

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**O PAPEL DOS FITOCROMOS B NAS RESPOSTAS AO
ESTRESSE INDUZIDO PELA DEFICIÊNCIA DE NPK EM
TOMATEIRO**

Mariana Bomfim Soares

Engenheira Agrônoma

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**THE ROLE OF PHYTOCHROMES B IN RESPONSES TO
STRESS INDUCED BY NPK DEFICIENCY IN TOMATO**

Mariana Bomfim Soares

Orientador: Prof. Dr. Renato de Mello Prado

Coorientador: Prof. Dr. Rogério Falleiros Carvalho

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

S676p	Soares, Mariana Bomfim O papel dos fitocromos B nas respostas ao estresse induzido pela deficiência de NPK em tomateiro / Mariana Bomfim Soares. -- Jaboticabal, 2022 69 p. : tabs., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Renato de Mello Prado Coorientador: Rogério Falleiros Carvalho 1. Solanum lycopersicum L.. 2. deficiência nutricional. 3. mutante. 4. phyB. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: O PAPEL DOS FITOCROMOS B NAS RESPOSTAS AO ESTRESSE INDUZIDO PELA DEFICIÊNCIA DE NPK EM TOMATEIRO

AUTORA: MARIANA BOMFIM SOARES

ORIENTADOR: RENATO DE MELLO PRADO

COORIENTADOR: ROGÉRIO FALLEIROS CARVALHO

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

Prof. Dr. RENATO DE MELLO PRADO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. RAFAEL FERREIRA BARRETO (Participação Virtual)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS / Chapadão do Sul/MS

Prof. Dr. PEDRO LUÍS DA COSTA AGUIAR ALVES (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Pós-Doutorando DILIER OLIVERA VICIEDO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola-FCAV/UNESP / Jaboticabal/SP

Profa. Dra. GILMARA PEREIRA DA SILVA (Participação Virtual)
Universidade do Estado do Mato Grosso-Câmpus Universitário de Alta Floresta / Alta Floresta/MT

Jaboticabal, 08 de abril de 2022

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Mariana Bomfim Soares, nascida em Teixeira de Freitas, Bahia, no dia 01 de maio de 1993. Filha de Maria Rita Teixeira Bomfim e José Rocha Soares. Iniciou o curso de Agronomia em outubro de 2011, na Universidade Estadual de Santa Cruz onde concluiu em fevereiro de 2017. Durante a graduação foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) por quatro anos, onde desenvolveu pesquisa na área de nutrição de plantas e propagação vegetativa do cacau, no Centro de Pesquisas do Cacau (Cepec/Ceplac), e recebeu o prêmio de “Melhor apresentação oral” por dois anos consecutivos. Ainda na graduação realizou estágio não obrigatório na empresa Agrícola Conduru LTDA, onde acompanhou atividades desde o plantio ao beneficiamento de amêndoas de cacau e executou projeto de paisagismo. Em 2017 ingressou no mestrado no Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal na Universidade Estadual de Santa Cruz, sendo bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), desenvolvendo o projeto “Miniestacas ortotrópicas: enraizamento, crescimento e qualidade de mudas de cacauzeiros”, sob orientação do professor George Andrade Sodré, com conclusão em fevereiro de 2019. Em março de 2019, iniciou o curso de Doutorado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), no programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) sendo bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), onde desenvolveu pesquisas nas áreas de nutrição de plantas e fisiologia vegetal, sob orientação do professor Renato de Mello Prado.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

À minha mãe, Maria Rita Teixeira Bomfim
(*in memoriam*) pelo amor incondicional,
dedicação, esforço e por sempre ter
acreditado em mim.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus e a espiritualidade amiga, por todo amparo durante a minha vida, por nunca ter me deixado abater pelas dificuldades.

A minha família, por todo apoio e amparo. Aos meus pais Maria Rita Teixeira Bomfim (*in memoriam*) e José Rocha Soares por nunca terem medido esforços para me criar e me educar, aos meus irmãos Ariza e Filipe por todo amor, apoio e companheirismo.

