V G K M G K P L H Y K G S T F 181 caccgtgtgatccagggttcaatgtgtcaaggaggtgatcttcaac H R V I P G F M C Q G G D P T 226 gccggaaacgggacccggaggag<b>tcctg</b>ctctatggagccaaatcc A G N G T G G E S I Y G A K F 271 aacgatgagaacttctgtaagaagcaaccggcctggaaatccctc N D E N F V K K H T G P G I L 316 tccatggctaatgctggacctggaaaccaacgggtctcagtttttc S M A N A G P G T N G S Q P F 361 atctgtaccgctaaagactgagtggtcaacggaaagcaactgtgtg I C T A K T E W L N G K H V V 406 <b>tttggaca</b>agttgttgaaggcaatggatgtgattaaagaaggcagag F G Q V V E G M D V I K K A E 451 gctgttggatctagctctggaaaggtgctccaagcctgt<b>ggtbabb</b> A V G S S S S G R C S K P V V I 496 <b>gctgactggggc</b>aaactctag 516 A D C G Q L </pre>	<p><i>dgt<sup>2</sup></i></p> <pre> 1 atggcaaatccaaagggt<b>ttcttcttgaacttaccatccgg</b>tggtgca M A N P K V F P D L T I G G A 46 ccagctgggtcgtgtgggtgatggagctcttcccgataaccactccc P A G R V V M E L F A D T T P 91 aaaaecgctgagaaacttccgagctcttctgtaaccggtgagaaggt K T A E N F R A L C T G E K G 136 gttggaagaatggggagccttctgcaacaagggtctcaactctc V G K M G K P L H Y K G S T F 181 caccgtgtgatccagggttcaatgtgtcaaggaggtgatcttcaac H R V I P G F M C Q G G D P T 226 gccggaaacgggacccggaggag<b>tcctg</b>ctctatggagccaaatcc A G N G T G G E S I Y G A K F 271 aacgatgagaacttctgtaagaagcaaccggcctggaaatccctc N D E N F V K K H T G P G I L 316 tccatggctaatgctggacctggaaaccaacgggtctcagtttttc S M A N A G P G T N G S Q P F 361 atctgtaccgctaaagactgagtggtcaacggaaagcaactgtgtg I C T A K T E <b>STOP</b> L N G K H V V 406 <b>tttggaca</b>agttgttgaaggcaatggatgtgattaaagaaggcagag F G Q V V E G M D V I K K A E 451 gctgttggatctagctctggaaaggtgctccaagcctgt<b>ggtbabb</b> A V G S S S S G R C S K P V V I 496 <b>gctgactggggc</b>aaactctag 516 A D C G Q L </pre>
<p><i>dgt<sup>1</sup></i></p> <pre> 1 atggcaaatccaaagggt<b>ttcttcttgaacttaccatccgg</b>tggtgca M A N P K V F P D L T I G G A 46 ccagctgggtcgtgtgggtgatggagctcttcccgataaccactccc P A G R V V M E L F A D T T P 91 aaaaecgctgagaaacttccgagctcttctgtaaccggtgagaaggt K T A E N F R A L C T G E K G 136 gttggaagaatggggagccttctgcaacaagggtctcaactctc V G K M G K P L H Y K G S T F 181 caccgtgtgatccagggttcaatgtgtcaaggaggtgatcttcaac H R V I P G F M C Q G G D P T 226 gccggaaacgggacccggaggag<b>tcctg</b>ctctatggagccaaatcc A G N G T G G E S I Y G A K F 271 aacgatgagaacttctgtaagaagcaaccggcctggaaatccctc N D E N F V K K H T G P G I L 316 tccatggctaatgctggacctggaaaccaacgggtctcagtttttc S M A N A G P G T N G S Q P F 361 atctgtaccgctaaagactgagtggtcaacggaaagcaactgtgtg I C T A K T E W L N G K H V V 406 <b>tttggaca</b>agttgttgaaggcaatggatgtgattaaagaaggcagag F G Q V V E G M D V I K K A E 451 gctgttggatctagctctggaaaggtgctccaagcctgt<b>ggtbabb</b> A V G S S S S G R C S K P V V I 496 <b>gctgactggggc</b>aaactctag 516 A D C G Q L </pre>	<p><i>dgt<sup>db</sup></i></p> <pre> 1 atggcaaatccaaagggt<b>ttcttcttgaacttaccatccgg</b>tggtgca M A N P K V F P D L T I G G A 46 ccagctgggtcgtgtgggtgatggagctcttcccgataaccactccc P A G R V V M E L F A D T T P 91 aaaaecgctgagaaacttccgagctcttctgtaaccggtgagaaggt K T A E N F R A L C T G E K G 136 gttggaagaatggggagccttctgcaacaagggtctcaactctc V G K M G K P L H Y K G S T F 181 caccgtgtgatccagggttcaatgtgtcaaggaggtgatcttcaac H R V I P G F M C Q G G D P T 226 gccggaaacgggacccggaggag<b>tcctg</b>ctctatggagccaaatcc A G N G T G G E S I Y G A K F 271 aacgatgagaacttctgtaagaagcaaccggcctggaaatccctc N D E N F V K K H T G P G I L 316 tccatggctaatgctggacctggaaaccaacgggtctcagtttttc S M A N A G P G T N G S Q P F 361 atctgtaccgctaaagactgagtggtcaacggaaagcaactgtgtg I C T A K T E W L N G K H V V 406 <b>tttggaca</b>agttgttgaaggcaatggatgtgattaaagaaggcagag F G Q V V E G M D V I K K A E 451 gctgttggatctagctctggaaaggtgctccaagcctgt<b>ggtbabb</b> A V G S S S S G R C S K P V V I 496 <b>gctgactggggc</b>aaactctag 516 A D C G Q L </pre>

Dessa forma, para a confirmação genotípica, as sementes de MT, *dgt*, *Nr*, *epi*, *Nr dgt* e *epi dgt* foram cultivadas, conforme descrito no item 3.1.1, para, a partir das folhas, o DNA genômico ser extraído e realizado o PCR, como descrito no item 3.2.2.a. Entretanto, a análise realizada contemplou apenas a mutação *dgt<sup>1-1</sup>*, a qual foi atendida pelos primers sintetizados (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Sequência do gene *DGT* para o genótipo selvagem (WT) e para o mutante. As sequências dos primers forward (FW) (verde) e reverse (RV) (azul) estão marcados na sequência. A mutação está marcada em vermelho na sequência, e a sequência de restrição da enzima TaqI está marcada em amarelo (5'TCGA 3'AGCT).

<i>DGT</i>	0-50 pb	ATGGCAAATCCAAAGGT <b>TTTCTTTGACCTACCATCGG</b> TGGTGCACCAGC
	51-100 pb	TGGTCGTGTGGTATGGAGCTCTTCGCCGATACCACTCCCAAACCGCTG
	101-150 pb	AGAACTTCCGAGCTCTTTGTACCGGTGAGAAAGGTGTTGGAAAGATGGGG
	151-200 pb	AAGCCTTTGCACTACAAGGGCTCAACCTTCCACCGTGTGATCCCAGGGTT
	201-250 pb	CATGTGTCAAGGAGGTGATTTCAACC GCCGAAACGGGACCGGAGGAGAG <b>T</b>
	251-300 pb	<b>CGA</b> TCTATGGAGCCAAATCAACGATGAGAAGCTTCGTTAAGAAGCACACC
	301-350 pb	GGCCCTGGAATCCTCTCCATGGCTAATGCTGGACCTGGAACCAACGGTTC
	351-400 pb	TCAGTTTTTTCATCTGTACCGCTAAGACTGAGTGGCTCAACGGAAAGCACG
	401-450 pb	TCGTGTT <b>TCGA</b> CAAGTTGTTGAAGGCATGGATGTGATTAAGAAGGCAGAG
	451-500 pb	GCTGTTGGATCTAGCTCTGGAAGGTGCTCCAAGCCTGT <b>GGTTATTGCTGA</b>
501-516 pb	<b>CTGCCGGTC</b> AACTCTAG	
<i>dgt</i>	0-50 pb	ATGGCAAATCCAAAGGT <b>TTTCTTTGACCTACCATCGG</b> TGGTGCACCAGC
	51-100 pb	TGGTCGTGTGGTATGGAGCTCTTCGCCGATACCACTCCCAAACCGCTG
	101-150 pb	AGAACTTCCGAGCTCTTTGTACCGGTGAGAAAGGTGTTGGAAAGATGGGG
	151-200 pb	AAGCCTTTGCACTACAAGGGCTCAACCTTCCACCGTGTGATCCCAGGGTT
	201-250 pb	CATGTGTCAAGGAGGTGATTTCAACC GCCGAAACGGGACCGGAGGAGAG <b>T</b>
	251-300 pb	<b>CGA</b> TCTATGGAGCCAAATCAACGATGAGAAGCTTCGTTAAGAAGCACACC
	301-350 pb	GGCCCTGGAATCCTCTCCATGGCTAATGCTGGACCTGGAACCAACGGTTC
	351-400 pb	TCAGTTTTTTCATCTGTACCGCTAAGACTGAGTGGCTCAACGGAAAGCACG
	401-450 pb	TCGTGTT <b>TCGA</b> CAAGTTGTTGAAGGCATGGATGTGATTAAGAAGGCAGAG
	451-500 pb	GCTGTTGGATCTAGCTCTGGAAGGTGCTCCAAGCCTGT <b>GGTTATTGCTGA</b>
501-516 pb	<b>CTGCCGGTC</b> AACTCTAG	

O gel mostrado na figura 4.4.A representa o produto de PCR utilizando os primers descrito na tabela 4.4, de aproximadamente 490 pb. Conforme mostrado na figura 4.4.B, os fragmentos gerados pela digestão com a TaqI seriam de tamanhos muito próximos, de 257 e 234 pb, mas no gel não foi possível realizar a separação das mesmas, pois em 4.4C é possível visualizar somente uma banda entre 100 e 200 pb.

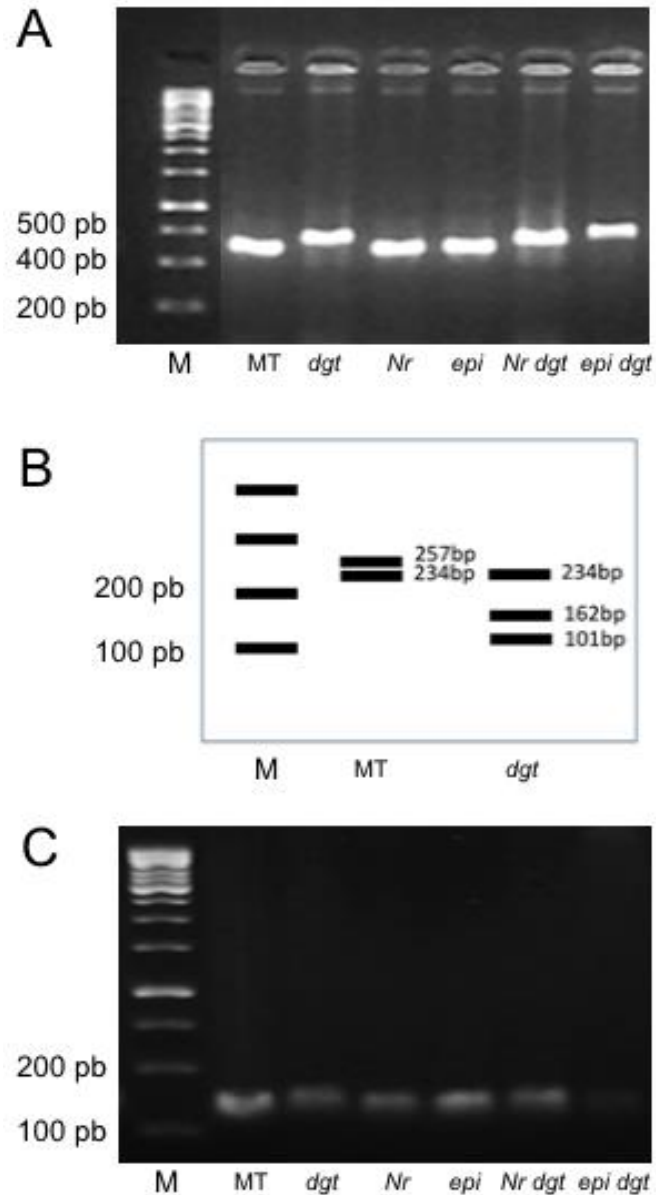


Figura 4.4. A figura (A) representa o produto de PCR utilizando os primers descrito na tabela 3, de aproximadamente 490 pb, a figura (B) representa como seria a visualização no gel das bandas com a digestão da enzima de restrição TaqI, e como foi a visualização no gel após a digestão completa na figura (C).

#### 4.3. Confirmação genotípica da presença das duplas mutações *epi dgt* e *Nr dgt* por sequenciamento

Se a mutação fosse a *dgt*<sup>1-1</sup> seria possível ser detectada pelo PCR seguido da digestão por TaqI. Como não foi possível visualizar a mutação *dgt* por essa digestão,

foi realizado o sequenciamento dos produtos de PCR obtidos no item 3.2.2.b., antes de serem digeridos pela TaqI, para verificar se a mutação *dgt* no material de estudo estava nos outros dois alelos (*dgt<sup>1-2</sup>* e *dgt<sup>dp</sup>*). A partir do sequenciamento do genótipo selvagem (MT) e dos mutantes foi possível obter as sequências mostradas na tabela 4.6.

Tabela 4.6. Sequenciamento do gene *dgt* para o genótipo selvagem (MT) e para o mutante. A sequência de restrição da enzima TaqI está marcada em amarelo (5'TCGA 3'AGCT), e a sequência mutada está em vermelho.

<b>MT</b>	0-50 pb	GAAKCATSGTYAGTGGTGATGGAGCTCTTCGCCGATACCACTCCCAAAA
	51-100 pb	CCGCTGAGAACTTCCGAGCTCTTTGTACCGGTGAGAAAGGTGTTGGAAAG
	101-150 pb	ATGGGGAAGCCTTTGCACTACAAGGGCTCAACCTTCCACCGTGTGATCCC
	151-200 pb	AGGGTTCATGTGTCAAGGAGGTGATTTACCGCCGGAACGGGACCGGAG
	201-250 pb	GAGAGTCGAATCTATGGAGCCAAATTCACGATGAGAACTTCGTTAAGAAG
	251-300 pb	CACACCGGCCCTGGAATCCTCTCCATGGCTAATGCTGGACCTGGAACCAA
	301-350 pb	CGTTTCTCAGTTTTTTCATCTGTACCGCTAAGACTGAGTGGCTCAACGGAA
	351-400 pb	AGCACGTCGTGTTGGACAAGTTGTTGAAGGCATGGATGTGATTAAGAAG
	401-450 pb	GCAGAGGCTGTTGGATCTAGCTCTGGAAGGTGCTCCAAGCCTGTGGTTAT
	451-465 pb	TGCTGACTGCGGTCA
<b><i>dgt</i></b>	0-50 pb	AAGGGGGGACTCGGYAGTGGTGWGGAGCTCTTCGCCGATACCTCCCAA
	51-100 pb	ACCGCTGAGAACTTCCGAGCTCTTTGACCGGTGAGAAAGGTGTTGGAAAG
	101-150 pb	ATGGGGAAGCCTTTGCACTACAAGGGCTCAACCTTCCACCGTGTGATCCC
	151-200 pb	AGGGTTCATGTGTCAAGGAGGTGATTTACCGCCGGAACGGGACCGGAG
	201-250 pb	GAGAGTCGAATCTATGGAGCCAAATTCACGATGAGAACTTCGTTAAGAAG
	251-300 pb	CACACCGGCCCTGGAATCCTCTCCATGGCTAATGCTGGACCTGGAACCAA
	301-350 pb	CGTTTCTCAGTTTTTTCATCTGTACCGCTAAGACTGAGTGGCTCAACGGAA
	351-400 pb	AGCACGTCGTGTTTAGACAAGTTGTTGAAGGCATGGATGTGATTAAGAAG
	401-450 pb	GCAGAGGCTGTTGGATYTWKYCTGGAAGGTGCTCCAAGCCTGTGGTTAT
	451-465 pb	TGCTGACTGCGGTCA
<b><i>Nr</i></b>	0-50 pb	GGTTAWMGGGYRWGTGGTGWGGAGCTCTTCGCCGATACCACTCCCAAAA
	51-100 pb	CCGCTGAGAACTTCCGAGCTCTTTGTACCGGTGAGAAAGGTGTTGGAAAG
	101-150 pb	ATGGGGAAGCCTTTKYWCTACAAGGGCTCAACCTTCCACCGTGTGATCCC
	151-200 pb	AGGGTTCATGTGTCAAGGAGGTGATTTACCGCCGGAACGGGACCGGAG
	201-250 pb	GAGAGTCGAATCTATGGAGCCAAATTCACGATGAGAACTTCGTTAAGAAG
	251-300 pb	CACACCGGCCCTGGAATCCTCTCCATGGCTAATGCTGGACCTGGAACCAA
	301-350 pb	CGTTTCTCAGTTTTTTCATCTGTACCGCTAAGACTGAGTGGCTCAACGGAA
	351-400 pb	AGCACGTCGTGTTGGACAAGTTGTTGAAGGCATGGATGTGATTAAGAAG
	401-450 pb	GCAGAGGCTGTTGGATCTAGCTCTGGAAGGTGCTCCAAGCCTGTGGTTAT
	451-465 pb	TGCTGACTGCGGTCA
<b><i>epi</i></b>	0-50 pb	CTYYWMRTCGGCCAGKGTGTGGAGCTCTTCGCCGATACCACTCCCAAAA
	51-100 pb	CCGCTGAGAACTTCCGAGCTCTTTGAACCGGTGAGAAAGGTGTTGGAAAG
	101-150 pb	ATGGGGAAGCCTTTGTTCTACARGGGCTCAACCTTCCACCGTGTGATCCC
	151-200 pb	AGGGTTCATGTGTCAAGGAGGTGATTTACCGCCGGAACGGGACCGGAG
	201-250 pb	GAGAGTCGAATCTWTGGAGCCAAATTCACGATGAGAACTTCGTTAAGAAG
	251-300 pb	CACACCGGCCCTGGAATCCTCTCCATGGCTAATGCTGGACCTGGAACCAA
	301-350 pb	CGTTTCTCAGTTTTTTCATCTGTACCGCTAAGACTGAGTGGCTCAACGGAA
	351-400 pb	AGCACGTCGTGTTGGACAAGKTGTTGAAGGCATGGATGTGATTAAGAAG
	401-450 pb	GCAGAGGCTGKTGGATCTAGCTCTGGAAGGTGCTCCAAGCCTGTGGTTAT
	451-465 pb	TGYTGACTGSGGTCA
<b><i>Nr dgt</i></b>	0-50 pb	GRAATAYTSTKKTGTGGTGWGGAGCTCTTCGCCGATACCACTCCCAAAA
	51-100 pb	CCGCTGAGAACTTCCGAGCTCTTTGTACCGGTGAGAAAGGTGTTGGAAAG
	101-150 pb	ATGGGGAAGCCTTTGCACTACAAGGGCTCAACCTTCCACCGTGTGATCCC
	151-200 pb	AGGGTTCATGTGTCAAGGAGGTGATTTACCGCCGGAACGGGACCGGAG
	201-250 pb	GAGAGTCGAATCTATGGAGCCAAATTCACGATGAGAACTTCGTTAAGAAG
	251-300 pb	CACACCGGCCCTGGAATCCTCTCCATGGCTAATGCTGGACCTGGAACCAA
	301-350 pb	CGTTTCTCAGTTTTTTCATCTGTACCGCTAAGACTGAGTGGCTCAACGGAA
	351-400 pb	AGCACGTCGTGTTTAGACAAGTTGTTGAAGGCATGGATGTGATTAAGAAG
	401-450 pb	GCAGAGGCTGTTGGATCTAGCTCTGGAAGGTGCTCCAAGCCTGTGGTTAT
	451-465 pb	TGCTGACTGCGGTCA
<b><i>epi dgt</i></b>	0-50 pb	MWTTTWAACCKYKGTGGTGWGGAGCTCTTCGCCGATACCACTCCCAAAA
	51-100 pb	CCGCTGAGAACTTCCGAGCTCTTTGTACCGGTGAGAAAGGTGTTGGAAAG
	101-150 pb	ATGGGGAAGCCTTTGCACTACAAGGGCTCAACCTTCCACCGTGTGATCCC
	151-200 pb	AGGGTTCATGTGTCAAGGAGGTGATTTACCGCCGGAACGGGACCGGAG
	201-250 pb	GAGAGTCGAATCTATGGAGCCAAATTCACGATGAGAACTTCGTTAAGAAG
	251-300 pb	CACACCGGCCCTGGAATCCTCTCCATGGCTAATGCTGGACCTGGAACCAA
	301-350 pb	CGTTTCTCAGTTTTTTCATCTGTACCGCTAAGACTGAGTGGCTCAACGGAA
	351-400 pb	AGCACGTCGTGTTTAGACAAGTTGTTGAAGGCATGGATGTGATTAAGAAG
	401-450 pb	GCAGAGGCTGTTGGATCTAGCTCTGGAAGGTGCTCCAAGCCTGTGGTTAT
	451-465 pb	TGCTGACTGCGGTCA

Por meio da análise das sequências, foi possível observar a mutação *dgt* através da troca de bases G por A, e não G por C. Essa troca de bases faz com que o aminoácido codificado pela trinca de bases seja modificado de Glicina (Gly - GGA) por uma Arginina (Arg) com a sequência AGA, ao invés da sequência CGA, que seria o sítio de restrição da enzima TaqI. Portanto, os duplos mutantes *Nr dgt* e *epi dgt* foram caracterizados tanto fenotipicamente, quanto genotipicamente, podendo dar sequência aos experimentos do projeto.

#### 4.4. Análises de crescimento

##### a. Comprimento, densidade e diâmetro:

Nos resultados obtidos de comprimento total da raiz (mm) (Figura 4.5), o MT apresentou aumento de comprimento total das raízes na ausência de Fe somente no T2, assim como o *Nr* e o *epi*. No T0 e T1 com Fe o mutante *epi* apresentou maior crescimento do sistema radicular quando comparado ao MT, o que não ocorreu no T1 sem Fe (Figura 4.5). Já no T2 sem Fe, o *Nr* e o *epi* apresentaram maior desenvolvimento de raiz comparado ao MT (Figura 4.5). Já o *dgt* não apresentou diferenças nos tempos estudados e nos tratamentos com e sem Fe (Figura 4.5).

Nos duplos mutantes, a interação epistática no sistema radicular do parental *dgt* sobre o *Nr* e *epi* foi observada (Tabela 4.7). Os resultados se assemelham aos encontrados para *dgt*, o qual não apresentou diferenças no comprimento nos tempos estudados e nos tratamentos com e sem Fe (Figura 4.7).



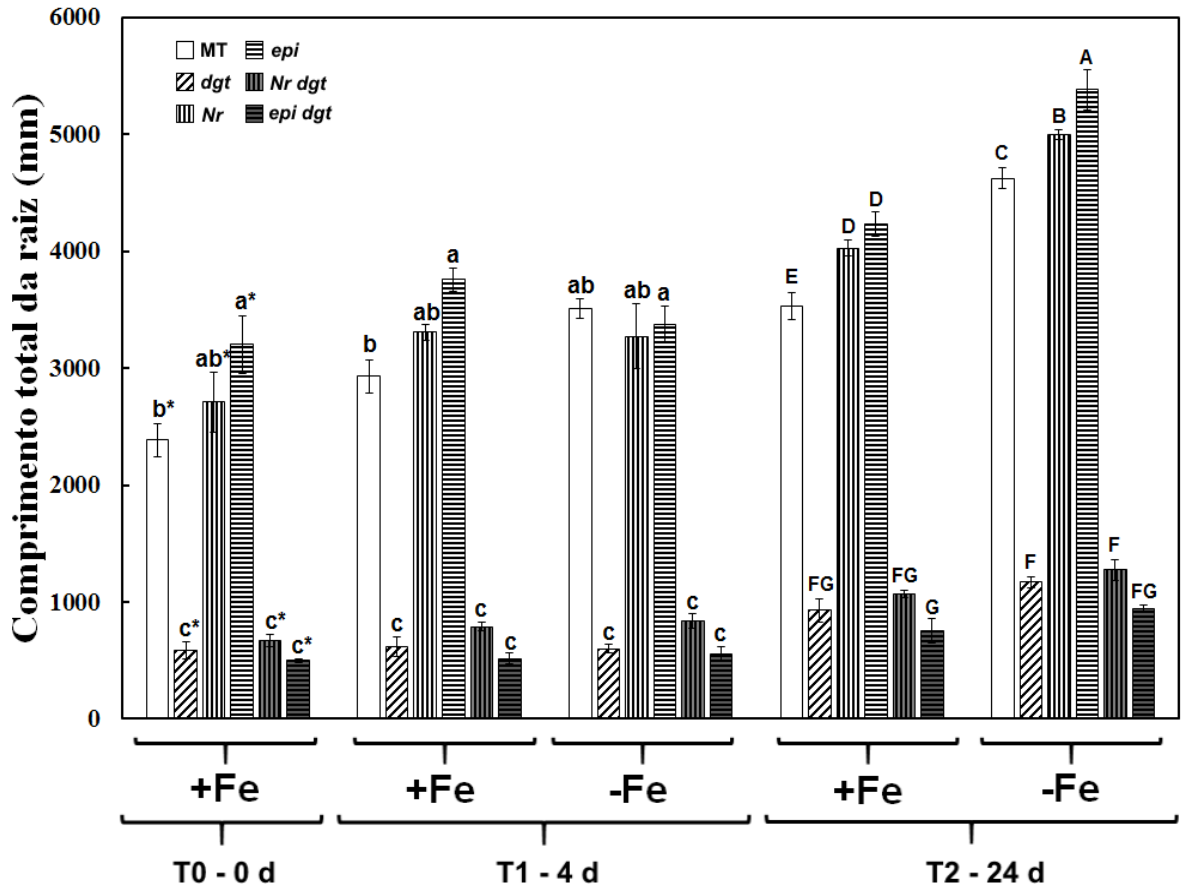


Figura 4.5. Comprimento total da raiz dos genótipos MT, *dgt*, *Nr*, *epi*, *Nr dgt* e *epi dgt* cultivados na presença (+) ou ausência (-) de Fe. T0 corresponde ao tempo anterior à retirada do Fe da solução nutritiva; T1 corresponde ao período de quatro dias com ou sem Fe na solução, e T2 corresponde ao período de 24 dias com ou sem Fe na solução. As barras são as médias de cada tratamento seguidas do erro padrão. As letras sobre as barras representam as diferenças calculadas entre as médias dos tratamentos por meio do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, para cada tempo.

Tabela 4.7. Interações possíveis na parte aérea e no sistema radicular nos duplos mutantes, nos tempos de coleta T1 e T2 na deficiência de Fe. O cruzamento dos mutantes *Nr* (apresenta baixa sensibilidade à etileno - ET<sup>-</sup>) e *dgt* (apresenta baixa sensibilidade à auxina -AUX<sup>-</sup>) originou o duplo mutante *Nr dgt*. Já o cruzamento do *dgt* com o *epi* (apresenta maior produção de etileno - ET<sup>+</sup>) originou o duplo mutante *epi dgt*.

Análises	Parte aérea Genótipo				Sistema radicular Genótipo			
	<i>Nr dgt</i> ET <sup>-</sup> e AUX <sup>-</sup>		<i>epi dgt</i> ET <sup>+</sup> e AUX		<i>Nr dgt</i> ET <sup>-</sup> e AUX <sup>-</sup>		<i>epi dgt</i> ET <sup>+</sup> e AUX <sup>-</sup>	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
Comprimento total					epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>
Densidade					epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>
Diâmetro					aditivo	aditivo	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>
Área	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>	sinérgico	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>
Massa da matéria seca	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>
Conteúdo de clorofila a+b	aditivo	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>epi</i>				
Conteúdo de MDA	aditivo	epistático <i>Nr</i>	epistático <i>epi</i>	epistático <i>epi</i>	epistático <i>Nr</i>	epistático <i>Nr</i>	aditivo	epistático <i>dgt</i>
Conteúdo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	sinérgico	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>epi</i>	sinérgico	aditivo	epistático <i>dgt</i>	sinérgico	epistático <i>epi</i>
SOD	epistático <i>dgt</i>	epistático <i>Nr</i>	epistático <i>epi</i>	epistático <i>epi</i>	aditivo	epistático <i>Nr</i>	epistático <i>epi</i>	aditivo
CAT	epistático <i>dgt</i>	aditivo	aditivo	aditivo	epistático <i>Nr</i>	epistático <i>Nr</i>	epistático <i>epi</i>	aditivo
APX	aditivo	aditivo	aditivo	aditivo	aditivo	epistático <i>Nr</i>	aditivo	epistático <i>epi</i>
Níveis de transcritos do gene <i>SIIRT1</i>					aditivo		epistático <i>epi</i>	
Níveis de transcritos do gene <i>SIFRO1</i>					sinérgico		sinérgico	



Os resultados obtidos de densidade da raiz (mm) (Figura 4.6) são iguais aos obtidos para comprimento total de raiz para todos os genótipos estudados (Figura 4.5), uma vez que o cálculo desse parâmetro tem como base o comprimento total da raiz pelo volume de solução que essa raiz ocupava no vaso.

Para a densidade da raiz (Figura 4.5), os duplos mutantes apresentaram uma interação epistática no sistema radicular do parental *dgt* sobre o *Nr* e *epi* (Tabela 4.7), e não apresentou diferenças nos tempos estudados e nos tratamentos com e sem Fe (Figura 4.6).

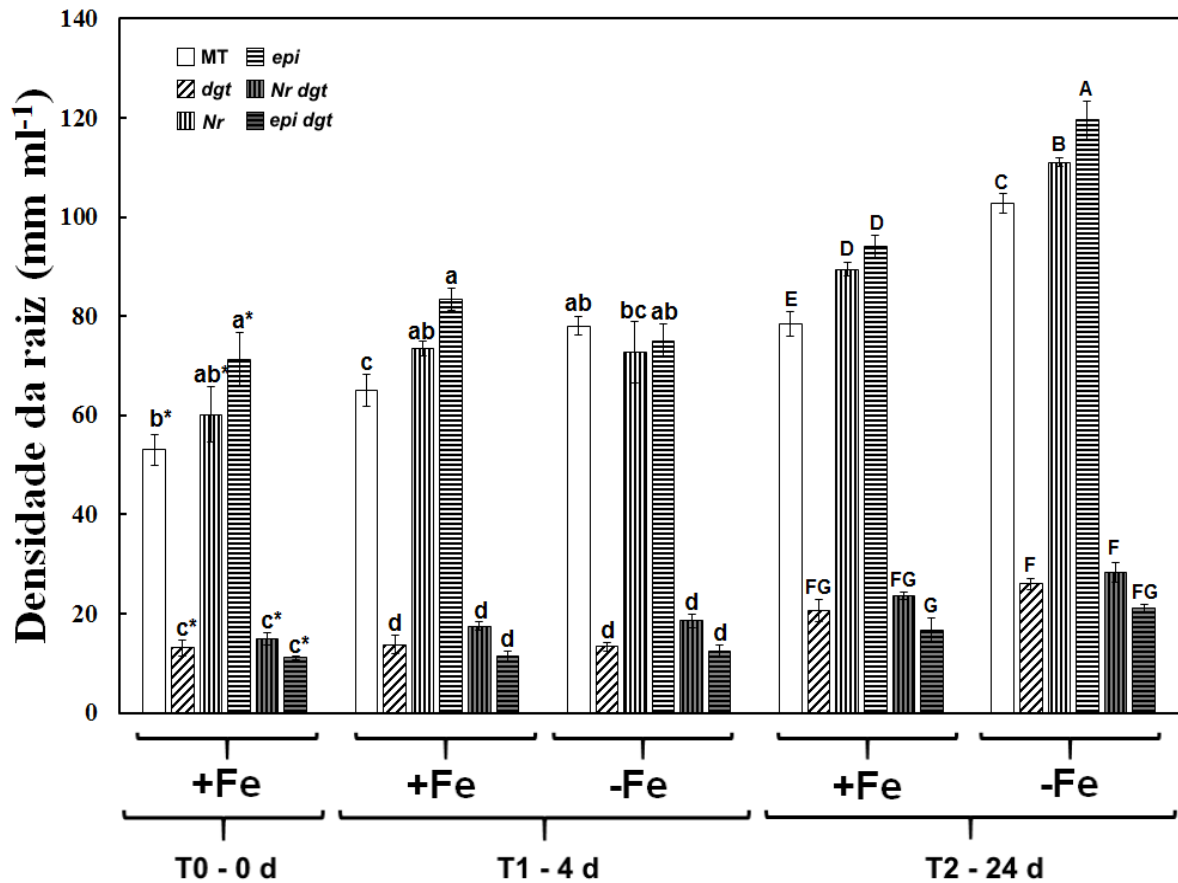


Figura 4.6. Densidade da raiz dos genótipos MT, *dgt*, *Nr*, *epi*, *Nr dgt* e *epi dgt* cultivados na presença (+) ou ausência (-) de Fe. T0 corresponde ao tempo anterior à retirada do Fe da solução nutritiva; T1 corresponde ao período de quatro dias com ou sem Fe na solução, e T2 corresponde ao período de 24 dias com ou sem Fe na solução. As barras são as médias de cada tratamento seguidas do erro padrão. As letras sobre as barras representam as diferenças calculadas entre as médias dos tratamentos por meio do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, para cada tempo.

No gráfico de diâmetro de raiz (mm) (Figura 4.7), os mutantes *dgt* e *epl* apresentaram diâmetro de raiz semelhantes entre si, entretanto maiores que do MT e do *Nr*, tanto no T0 como no T1 com e sem Fe. Porém, somente o *dgt* apresentou aumento no diâmetro da raiz no tratamento sem Fe no T1 (Figura 4.7). Em T2, os genótipos apresentaram maiores diâmetros nos tratamentos sem Fe, quando comparados ao tratamento com Fe, sendo que o *epl* apresentou maior diâmetro que os demais genótipos (Figura 4.7).

O genótipo *Nr dgt* apresentou interação epistática nos tempos T0 e T1 com Fe para o genótipo *dgt*, porém aditivo no T1 sem Fe, assim como no T2, pois seus resultados mostraram que o diâmetro de raiz foi semelhante ou intermediário aos dois parentais (Figura 4.7 e Tabela 4.7). Já os duplos mtantes *epl dgt* apresentaram interações sinérgicas no T0 e no T1 com Fe, sendo seu diâmetro de raiz maior que nos dois (Figura 4.7). Nos tratamentos sem Fe, tanto no T1 quanto no T2, o *epl dgt* apresentou interação epistática para o genótipo *dgt*, assim como no T2 com Fe (Figura 4.7 e tabela 4.7).

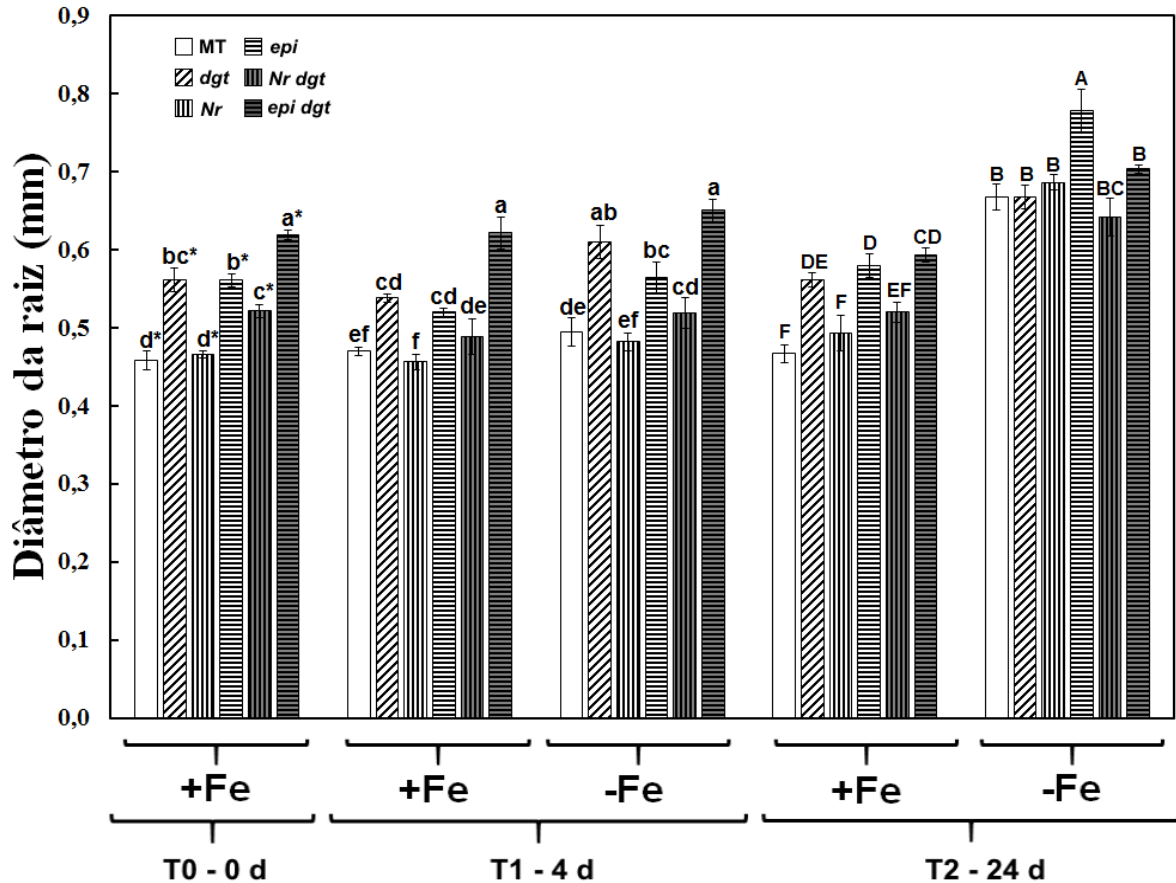


Figura 4.7. Diâmetro da raiz dos genótipos MT, *dgt*, *Nr*, *epi*, *Nr dgt* e *epi dgt* cultivados na presença (+) ou ausência (-) de Fe. T0 corresponde ao tempo anterior à retirada do Fe da solução nutritiva; T1 corresponde ao período de quatro dias com ou sem Fe na solução, e T2 corresponde ao período de 24 dias com ou sem Fe na solução. As barras são as médias de cada tratamento seguidas do erro padrão. As letras sobre as barras representam as diferenças calculadas entre as médias dos tratamentos por meio do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, para cada tempo.

*b. Área foliar e radicular:*

Na parte aérea, os mutantes em etileno *Nr* e *epi* apresentaram maior área que o MT e os demais mutantes *dgt*, *Nr dgt* e *epi dgt* no T0, e o mesmo ocorreu no T1 e no T2 com e sem Fe (Figura 4.8). Já no T2, todos os genótipos não apresentaram diferenças nos tratamentos com e sem Fe, com exceção do MT, que apresentou menor área sem Fe (Figura 4.8).

Para a raiz, o *epi* apresentou maior área no T0 que os demais genótipos (Figura 4.8). No T1, os genótipos não apresentaram diferenças entre os tratamentos com e

sem Fe (Figura 4.8). No T2, o *Nr* foi o que apresentou diferença na área de raiz, apresentando aumento no tratamento se Fe (Figura 4.8).

Para os duplos mutantes, tanto área foliar quanto área de raiz não foram alteradas nos tratamentos com e sem Fe ao longo dos tempos estudados (T0, T1 e T2) (Figura 4.8). O *Nr dgt* apresentou interação epistática para o genótipo *dgt* em todos os tempos e tratamentos estudados no que diz respeito à área foliar e radicular (Tabela 4.7). Para o *epi dgt*, a interação epistática para o *dgt* foi observada nos tempos T0 e T1 com e sem Fe, e a interação sinérgica no T2 com e sem Fe, sendo que esse duplo mutante apresentou menor área foliar que seus parentais (Tabela 4.7). Já para raiz, o *epi dgt* apresentou interação epistática para o genótipo *dgt* em todos os tempos e tratamentos estudados (Tabela 4.7).

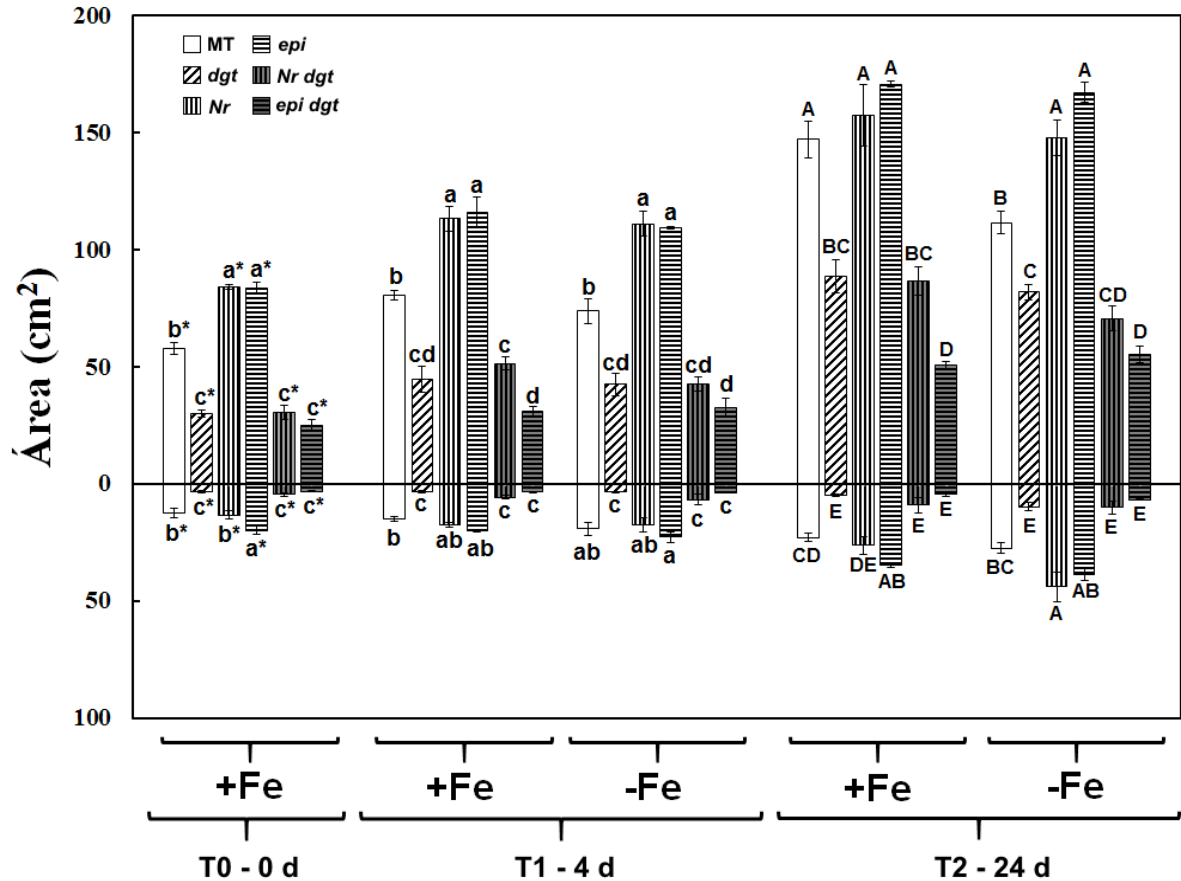


Figura 4.8. Área foliar e radicular dos genótipos MT, *dgt*, *Nr*, *epi*, *Nr dgt* e *epi dgt* cultivados na presença (+) ou ausência (-) de Fe. T0 corresponde ao tempo anterior à retirada do Fe da solução nutritiva; T1 corresponde ao período de quatro dias com ou sem Fe na solução, e T2 corresponde ao período de 24 dias com ou sem Fe na solução. As barras são as médias de cada tratamento seguidas do erro padrão. As letras sobre as barras representam as diferenças calculadas entre as médias dos tratamentos por meio do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, para cada tempo.

### c. Massa de matéria seca

Nos resultados de massa da matéria seca da parte aérea, o MT apresentou redução somente no T2 sem Fe, tendo o mesmo resultado o *dgt* (Figura 4.9). O *Nr* apresentou decréscimo de massa da matéria seca nos tratamentos sem Fe, tanto no T1, quanto no T2, ao passo que *epi* que não apresentou redução (Figura 4.9). Para os duplos mutantes, somente o *Nr dgt* apresentou redução de massa da matéria seca no T2 sem Fe (Figura 4.9).

Já para as raízes, pôde ser observado um aumento na massa da matéria seca quando ocorreu a deficiência de Fe no T1 para os genótipos MT e *ept* (Figura 4.9). Já no T2, todos os genótipos apresentaram aumento na massa da matéria seca para as raízes (Figura 4.9).

As interações observadas entre os fitormônios auxina e etileno nos duplos mutantes (*Nr dgt* e *ept dgt*) para a massa da matéria seca da raiz foi a epistática para o *dgt*, apresentado os resultados semelhantes a esse parental em todos os tempos e tratamentos (Tabela 4.7). Na parte aérea, o *Nr dgt* quanto o *ept dgt* apresentaram interação epistática no T1 com e sem Fe, assim como no T2 sem Fe (Tabela 4.7). Entretanto, no T2 com Fe a interação observada foi a sinérgica, pois se observou menor massa de matéria seca que os parentais (Tabela 4.7).

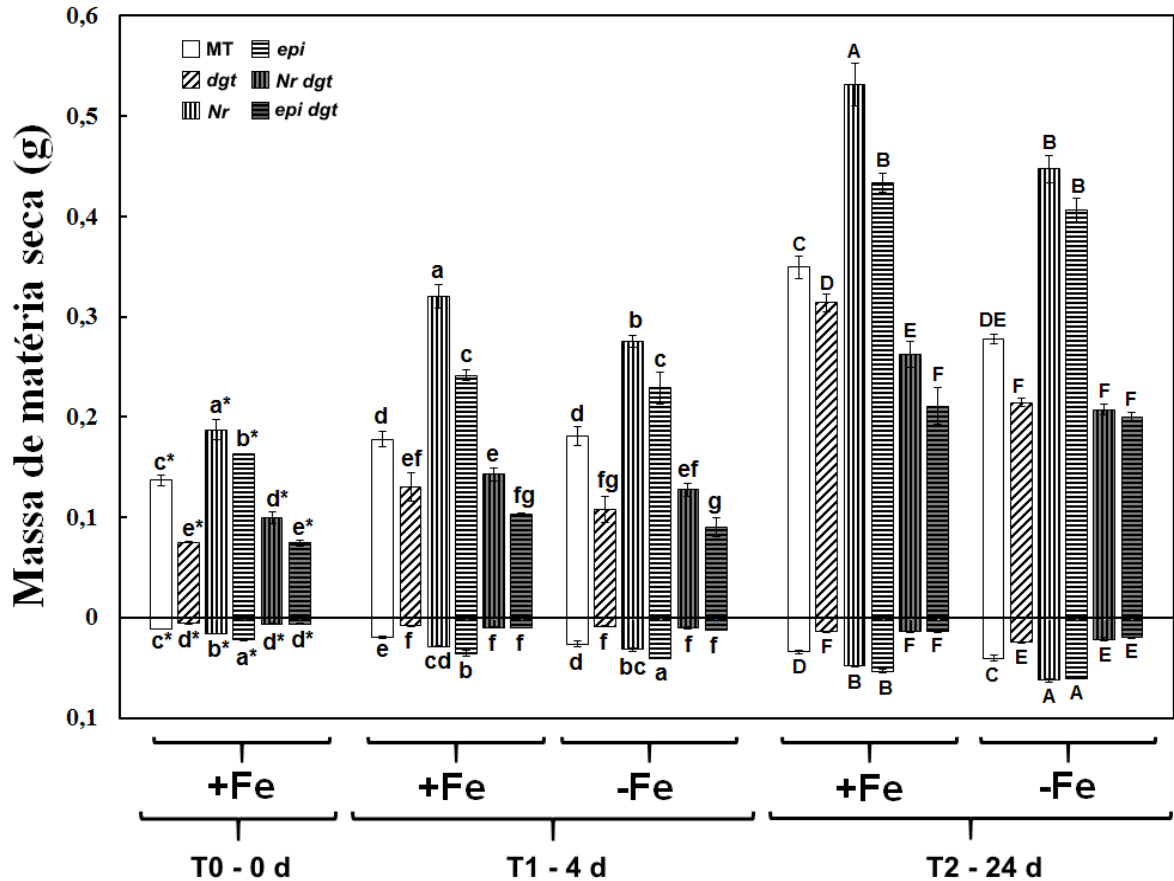


Figura 4.9. Massa da matéria seca da parte aérea e das raízes dos genótipos MT, *dgt*, *Nr*, *epi*, *Nr dgt* e *epi dgt* cultivados na presença (+) ou ausência (-) de Fe. T0 corresponde ao tempo anterior à retirada do Fe da solução nutritiva; T1 corresponde ao período de quatro dias com ou sem Fe na solução, e T2 corresponde ao período de 24 dias com ou sem Fe na solução. As barras são as médias de cada tratamento seguidas do erro padrão. As letras sobre as barras representam as diferenças calculadas entre as médias dos tratamentos por meio do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, para cada tempo.