A Ana Virgínia por todo amor, companheirismo, incentivo e apoio.

À Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Unesp/FCAV) por todo conhecimento e oportunidades que me proporcionou, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, o professor Renato de Mello Prado e ao meu coorientador, o professor Rogério Falleiros Carvalho, pela paciência, dedicação, por terem me orientado e me dado todo o suporte necessário, por terem me ajudado a ser uma profissional melhor e por serem exemplos de profissionais a ser seguido.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite e pela contribuição com o trabalho.

Aos professores da Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) e Ciência do Solo UNESP/FCAV, em especial o professor Arthur Bernardes Cecílio Filho, o professor Pedro Luís da Costa Aguiar Alves, e a professora Mara Cristina Pessoa da Cruz, por todo conhecimento passado, paciência em me auxiliar e contribuição com os meus experimentos.

Ao Departamento de Ciências da Produção Agrícola, Setor de Ciência do Solo, ao Departamento de Biologia e todos os funcionários que me auxiliaram, em especial as técnicas do laboratório de Fisiologia Vegetal e de Nutrição de Plantas, Sonia Maria R. Carregari e Claudinha .

Aos amigos e colegas da Pós-Graduação, Lucas, Luis Felipe, Gelza, Rafael, Kamila, Dilier, Alexander, Lívia, Gabriela, Antônio, Marcilene, Eduarda, Clebson, Kleve, Carlos, Regis, Regiara, Victor, Kolima, Vanessa, João, Leonardo, Luís Fernando e Vinicius por terem feito dos meus dias mais leves, por terem me auxiliado com a pesquisa, pelos momentos de descontração, por todo carinho e por terem feito o meu caminhar mais leve.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos aqueles que cruzaram o caminho com o meu e que de alguma forma contribuíram com o meu crescimento pessoal e profissional.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	1
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	3
2.1. Fotomorfogênese	3
2.2. Fitocromos: aspectos gerais	3
2.2.1. Caracterização morfofisiológica dos mutantes em phyB de tomateiro	5
2.3. Tomateiro como planta modelo alternativo a <i>Arabidopsis Thaliana</i>	5
2.4. Fitocromos no controle da nutrição de plantas.....	6
2.5. Deficiência nutricional	7
2.6. Enxertia como ferramenta de estudo da comunicação entre parte aérea-raiz..	8
3. Referências	9
CAPÍTULO 2 - Tomato phytochromes B1 and B2 are part of the responses to the nutritional stress induced by NPK deficiency.....	13
1. Introduction.....	14
2. Materials and methods	15
2.1. Growth conditions and plant material	15
2.2. Treatments and experimental design	16
2.3. Performed analyses	17
2.4. Statistical analysis.....	18
3. Results	19
3.1. Complete nutrient solution	19
3.2. Nitrogen deficiency (-N)	19
3.3. Phosphorus deficiency (-P)	22
3.4. Potassium deficiency (-K)	24
4. Discussion	27
4.1. Complete nutrient solution	28
4.2. Nitrogen deficiency (-N)	29
4.3. Phosphorus deficiency (-P)	30
4.4. Potassium deficiency (-K)	32
References.....	34

CAPÍTULO 3 - O Fitocromo B1 de tomateiro modula as respostas a deficiência de N, P e K através da comunicação parte aérea-raiz.....	39
Resumo	39
1. Introdução	39
2. Material e Métodos	41
2.1. Condições de crescimento, material vegetal e enxertia	41
2.2. Tratamentos e delineamento experimental	42
2.3. Análises realizadas	43
2.4. Análise estatística	45
3. Resultados	45
3.1. Solução completa.....	45
3.2. Deficiência de nitrogênio (-N).....	50
3.3. Deficiência de fósforo (-P).....	51
3.4. Deficiência de potássio (-K)	53
4. Discussão	54
4.1. Solução completa.....	54
4.2. Deficiência de nitrogênio (-N).....	56
4.3. Deficiência de fósforo (-P).....	58
4.4. Deficiência de potássio (-K)	59
5. Referências	62
APÊNDICE	65
Apêndice A – Material suplementar para o capítulo 3.....	66