#### d. Análise química de nutrientes

A análise química dos macros e dos micronutrientes nas folhas e na raiz foi realizada através da digestão das amostras e leitura em ICP-OES. Os macronutrientes foram expressos em  $\text{mg g}^{-1}$  e micronutrientes em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , para todos os genótipos e tempos, conforme descrito na tabela 4.8. A análise estatística foi realizada nos tempos, sendo comparados os tratamentos com e sem Fe.

O fósforo (P) no *dgt* e nos duplos mutantes *Nr dgt* e *epi dgt* mostraram conteúdos iguais desse nutriente na raiz, nos tempos T0 e T1 (com e sem Fe), o que não foi encontrado para o T2 (Tabela 4.8). Esse resultado mostra uma interação epistática para o *dgt* nos duplos mutantes, com quantificação de P metade dos demais genótipos (Tabela 4.8). O cálcio (Ca) seguiu a mesma tendência do P, uma vez que *dgt* e nos duplos mutantes *Nr dgt* e *epi dgt* mostraram conteúdos iguais desse nutriente na raiz, nos tempos T0 e T1 (com e sem Fe), e no T2 foi observado redução de Ca nos genótipos no tratamento sem Fe; ao contrário das folhas, que apresentaram aumento no conteúdo (Tabela 4.8). Para o Ca também observou-se interação epistática para o *dgt* nos duplos mutantes, com quantificação de Ca mais de quatro vezes abaixo dos demais genótipos (Tabela 4.8). Para o potássio (K), magnésio (Mg) e enxofre (S) não foram encontradas grandes alterações de conteúdo desses nutrientes nos tempos e nos tratamentos com e sem Fe (Tabela 4.8).

A quantificação do ferro (Fe) no T0 mostrou que o *dgt* e o *epi dgt* apresentaram maiores quantidades desse micronutriente na raiz. No T1 nas folhas mostrou que somente o *epi* mostrou diminuição no conteúdo desse metal no tratamento sem Fe, e o MT para a raiz (Tabela 4.8). Já no T2, todos os genótipos apresentaram redução de Fe nas folhas no tratamento sem Fe, e para a raiz, o *dgt* (Tabela 4.8). Para o cobre (Cu), foi possível observar maior quantidade desse micronutriente para o *epi dgt* no T0 na raiz. No T1, foi possível observar aumento do Cu nos genótipos *dgt*, *Nr dgt* e *epi dgt* no tratamento sem Fe maior que para os outros genótipos na raiz (Tabela 4.8). No T2, o *dgt*, *epi*, *Nr dgt* e *epi dgt* apresentaram maior quantidade de Cu no tratamento sem Fe na raiz (Tabela 4.8). Para o manganês (Mn), a quantidade apresentada na raiz é mais de 10 vezes a quantidade apresentada em folhas em todos os tempos e genótipos (Tabela 4.8). No T2, os genótipos no tratamento sem Fe apresentaram, aproximadamente, o dobro de Mn que no tratamento com Fe (Tabela 4.8). A quantificação de zinco (Zn) apresentou maiores conteúdos nas raízes que nas folhas, porém não foram encontradas grandes alterações de conteúdo desse nutriente nos tempos e nos tratamentos com e sem Fe (Tabela 4.8). A quantificação de boro (B) não foram encontradas grandes alterações de conteúdo desse nutriente nos tempos e nos tratamentos com e sem Fe (Tabela 4.8).



Tabela 4.8. Análise nutricional dos macronutrientes (mg g<sup>-1</sup>) e micronutrientes (µg g<sup>-1</sup>) das folhas e da raiz nos tempos T0, T1 e T2. (Continua)

Tratamentos		P	K	Ca		Mg	S	Fe	Cu	Mn		Zn	B	
		mg g <sup>-1</sup>												
		µg g <sup>-1</sup>												
T0 - 0 d (+Fe)	MT	folhas	11,6 ± 0,7 <sup>bc</sup>	52,4 ± 1,6 <sup>a</sup>	43,8 ± 1,0 <sup>a</sup>	11,2 ± 0,4 <sup>ab</sup>	12,3 ± 1,6 <sup>ab</sup>	91,7 ± 8,6 <sup>a</sup>	12,3 ± 0,5 <sup>bc</sup>	180,5 ± 14,6 <sup>a</sup>	27,9 ± 2,1 <sup>ab</sup>	112,6 ± 17,9 <sup>ab</sup>		
	MT	raiz	35,1 ± 0,6 <sup>a</sup>	47,0 ± 0,8 <sup>b</sup>	58,0 ± 1,3 <sup>a</sup>	4,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,9 ± 0,2 <sup>b</sup>	322,6 ± 53,8 <sup>bc</sup>	12,5 ± 0,9 <sup>b</sup>	2147,5 ± 267,9 <sup>a</sup>	223,5 ± 23,3 <sup>a</sup>	145,0 ± 12,7 <sup>ab</sup>		
	<i>dgt</i>	folhas	11,0 ± 0,8 <sup>bc</sup>	54,5 ± 5,6 <sup>a</sup>	40,7 ± 1,8 <sup>ab</sup>	9,8 ± 0,6 <sup>b</sup>	10,7 ± 0,6 <sup>b</sup>	96,8 ± 11,8 <sup>a</sup>	12,1 ± 1,0 <sup>bc</sup>	163,7 ± 16,0 <sup>ab</sup>	25,4 ± 1,8 <sup>bc</sup>	89,0 ± 3,7 <sup>b</sup>		
	<i>dgt</i>	raiz	5,2 ± 0,3 <sup>c</sup>	48,8 ± 3,0 <sup>b</sup>	7,0 ± 0,3 <sup>c</sup>	4,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,7 ± 0,4 <sup>ab</sup>	589,4 ± 94,7 <sup>ab</sup>	24,4 ± 5,6 <sup>b</sup>	1837,7 ± 240,1 <sup>ab</sup>	189,6 ± 40,6 <sup>ab</sup>	187,0 ± 39,6 <sup>a</sup>		
	<i>Nr</i>	folhas	10,2 ± 0,1 <sup>c</sup>	59,6 ± 10,1 <sup>a</sup>	38,8 ± 2,6 <sup>b</sup>	10,4 ± 0,9 <sup>ab</sup>	10,8 ± 1,4 <sup>b</sup>	86,1 ± 4,8 <sup>a</sup>	11,0 ± 0,2 <sup>c</sup>	145,9 ± 5,0 <sup>bc</sup>	20,4 ± 2,2 <sup>d</sup>	102,4 ± 12,0 <sup>ab</sup>		
	<i>Nr</i>	raiz	33,7 ± 3,0 <sup>a</sup>	50,3 ± 3,5 <sup>b</sup>	61,3 ± 6,5 <sup>a</sup>	4,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	6,2 ± 1,2 <sup>a</sup>	274,5 ± 28,4 <sup>c</sup>	10,9 ± 2,2 <sup>b</sup>	2441,8 ± 304,4 <sup>a</sup>	142,0 ± 19,5 <sup>bc</sup>	142,7 ± 25,1 <sup>ab</sup>		
	<i>epi</i>	folhas	12,5 ± 0,6 <sup>ab</sup>	55,3 ± 5,0 <sup>a</sup>	42,2 ± 1,4 <sup>a</sup>	11,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	13,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	96,3 ± 1,1 <sup>a</sup>	12,8 ± 0,8 <sup>bc</sup>	124,4 ± 9,4 <sup>c</sup>	24,4 ± 1,3 <sup>bc</sup>	123,9 ± 12,7 <sup>a</sup>		
	<i>epi</i>	raiz	23,2 ± 3,8 <sup>bc</sup>	57,0 ± 2,0 <sup>a</sup>	43,4 ± 7,5 <sup>b</sup>	4,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	391,9 ± 117,3 <sup>bc</sup>	10,0 ± 1,5 <sup>b</sup>	1818,4 ± 38,7 <sup>ab</sup>	90,3 ± 7,3 <sup>c</sup>	97,6 ± 8,8 <sup>b</sup>		
	<i>Nr dgt</i>	folhas	11,0 ± 0,3 <sup>bc</sup>	59,7 ± 4,7 <sup>a</sup>	41,0 ± 0,9 <sup>ab</sup>	10,0 ± 0,2 <sup>b</sup>	11,4 ± 0,6 <sup>ab</sup>	88,5 ± 3,8 <sup>a</sup>	14,3 ± 1,4 <sup>b</sup>	152,0 ± 17,4 <sup>ab</sup>	23,1 ± 1,3 <sup>cd</sup>	88,9 ± 12,1 <sup>b</sup>		
	<i>Nr dgt</i>	raiz	6,8 ± 1,6 <sup>c</sup>	52,6 ± 4,6 <sup>ab</sup>	9,9 ± 4,1 <sup>c</sup>	4,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,9 ± 0,3 <sup>ab</sup>	375,1 ± 63,7 <sup>bc</sup>	27,8 ± 13,7 <sup>b</sup>	1807,2 ± 196,6 <sup>ab</sup>	167,9 ± 34,9 <sup>ab</sup>	191,0 ± 31,0 <sup>a</sup>		
	<i>epi dgt</i>	folhas	14,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	57,7 ± 3,4 <sup>a</sup>	42,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	10,9 ± 0,2 <sup>ab</sup>	13,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	92,8 ± 2,5 <sup>a</sup>	18,1 ± 1,4 <sup>a</sup>	143,7 ± 6,7 <sup>bc</sup>	30,2 ± 1,2 <sup>a</sup>	101,0 ± 3,7 <sup>ab</sup>		
	<i>epi dgt</i>	raiz	4,9 ± 0,1 <sup>c</sup>	51,8 ± 0,6 <sup>ab</sup>	5,6 ± 0,3 <sup>c</sup>	4,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	4,8 ± 0,2 <sup>ab</sup>	780,2 ± 203,4 <sup>a</sup>	50,8 ± 13,4 <sup>a</sup>	1335,2 ± 56,6 <sup>b</sup>	220,1 ± 42,1 <sup>a</sup>	180,2 ± 24,6 <sup>a</sup>		
	T1 - 4 d (+Fe)	MT	folhas	11,1 ± 0,7 <sup>bc</sup>	49,3 ± 6,2 <sup>bc</sup>	42,0 ± 1,7 <sup>ab</sup>	11,7 ± 0,4 <sup>ab</sup>	13,0 ± 0,5 <sup>bc</sup>	110,6 ± 8,1 <sup>ab</sup>	10,4 ± 0,7 <sup>de</sup>	176,5 ± 25,0 <sup>ab</sup>	22,5 ± 0,9 <sup>bc</sup>	117,2 ± 26,5 <sup>bc</sup>	
		MT	raiz	31,1 ± 8,7 <sup>ab</sup>	46,2 ± 3,7 <sup>ab</sup>	61,0 ± 13,8 <sup>ab</sup>	7,5 ± 2,4 <sup>a</sup>	6,1 ± 1,9 <sup>a</sup>	940,7 ± 386,5 <sup>a</sup>	12,2 ± 1,9 <sup>c</sup>	1611,6 ± 616,9 <sup>ab</sup>	126,6 ± 12,1 <sup>bc</sup>	151,8 ± 15,4 <sup>bc</sup>	
		<i>dgt</i>	folhas	11,1 ± 1,1 <sup>bc</sup>	49,8 ± 4,5 <sup>bc</sup>	41,4 ± 1,8 <sup>ab</sup>	10,8 ± 0,4 <sup>b</sup>	11,2 ± 1,1 <sup>c</sup>	97,3 ± 8,8 <sup>ab</sup>	11,8 ± 1,2 <sup>cd</sup>	201,7 ± 28,4 <sup>ab</sup>	22,8 ± 1,9 <sup>bc</sup>	113,1 ± 21,2 <sup>bc</sup>	
		<i>dgt</i>	raiz	5,7 ± 0,5 <sup>d</sup>	44,5 ± 3,0 <sup>ab</sup>	9,1 ± 1,8 <sup>c</sup>	5,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	4,4 ± 0,0 <sup>a</sup>	662,5 ± 67,3 <sup>ab</sup>	12,3 ± 0,9 <sup>c</sup>	1670,7 ± 212,0 <sup>ab</sup>	129,1 ± 29,2 <sup>bc</sup>	239,6 ± 39,5 <sup>a</sup>	
		<i>Nr</i>	folhas	8,9 ± 0,6 <sup>d</sup>	41,5 ± 5,0 <sup>e</sup>	38,3 ± 2,4 <sup>b</sup>	11,4 ± 0,6 <sup>ab</sup>	11,5 ± 1,2 <sup>c</sup>	106,1 ± 6,5 <sup>ab</sup>	9,7 ± 0,8 <sup>ef</sup>	155,8 ± 20,6 <sup>cd</sup>	17,6 ± 1,8 <sup>d</sup>	160,5 ± 15,7 <sup>ab</sup>	
		<i>Nr</i>	raiz	27,4 ± 2,4 <sup>ab</sup>	31,8 ± 1,8 <sup>bc</sup>	63,2 ± 3,8 <sup>ab</sup>	6,2 ± 2,5 <sup>a</sup>	4,9 ± 1,4 <sup>a</sup>	299,1 ± 101,5 <sup>bc</sup>	9,3 ± 1,5 <sup>c</sup>	1433,4 ± 296,0 <sup>ab</sup>	85,0 ± 4,7 <sup>cd</sup>	142,0 ± 16,6 <sup>bc</sup>	
<i>epi</i>		folhas	11,1 ± 0,7 <sup>bc</sup>	49,8 ± 3,6 <sup>bc</sup>	42,2 ± 2,5 <sup>ab</sup>	11,6 ± 0,7 <sup>ab</sup>	14,8 ± 0,4 <sup>b</sup>	115,6 ± 6,3 <sup>a</sup>	11,2 ± 1,1 <sup>cd</sup>	134,1 ± 10,5 <sup>e</sup>	22,3 ± 2,2 <sup>bc</sup>	194,2 ± 10,0 <sup>a</sup>		
<i>epi</i>		raiz	18,4 ± 2,5 <sup>bc</sup>	34,0 ± 8,2 <sup>bc</sup>	86,6 ± 22,3 <sup>a</sup>	5,9 ± 2,4 <sup>a</sup>	5,8 ± 1,9 <sup>a</sup>	424,2 ± 19,8 <sup>bc</sup>	9,0 ± 1,0 <sup>c</sup>	1168,9 ± 156,2 <sup>ab</sup>	63,4 ± 6,5 <sup>d</sup>	108,1 ± 14,4 <sup>c</sup>		
<i>Nr dgt</i>		folhas	10,2 ± 0,6 <sup>bc</sup>	50,2 ± 4,2 <sup>bc</sup>	44,0 ± 4,6 <sup>ab</sup>	10,6 ± 0,8 <sup>b</sup>	10,8 ± 1,0 <sup>c</sup>	93,7 ± 7,1 <sup>ab</sup>	11,2 ± 0,7 <sup>cd</sup>	208,9 ± 12,8 <sup>ab</sup>	26,1 ± 3,2 <sup>ab</sup>	104,5 ± 13,7 <sup>c</sup>		
<i>Nr dgt</i>		raiz	12,5 ± 6,1 <sup>cd</sup>	49,3 ± 1,7 <sup>ab</sup>	24,8 ± 15,6 <sup>c</sup>	4,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	552,2 ± 125,4 <sup>ab</sup>	9,4 ± 1,6 <sup>c</sup>	1600,4 ± 172,2 <sup>ab</sup>	126,4 ± 13,8 <sup>bc</sup>	194,8 ± 32,7 <sup>ab</sup>		
<i>epi dgt</i>		folhas	13,7 ± 0,9 <sup>a</sup>	56,4 ± 1,4 <sup>a</sup>	42,8 ± 1,8 <sup>ab</sup>	11,7 ± 53,0 <sup>ab</sup>	11,6 ± 0,6 <sup>c</sup>	110,3 ± 8,7 <sup>ab</sup>	13,9 ± 0,6 <sup>ab</sup>	148,5 ± 11,9 <sup>de</sup>	30,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	117,8 ± 7,3 <sup>bc</sup>		
<i>epi dgt</i>		raiz	6,6 ± 1,3 <sup>d</sup>	54,0 ± 0,7 <sup>ab</sup>	6,3 ± 0,4 <sup>c</sup>	4,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	424,3 ± 25,9 <sup>bc</sup>	22,4 ± 3,1 <sup>b</sup>	996,3 ± 288,5 <sup>ab</sup>	123,2 ± 19,0 <sup>bc</sup>	134,1 ± 9,6 <sup>bc</sup>		

Tabela 4.8. Análise nutricional dos macronutrientes (mg g<sup>-1</sup>) e micronutrientes (µg g<sup>-1</sup>) das folhas e da raiz nos tempos T0, T1 e T2. (Continuação)

Tratamentos		P	K	Ca		Mg	S	Fe	Cu	Mn	Zn	B	
		mg g <sup>-1</sup>											
		µg g <sup>-1</sup>											
MT	folhas	11,2 ± 0,2 bc	45,5 ± 4,8	de 46,0 ± 0,5	ab 11,4 ± 0,3	ab 12,3 ± 0,9 c	95,4 ± 17,2	ab 9,5 ± 0,3 f	196,3 ± 8,8	ab 20,2 ± 2,1 cd	116,0 ± 11,8 bc		
	raiz	19,7 ± 9,0 bc	42,8 ± 2,0	ab 31,2 ± 19,1	bc 5,3 ± 0,6	a 5,2 ± 0,6 a	313,6 ± 105,1	bc 9,2 ± 0,1 c	1757,9 ± 275,9	ab 104,0 ± 10,0 cd	170,6 ± 31,2 ab		
<i>dgt</i>	folhas	11,5 ± 0,8 bc	47,8 ± 3,6	cd 44,7 ± 1,2	ab 10,9 ± 0,6	b 11,0 ± 0,4 c	95,8 ± 8,4	ab 12,3 ± 1,1 bc	213,4 ± 9,1	a 27,0 ± 2,3 ab	113,3 ± 25,1 bc		
	raiz	4,8 ± 0,3 d	53,5 ± 0,1	ab 6,1 ± 0,4	c 5,0 ± 0,3	a 4,3 ± 0,6 a	720,6 ± 125,8	ab 38,5 ± 1,5 a	1574,1 ± 286,3	ab 198,9 ± 29,7 a	185,2 ± 21,6 ab		
T1 - 4 d (-Fe)	<i>Nr</i>	folhas	9,7 ± 0,4 cd	46,9 ± 4,1	de 44,9 ± 1,4	ab 11,6 ± 0,3	ab 11,2 ± 0,5 c	92,0 ± 7,4	ab 9,9 ± 0,5 ef	161,8 ± 7,3	bc 21,6 ± 0,1 bc	133,0 ± 24,9 bc	
	<i>Nr</i>	raiz	40,5 ± 7,2 a	25,8 ± 12,8 c	89,7 ± 16,4 a	4,1 ± 0,4	a 8,0 ± 3,5 a	189,0 ± 43,5	c 9,3 ± 1,6 c	1999,3 ± 407,3	a 109,9 ± 27,2 cd	140,0 ± 28,5 bc	
<i>epi</i>	folhas	14,7 ± 0,3 a	54,1 ± 2,8	ab 48,5 ± 3,9	a 12,9 ± 1,1	a 17,3 ± 1,3 a	77,1 ± 3,9	c 12,3 ± 0,4 bc	141,9 ± 20,8	e 23,8 ± 2,5 bc	158,7 ± 11,6 ab		
	raiz	25,5 ± 2,6 bc	35,0 ± 8,8	bc 59,5 ± 5,3	ab 5,6 ± 1,6	a 6,5 ± 0,8 a	282,5 ± 34,8	bc 10,9 ± 1,7 c	1702,0 ± 209,8	ab 98,7 ± 16,0 cd	132,3 ± 33,3 bc		
<i>Nr dgt</i>	folhas	10,9 ± 0,1 bc	54,0 ± 4,9	ab 43,5 ± 3,0	ab 11,0 ± 0,6	ab 11,5 ± 0,7 c	83,8 ± 8,1	bc 13,0 ± 0,6 ab	196,6 ± 21,4	ab 26,6 ± 4,2 ab	92,8 ± 6,7 c		
	raiz	4,6 ± 0,3 d	62,7 ± 11,7	a 5,6 ± 0,3	c 4,6 ± 0,2	a 4,4 ± 0,4 a	383,4 ± 77,0	bc 45,5 ± 5,4 a	1211,0 ± 188,1	ab 220,2 ± 32,2 a	190,5 ± 17,7 ab		
<i>epi dgt</i>	folhas	14,1 ± 0,3 a	52,4 ± 2,7	ab 46,0 ± 0,3	ab 12,1 ± 0,1	ab 11,6 ± 0,4 c	92,5 ± 1,1	ab 14,6 ± 0,5 a	163,9 ± 13,0	ab 31,0 ± 1,1 a	119,5 ± 5,8 bc		
	raiz	8,6 ± 3,2 d	48,1 ± 3,9	ab 6,7 ± 0,4	c 4,2 ± 0,4	a 3,9 ± 0,2 a	518,8 ± 46,4	ab 37,1 ± 5,3 a	835,0 ± 63,7	b 175,4 ± 16,2 ab	141,0 ± 19,1 bc		
MT	folhas	11,3 ± 0,2 cd	53,4 ± 1,8	ab 41,4 ± 3,4	cd 11,9 ± 0,8	bc 15,0 ± 1,1 bc	103,5 ± 4,8	ab 13,5 ± 0,1 bc	160,0 ± 23,9	fg 21,8 ± 0,8 cd	175,2 ± 8,5 ab		
	raiz	45,2 ± 5,0 a	37,7 ± 1,3	b 84,6 ± 9,9	a 4,3 ± 0,9	ab 4,7 ± 0,8 bc	174,4 ± 31,3	c 9,6 ± 1,7 e	2438,7 ± 172,0	ab 148,5 ± 19,7 ab	137,4 ± 4,2 cd		
<i>dgt</i>	folhas	11,2 ± 0,9 cd	53,6 ± 2,2	ab 45,4 ± 1,8	bc 11,2 ± 0,3	bc 13,2 ± 0,7 c	95,0 ± 12,9	b 9,5 ± 0,3 e	203,7 ± 9,0	ef 21,6 ± 0,2 cd	111,5 ± 22,2 e		
	raiz	16,4 ± 1,2 b	45,4 ± 1,4	ab 13,9 ± 5,4	b 4,0 ± 0,4	ab 4,2 ± 0,5 c	580,1 ± 132,1	a 21,9 ± 7,6 de	1898,7 ± 520,7	ab 124,3 ± 47,9 ab	185,2 ± 12,0 b		
T2 - 24 d (+Fe)	<i>Nr</i>	folhas	10,7 ± 1,1 de	57,5 ± 5,4	ab 41,7 ± 3,6	cd 11,0 ± 0,6	cd 14,0 ± 0,9 c	99,7 ± 2,1	b 12,4 ± 0,0 cd	128,9 ± 12,5	gh 17,8 ± 2,0 d	159,7 ± 11,9 bc	
	<i>Nr</i>	raiz	41,1 ± 7,5 a	41,8 ± 5,5	b 81,9 ± 14,9	a 5,8 ± 1,1	a 8,0 ± 2,2 a	174,1 ± 27,7	c 9,0 ± 1,0 e	2534,0 ± 246,4	a 110,4 ± 22,8 bc	113,7 ± 6,3 de	
<i>epi</i>	folhas	13,7 ± 0,3 ab	60,1 ± 5,5	a 45,6 ± 2,0	bc 11,1 ± 0,0	cd 19,1 ± 0,1 a	122,5 ± 9,7	a 14,5 ± 0,7 bc	103,7 ± 18,4	h 18,8 ± 1,9 d	199,9 ± 24,4 ab		
	raiz	16,4 ± 4,2 b	44,8 ± 2,5	ab 34,4 ± 7,3	b 5,6 ± 1,5	a 6,4 ± 0,9 ab	249,6 ± 84,3	bc 10,7 ± 1,2 e	1200,1 ± 283,0	c 63,3 ± 6,8 cd	86,6 ± 4,7 e		
<i>Nr dgt</i>	folhas	9,0 ± 1,4 e	51,4 ± 1,5	bc 40,6 ± 3,9	d 9,9 ± 1,2	d 11,1 ± 2,3 c	97,2 ± 10,2	b 10,7 ± 0,9 de	165,9 ± 30,3	fg 19,5 ± 1,1 d	115,6 ± 16,2 de		
	raiz	18,7 ± 9,2 b	43,8 ± 0,8	ab 25,5 ± 19,2	b 2,9 ± 0,4	bc 4,0 ± 0,1 c	215,9 ± 58,4	bc 23,9 ± 6,4 de	1537,5 ± 295,8	bc 134,8 ± 39,1 ab	214,1 ± 1,4 a		
<i>epi dgt</i>	folhas	14,7 ± 0,4 ab	56,8 ± 2,5	ab 49,2 ± 5,3	bc 11,3 ± 0,6	bc 15,1 ± 1,0 bc	97,2 ± 2,3	b 14,0 ± 1,4 bc	180,7 ± 22,5	fg 24,3 ± 2,5 bc	128,1 ± 9,3 cd		
	raiz	8,3 ± 1,3 b	41,6 ± 3,7	b 7,6 ± 0,9	b 3,6 ± 0,5	ab 4,1 ± 0,4 c	376,8 ± 64,1	b 46,1 ± 12,7 cd	1055,8 ± 148,5	c 204,7 ± 43,9 a	153,6 ± 18,4 c		

Tabela 4.8. Análise nutricional dos macronutrientes (mg g<sup>-1</sup>) e micronutrientes (µg g<sup>-1</sup>) das folhas e da raiz nos tempos T0, T1 e T2. (Conclusão)

Tratamentos		(Conclusão)										
		P	K	Ca		Mg	S	Fe	Cu	Mn		Zn
		mg g <sup>-1</sup>										
		µg g <sup>-1</sup>										
MT	folhas	13,0 ± 1,2 bc	40,5 ± 3,0 e	52,9 ± 2,9 ab	13,4 ± 0,7 ab	14,2 ± 0,9 c	71,2 ± 6,6 c	14,9 ± 0,8 ab	308,8 ± 29,0 cd	28,0 ± 0,9 ab	183,6 ± 37,0 ab	
MT	raiz	10,3 ± 0,3 b	58,4 ± 5,2 a	8,7 ± 1,0 b	2,7 ± 0,3 bc	5,7 ± 0,6 ab	123,0 ± 11,6 c	32,6 ± 3,8 de	1415,4 ± 60,3 c	92,2 ± 27,1 bc	99,1 ± 7,2 e	
<i>dgt</i>	folhas	12,9 ± 0,3 bc	42,4 ± 1,9 e	56,2 ± 3,4 ab	13,4 ± 0,5 ab	12,5 ± 0,7 c	71,5 ± 1,6 c	13,6 ± 0,7 bc	443,8 ± 9,3 a	26,2 ± 0,8 ab	185,4 ± 16,0 ab	
<i>dgt</i>	raiz	9,6 ± 1,1 b	50,5 ± 4,1 ab	8,9 ± 1,1 b	3,0 ± 0,2 bc	4,5 ± 0,6 bc	104,3 ± 11,4 c	57,9 ± 10,9 bc	1066,2 ± 178,7 c	102,5 ± 27,1 bc	136,7 ± 21,7 cd	
T2 - 24 d (Fe)	<i>Nr</i>	folhas	11,4 ± 0,9 cd	43,8 ± 2,0 de	51,5 ± 2,3 ab	13,1 ± 0,2 ab	13,2 ± 0,7 c	68,3 ± 4,6 c	14,5 ± 1,0 bc	261,6 ± 19,1 de	19,0 ± 2,3 d	190,8 ± 23,5 ab
	<i>Nr</i>	raiz	11,4 ± 0,8 b	51,3 ± 2,7 ab	13,9 ± 2,9 b	5,0 ± 1,6 ab	7,2 ± 0,3 ab	98,8 ± 10,8 c	22,8 ± 1,4 de	997,9 ± 188,1 c	68,3 ± 9,7 c	95,2 ± 11,0 e
T2 - 24 d (Fe)	<i>e</i>	folhas	16,4 ± 0,2 a	47,9 ± 0,9 cd	61,8 ± 3,0 a	14,4 ± 0,5 a	18,6 ± 1,6 ab	64,3 ± 5,2 c	16,8 ± 0,4 ab	265,3 ± 27,4 de	25,0 ± 2,4 ab	230,2 ± 17,1 a
	<i>e</i>	raiz	10,4 ± 2,1 b	48,2 ± 7,6 ab	11,1 ± 1,7 b	3,8 ± 1,0 ab	6,7 ± 1,0 ab	157,7 ± 40,8 c	28,3 ± 6,8 de	1102,2 ± 252,7 c	80,8 ± 25,0 c	88,0 ± 5,9 e
	<i>Nr dgt</i>	folhas	11,4 ± 0,5 cd	44,1 ± 1,2 de	56,0 ± 1,0 ab	13,1 ± 0,3 ab	12,5 ± 0,4 c	62,0 ± 0,7 c	13,9 ± 0,4 bc	386,3 ± 23,0 ab	25,8 ± 0,4 ab	166,2 ± 12,0 bc
	<i>Nr dgt</i>	raiz	10,5 ± 1,2 b	44,9 ± 0,2 ab	7,8 ± 1,5 b	2,8 ± 0,3 bc	7,3 ± 0,8 ab	110,9 ± 32,8 c	75,2 ± 15,8 b	1777,2 ± 618,1 ab	130,1 ± 22,6 ab	150,0 ± 15,5 c
	<i>e dgt</i>	folhas	14,3 ± 1,8 ab	53,5 ± 3,6 ab	49,6 ± 6,1 bc	12,3 ± 1,1 ab	12,2 ± 2,2 c	63,0 ± 3,5 c	15,1 ± 0,5 ab	359,0 ± 29,3 bc	29,1 ± 1,4 a	138,9 ± 19,6 bc
	<i>e dgt</i>	raiz	9,2 ± 0,5 b	40,9 ± 0,6 b	7,4 ± 2,2 b	2,2 ± 0,2 c	6,8 ± 0,3 ab	209,8 ± 24,5 bc	107,2 ± 11,0 a	907,8 ± 78,3 c	174,6 ± 29,5 ab	144,3 ± 3,1 c

As letras representam as diferenças calculadas entre as médias dos tratamentos por meio do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, para cada tempo.

## 4.5. Análises bioquímicas

### a. Clorofilas foliares totais

Nos resultados de conteúdo de clorofila total *a+b* (Figura 4.10), os genótipos apresentaram diferenças apenas no T2, quando comparados os tratamentos com e sem Fe, sendo que o MT apresentou maior decréscimo comparada aos outros genótipos. O mutante *epi* apresentou menores conteúdos de clorofila total quando comparados aos outros genótipos ao longo do tempo, ao passo que no T2 sem Fe esse genótipo apresentou igual conteúdo quando comparado ao *Nr* (Figura 4.10).

Em T0, os duplos mutantes não apresentaram diferenças significativas em relação ao conteúdo de clorofilas *a+b* dos demais genótipos, sendo considerada a interação como aditiva (Figura 4.10 e Tabela 4.7). Em T1 com Fe, o genótipo *dgt* apresentou-se epistático sobre o *Nr* no duplo mutante *Nr dgt* e sem Fe não apresentou diferenças entre seus parentais (Figura 4.10 e Tabela 4.7). Já o *epi dgt* apresentou interação epistática para o genótipo *dgt* tanto com Fe quanto sem Fe no T1 (Figura 4.10 e Tabela 4.7). No T2, os duplos mutantes não apresentaram diferenças estatísticas de seus parentais quando estavam no tratamento com Fe; já sem Fe, o *Nr dgt* apresentou interação epistática para o parental *dgt* e o *epi dgt* apresentou interação epistática para o parental *epi* (Figura 4.10 e Tabela 4.7).

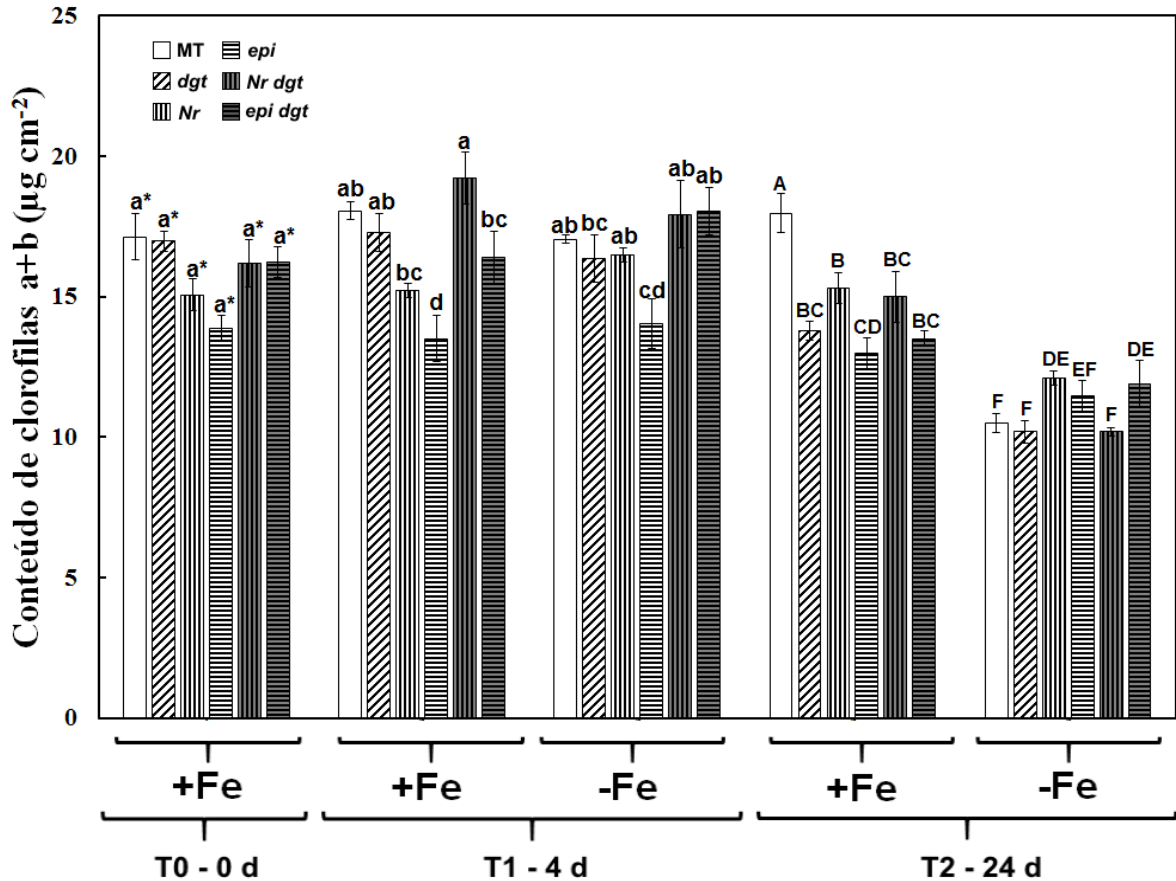


Figura 4.10. Conteúdo de clorofilas a+b dos genótipos MT, *dgt*, *Nr*, *epi*, *Nr dgt* e *epi dgt* cultivados na presença (+) ou ausência (-) de Fe. T0 corresponde ao tempo anterior à retirada do Fe da solução nutritiva; T1 corresponde ao período de quatro dias com ou sem Fe na solução, e T2 corresponde ao período de 24 dias com ou sem Fe na solução. As barras são as médias de cada tratamento seguidas do erro padrão. As letras sobre as barras representam as diferenças calculadas entre as médias dos tratamentos por meio do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, para cada tempo.

A figura 4.11 são as fotos dos genótipos estudados no T2, mostrando as diferenças visuais entre os tratamentos com (+) e sem (-) Fe. Nessa figura é possível observar que os maiores sintomas visuais da deficiência de Fe ocorre nas folhas mais jovens das plantas.

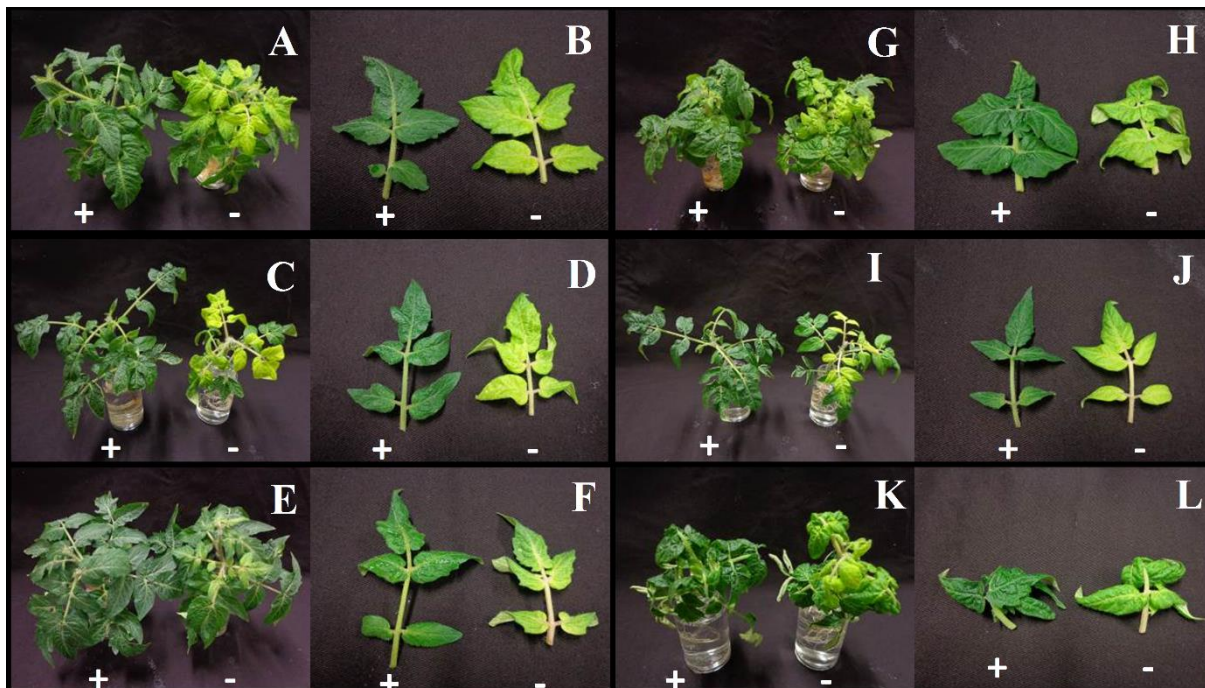


Figura 4.11. Sintomas visuais da deficiência de Fe nos genótipos A, B. MT, C, D. *dgt*, E, F. *Nr*, G, H. *epi*, I, J. *Nr dgt* e L, L. *epi dgt* cultivados na presença (+) ou ausência (-) de Fe, no T2 corresponde ao período de 24 dias. Como pode ser observado, as plantas apresentam-se cloróticas comparadas ao tratamento + Fe.

#### b. Peroxidação Lipídica:

Na parte aérea, os genótipos MT, *dgt*, *Nr* e *Nr dgt* apresentaram maior conteúdo de MDA que os genótipos *epi* e *epi dgt* no T0 (Figura 4.12). Em T1, somente o genótipo *epi* apresentou aumento no conteúdo de MDA no tratamento sem Fe, quando comparado ao tratamento com Fe (Figura 4.12). Em T2, os genótipos que apresentaram maior conteúdo de MDA no tratamento sem Fe foram o MT e o duplo mutante *Nr dgt* (Figura 4.12). Já para o *epi dgt* o tratamento com Fe apresentou maior conteúdo de MDA que o tratamento sem Fe (Figura 4.12).

Para a raiz, o MT e o *Nr* apresentaram menor conteúdo de MDA que os demais genótipos no T0 (Figura 4.12). No T1, os genótipos MT, *Nr dgt* e *epi dgt* apresentaram aumento no conteúdo de MDA no tratamento sem Fe quando comparados aos tratamentos com Fe (Figura 4.12). No T2, com exceção do genótipo *epi dgt*, os demais genótipos apresentaram maior conteúdo de MDA no tratamento sem Fe que no tratamento com Fe (Figura 4.12).

O *Nr dgt* não apresentou diferenças dos seus parentais em T0, bem como no T1 sem Fe para a parte aérea (Figura 4.12 e Tabela 4.7). Em T2, o *Nr dgt* interação sinérgica na parte aérea, pois apresentou menor conteúdo de MDA que seus parentais (*Nr* e *dgt*) no tratamento com Fe, ao passo que no tratamento sem Fe, o *Nr dgt* apresentou interação epistática para seu parental *Nr* (Figura 4.12 e Tabela 4.7). Ocorreu epistasia do mutante *epi* sobre o *dgt* para o duplo mutante *epi dgt* nos tempos T0, T1 com e sem Fe e T2 sem Fe na parte aérea; já no T2 com Fe, a interação epistática foi para o *dgt* (Figura 4.12 e Tabela 4.7).

Na raiz, observou-se interação epistática do *dgt* sobre o *Nr* no duplo mutante *Nr dgt* em T0 e nos tempos T1 e T2 sem Fe para o *Nr* (Figura 4.12 e Tabela 4.7). Em T1 com Fe, o *Nr dgt* não apresentou diferença significativa dos dois parentais *Nr* e *dgt*, enquanto que em T2 com Fe, o *Nr dgt* mostrou efeito sinérgico, apresentando menor conteúdo de MDA que os simples mutantes *Nr* e *dgt* (Figura 4.12 e Tabela 4.7). O *epi dgt* apresentou interação epistática para o parental *epi* no T0 e epistático para o *dgt* no T2 sem Fe (Figura 4.12 e Tabela 4.7). Já no T1 com Fe, o *epi dgt* apresentou interação aditiva, e no tratamento sem Fe não apresentou diferença entre seus parentais *epi* e *dgt* (Figura 4.12 e Tabela 4.7). Em T2 com Fe, o *epi dgt* apresentou interação sinérgica e maior conteúdo de MDA que *epi* e *dgt* (Figura 4.12 e Tabela 4.7).

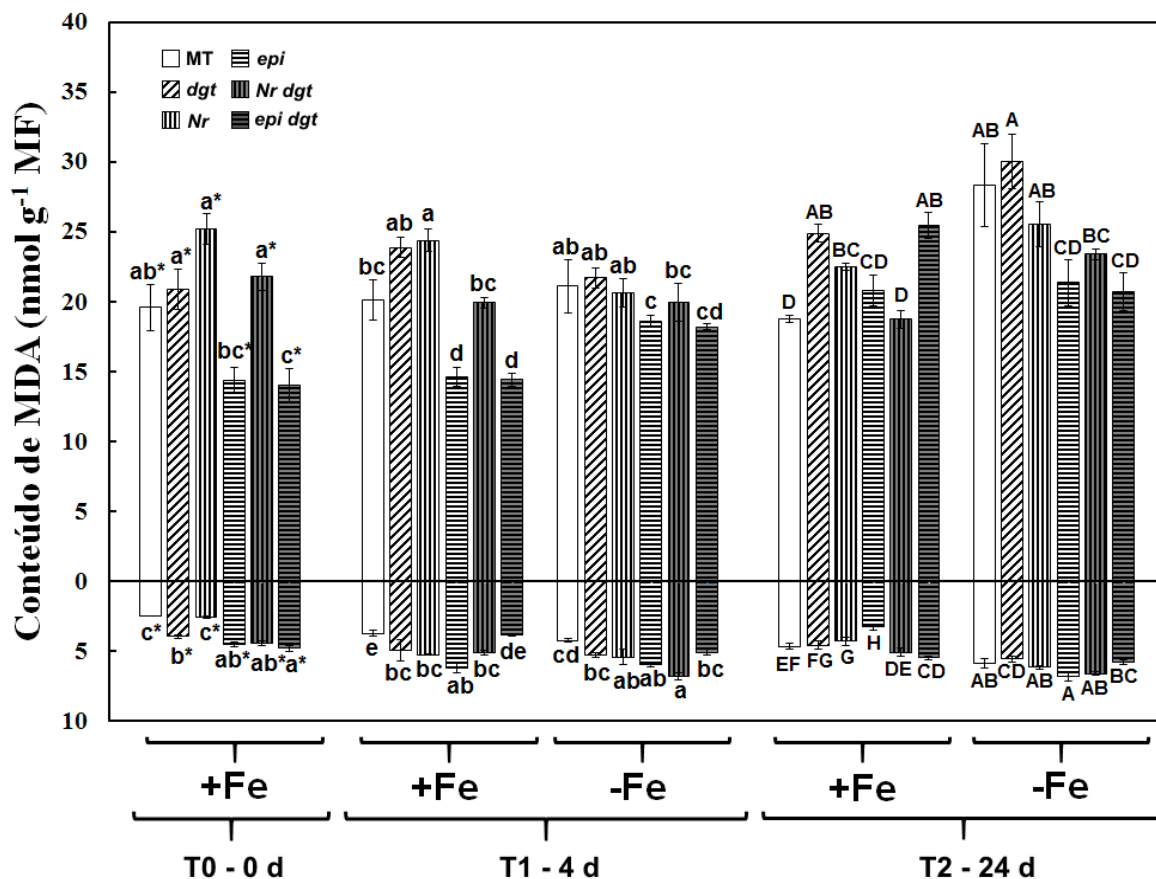


Figura 4.12. Conteúdo de MDA dos genótipos MT, *dgt*, *Nr*, *epi*, *Nr dgt* e *epi dgt* cultivados na presença (+) ou ausência (-) de Fe. T0 corresponde ao tempo anterior à retirada do Fe da solução nutritiva; T1 corresponde ao período de quatro dias com ou sem Fe na solução, e T2 corresponde ao período de 24 dias com ou sem Fe na solução. As barras são as médias de cada tratamento seguidas do erro padrão. As letras sobre as barras representam as diferenças calculadas entre as médias dos tratamentos por meio do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, para cada tempo.

### c. Conteúdo de Peróxido de Hidrogênio:

Para o conteúdo de  $H_2O_2$  na parte aérea em T0, o *dgt* e o *Nr dgt* apresentaram maiores concentrações que os demais genótipos (Figura 4.13). Em T1, o *dgt*, *Nr*, *epi* e *Nr dgt* apresentaram aumento no conteúdo de  $H_2O_2$  no tratamento sem Fe quando comparados ao tratamento com Fe (Figura 4.13). Já em T2, os genótipos que apresentaram diferenças com aumento no conteúdo de  $H_2O_2$  no tratamento sem Fe quando comparados ao tratamento com Fe foram o MT, *dgt* e o *epi* (Figura 4.13).