O PAPEL DOS FITOCROMOS B NAS RESPOSTAS AO ESTRESSE INDUZIDO PELA DEFICIÊNCIA DE NPK EM TOMATEIRO

RESUMO – A luz é o sinal ambiental que influencia o crescimento e desenvolvimento das plantas, desde a germinação ao florescimento. As plantas percebem, interpretam e traduzem os sinais luminosos por meio dos fotorreceptores, entre eles os fitocromos, que absorvem comprimentos de onda do vermelho ao vermelho extremo e controlam diversas respostas no ciclo de vida das plantas, incluindo a nutrição. Tem se tornado cada vez mais evidente a participação desse fotorreceptor nas respostas das plantas ao estresse causado pela deficiência nutricional. Entretanto, embora haja algumas evidências na literatura, ainda é pouco conhecida a interação dos fitocromos B com os mecanismos de respostas ao estresse por deficiência de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), que são os nutrientes considerados mais responsivos pelas plantas. Essa pesquisa foi realizada com o objetivo de estudar o papel dos fitocromos B nas respostas nutricionais, fisiológicas e de crescimento do tomateiro ao estresse por deficiência de N, P e K. Inicialmente, plantas dos mutantes com perda de função de phyB1 (*phyB1*) e phyB2 (*phyB2*) e do seu genótipo controle (*Solanum lycopersicum* L. cv Moneymaker) foram cultivadas sob deficiência de N, P e K. A deficiência de phyB1 e phyB2 diminuiu o acúmulo de N, P e K, a concentração de clorofilas e carotenoides e a produção de massa seca das plantas sob suficiência nutricional. Em plantas deficientes em N, phyB1 regula positivamente a absorção de N, a síntese de pigmentos e produção de massa seca, enquanto apenas a absorção de N está sob controle de phyB2. A deficiência de phyB1 mitigou os danos causados pela deficiência de P, pois aumentou a produção de massa seca das plantas em relação ao genótipo controle. Sob deficiência de K, phyB1 aumenta a absorção de P e síntese de clorofilas e carotenoides e phyB2 diminui a peroxidação lipídica das membranas. Posteriormente, a fim de avaliar se o controle de phyB1 nas respostas do tomateiro a deficiência de N, P e K ocorre reciprocamente a partir da comunicação entre parte aérea e raiz, foram utilizados enxertos recíprocos e combinações de enxertia entre *phyB1* e o genótipo controle sob condições de deficiência de N, P e K. O fitocromo B1 da parte aérea está envolvido na absorção de N e P e regula positivamente a condutância estomática e transpiração do tomateiro. A utilização do genótipo controle como enxerto e *phyB1* como porta-enxerto aliviou os danos causados pela deficiência de N, evidenciado pelo aumento na massa seca. Esses resultados sugerem que o controle das respostas nutricionais, fisiológicas e de crescimento do tomateiro é realizado pelos fitocromos através da comunicação entre parte aérea e raiz.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum* L., deficiência nutricional, mutante, phyB