Na raiz, os maiores conteúdos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram observados para o *dgt*, e nos duplos mutantes *Nr dgt* e *epi dgt* em T0 (Figura 4.13). Em T1, somente os duplos mutantes *Nr dgt* e *epi dgt* não apresentaram aumento no conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no tratamento sem Fe quando comparados ao tratamento com Fe; repetindo o resultado em T2, sendo que o genótipo *epi* também não apresentou diferenças entre os tratamentos com e sem Fe (Figura 4.13). As maiores diferenças no conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos tratamentos com e sem Fe foram observados em T2 e para os genótipos MT e *dgt* (Figura 4.13).

Em T0 e T2, o *Nr dgt* apresentou interação epistática na parte aérea para o *dgt* e aumento do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em T1 maior que dos parentais *Nr* e *dgt*, sendo considerado uma interação sinérgica (Figura 4.13 e Tabela 4.7). Já no *epi dgt* foi possível observar interação epistática do *epi* sobre o *dgt* em T0, T1 e T2 sem Fe, sendo observado interação sinérgica somente em T2 sem Fe, pois seu conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi abaixo de *epi* e *dgt* (Figura 4.13 e Tabela 4.7).

Na raiz, pode-se observar a interação sinérgica no *Nr dgt* em T0, T1 e T2 com Fe, pois seu conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi maior que ambos parentais, bem como um efeito aditivo em T1 sem Fe, além de interação epistática em T2 sem Fe para o parental *dgt* (Figura 4.13 e Tabela 4.7). O duplo mutante *epi dgt* apresentou interação epistática em T0 e T1 com Fe para o *dgt* sobre o *epi* e em T2 com e sem Fe para o *epi* (Figura 4.13 e Tabela 4.7).

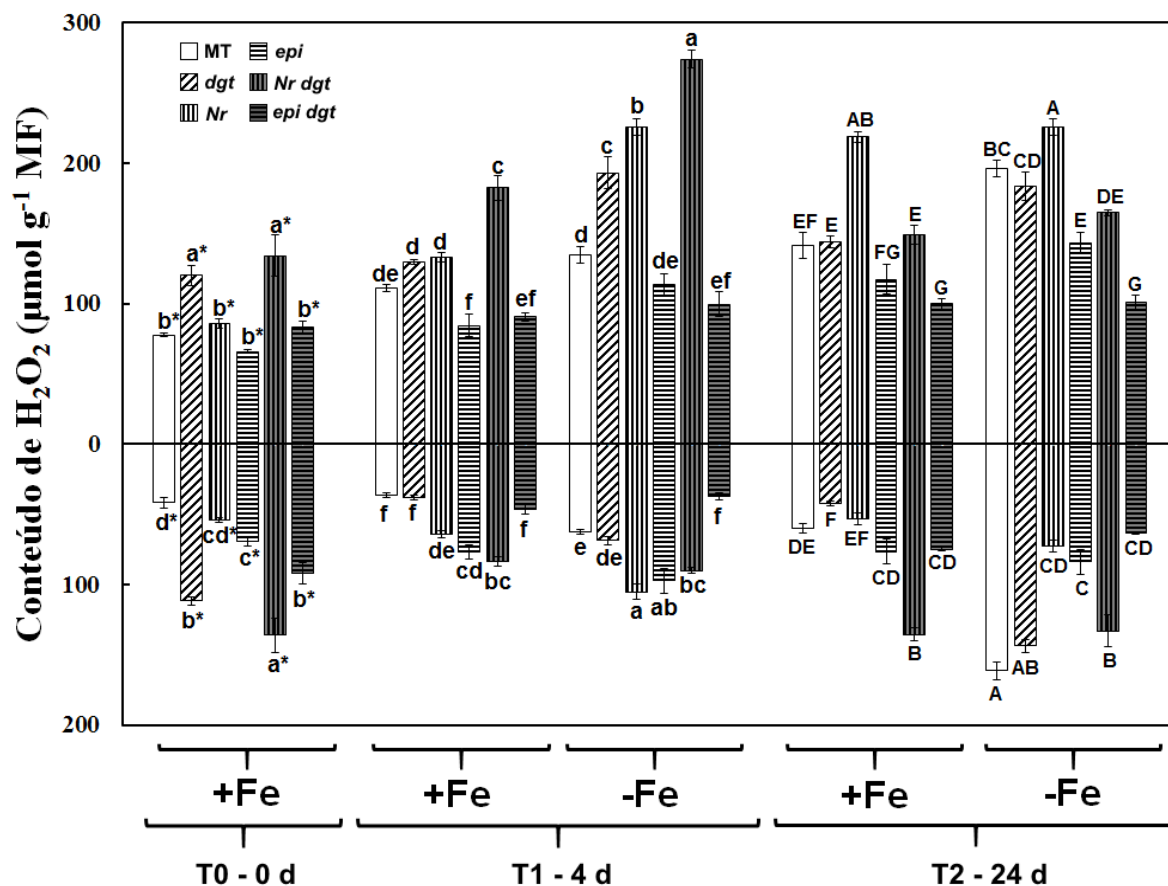


Figura 4.13. Conteúdo de  $H_2O_2$  dos genótipos MT, *dgt*, *Nr*, *epi*, *Nr dgt* e *epi dgt* cultivados na presença (+) ou ausência (-) de Fe. T0 corresponde ao tempo anterior à retirada do Fe da solução nutritiva; T1 corresponde ao período de quatro dias com ou sem Fe na solução, e T2 corresponde ao período de 24 dias com ou sem Fe na solução. As barras são as médias de cada tratamento seguidas do erro padrão. As letras sobre as barras representam as diferenças calculadas entre as médias dos tratamentos por meio do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, para cada tempo.

#### d. Enzimas antioxidantes: Superóxido Dismutase – SOD

A atividade específica da SOD na parte aérea para o T0 foi maior para os genótipos *epi* e *epi dgt*, porém com diferença significativa somente do MT (Figura 4.14). No T1, todos os genótipos estudados apresentaram aumento na atividade da SOD no tratamento sem Fe quando comparado ao tratamento com Fe (Figura 4.14). Esses resultados foram iguais no T2, com exceção dos genótipos *Nr* e *epi* que não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos com e sem Fe (Figura 4.14).

Para o sistema radicular, em T0 o *dgt* apresentou maior atividade da SOD quando comparado aos demais genótipos (Figura 4.14). No T1, os genótipos *dgt*, *Nr* e os duplos *Nr dgt* e *epi dgt* apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos com e sem Fe, com aumento de atividade sem Fe (Figura 4.14). Ao contrário do observado para o T2, o qual os genótipos não apresentaram diferenças entre os tratamentos com e sem Fe (Figura 4.14).

Para a SOD, os duplos mutantes *Nr dgt* e *epi dgt* não apresentaram diferenças significativas em relação aos seus parentais no T0 tanto para parte aérea quanto para raiz (Figura 4.14 e Tabela 4.7). Já em T1, os duplos mutantes apresentaram interação epistática para a parte aérea, sendo que para o *Nr dgt* no tratamento com Fe a interação epistática foi para o *Nr* e para o tratamento sem Fe para o *dgt*, e o *epi dgt* apresentou interação epistática para o *epi* tanto com ou sem Fe em solução tanto para a parte aérea quanto para a raiz (Figura 4.14 e Tabela 4.7). Em T2 para a parte aérea, o *Nr dgt* apresentou interação sinérgica, com atividade de SOD abaixo dos parentais para o tratamento com Fe e epistático para *Nr* no tratamento sem Fe (Figura 4.14 e Tabela 4.7).

Na raiz, o *Nr dgt* não apresentou diferenças significativas de seus parentais em T1 com e sem Fe, e interação epistática no T2 com Fe para o parental *dgt* e sem Fe para o parental *Nr* (Figura 4.14 e Tabela 4.7). O *epi dgt* apresentou interação epistática para o parental *epi* somente no T1 sem Fe, e nos tempos T1 com Fe e T2 com e sem Fe não apresentou diferenças significativas em relação aos seus parentais (Figura 4.14 e Tabela 4.7).

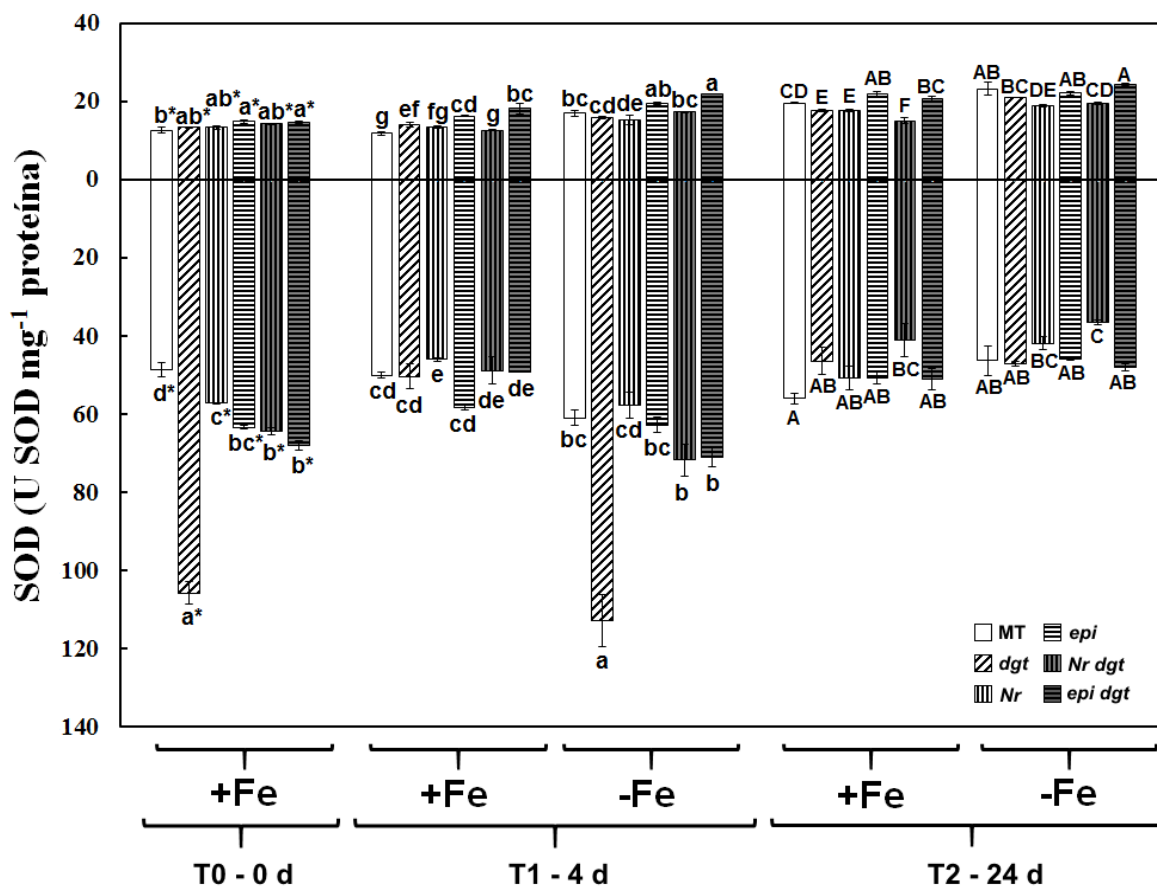


Figura 4.14. Atividade específica da SOD dos genótipos MT, *dgt*, *Nr*, *epi*, *Nr dgt* e *epi dgt* cultivados na presença (+) ou ausência (-) de Fe. T0 corresponde ao tempo anterior à retirada do Fe da solução nutritiva; T1 corresponde ao período de quatro dias com ou sem Fe na solução, e T2 corresponde ao período de 24 dias com ou sem Fe na solução. As barras são as médias de cada tratamento seguidas do erro padrão. As letras sobre as barras representam as diferenças calculadas entre as médias dos tratamentos por meio do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, para cada tempo.

#### e. Enzimas antioxidantes: Catalase – CAT

No T0, o genótipo *epi* apresentou maior atividade específica de CAT que os demais genótipos para a parte aérea, e o genótipo *dgt* para a raiz (Figura 4.15). No T1, o *dg* foi o único genótipo que apresentou diferenças significativas no tratamento com e sem Fe para a parte aérea, com aumento de atividade de CAT no tratamento sem Fe (Figura 4.15). No T2 para a parte aérea, somente o MT não apresentou redução de atividade de CAT no tratamento sem Fe quando comparado ao tratamento com Fe (Figura 4.15).

No sistema radicular, o MT, *epi* e os duplos mutantes apresentaram redução na atividade de CAT no tratamento sem Fe quando comparado ao tratamento com Fe no T1 (Figura 4.15). E no T2, todos os genótipos apresentaram redução na atividade da CAT sem Fe quando comparado ao tratamento com Fe (Figura 4.15).

Para a CAT, o duplo mutante *Nr dgt* não apresentou diferenças significativas em relação aos seus parentais no T0 tanto para parte aérea quanto para raiz (Figura 4.15 e Tabela 4.7). O duplo mutante *epi dgt* apresentou interação epistática para o *dgt* no T0 da parte aérea e sinérgico para a raiz, de modo que a atividade da CAT foi menor no duplo mutante que nos parentais (Figura 4.15 e Tabela 4.7). No T1 com Fe na parte aérea, o *Nr dgt* apresentou atividade de CAT maior que dos parentais *dgt* e *Nr*, sendo uma interação sinérgica; e no tratamento sem Fe apresentou interação epistática para o *dgt*, assim como no T2 com Fe (Figura 4.15 e Tabela 4.7). O *epi dgt* apresentou interação epistática para o *epi* no T1 com Fe e interação epistática para o *dgt* no T2 com Fe, na parte aérea (Figura 4.15 e Tabela 4.7). Nos tratamentos sem Fe dos tempos T1 e T2, o *epi dgt* não apresentou diferenças estatísticas dos seus parentais *epi* e *dgt* (Figura 4.15 e Tabela 4.7).

Para a raiz, o *Nr dgt* apresentou interação epistática para o parental *Nr* no T1 e no T2 sem Fe, não apresentando diferenças significativas dos parentais no T0, T1 e T2 com Fe (Figura 4.15 e Tabela 4.7). O duplo mutante *epi dgt* apresentou interação sinérgica para a raiz no T0 e no T2 com Fe, pois apresentou resultados de atividade de CAT abaixo dos seus parentais (Figura 4.15 e Tabela 4.7). No T1 com e sem Fe, a interação observada no *epi dgt* para a raiz foi a epistática para o genótipo *epi* (Figura 4.15 e Tabela 4.7).

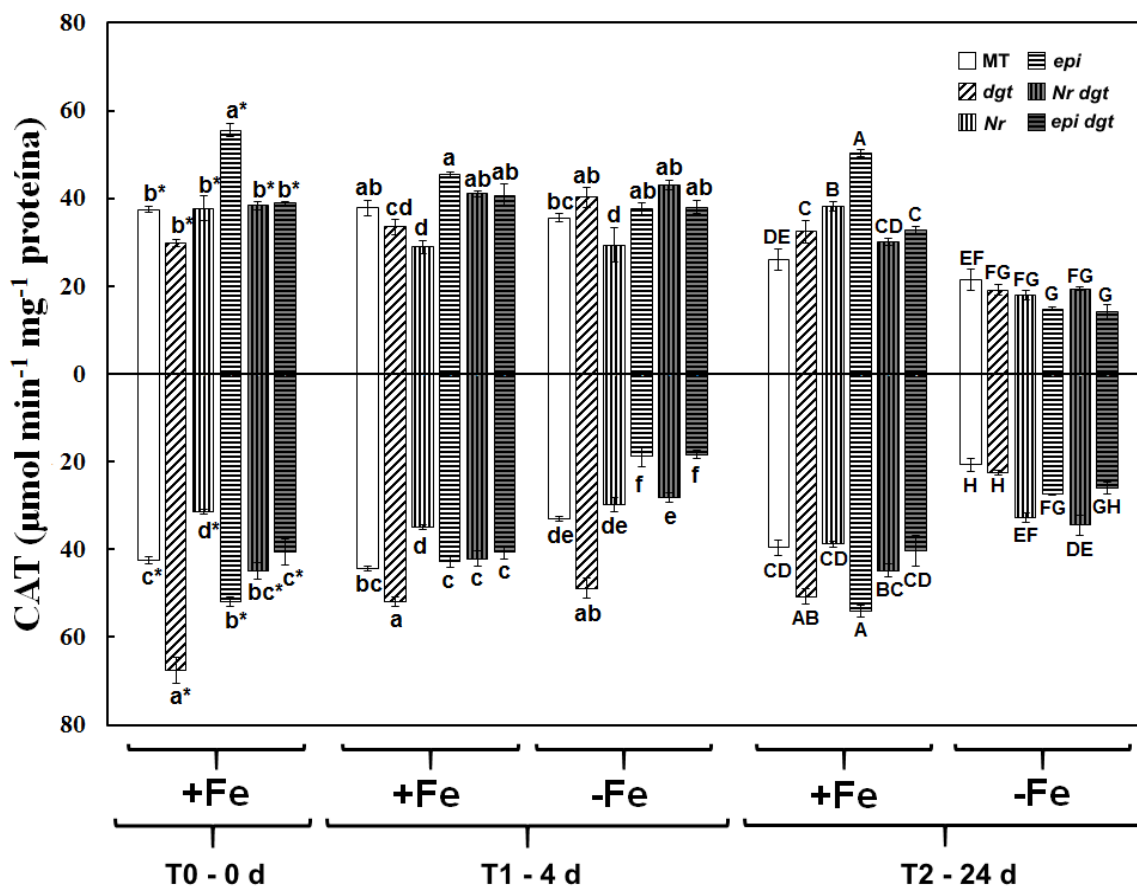


Figura 4.15. Atividade específica da CAT dos genótipos MT, *dgt*, *Nr*, *epi*, *Nr dgt* e *epi dgt* cultivados na presença (+) ou ausência (-) de Fe. T0 corresponde ao tempo anterior à retirada do Fe da solução nutritiva; T1 corresponde ao período de quatro dias com ou sem Fe na solução, e T2 corresponde ao período de 24 dias com ou sem Fe na solução. As barras são as médias de cada tratamento seguidas do erro padrão. As letras sobre as barras representam as diferenças calculadas entre as médias dos tratamentos por meio do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, para cada tempo.

#### F. Enzimas antioxidantes: Ascorbato peroxidase - APX

No T0, a APX não apresentou diferenças significativas entre os genótipos na parte aérea, diferentemente do observado para o sistema radicular, onde o duplo mutante *Nr dgt* apresentou maior atividade que os demais genótipos (Figura 4.16). No T1 para a parte aérea, os genótipos MT, *dgt* e *epi dgt* apresentaram maior atividade de APX no tratamento sem Fe quando comparado ao tratamento com Fe (Figura 4.16). Para a raiz no T1, os genótipos apresentaram decréscimo na atividade da APX no tratamento sem Fe quando comparado ao tratamento com Fe, sendo eles o MT, *Nr* e

*epi*, diferentemente do encontrado para o genótipo *dgt*, que apresentou aumento de atividade (Figura 4.16). No T2 para a parte aérea, os todos genótipos apresentaram decréscimo na atividade da APX no tratamento sem Fe quando comparado ao tratamento com Fe (Figura 4.16). Já para o sistema radicular no T2, o *dgt* e *Nr dgt* apresentaram decréscimo de atividade no tratamento sem Fe quando comparado ao tratamento com Fe, ao contrário do observado para o *epi*, os quais apresentaram aumento de atividade da APX (Figura 4.16).

O duplo mutante *Nr dgt* não apresentou diferenças estatísticas na atividade específica da APX quando comparados ao seus parentais nos tratamentos T0 e T2 sem Fe para a parte aérea, e para a raiz no T1 com Fe, com atividade intermediária aos seus parentais no T1 sem Fe (Figura 4.16 e Tabela 4.7). A interação epistática para o parental *Nr* foi observada no T1 com Fe para a parte aérea e no T2 sem Fe para a raiz (Figura 4.16 e Tabela 4.7). No T2 com Fe, tanto para a parte aérea quanto para a raiz, o *Nr dgt* apresentou maior atividade de APX que seus parentais *Nr* e *dgt*, sendo considerada uma interação sinérgica entre eles (Figura 4.16 e Tabela 4.7).

O *epi dgt* apresentou atividade de APX intermediária aos seus parentais *epi* e *dgt* no T2 com e sem Fe para a parte aérea (Figura 4.16 e Tabela 4.7). A interação epistática para o parental *dgt* foi observado na raiz no T0, T1 e T2 com Fe (Figura 4.16 e Tabela 4.7). Já a interação epistática para o *epi* foi observada no T0 da parte aérea e no T2 sem Fe no sistema radicular (Figura 4.16 e Tabela 4.7).

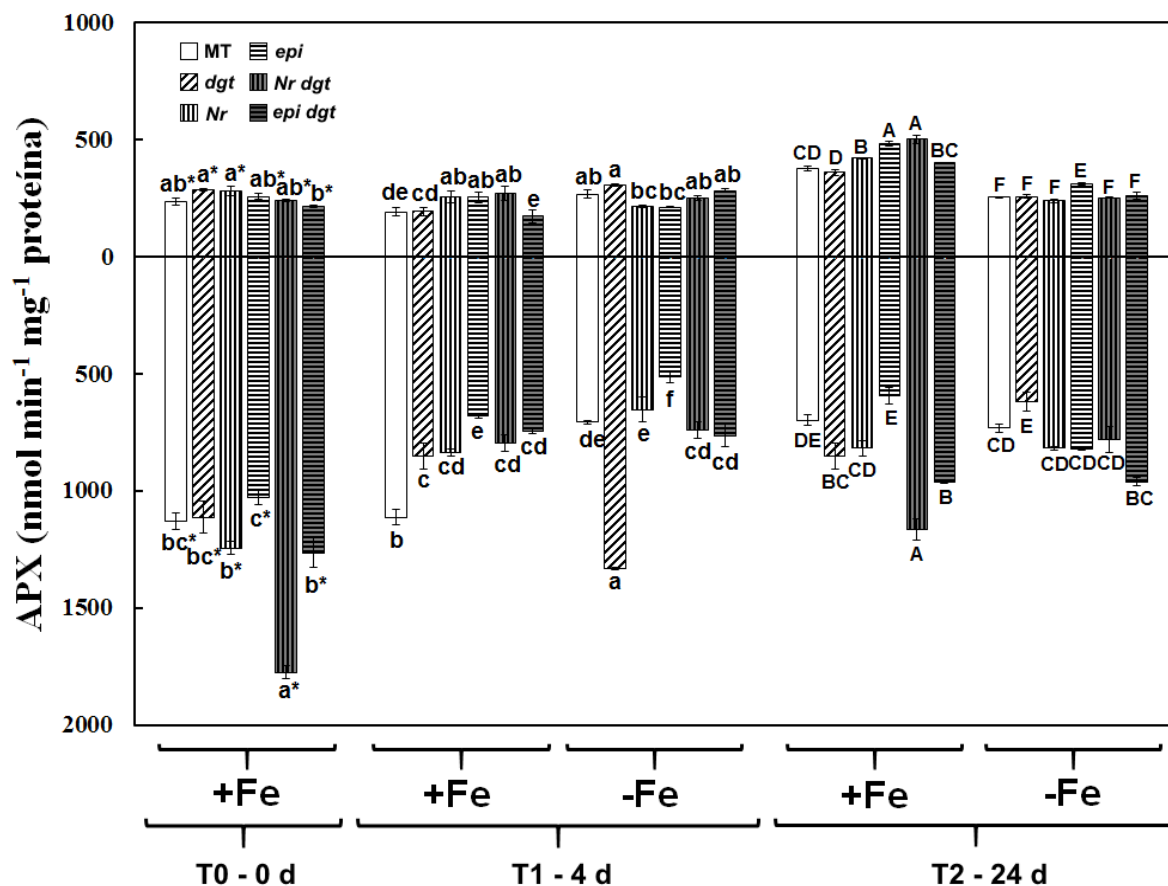


Figura 4.16. Atividade específica da APX dos genótipos MT, *dgt*, *Nr*, *epi*, *Nr dgt* e *epi dgt* cultivados na presença (+) ou ausência (-) de Fe. T0 corresponde ao tempo anterior à retirada do Fe da solução nutritiva; T1 corresponde ao período de quatro dias com ou sem Fe na solução, e T2 corresponde ao período de 24 dias com ou sem Fe na solução. As barras são as médias de cada tratamento seguidas do erro padrão. As letras sobre as barras representam as diferenças calculadas entre as médias dos tratamentos por meio do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, para cada tempo.

#### 4.6. Análises de qRT-PCR

##### a. Desenho dos primers:

No presente trabalho, foram analisados os genes *SIIRT1*, que codifica um transportador de Fe na membrana, e *SIFRO1*, que codifica a enzima ferro-quelato redutase. Os dois genes estão relacionados às respostas da raiz na deficiência de Fe, como parte da Estratégia I das dicotiledôneas. Os primers para *SIIRT1* e *SIFRO1*



foram desenhados através do software Primer 3 a partir de sequências de mRNA do banco de dados NCBI e SolGenomics (banco de dados específico para Solanáceas). As sequências dos primers estão descritas na tabela 4.18, bem como o tamanho das suas sequências de cDNA. O gene endógeno CAC foi selecionado através de testes de primers para os genes endógenos realizados anteriormente às reações comparativas entre os genes alvo (EXPÓSITO-RODRIGUEZ et al., 2008)

Tabela 4.18. Genes estudados durante a deficiência de Fe em tomateiro e o primers desenhados e utilizados no experimento.

Gene	Sequência dos primers (5´- 3´)	Referência
<i>iron-regulated transporter 1 (SIIRT1)</i>	F – GAAATGGCTGTGGCTGGAAATC R – CTGTAGGATGCAACCACCAAGG	Desenhado (261 pb)
<i>ferric-chelate reductase (SIFRO1)</i>	F – GTTCGTTTAGTCTCTGCTCGTG R – TGAAGTGATGGTAAAAGGATGC	Desenhado (153 pb)
CAC ( <i>endógeno</i> )	F – CCTCCGTTGTGATGTAAGTGG R – ATGGTGAAAGTAACATCATCG	EXPÓSITO-RODRIGUEZ et al., 2008 (173 pb)

#### b. Resultados obtidos pela análise de qPCR: gene *SIIRT1*

A análise dos níveis de transcritos foi realizada por PCR em tempo real utilizando o gene CAC como referência. Para os cálculos, além do gene de referência CAC, o MT no tratamento com Fe foi utilizado como controle do experimento. Sendo assim, o MT foi considerado genótipo controle no T0 para os demais genótipos estudados, e o MT com Fe no T1 foi considerado como genótipo controle para os demais genótipos e tratamentos.

Os resultados dos níveis de transcritos para o gene *SIIRT1*, que codifica um transportador de Fe de membrana, mostraram que no T0 o gene foi mais expresso nos genótipos mutantes que no MT, tendo o *Nr dgt* maior expressão nesse tempo (Figura 4.17). Em T1, os genótipos e tratamentos também apresentaram os níveis de transcritos maior que o MT (Figura 4.17). Sendo que no tratamento sem Fe, o gene *SIIRT1* foi mais expresso nos genótipos, com exceção do *Nr dgt* (Figura 4.17). Os genótipos *epi* e *epi dgt* apresentaram os níveis de transcritos maior que no tratamento sem Fe que com Fe (Figura 4.17).

Na tabela 4.7 é possível observar as interações dos duplos mutantes em relação aos seus parentais. Para o genótipo *Nr dgt*, no T0 apresentou maiores níveis de transcritos do gene *SIIRT1* que *Nr* e *dgt* (Figura 4.17 e Tabela 4.7). Em T1, o *Nr dgt* não apresentou diferenças nos tratamentos com e sem Fe do *dgt* nem do *Nr* (Figura 4.17 e Tabela 4.7).

O *epi dgt* não apresentou diferenças nos níveis de transcritos do gene *SIIRT1* quando comparado ao *epi* e *dgt* em T0 (Figura 4.17 e Tabela 4.7). Entretanto, em T1, o *epi dgt* apresentou interação epistática para o *dgt* no tratamento com Fe, e no tratamento sem Fe apresentou interação epistática para o *epi* (Figura 4.17 e Tabela 4.7).

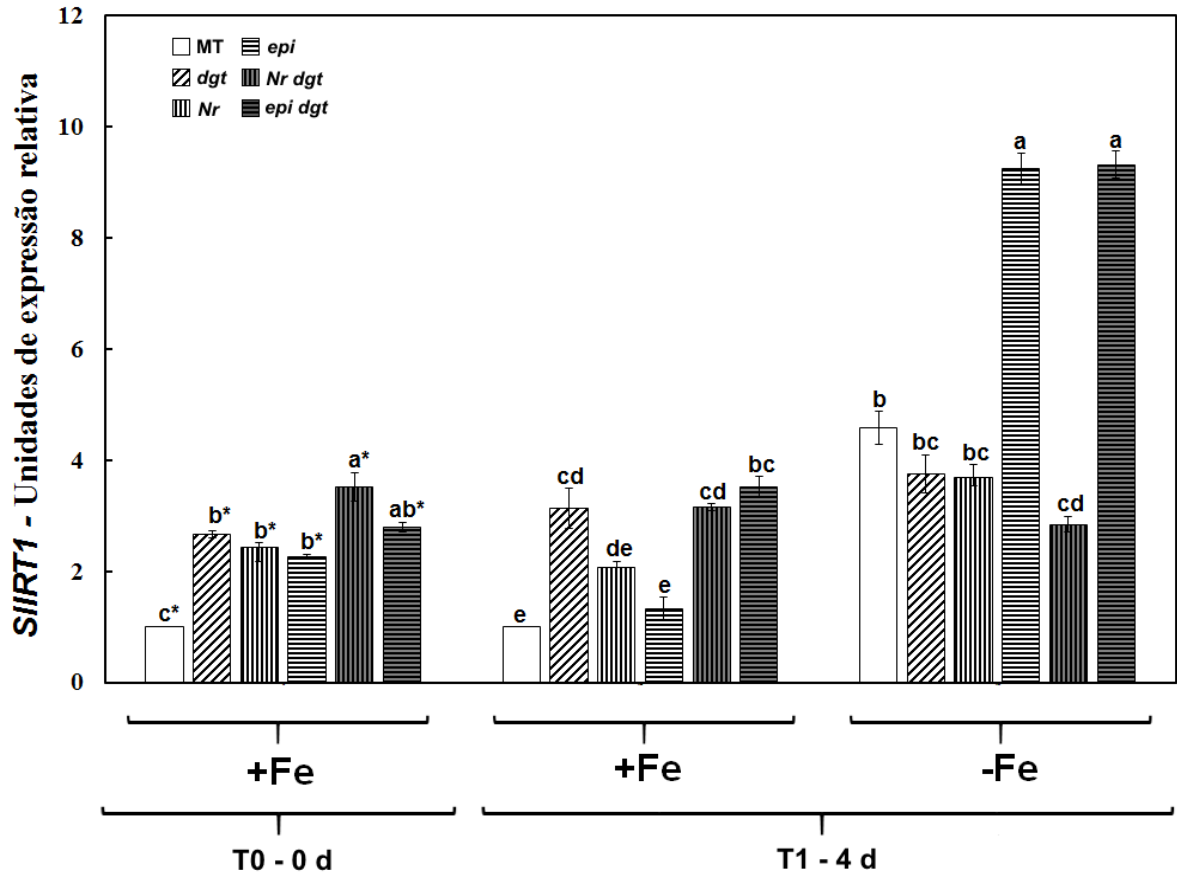


Figura 4.17. Níveis de transcritos do gene *SIIRT1* dos genótipos MT, *dgt*, *Nr*, *epi*, *Nr dgt* e *epi dgt* cultivados na presença (+) ou ausência (-) de Fe. T0 corresponde ao tempo anterior à retirada do Fe da solução nutritiva; T1 corresponde ao período de quatro dias com ou sem Fe na solução. As barras são as médias de cada tratamento seguidas do erro padrão. As letras sobre as barras representam as diferenças calculadas entre as médias dos tratamentos por meio do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, para cada tempo.

*b. Resultados obtidos pela análise de qPCR: gene SIFRO1*

Os níveis de transcritos do gene *SIFRO1*, que codifica a enzima ferro-quelato redutase, mostrou que em T0 os duplos mutantes *Nr dgt* e *epi dgt* apresentavam maiores níveis de transcritos que o MT e os demais genótipos (Figura 4.18). Em T1, o gene *SIFRO1* foi mais expresso no genótipo *epi* e nos duplos mutantes *Nr dgt* e *epi dgt* que em MT, *dgt* e *Nr* nos tratamentos com e sem Fe (Figura 4.18). Os genótipos *epi* e *epi dgt* apresentaram os níveis de transcritos maior que os demais genótipos no tratamento sem Fe (Figura 4.18).

A interação entre o duplos mutantes *Nr dgt* e *epi dgt* e os parentais está especificado na tabela 4.7. Nos dois tempos (T0 e T1) e tratamentos com e sem Fe, os duplos mutantes apresentaram maiores expressões relativas que seus parentais, sendo considerada uma interação sinérgica (Figura 4.18 e Tabela 4.7). Essa interação ocorre quando os mutantes simples apresentam efeitos similares na expressão desse gene, e ao unir esses efeitos em um genótipo duplo mutante, o gene expressou mais que nos mutantes simples.

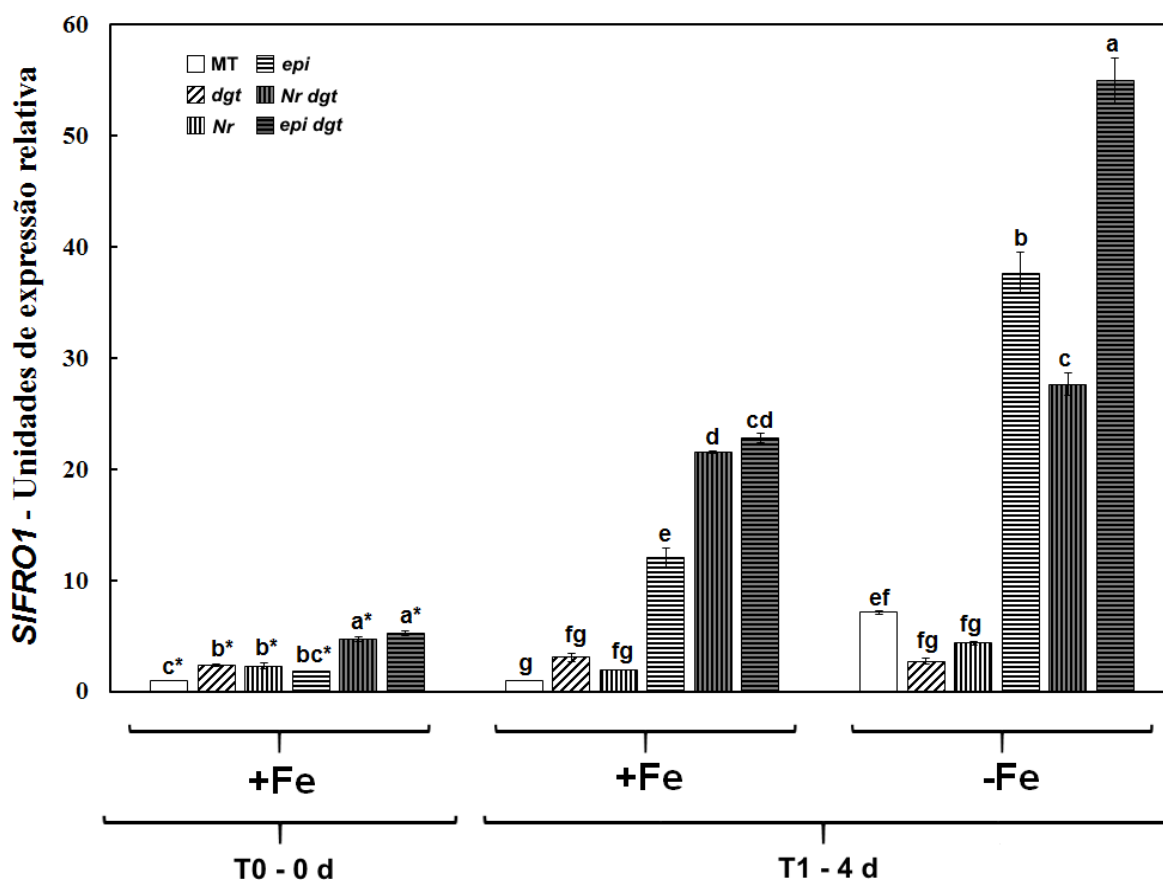


Figura 4.18. Níveis de transcritos do gene *SIFRO1* dos genótipos MT, *dgt*, *Nr*, *epi*, *Nr dgt* e *epi dgt* cultivados na presença (+) ou ausência (-) de Fe. T0 corresponde ao tempo anterior à retirada do Fe da solução nutritiva; T1 corresponde ao período de quatro dias com ou sem Fe na solução. As barras são as médias de cada tratamento seguidas do erro padrão. As letras sobre as barras representam as diferenças calculadas entre as médias dos tratamentos por meio do teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, para cada tempo.

## 5. DISCUSSÃO

Há fortes evidências da interação entre auxina e etileno na regulação das respostas à deficiência de Fe (SWARUP et al., 2007). Contudo, na literatura os trabalhos encontrados abordam somente um ou outro fitormônio separadamente, e pouco a interação entre eles. Além disso, a maioria desses trabalhos abordam os efeitos da auxina ou etileno aplicados exogenamente. Dessa forma, o uso de mutantes hormonais que exageradamente produzem ou são pouco sensíveis aos fitormônios é importante para entender como essas moléculas interagem durante uma resposta. Portanto, a obtenção dos duplos mutantes, através dos cruzamentos realizados nesse trabalho, foi importante para relacionar interação entre auxina e etileno tanto nas raízes quanto na parte aérea das plantas de tomateiro submetidas à deficiência de Fe.

### 5.1. A auxina e o etileno podem modular das respostas à deficiência de Fe

As respostas à deficiência de Fe em tomateiro pode ser modulada pelos fitormônios auxina e etileno, conforme mostrado nos resultados do presente trabalho com os simples mutantes fitormonais *dgt*, *Nr* e *epi*. Na deficiência de Fe, o *dgt* apresentou maior diâmetro de raiz (Figura 4.7), deixando-as mais espessas, entretanto não alterou o comprimento total (Figura 4.5) e a densidade da raiz (Figura 4.6), conforme observado para o MT. Esse aumento no diâmetro do *dgt* pode ser explicado por sua baixa sensibilidade à auxina (OH et al., 2006), porque segundo Aloni e Zimmermann (1983), a auxina provoca aumento do número de vasos nos tecidos das plantas onde esse fitormônio está em maior concentração, reduzindo o diâmetro da raiz. Além disso, o aumento no diâmetro da raiz do *dgt* fez aumentar a massa da matéria seca (Figura 4.9), porém não alterou a área radicular (Figura 4.8). Nos mutantes em etileno, a deficiência de Fe provocou maior comprimento e diâmetro de raiz no *epi* que no *Nr* (Figuras 4.5 e 4.7). Certamente, pelo excesso de etileno que é produzido pelo *epi* nos tecidos, que pode provocar o aumento no número e no tamanho das células de transferência nas raízes sob condições de deficiência de Fe, levando ao aumento no diâmetro das raízes (GARCÍA et al., 2015). Entretanto, foi o

*Nr* que apresentou aumento na área radicular na ausência de Fe no T2 (Figura 4.8). Quando esse mutante *Nr* é submetido às condições de deficiência de Fe, a auxina pode influenciar as respostas nas raízes, uma vez que ocorre o aumento desse fitormônio nessas condições Shen et al. (2015), influenciando na arquitetura e crescimento das raízes laterais (Liu et al., 2015).

A quantificação dos nutrientes nas raízes mostrou que o *dgt* acumulou menos fósforo (P) e cálcio (Ca) que o MT, *Nr* e *epi*, no T0 e no T1 com e sem Fe (Tabela 4.8), apesar de não apresentar sintomas visuais de deficiência desses macronutrientes. Tanto o P quanto o Ca nas raízes estão relacionados à auxina, uma vez que esse fitormônio estimula o crescimento dos pelos e das raízes laterais sob baixas concentrações de P (RAMAEKERS et al., 2010); enquanto que o Ca tem efeito antagônico à auxina no crescimento da raiz, pois em altas concentrações inibe o crescimento, e a auxina promove (HEPLER, 2005). Entretanto, o uso de inibidor de auxina nas raízes de *Arabidopsis* sob alta concentração de P fez aumentar o crescimento dos pelos radiculares (MA et al., 2001), ao contrário do observado para o *dgt* neste trabalho. Contudo, sob baixas concentrações de P, as raízes apresentaram aumento no diâmetro e pouca alteração no comprimento (MA et al., 2001), conforme encontrado no *dgt* (Figuras 4.5 e 4.7).

Apesar de ser observado o aumento significativo do conteúdo de MDA nas raízes em todos os genótipos no tratamento sem Fe no T2 (Figura 4.12), o que indica aumento de estresse celular, a massa de matéria seca também foi aumentada (Figura 4.9). Em arroz, Sperotto et al. (2008) relataram aumento na peroxidação lipídica das raízes submetidas à deficiência de Fe, como observado no presente trabalho; porém, eles também observaram diminuição na massa de matéria seca. Os sintomas de deficiência de Fe dependem da espécie e da idade da planta (SPEROTTO et al., 2008), além da ação de fitormônios interligados, como a auxina e o etileno, que regulam o desenvolvimento das raízes (ZHU et al., 2016), sendo uma melhor adaptação para absorção do nutriente. Na parte aérea, o *Nr* apresentou maior diminuição na massa de matéria seca na parte aérea na deficiência de Fe no T2, seguido do MT e *dgt* (Figura 4.9). Além disso, os genótipos apresentaram aumento no conteúdo de MDA na parte aérea nesse tempo (Figura 4.12). Esses resultados estão de acordo com os observados por Sun et al. (2007) em milho submetido à ausência de Fe na solução.

Uma explicação para o aumento no conteúdo de MDA é o fato que pode o Fe participar de processos de oxi-redução nas células (HELL; STEPHAN, 2003), e sua deficiência pode acarretar em estresse oxidativo nas células pela geração e acúmulo de ERO, causando oxidação dos componentes celulares e afetando negativamente a integridade das membranas das organelas (VIGANI et al., 2013). Ao mesmo tempo, observou-se decréscimo no conteúdo de clorofila a+b no T2 sem Fe em todos os genótipos (Figura 4.10), que está associado à deficiência de Fe, conforme pode ser observado pela análise nutricional (Tabela 4.8), uma vez que esse micronutriente é essencial na biossíntese de clorofila (HINDT; GUERINOT, 2012). Desse modo, a diminuição do conteúdo de clorofila interfere nas reações fotoquímicas da fotossíntese, que são essenciais para a fixação de carbono, e conseqüentemente menor acúmulo da massa de matéria seca nas plantas (KOBAYASHI et al., 2013), conforme observado na figura 4.9. Contudo, o conteúdo de Ca na parte aérea aumentou nesse T2 sem Fe (Tabela 4.8), pois é um mensageiro secundário que em algumas espécies pode retardar a perda da clorofila através da manutenção da proteína e das membranas do tilacóide (HEPLER, 2005), o que significa que o estresse por deficiência de Fe estava iniciando nas plantas.

Uma vez que ocorreu redução da síntese de clorofila pela deficiência de Fe (Figura 4.10), o aparato fotossintético necessita ser rearranjado, de maneira a evitar um estresse causado por excesso de luz que continua sendo captada nas folhas, pois pode ocorrer aumento da redução do  $O_2$  em  $O_2^-$ , e o  $O_2^-$  em  $H_2O_2$ , ambas potentes ERO (GURURANI et al., 2015). Dessa forma, a enzima superóxido dismutase (SOD) que atua na dismutação do ânion  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  (GRATÃO et al. 2005), apresentou aumento de atividade no T1 sem Fe para todos os genótipos na parte aérea (Figura 4.14), confirmando o que foi observado nos resultado de  $H_2O_2$  para esse tempo nos genótipos *dgt*, *Nr* e *epi* (Figura 4.13). No T2, o aumento da atividade da SOD foi observado para os genótipos MT e *dgt* para a parte aérea no tratamento sem Fe quando comparado ao tratamento com Fe (Figura 4.14), ao mesmo tempo que o conteúdo de  $H_2O_2$  aumentou para MT, *dgt* e *epi* (Figura 4.13), assim como relatado em folhas de milho submetidos à estresse por ausência de Fe (SUN et al., 2007). Contudo, o aumento do  $H_2O_2$  pode ter dupla função celular, dependendo do nível e distribuição subcelular (ZHOU et al., 2016), pois em altas concentrações é uma

molécula danosa às células, enquanto que em concentrações adequadas à planta pode ter a função de sinalização que regula o metabolismo célula envolvido no crescimento, desenvolvimento e resposta aos estímulos do meio ambiente (BAXTER; MITTLER; SUZUKI, 2014). Como os resultados observados foram diferentes em relação aos mutantes hormonais estudados, essa possível sinalização por  $H_2O_2$  está relacionada com fitormônios (FERNÁNDEZ-MARCOS et al., 2013; XIA et al., 2015), como a auxina que pode ativar genes de defesa e o balanço das enzimas antioxidantes (ZHOU et al., 2016). Já o etileno está relacionado com a interação positiva entre a produção de ERO na deficiência nutricional (GARCÍA et al., 2015), pela indução do desenvolvimento radicular observado (Figuras 4.5 e 4.9).

Nas raízes, os genótipos *dgt* e *Nr* apresentaram aumento de atividade da SOD no T1 sem Fe (Figura 4.14), bem como o aumento no conteúdo de  $H_2O_2$  (Figura 4.13). Além disso, não foi observado aumento na atividade da SOD no T2 sem Fe na raiz, porém ocorreu aumento no conteúdo de  $H_2O_2$  no MT, *dgt* e *Nr* (Figura 4.13). Segundo Corpas (2015), o  $H_2O_2$  é resultado tanto da ação da enzima SOD, como também pode ser produzido nos através da enzima acil-CoA oxidase pela  $\beta$ -oxidação ou através da glicolato oxidase pela fotorrespiração nos peroxissomos. Apesar da auxina estar relacionada a modulação dos genes relacionados as ERO, inclusive de algumas enzimas antioxidantes (ZHOU et al., 2016), o aumento da atividade da SOD no mutante *dgt* parece não estar relacionado ao aumento da síntese e sensibilidade a esse fitormônio, uma vez que possuem baixa sensibilidade a ele. Quando ocorre uma mutação em uma rota de sinalização hormonal, a planta pode desenvolver outras maneiras para responder a estresse ambiental, como aumento na síntese de outras moléculas sinalizadoras (LIU et al., 2016). Sendo que uma dessas moléculas sinalizadoras, relacionadas à deficiência de Fe, é o óxido nítrico (NO) (SHEN et al., 2015), que pode desencadear o aumento da atividade das enzimas SOD e APX (LIN et al., 2011).

Desse modo, o aumento no conteúdo de  $H_2O_2$  nas células pode levar ao aumento da atividade das peroxidases CAT e APX, para manter o balanço dessa ERO de forma a não causar estresse oxidativo. Sendo assim, os resultados de CAT (Figura 4.15) e APX (Figura 4.16) na parte aérea no *dgt* mostra maior atividade dessas enzimas no T1 sem Fe quando comparado ao tratamento com Fe, apoiando nos dados



obtidos para SOD (Figura 4.14) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 4.13). Apesar da baixa sensibilidade do *dgt* à auxina, a literatura mostra que esse fitormônio pode diminuir o efeito danoso de estresse abiótico através do estímulo do crescimento da planta, assim como P e K em concentrações adequadas para manter o balanço osmótico da célula (KAYA et al., 2013). Apesar disso, para os resultados de K, o *dgt* apresentou queda no conteúdo apenas no T2 sem Fe, e não mostrou diferença no conteúdo de P nos tratamentos com e sem Fe na parte aérea (Tabela 4.8). Já para os genótipos mutantes em etileno (*Nr* e *epi*) não foi observado aumento na atividade de CAT e APX no T1 sem Fe, conforme foi observado o aumento no conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na parte aérea (Figura 4.13). De modo contrário do observado pela aplicação de etileno exógeno que fez diminuir o conteúdo de MDA, aumentando a estabilidade das membranas celulares pelo aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e peroxidase (POD) em pereira (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) (LIU et al., 2015). Já em T2 na parte aérea, o MT, *dgt* e o *epi* apresentaram maiores conteúdos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 4.13), porém as enzimas CAT e APX apresentaram redução na atividade para todos os genótipos no tratamento sem Fe (Figuras 4.15 e 4.16).