THE ROLE OF PHYTOCHROMES B IN RESPONSES TO STRESS INDUCED BY NPK DEFICIENCY IN TOMATO

ABSTRACT - It is already well known that light is an environmental signal that influences the growth and development of plants from germination to flowering. Plants perceive, interpret, and translate light signals through a complex system of photoreceptors, including phytochromes, which absorb wavelengths from red to far red and control several responses in the life cycle of plants, including nutrition. The participation of this photoreceptor in plant responses to stress caused by nutritional deficiency has become increasingly evident. However, although there is some evidence in the literature, little is known about the interaction of phytochromes B (phyB) with the mechanisms of stress responses due to nitrogen (N), phosphorus (P) and potassium (K) deficiency, which are the nutrients considered most responsive by plants. This research was carried out with the objective of studying the role of phytochromes B in the nutritional, physiological and growth responses of tomato to N, P, and K deficiency. Initially, *phyB1* and *phyB2* tomato mutants (deficient in phyB1 and phyB2) and their control genotype (*Solanum lycopersicum* L. cv Moneymaker) were cultivated under sufficiency and N, P and K deficiency. In N-deficient plants, phyB1 upregulates N uptake, pigment synthesis and dry weight production, while only N uptake is under the control of phyB2. phyB1 deficiency mitigated the damage caused by P deficiency, as it increased the plant dry weight production in relation to the control genotype. Under K deficiency, phyB1 increased P uptake, chlorophyll, and carotenoid synthesis and phyB2 decreases membrane lipid peroxidation. Afterwards, to verify whether the interaction between phyB1 and N, P, and K occurs reciprocally to the communication between shoots and roots; reciprocal grafts and graft combinations between the control genotype and *phyB1* were used under nutritional sufficiency and individual deficiencies of N, P, and K. It was verified that shoot phytochrome B1 is involved in the absorption of N and P and regulates stomatal conductance and transpiration of tomato. The grafting combination between the control genotype as scion and *phyB1* as rootstock alleviated the damages of nitrogen deficiency by increasing dry weight production. These results suggest that the control of nutritional, physiological and growth responses of tomato is performed by phytochrome through shoot-root communication.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L., nutritional deficiency, mutant, phyB

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. Introdução

O nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) são apontados como os nutrientes que mais restringem o crescimento das culturas (De Souza Osório et al., 2020; Teixeira et al., 2021). Cada espécie quando submetida a deficiência nutricional apresenta diferentes mecanismos fisiológicos e taxas de absorção de nutriente que influenciam o seu crescimento (De Souza Osório et al., 2020). Devido a esses elementos serem considerados como essenciais, as plantas desenvolveram mecanismos para otimizar a sua absorção e utilização.

A luz é um sinal ambiental chave que regula o crescimento e desenvolvimento das plantas incluindo a germinação de sementes, desestiolamento, expansão foliar, alongamento do caule, fototropismo, evitação à sombra, ritmo circadiano, florescimento e a nutrição (Li et al., 2011; Xu et al., 2021). As plantas monitoram a direção, duração, quantidade, qualidade, e através desse monitoramento, conseguem dinamicamente absorver e utilizar os nutrientes em resposta às flutuações ambientais (Xu et al., 2021). As informações contidas na luz são obtidas por um complexo sistema de fotorreceptores, que são caracterizados pelo comprimento de onda que percebem (Carvalho et al., 2011). Até o momento, foram identificados cinco classes de fotorreceptores nas plantas superiores, entre eles, os fitocromos (phys), que absorvem comprimentos de onda na faixa do vermelho (600-700 nm) e vermelho extremo (700-750 nm) (Mawphlang e Kharshiing, 2017).

Embora haja diferentes fotorreceptores, os fitocromos são os mais estudados, e, a cada ano, um número considerável de pesquisas utilizando tratamento com luz vermelha/vermelho extremo, bem como mutantes fotomorfogenéticos, são publicadas descrevendo novas funções bioquímicas e moleculares (Carvalho et al., 2011). A caracterização molecular dos fitocromos tem sido feita para várias espécies, incluindo o tomateiro (*Solanum Lycopersicum* L.), uma das hortaliças mais importantes do mundo. Nessa espécie, foram identificados cinco genes de membros da família dos

fitocromos, entre eles *PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYE* e *PHYF* que codificam para as apoproteínas *PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYE* e *PHYF* (Hauser et al., 1995).