Certamente, a diminuição na atividade das enzimas CAT e APX pode estar relacionada à deficiência de Fe, pois ambas enzimas possuem o Fe do grupo heme em seus sítios ativos (SCANDALIOS; GUAN; POLIDOROS, 1997; RAMÍREZ; BARTOLI; LAMATTINA, 2013). Assim, Iturbe-Ormaetxe et al. (1995) mostrou que a deficiência de Fe em folhas de ervilha ocasionou decréscimo no conteúdo de clorofilas, e conseqüentemente, na fotossíntese, além de reduzir a atividade da CAT e APX em 51%, enquanto que aumenta a atividade da Cu/Zn-SOD. Conforme a quantificação de Cu (Tabela 4.8), os genótipos *dgt* e *epi* no tratamento sem Fe, podendo indicar a utilização desse Cu na formação da Cu/Zn-SOD.

No sistema radicular, o MT e *epi* apresentaram redução na atividade de CAT, e para a APX o MT, *Nr* e *epi*, diferentemente do encontrado para o genótipo *dgt*, que apresentou aumento de atividade no tratamento sem Fe quando comparado ao tratamento com Fe no T1 (Figura 4.15). O aumento da atividade da peroxidase APX no genótipo *dgt* sem Fe corresponde ao aumento na atividade da SOD (Figura 4.14), que fez aumentar a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio celular (Figura 4.13). Entretanto, os genótipos mutantes em etileno apresentaram respostas similares ao MT para a

atividade dessas peroxidases, o que pode indicar que a percepção interrompida da auxina no mutante *dgt* pode desencadear aumento na atividade das enzimas antioxidantes através de outras vias de sinalização, como na síntese de ácido abscísico (ABA), que controla a modulação da expressão dos genes das enzimas antioxidantes (SHI et al., 2014).

Contudo, no T2, todos os genótipos apresentaram redução na atividade da CAT quando comparado ao tratamento com Fe, enquanto que para a APX, o *dgt* apresentou decréscimo de atividade no tratamento sem Fe quando comparado ao tratamento com Fe (Figuras 4.15 e 4.16). Conforme observado na figura 4.14, a atividade da SOD não se alterou no genótipo *epi* no T2 com e sem Fe, bem como não alterou o conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 4.13). A diminuição da atividade das enzimas antioxidantes nos genótipos MT, *dgt* e *Nr* fez acumular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos tecidos (Figura 4.13) no T2 sem Fe, ocasionando aumento na peroxidação lipídica das raízes (Figura 4.12). Entretanto, o *epi* apresentou aumento da APX no T2 sem Fe, sem apresentar aumento na atividade da SOD (Figura 4.14), bem como no conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 4.13). Desse forma, como o *epi* produz etileno em maior concentração, pode-se afirmar que ocorreu maior síntese e aumento de ácido ascórbico nas células sob estresse ambiental influenciado por esse fitormônio (ZHANG et al., 2012). Além disso, a APX está relacionada à ciclagem e regulação do ácido ascórbico nas células, sendo que o aumento do ascorbato nas células pode contribuir para regular a homeostase redox nas células sob deficiência de Fe (RAMÍREZ; BARTOLI; LAMATTINA, 2013).

Além das alterações morfológicas e bioquímicas analisadas, a deficiência de Fe altera a expressão de genes relacionados as raízes, como excreção de prótons via H<sup>+</sup>-ATPases (*AHA2*), redutase férrica (*FRO1*) e transportadores de ferro (*IRT1*), caracterizando a Estratégia I em dicotiledôneas (YE, et al., 2015). Nos resultados dos níveis de transcritos do gene *SIFRO1*, foi possível observar que os genótipos MT e *epi* mostraram maior expressão aos quatro dias sem Fe (Figura 4.18). Para os genótipos MT e *epi* esse aumento de expressão pode ser devido ao aumento na síntese de etileno pela deficiência de Fe (MT) (ROMERA et al., 1999; LUCENA et al., 2006), bem como pela mutação que induz ao aumento da síntese de etileno nos mutantes *epi* (FUJINO et al., 1988). Esses mesmos resultados foram observados para os níveis de transcritos do gene *SIIRT1*, do transportador de membrana para Fe

(Figura 4.17). Para o *Nr* foi possível observar aumento na expressão desse transportador de Fe (Figura 4.17). Esse resultado tem relação com a auxina que pode induzir ao aumento da expressão de transportador de Fe nas membranas, conforme descrito por Graziano e Lamattina (2007), pela aplicação de auxina exógena em tomateiro sob deficiência de Fe. Entretanto, Bacaicoa et al. (2009, 2011) descreveram também aumento da expressão dos genes relacionados a redutase férrica como sendo induzidos pela aplicação de auxina em abóbora, o que não foi observado para o genótipo *Nr* (Figura 4.18).

## 5.2. A interação entre auxina e etileno nas respostas à deficiência de Fe

Com base no forte controle da auxina ou etileno no desenvolvimento das plantas, especialmente nas respostas à deficiência de Fe, não foi surpresa conjecturar que isso ocorre por meio da interação entre esses fitormônios. Dessa forma, no presente trabalho, para verificar a interação entre auxina e etileno no crescimento de plantas de tomateiro sob deficiência de Fe, foram obtidos duplos mutantes com alterações nessas classes hormonais (Tabelas 3.1 e 4.1). Assim, as vias de sinalização pelas quais as interações ocorreram foram baseadas nos efeitos sinérgicos, aditivos ou epistáticos das mutações (PÉREZ-PÉREZ; CANDELA; MICOL, et al., 2009; CARVALHO; QUECINE; PERES, 2010).

Como pôde ser observado, a interação entre auxina e etileno parece ser bastante complexa e depender, por exemplo, da idade, órgão e presença de Fe. Entretanto, o que chamou a atenção foi o fato que a interação entre auxina e etileno é dependente dos eventos bioquímicos-moleculares que ocorrem durante a deficiência de Fe. De fato, nessa condição, a interação da auxina e etileno ocorre por vias aditivas, sinérgicas ou epistática em uma mesma resposta, porém em idades diferentes das plantas. Por exemplo, durante o crescimento da raiz, o comprimento total (Figura 4.5), densidade (Figura 4.6), diâmetro (Figura 4.7), área (Figura 4.8) e massa da matéria seca (Figura 4.9) da raiz são modulados por vias epistáticas, pois *dgt* apresentou-se epistático a *Nr* e *epi* nessas respostas. Em outras palavras, isso sugere que em uma mesma via de sinalização, a auxina pode agir anteriormente ao etileno no controle do crescimento da raiz (Tabela 4.7). Entretanto, vias paralelas de

ação da auxina e etileno podem ser observadas na raiz visto que o controle do diâmetro desse órgão também ocorre por meio de interações aditivas (Tabela 4.7).

Dessa forma, não foi surpresa observar que a deficiência de Fe resultasse em uma forte alteração nutricional baseada na vias de interação hormonal, conforme observado para P, Ca e Cu, sendo que foi observada interação epistática para o *dgt* nas raízes com os duplos mutantes *Nr dgt* e *epi dgt* (Tabela 4.8). Além disso, pode ser observado que para os níveis de transcritos do gene que codifica para a redutase férrica, *SIFRO1*, a interação entre auxina e etileno observada foi a sinérgica, com os duplos mutantes apresentando resultados superiores aos simples mutantes (Tabela 4.7 e Figura 4.18). Porém, para a expressão do gene *SIIRT1*, que codifica para o transportador de Fe na membrana da raiz, os duplos mutantes apresentaram respostas distintas quanto às interações, uma vez que o *Nr dgt* apresentou resposta aditiva, com vias paralelas de ação entre auxina e etileno, ao contrário do apresentado para o *epi dgt*, que parece ter a mesma via de sinalização, pois o *epi* apresentou-se epistático ao *dgt* (Tabela 4.7 e Figura 4.18).

A alteração no metabolismo oxidativo na raiz submetida à deficiência de Fe também parece depender da interação entre auxinas e etileno de modo multifacetado. Nesse sentido, o etileno parece ser epistático sobre a *dgt* na maioria das respostas, como pode ser observado para o conteúdo de MDA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figuras 4.12 e 4.13) e nas atividades das enzimas antioxidantes SOD (Figura 4.14), CAT (Figura 4.15) e APX (Figura 4.16). Ao passo que as interações aditivas foram observadas em *Nr dgt* e *epi dgt*, mostrando vias paralelas de ação durante a deficiência de Fe (Tabela 4.7).

Embora as respostas à quantidade de Fe na raiz possam ser controladas por mecanismos de interação distintos entre auxinas e etileno, a sinalização que envolve a raiz e a parte aérea também parecem depender desses fitormônios. Na parte aérea dessas plantas submetidas à deficiência de Fe, pode-se observar interação epistática da auxina sobre o etileno nas análises de área foliar (Figura 4.8) e massa da matéria seca (Figura 4.9) tanto em *Nr dgt* quanto no *epi dgt*. Enquanto que nas análises bioquímicas, a interação entre auxina e etileno mostrou-se muito complexa e dependente do tempo de exposição à deficiência do Fe. Assim como foi possível observar para o sistema radicular que o etileno mostrou-se mais atuante nas respostas encontradas, na parte aérea isso também foi encontrado nos duplos mutantes (Tabela

4.7). Contudo, alguns resultados como para as peroxidases CAT (Figura 4.15) e APX (Figura 4.16), o efeito aditivo foi observado nos duplos mutantes, mostrando a ação de auxina e etileno em vias paralelas independentes e contrárias (Tabela 4.7).



## 6. CONCLUSÕES

Nas respostas de crescimento da raiz, o *dgt* (*AUX<sup>-</sup>*) apresentou respostas epistáticas sobre os simples mutantes em etileno (*Nr – ET<sup>-</sup>* e *epi – ET<sup>+</sup>*). Contudo, para as análises bioquímicas, o efeito do tempo de exposição à ausência de Fe, tanto no sistema radicular quanto para a parte aérea, manifestaram outros tipos de interação, como a aditiva e a sinérgica, mostrando vias independentes da auxina e etileno para essas respostas. Já para a expressão dos genes da redutase férrica (*SIFRO1*), foi possível identificar a interação sinérgica entre auxina e etileno, proporcionando aumento da expressão nos duplos mutantes em relação aos simples mutantes. Enquanto que para o transportador de Fe da membrana da raiz (*SIIRT1*), o *Nr dgt* apresentou interação aditiva e o *epi dgt* apresentou efeito epistático do *epi* sobre o *dgt*.

Com esses resultados, pode-se concluir que existe a interação entre auxina e etileno nas respostas à deficiência de Fe em tomateiro, e é dependente do tempo de exposição à deficiência bem como do órgão analisado.





## 7. REFERÊNCIAS

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 1337–1344, 2001.

ALMANSA, M. S.; PALMA, J. M.; YANÁEZ, J.; DEL RÍO L. A.; SEVILLA, F. Purification of an iron-containing superoxide dismutase from a citrus plant, *Citrus limonum* R. **Free Radicals Research Communications**, New York, v. 12, n. 1, p. 319–328, 1991.

ALONI, R.; ZIMMERMANN, M. H. The control of vessel size and density along the plant axis – a new hypothesis. **Differentiation**, London, v. 24, n. 1-3, p. 203–208, 1983.

ARMENGAUD, P.; BREITLING, R.; AMTMANN, A. The potassium dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 136, n. 1, p. 2556–2576, 2004.

ASENSIO, A. C.; GIL-MONREAL, M.; PIRES, L.; GOGORCENA, Y.; APAROCOP-TEJO, P. M.; MORAN, J.F. Two Fe-superoxide dismutase families respond differently to stress and senescence in legumes. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 169, n. 13, p. 1253–1260, 2012.

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 104, n. 2, p. 280–292, 1998.

BACAICOA, E.; GARCÍA-MINA, J. M. Iron-efficiency in different cucumber cultivars: the importance of the optimizing the use of foliar iron. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 134, n. 4, p. 405–416, 2009.

BACAICOA, E.; MORA, V.; ZAMARREÑO, A. M.; FUENTES, M.; CASANOVA, E.; GARCÍA-MINA, J. M. Auxin: a major player in the shoot-to-root regulation of root Fe-stress physiological responses to Fe deficiency in cucumber plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 49, n. 5, p. 545-556, 2011.

BAFANA, A.; DUTT, S.; KUMAR, S.; AHUJA, P. S. Superoxide dismutase: an industrial perspective. **Critical reviews in biotechnology**, Boca Raton, v. 31, n. 1, p. 65-76, 2011.

BALBI, V.; LOMAX, T. L. Regulation of early tomato fruit development by the *Diageotropica* gene. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 131, p. 186-197, 2003.

BARRY, C. S.; FOX, E. A.; YEN, H.; LEE, S.; YING, T.; GRIERSON, D.; GIOVANNONI, J. J. Analysis of the ethylene response in the epinastic mutant of tomato. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 127, n. 1, p. 58-66, 2001.

BAXTER, A.; MITTLER, R.; SUZUKI, N. ROS as key players in plant stress signaling. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 5, p. 1229–1240, 2014.

BEEVERS, L.; HAGEMAN, R. H. Nitrate reduction in higher plants. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v. 20, p. 495–522, 1969.

BIENFAIT, H. F. Regulated redox processes at the plasmalemma of plant root cells and their function in iron uptake. **Journal Bioenergy Biomembrane**, New York, v. 17, n. 2, p. 73–83, 1985.

BLANCO-ULATE, B.; VINCENTI, E.; POWELL, A. L.; CANTU, D. Tomato transcriptome and mutant analyses suggest a role for plant stress hormones in the interaction between fruit and *Botrytis cinerea*. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 14, n. 4, p. 142, 2013 DOI: 10.3389/fpls.2013.00142.

BOWLER, C.; VAN CAMP, W.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutases in plants. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 13, n. 3, p. 199–218, 1994.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 72, n. 1-2, p. 248–259, 1976.

BRIAT, J.-F.; DUBOS, C.; GAYMARD, F. Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 33-40, 2015.

BRUMBAROVA, T.; BAUER, P. Iron-Mediated control of the basic helix-loop-helix protein FER, a regulator of iron uptake in tomato. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 137, n. 3, p. 1018–1026, 2005.

CARVALHO, R. F.; QUECINI, V.; PERES, L. E. P. Hormonal modulation of photomorphogenesis-controlled anthocyanin accumulation in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) hypocotyls: physiological and genetic studies. **Plant Science**, Shannon, v. 178, n. 3, p. 258–264, 2010.

CARVALHO, R. F.; CAMPOS, M. L.; PINO, L. E.; CRESTANA, S. L.; ZSÖGÖN, A.; LIMA, J. E.; BENEDITO, V. A.; PERES, L. E. P. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. **Plant Methods**, London, v. 7, 2011. DOI: 10.1186/1746-4811-7-18

CEMBROWSKA-LECH, D.; KOPROWSKI, M.; KEPCZYŃKI, J. Germination induction of dormant *Avena fatua* caryopses by KAR<sub>1</sub> and GA<sub>3</sub> involving the control of reactive oxygen species (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and enzymatic antioxidants (superoxide dismutase and catalase) both in the embryo and the aleurone layers. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 176, 169–179, 2015.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Boston, v. 61, n. 2, p. 192-208, 2004.

CHEN, W. W.; YANG, J. L.; QIN, C.; JIN, C. W.; MO, J. H.; YE, T.; ZHENG, S. J. Nitric oxide acts downstream of auxin to trigger root ferric-chelate reductase activity in response to iron deficiency in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 154, p. 810–819, 2010.

CHILIMBA, A. D. C.; YOUNG, S. D.; BLACK, C. R.; ROGERSON, K. B.; ANDER, E.L.; WATTS, M.; LAMMEL, J.; BROADLEY, M. R. Maize grain and soil surveys reveal suboptimal dietary selenium intake is widespread in Malawi. **Scientific reports**, London, v. 1, p. 72, 2011. DOI: 10.1038/srep00072.

CHOUDHURY, S.; PANDA, P.; SAHOO, L.; PANDA, S. K. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. **Plant Signaling and Behavior**, Georgetown v. 8, n. 4, e23681, 2013. DOI: 10.4161/psb.23681.

COLANGELO, E. P.; GUERINOT, M. L. The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 12, p. 3400–3412, 2004.

COLOMBO, C.; PALUMBO, G.; HE, J.-Z.; PINTON, R.; CESCO, S. Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. **Journal of Soils and Sediments**, Berlin, v. 14, n. 3, p. 538–548, 2014.

CORNELL, R. M.; SCHAWERTMANN, U. Chapter 1. Introduction to the Iron Oxides. In: CORNELL, R. M.; SCHAWERTMANN, U. **The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses**. 2<sup>a</sup> ed. Wiley-VCH, Weinheim, Cambridge, United Kingdom, 2003. 664 p.

CORPAS, F. J. What is the role of hydrogen peroxide in plant peroxisomes? **Plant Biology**, Stuttgart, v. 17, n. 6, p. 1099–1103, 2015.

CORPAS, F. J.; FERNÁNDEZ-OCAÑA, A.; CARRERAS, A.; VALDERRAMA, R.; LUQUE, F.; ESTEBAN, F. J.; RODRÍGUEZ-SERRANO, M.; CHAKI, M.; PEDRAJAS, J. R.; SANDALIO, L. M.; DEL RÍO, L. A.; BARROSO, J. B. The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 47, n. 7, p. 984-994, 2006.

CURIE, C.; BRIAT, J.-B. Iron transport and signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 183–206, 2003.

ECKHARDT, U.; MARQUES, A. M.; BUCKHOUT, T. J. Two iron- regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 45, n. 4, p. 437-448, 2001.

EIDE, D.; BRODERIUS, M.; FETT, J.; GUERINOT, M. L. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, n. 11, p. 5624-5628, 1996.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M.; BORGES, A. A.; BORGES-PÉREZ, A.; PÉREZ, J. A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, London, v. 8, p. 131, 2008. DOI: 10.1186/1471-2229-8-131

FAGERIA, V. D. Nutrient interactions in crop plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, n. 8, p. 1269–1290, 2001.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C.; CLARK, R. B. Micronutrients in crop production. **Advances in Agronomy**, Amsterdam, v. 77, p. 185–268, 2002.

FERNÁNDEZ-MARCOS, M.; SANZ, L.; LEWIS, D.R.; MUDAY, G. K.; LORENZO, O. Control of auxin transport by reactive oxygen and nitrogen species. In: CHEN, R.; BALUSKA, F. **Polar auxin transport**. Signaling and Communication in Plants. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, German, 2013. p. 103-117.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3ª ed. Embrapa-Cenargen, Brasília, Brasil, 1998. 220 p.

FOX, T. C.; GUERINOT, M. L. Molecular biology of cation transport in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 669–696, 1998.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, n. 8, p. 1056–1071, 2005.

FREEMAN, J. L.; GARCIA, D.; KIM, D.; HOPF, A.; SALT, D. E. Constitutively elevated salicylic acid signals glutathione-mediated nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 137, n. 3, p. 1082–1091, 2005.

FUJINO, D. W.; BURGER, D. W.; YANG, S. F.; BRADFORD, K. J. Characterization of an ethylene overproducing mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cultivar VFN8). **Plant Physiology**, Lancaster, v. 88, n. 3, p. 774–779, 1988.

FUJINO, D. W.; BURGER, D. W.; BRADFORD, K. J. Ineffectiveness of ethylene biosynthetic and action inhibitors in phenotypically reverting the *Epinastic* mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 8, p. 53–61, 1989.

FUJITA, Y.; VAN BODEGOM, P. M.; WITTE, J. P. M. Relationships between nutrient-related plant traits and combinations of soil N and P fertility measures. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 12, e83735, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0083735.

GARCÍA, M. J.; LUCENA, C.; ROMERA, F. J.; ALCÁNTARA, E.; PÉREZ-VICENTE, R. Ethylene and nitric oxide involvement in the up-regulation of key genes related to iron acquisition and homeostasis in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 14, p. 3885–3899, 2010.

GARCÍA, M. J.; SUÁREZ, V.; ROMERA, F. J.; ALCÁNTARA, E.; PÉREZ-VICENTE, R. A new model involving ethylene, nitric oxide and Fe to explain the regulation of Fe-acquisition genes in Strategy I plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 49, n. 5, p. 537–544, 2011.

GARCÍA, M. J.; ROMERA, F. J.; LUCENA, C.; ALCÁNTARA, E.; PÉREZ-VICENTE, R. Ethylene and the regulation of physiological and morphological responses to nutrient deficiencies. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 169, n. 1, p. 51–60, 2015.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutase I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GOMES-JUNIOR, R. A.; GRATÃO, P. L.; GAZIOLA, S. A.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 34, n. 5, p. 449–456, 2007.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 32, p. 481-494, 2005.

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; CARVALHO, R. F.; TEZOTTO, T.; PIOTTO, F. A.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. Biochemical dissection of *diageotropica* and *Never ripe* tomato mutants to Cd-stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 56, p. 79-96, 2012.

GRAZIANO, M.; LAMATTINA, L. Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots. **Plant Journal**, Oxford, v. 52, n. 5, p. 949–960, 2007.

GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; TRAN, L.-S. P. Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. **Molecular Plant**, Oxford, v. 8, n. 9, p. 1304–1320, 2015.

HANKE, G.; MULO, P. Plant type ferredoxins and ferredoxin-dependent metabolism. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 36, n. 6, p. 1071–1084, 2013.

HÄNSCH, R.; MENDEL, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current Opinon in Plant Biology**, London, v. 12, n. 3, p. 259–266, 2009.

HARRISON, P. M.; AROSIO, P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1275, n. 3, p. 161-203, 1996.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 125, n. 1, p. 189–198, 1968.

HELL, R.; STEPHAN, U. W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta**, Berlin, v. 216, n. 4, p. 541–551, 2003.

HEPLER, P. K. Calcium: a central regulator of plant growth and development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 8, p. 2142–2155, 2005.

HINDT, M. N.; GUERINOT, M. L. Getting a sense for signals: regulation of the plant iron deficiency response. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1823, n. 9, p. 1521–1530, 2012.

HOAGLAND, D.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley, University California, Agricultural Experiment Station, USA, 1950. 34 pp.

HOUMANI, H.; RODRÍGUEZ-RUIZ, M.; PALMA, J. M.; ABDELLEY, C.; CORPAS, F. J. Modulation of superoxide dismutase (SOD) isozymes by organ development and high long-term salinity in the halophyte *Cakile maritime*. **Protoplasma**, Leipzig, v. 253, n. 3, p. 885–894, 2016.

IANNONE, M.; F.; GROPPA, M. D.; BENAVIDES, M. P. Cadmium induces different biochemical responses in wild type and catalase-deficient tobacco plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 109, n. 1, p. 201–211, 2014.

ITURBE-ORMAETXE, I.; MORAN, J. F.; ARRESE-IGOR, C.; GOGORCENA, Y.; KLUCAS, R. V.; BECANA, M. Activated oxygen and antioxidant defences in iron-deficient pea plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 421–429, 1995.

IVANCHENKO, M. G.; COFFEEN, W. C.; LOMAX, T. L.; DUBROVSKY, J. G. Mutations in the *Diageotropica* (*Dgt*) gene uncouple patterned cell division during lateral root initiation from proliferative cell division in the pericycle. **Plant Journal**, Oxford, v. 46, n. 3, p. 436–447, 2006.

JIANG, Z.; LIU, Q.; DEKKERS, M. J.; BARRÓN, V.; TORRENT, J.; ROBERTS, A. P. Control of Earth-like magnetic fields on the transformation of ferrihydrite to hematite and goethite. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 30395, 2016. DOI: 10.1038/srep30395.

JIN, C. W.; DU, S. T.; SHAMSI, I.H.; LUO, B. F.; LIN X. Y. NO *synthase*-generation NO acts downstream of auxin in regulating Fe-deficiency-induced root branching that enhances Fe-deficiency tolerance in tomato plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 11, p. 3875-3884, 2011.

KABIR, A. H.; PALTRIDGE, N. G.; ABLE, A. J.; PAULL, J. G.; STANGOULIS, J. C. R. Natural variation for Fe-efficiency associated with upregulation of Strategy I mechanisms and enhanced citrate and ethylene synthesis in *Pisum sativum* L. **Planta**, Berlin, v. 235, n. 6, p.1409–1419, 2012.

KAYA, C.; ASHRAF, M.; DIKILITAS, M.; TUNA, A. L. Alleviation of salt stress-induced adverse effects on maize plants by exogenous application of indoleacetic acid (IAA) and inorganic nutrients – A field trial. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v. 7, n. 2, p. 249–254, 2013.

KENDE, H. Ethylene biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 44, p. 283–307, 1993.

KIM, S. A.; GUERINOT, M. L. Mining iron: Iron uptake and transport in plants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, n. 12, p. 2273–2280, 2007.

KOBAYASHI, K.; SASAKI, D.; NOGUCHI, K.; FUJINUMA, D.; KOMATSU, H.; KOBAYASHI, M.; SATO, M.; TOYOOKA, K.; SUGIMOTO, K.; NIYOGI, K. K.; WADA, H.; MASUDA, T. Photosynthesis of root chloroplasts developed in Arabidopsis lines overexpressing GOLDEN2-LIKE transcription factors. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 54, n. 8, p. 1365–1377, 2013.

KOBAYASHI, T.; NISHIZAWA, N. K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 131–152, 2012.



KRAUS, T. E.; MCKERSIE, B. D.; FLETCHER, R. A. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 145, n. 4, p. 570-576, 1995.

KRISHNAMURTHY, A.; RATHINASABAPATHI, B. Oxidative stress tolerance in plants: novel interplay between auxin and reactive oxygen species signaling. **Plant Signaling and Behavior**, Georgetown, v. 8, n. 10, e25761, 2013. DOI: 10.4161/psb.25761.

KROHLING, C. A.; EUTRÓPIO, F. J.; BERTOLAZI, A. A.; DOBBSS, L. B.; CAMPOSTRINI, E.; DIAS, T.; RAMOS, A. C. Ecophysiology of iron homeostasis in plants. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 62, n. 1, p. 39-47, 2016.

KROUK, G.; RUFFEL, S.; GUTIÉRREZ, R. A.; GOJON, A.; CRAWFORD, N. M.; CORUZZI, G. M.; LACOMBE, B. A framework integrating plant growth with hormones and nutrients. **Trends Plant Science**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 178-182, 2011.

LANAHAN, M. B.; YEN, H.-C.; GIOVANNONI, J. T.; KLEE, H. J. The *Never Ripe* mutation blocks ethylene perception in tomato. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, n. 4, p. 521-530, 1994.

LI, L.; CHENG, X.; LING, H.-Q. Isolation and characterization of Fe(III)-chelate reductase gene *LeFRO1* in tomato. **Plant Molecular Biology**, v. 54, p. 125-136, 2004.

LIAO, X.; YUN, S.; ZHAO, G. Structure, function, and nutrition of phytoferritin: a newly functional factor for iron supplement. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 54, n. 10, p. 1342-1352, 2014.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, New York, v. 148, p. 350-382, 1987.

LIMA, J. E.; CARVALHO, R. F.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A.; PERES, L. E. P. Micro-MsK: a tomato genotype miniature size, short life cycle and improved in vitro shoot regeneration. **Plant Science**, Shannon, v. 167, n. 4, p. 753-757, 2004.

LIN, C.-C.; JIH, P.-J.; LIN, H.-H.; LIN, J.-S.; CHANG, L.-L.; SHEN, Y.-H.; JENG, S.-T. Nitric oxide activates superoxide dismutase and ascorbate peroxidase to repress the cell death induced by wounding. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 77, n. 3, p. 235-249, 2011.

LIN, X. Y.; YE, Y. Q.; FAN, S. K.; JIN, C. W.; ZHENG, S. J. Increased sucrose accumulation regulates iron-deficiency responses by promoting auxin signaling in *Arabidopsis* plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 170, n. 2, p. 907–920, 2016.

LIN, Y.-L.; LAI, Z.-X. Superoxide dismutase multigene family in longan somatic embryos: a comparison of CuZn-SOD, Fe-SOD, and Mn-SOD gene structure, splicing, phylogeny, and expression. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 32, n. 3, p. 595–615, 2013.

LINDSAY, W. L.; SCHWAB, A. P. The chemistry of iron in soils and its availability to plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 5, n. 4-7, p. 821-840, 1982.

LIU, R.; XU, Y.; LI, B.; QIN, G.; TIAN, S. The role of 1-methylcyclopropene in lipid peroxidation, anti-oxidant enzyme activities, and ethylene biosynthesis in 'Laiyang' pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) during fruit ripening. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 90, n. 2, p. 210–216, 2015.

LIU, Y.; WANG, R.; ZHANG, P.; CHEN, Q.; LUO, Q.; ZHU, Y.; XU, J. The nitrification inhibitor methyl 3-(4-hydroxyphenyl)propionate modulates root development by interfering with auxin signaling via the NO/ROS pathway in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 171, n. 3, p. 1686–1703, 2016.

LUCENA, C.; WATERS, B. M.; ROMERA, F. J.; GARCÍA, M. J.; MORALES, M.; ALCÁNTARA, E.; PÉREZ-VICENTE, R. Ethylene could influence ferric reductase, iron transporter, and H<sup>+</sup>-ATPase gene expression by affecting FER (or FER-like) gene activity. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 15, p. 4145–4154, 2006.

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

MALLICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 157, n. 2, p. 183–193, 2000.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. Academic Press, New York, USA, 2011. 672 p.

MEHLHORN, H. Ethylene-promoted ascorbate peroxidase activity protects plants against hydrogen peroxide, ozone and paraquat. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 13, n.9, p. 971-976, 1990.

MEISER, J.; LINGAM, S.; BAUER, P. Posttranslational regulation of the iron deficiency basic helix-loop-helix transcription factor FIT is affected by iron and nitric oxide. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 157, n. 4, p. 2154-2166, 2011.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **Plant Journal**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 1465–1472, 1997.

MENDEL, R. R.; KRUSE, T. Cell biology of molybdenum in plants and humans. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1823, n. 9, p. 1568–1579, 2012.

MILLER, A.-F. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 8, n. 2, p. 162–168, 2004.

MIRANSARI, M. Soil microbes and the availability of soil nutrients. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 35, n. 11, p. 3075-3084, 2013.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, p. 405-410, 2002.

MOLDES, C. A.; MEDICI, L. O.; ABRAHÃO, O. S.; TSAI, S. M.; AZEVEDO, R. A. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 30, n. 4, p. 469–479, 2008.

MONTEIRO, C. C.; ROLÃO, M. B.; FRANCO, M. R.; PETERS, L. P.; CIA, M. C.; CAPALDI, F. R.; CARVALHO, R. F.; GRATÃO, P. L.; ROSSI, M. L.; MARTINELLI, A. P.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. Biochemical and histological characterization of tomato mutants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 2, p. 573–585, 2012.

MOROHASHI, K; GROTEWOLD, E. A systems approach reveals regulatory circuitry for Arabidopsis trichome initiation by the GL3 and GL1 selectors. **Plos Genetics**, Stanford, v. 5, n. 2, e1000396, 2009.

MUDAY, G. K.; RAHMAN, A.; BINDER, B. M. Auxin and ethylene: collaborators or competitors? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 181–195, 2012.

MUÑOZ-ESPINOZA, V. A.; LÓPEZ-CLIMENT, M. F.; CASARETTO, J. A.; GÓMEZ-CADENAS, A. Water stress responses of tomato mutants impaired in hormone biosynthesis reveal abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid interactions. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 997, 2015. DOI: 10.3389/fpls.2015.00997.

NAGANE, T.; TANAKA, A.; TANAKA, R. Involvement of *AtNAP1* in the regulation of chlorophyll degradation in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Berlin, v. 231, n. 4, p. 939–949, 2010.

NAJAMI, N.; JANDA, T.; BARRIAH, W.; KAYAM, G.; TAL, M.; GUY, M.; VOLOKITA, M. Ascorbate peroxidase gene family in tomato: its identification and characterization. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 279, n. 2, p. 171–182, 2008.

NARANJO ARCOS, M. A.; BAUER, P. Iron nutrition, oxidative stress, and pathogen defense. In: ERKEKOGLU, P.; KOCER-GUMUSEL, B. (Eds.) **Nutritional Deficiency**. InTech, DOI: 10.5772/63204, 2016. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/nutritional-deficiency/iron-nutrition-oxidative-stress-and-pathogen-defense>

NIKIFOROVA, V.; FREITAG, J.; KEMPA, S.; ADAMIK, M.; HESSE, H.; HOEFGEN, R. Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. **Plant Journal**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 633–650, 2003.

OH, K.; IVANCHENKO, M. G.; WHITE T. J.; LOMAX T. L. The *diageotropica* gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling. **Planta**, Berlin 224, n. 1, 133–144, 2006.

OHKAMA-OHTSU, N.; WASAKI, J. Recent progress in plant nutrition research: cross-talk between nutrients, plant physiology and soil microorganisms. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 51, n. 8, p. 1255–1264, 2010.

PALMA, J. M.; PASTORI, G. M.; BUENO, P.; DISTEFANO, S.; DEL RÍO, L. A. Purification and properties of cytosolic copper, zinc superoxide dismutase from watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) cotyledons. **Free Radical Research communications**, Yverdon, v. 26, n. 1, p. 83–91, 1997.

PEKKER, I.; TEL-OR, E.; MITTLER, R. Reactive oxygen intermediates and glutathione regulate the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during iron-mediated oxidative stress in bean. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 49, n. 5, p. 429–438, 2002.

PÉREZ-PÉREZ, J. M.; CANDELA, H.; MICOL, J. L. Understanding synergy in genetic interactions. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 25, n. 8, p. 368–376, 2009.

PIOTROWSKA-NICZYPORUK, A.; BAJGUZ, A. The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). **Plant Growth Regulation**, Boston, v. 73, n. 1, p. 57–66, 2014.

PRATT, L. H.; CORDONNIER-PRATT, M. M.; KELMENSEN, P. M.; LAZARONOVA, G. I.; KUBOTA, T.; ALBA, R. M. The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 20, n. 6, p. 672–677, 1997.

RAMAEKERS, L.; REMANS, R.; RAO, I. M.; BLAIR, M. W.; VANDERLEYDEN, J. Strategies for improving phosphorus acquisition efficiency of crop plants. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 117, n. 2-3, p. 169–176, 2010.

RAMÍREZ, L.; BARTOLI, C. G.; LAMATTINA, L. Glutathione and ascorbic acid protect *Arabidopsis* plants against detrimental effects of iron deficiency. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 11, p. 3168–3178, 2013.

RAVEN, E. L. Understanding functional diversity and substrate specificity in haem peroxidases: what can we learn from ascorbate peroxidase? **Natural Product Reports**, London, v. 20, n. 4, p. 367–381, 2003.

RICE, M. S.; LOMAX, T. L. The auxin-resistant *diageotropica* mutant of tomato responds to gravity via an auxin-mediated pathway. **Planta**, Berlin, v. 210, n. 6, p. 906–913, 2000.

RICK, C.; BUTLER, L. Cytohenetics of the tomato. **Advances in Genetics**, New York, v. 8, p. 267–382, 1956

RIZHSKY, L.; HALLAK-HERR, E.; VAN BREUSEGEM, F.; RACHMILEVITCH, S.; BARR, J. E.; RODERMEL, S.; INZÉ, D.; MITTLER, R. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. **The Plant Journal**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 329–342, 2002.

ROBINSON, N. J.; PROCTER, C. M.; CONNOLLY, E. L.; GUERINOT, M. L. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. **Nature**, London, v. 397, n. 6721, p. 694–697, 1999.

RODRIGUES, P. M. L. **Estudos estruturais em ferredoxinas por ressonância magnética nuclear**. 1999. 250 f. Tese (Mestrado em Química Inorgânica) – Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, Portugal, 1999.

ROMERA, F. J.; ALCÁNTARA, E.; DE LA GUARDIA, M. D. Ethylene production by Fe-deficient roots and its involvement in the regulation of Fe-deficiency stress responses by strategy I plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 83, n. 1, p. 51–55, 1999.

ROMERA, F. J.; GARCÍA, M. J.; ALCÁNTARA, E.; PÉREZ-VICENTE, R. Latest findings about the interplay of auxin, ethylene and nitric oxide in the regulation of Fe deficiency responses by Strategy I plants. **Plant Signaling and Behavior**, Georgetown, v. 6, n. 1, p. 167–170, 2011.

ROMERA, F. J.; LUCENA, C.; GARCÍA, M. J.; ALCÁNTARA, E.; PÉREZ-VICENTE, R. The role of ethylene and other signals in the regulation of Fe deficiency responses by dicot plants. In SARWAT, M.; AHMAD, A.; ABDIN, M. Z. (Eds.) **Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspectives**. Vol 2. Springer Science and Business Media, New York, USA, 2015.

RÖMHELD, V.; MARSCHNER, H. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. In: TINKER, B.; LAUCHLI, A. (Eds.) **Advances in Plant Nutrition**. Vol. 2. Praeger Publishers, New York, USA, 1986. p. 155–204.

ROSS, J. J.; WESTON, D. E.; DAVIDSON, S. E.; REID, J. B. Plant hormone interactions: How complex are they? **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 141, n. 4, p. 299–309, 2011.

ROZEN, S.; SKALESTSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in molecular biology**, Clifton, v. 132, p. 365-386, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1989. 1659 p.

SAUTER, M.; MOFFATT, B.; SAECHAO, M. C.; HELL, R.; WIRTZ, M. Methionine salvage and S-adenosylmethionine: essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis. **Biochemical Journal**, London, v. 451, n. 2, p. 145-154, 2013.

SCANDALIOS, J. G.; GUAN, L.; POLIDOROS, A. N. (1997) Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. In: SCANDALIOS, J. G. (Ed.), **Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA, 1997. p. 343–406.

SCHMIDT, W.; TITTEL, J.; SCHIKORA, A. Role of hormones in the induction of iron deficiency responses in Arabidopsis roots. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 122, n. 4, p. 1109–1118, 2000.

SCHMIDT, W.; SCHIKORA, A. Different pathways are involved in phosphate and iron stress-induced alterations of root epidermal cell development. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 125, n. 4, p. 2078–2084, 2001.

SCHOLZ, G.; BECKER, R.; STEPHAN, U. W.; RUDOLPH, A.; PICH, A. The regulation of iron uptake and possible functions of nicotianamine in higher plants. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, Stuttgart, v. 183, n. 4, p. 257–269, 1988.

SCHOLZ, G. Effect of nicotianamine on iron re-mobilization in de-rooted tomato seedlings. **Biology Metals**, Berlin, v. 2, n. 2, p. 89–91, 1989.

SCOTT, J. W.; HARBAUGH, B. K. **Micro-Tom – a miniature dwarf tomato**. Circular S-370, Florida Agricultural Experiment Station, USA, 1989. p. 1-6.

SHAHID, M.; DUMAT, C.; KHALID, S.; NIAZI, N. K.; ANTUNES, P. M. Cadmium bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, p. 1-65, 2016. DOI:10.1007/398\_2016\_8.

SHAO, H.-B.; CHU, L.-Y.; LU, Z.-H.; KANG, C.-M. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. **International Journal of Biological Science**, Lake Haven, v. 4, n. 1, p. 8–14, 2007.

SHARP, K. H.; MEWIES, M.; MOODY, P. C. E.; RAVEN, E. L. Crystal structure of the ascorbate peroxidase–ascorbate complex. **Nature Structural Biology**, New York, v. 10, n. 4, p. 303–307, 2003.

SHEN, C.; YUE, R.; SUN, T.; ZHANG, L.; YANG, Y.; WANG, H. OsARF16, a transcription factor regulating auxin redistribution, is required for iron deficiency response in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**, Shannon, v. 231, p. 148–158, 2015.

SHI, H.; CHEN, L.; YE, T.; LIU, X.; DING, K.; CHAN, Z. Modulation of auxin content in *Arabidopsis* confers improved drought stress resistance. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 82, p. 209–217, 2014.

SOFO, A.; SCOPA, A.; NUZZACI, M.; VITTI, A. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, n. 6, p. 13561–13578; 2015.

SPEROTTO, R. A.; BOFF, T.; DUARTE, G. L.; FETT, J. P. Increased senescence-associated gene expression and lipid peroxidation induced by iron deficiency in rice roots. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 1, p. 183–195, 2008.

STEPANOVA, A. N.; YUN, J.; LIKHACHEVA, A. V.; ALONSO, J. M. Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 19, p. 2169–2185, 2007.

STEPHAN, U. W.; SCHMIDKE, I.; STEPHAN, V. W.; SCHOLZ, G. The nicotianamine molecule is made-to-measure for complexation of metal micronutrients in plants. **Biometals**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 84–90, 1996.

SU, Y.; GUO, J.; LING, H.; CHEN, S.; WANG, S.; XU, L.; ALLAN, A. C.; QUE, Y. Isolation of a novel peroxisomal catalase gene from sugarcane, which is responsive to biotic and abiotic stresses. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 1, p. e84426, 2014.

SUN, B.; JING, Y.; CHEN, K.; SONG, L.; CHEN, F.; ZHANG, L. Protective effect of nitric oxide on iron deficiency-induced oxidative stress in maize (*Zea mays*). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, n. 5, p. 536–543, 2007.



SWARUP, R.; PERRY, P.; HAGENBEEK, D.; VAN DER STRAETEN, D.; BEEMSTER, G. T.; SANDBERG, G.; BHALERAO, R.; LJUNG, K.; BENNETT, M. J. Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 7, p. 2186–96, 2007.

SZACIŁOWSKI, K.; CHMURA, A.; STASICKA, Z. Interplay between iron complexes, nitric oxide and sulfur ligands: structure, (photo)reactivity and biological importance. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 249, n. 21-22, p. 2408–2436, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4<sup>a</sup> ed. Sunderland, Sinauer Associates, USA, 2006. 705 p.

TANDON, H. L. S. **Methods of analysis of soils, plants, water and fertilizers**. Fertilizer Development and Consultation Organization, Nova Delhi, India, 1998. 144 p.

THOMINE, S.; VERT, G. Iron transport in plants: better be safe than sorry. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, n. 3, p. 322–327, 2013.

TILLBERG, E. Indoleacetic acid levels in *Phaseolus*, *Zea* and *Pinus* during seed germination. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 60, n. 2, p. 317–319. 1977.

TOMASI, N.; DE NOBILI, M.; GOTTARDI, S.; ZANIN, L.; MIMMO, T.; VARANINI, Z.; RÖMHELD, V.; PINTON, R.; CESCO, S. Physiological and molecular characterization of Fe acquisition by tomato plants from natural Fe complexes. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 49, n. 2, p. 187–200, 2012.

VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J. R. QUANT: A software plant disease severity assessment. In: **8th International Congress of Plant Pathology**. Christchurch, New Zealand, 2003. p. 105.

VERT, G.; BRIAT, J.F.; CURIE, C. *Arabidopsis* IRT2 gene encodes a root-periphery iron transporter. **Plant Journal**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 181–189, 2001.

VIGANI, G.; ZOCCHI, G.; BASHIR, K.; PHILIPPAR, K.; BRIAT, J.-F. Signals from chloroplasts and mitochondria for iron homeostasis regulation. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 305–311, 2013.

WELCH, R. M.; SHUMAN, L. Micronutrient nutrition of plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 14, n. 1, p. 49–82, 1995.

WILKINSON, J. Q.; LANAHAN, M. B.; YEN, H. C.; GIOVANNONI, J. J.; KLEE, H. J. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by never-ripe. **Science**, New York, v. 270, n. 5243, p. 1807-1809, 1995.

WILKINSON, S.; KUDOYAROVA, G. R.; VESELOV, D. S.; ARKHIPOVA, T. N.; DAVIES, W. J. Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 9, p. 3499-3509, 2012.

WU, T.; ZHANG, H.-T.; WANG, Y.; JIA, W.-S.; XU, X.-F.; ZHANG, X.-Z.; HAN, Z.H. Induction of root Fe(III) reductase activity and proton extrusion by iron deficiency is mediated by auxin-based systemic signalling in *Malus xiaojinensis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 859–870, 2012.

WU, J.; WANG, C.; ZHENG, L.; WANG, L.; CHEN, Y.; WHELAN, J.; SHOU, H. Ethylene is involved in the regulation of iron homeostasis by regulating the expression of iron-acquisition-related genes in *Oryza sativa*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 2, p. 667–674, 2011.

XIA, X.-J.; ZHOU, Y.-H.; SHI, K.; ZHOU, J.; FOYER, C. H.; YU, J.-Q. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n. 10, p. 2839–2856, 2015.

YE, L.; LI, L.; WANG, L.; WANG, S.; LI, S.; DU, J.; ZHANG, S.; SHOU, H. MPK3/MPK6 are involved in iron deficiency-induced ethylene production in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 953, 2015. DOI:10.3389/fpls.2015.00953

YRUELA, I. Transition metals in plant photosynthesis. **Metallomics**, Cambridge, v. 5, n. 9, p. 1090–1109, 2013.

YU, Q.; RENGEL, Z. Micronutrient deficiency Influences plant growth and activities of superoxide dismutases in narrow-leafed lupins. **Annals of Botany**, Oxford, v. 83, n. 2, p. 175–182, 1999.

ZHANG, G.; SLASKI, J. J.; ARCHAMBAULT, D. J.; TAYLOR, J. Aluminum-induced alterations in lipid composition of microsomal membranes from an aluminum-resistant

and an aluminum-sensitive cultivar of *Triticum aestivum*. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 96, n. 4, p. 683–691, 1996.

ZHANG, Z.; WANG, J.; ZHANG, R.; HUANG, R. The ethylene response factor AtERF98 enhances tolerance to salt through the transcriptional activation of ascorbic acid synthesis in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 71, n. 2, p. 273–187, 2012.

ZHOU, T.; YANG, X.; GUO, K.; DENG, J.; XU, J.; GAO, W.; LINDSEY, K.; ZHANG, X. ROS Homeostasis Regulates Somatic Embryogenesis via the Regulation of Auxin Signaling in Cotton. **Molecular and Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 15, n. 6, p. 2108–2124, 2016.

ZHU, C.; YANG, N.; GUO, Z.; QIAN, M.; GAN, L. An ethylene and ROS-dependent pathway is involved in low ammonium-induced root hair elongation in Arabidopsis seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 105, p. 37–44, 2016.



## 8. IMPLICAÇÕES

Por meio de mutantes simples em auxina e etileno, bem como duplos mutantes nessas classes hormonais, foi possível elucidar tanto a participação dessas moléculas, separadamente, bem como a interação das mesmas durante a deficiência de Fe. A complexidade que envolve esse evento resulta do fato que as auxinas e o etileno parecem agir de maneira muito dependente da resposta, do órgão e da idade da planta. No que diz respeito à interação hormonal, embora no presente trabalho estejam propostos mecanismos paralelos (aditivos e sinérgicos) e vias compartilhadas de participação das auxinas e etileno nas respostas à deficiência de Fe, os mecanismos moleculares pelos quais essas interações ocorrem parecem ser bastante complexos. Além disso, com base na análise nutricional nos diferentes mutantes hormonais, essa complexidade estende-se ao fato que: i) as respostas vegetais a um único nutriente podem ser controladas por mais de um hormônio; ii) um hormônio pode modular as respostas a mais de um nutriente; iii) os fitormônios ou nutrientes podem interagir entre si durante a nutrição (FAGERIA, 2001; ROSS et al., 2011; WILKINSON et al., 2012; FUJITA et al., 2013) e iv) outras classes hormonais, tais como brassinoesteróides, ácido jasmônico e ácido salicílico parecem também interagir com os nutrientes (NIKIFOROVA et al., 2003; ARMENGAUD et al., 2004; FREEMAN et al., 2005; SHAO et al., 2007).