Embora a participação dos fitocromos tenha sido amplamente explorada, desde a germinação de sementes (Dechaine et al., 2009; Oh et al., 2009) até o florescimento, (Andres et al., 2009; Brock et al., 2010), tem sido revelada a participação desses fotorreceptores em respostas inerentes aos estresses abióticos, a exemplo da deficiência nutricional (Carvalho et al., 2016; Sakuraba e Yanagisawa, 2018).

No que diz respeito a participação dos fitocromos na nutrição de plantas, foi revelado em estudo com *Arabidopsis thaliana* que os fitocromos influenciam a capacidade do boro em estimular o crescimento do hipocótilo (Kocábek et al., 2009). Além disso, Sakuraba et al. (2018), na mesma espécie, observaram que *phyB* regula favorecendo a absorção de fósforo pelas raízes. Já Carvalho et al. (2016) observaram que *phyA* pode participar da nutrição de tomateiro. Nesse sentido, é importante verificar se mecanismos similares também controlam a absorção e utilização de nutrientes em outras espécies e membros da família dos fitocromos, especialmente em condições de déficit nutricional, que limita a produtividade das culturas.

Existem indicações a partir de combinações de enxertia e de mutantes fotomorfogénéticos, que os fitocromos são parte da comunicação entre parte aérea e raiz. Por exemplo, em *Arabidopsis* as combinações entre o wild type (WT) e o mutante deficiente no fitocromo B (*phyB-9*) (e.g. WT/*phyB-9* e *phyB-9*/WT) absorveram menos fósforo em relação ao genótipo controle WT/WT, indicando que ambos fitocromos, da parte aérea e da raiz estão envolvidos na absorção desse elemento nas raízes (Sakuraba et al., 2018). Dessa forma, o controle de *phyB* sobre a nutrição dependente da comunicação entre raiz e parte aérea levantam questões importantes sobre o controle fotomorfogénético da nutrição, principalmente no que diz respeito a espécies agronomicamente importantes, como tomateiro. Por exemplo: i) as respostas do tomateiro à deficiência de NPK são moduladas pelos fitocromos B1 e B2? ii) a interação entre *phyB1* de tomateiro e N, P, e K ocorre, reciprocamente, a partir da comunicação entre a parte aérea e raiz? Para responder essas questões, no presente trabalho nós realizamos a técnica de enxertia utilizando mutantes em *phyB* de tomateiro.

2. Revisão de literatura

2.1. Fotomorfogênese

A luz é essencial para o crescimento vegetal, não estando restrita ao processo de fotossíntese, pois também atua na transferência de informações para controlar uma série de respostas fisiológicas ao longo do ciclo de vida das plantas e garantir a sua sobrevivência às flutuações ambientais (Kami et al., 2010).

A fotomorfogênese é um processo chave que controla o desenvolvimento das plantas desde a germinação de sementes até o florescimento e senescência; nos vegetais é governada pelo espectro de luz que chega na superfície da terra, se estendendo aproximadamente do violeta (~380 nm) ao vermelho (~700 nm). A qualidade, intensidade, direção e duração da luz são aspectos percebidos por um complexo sistema de fotorreceptores, que juntos traduzem a informação da luz em sinais bioquímicos. Cinco classes de fotorreceptores estão presentes nas plantas superiores, e cada um possui um comprimento de onda específico de absorção da luz, dentre estes podemos citar: os fitocromos (phys), que são os mais importantes reguladores da fotomorfogênese; os receptores da luz azul, que são representados pelos criptocromos (crys), fototropinas (photo) e zeaxilinas os “UV Resistance Locus 8” (UVR8) (Carvalho et al., 2016; Mawphlang e Kharshiing, 2017).

2.2. Fitocromos: aspectos gerais

Os fitocromos são os principais fotoreceptores do espectro vermelho e vermelho extremo (600 a 750 nm) da luz solar e estão presentes em algas, cianobactérias, musgos, samambaias e plantas superiores. Além disso, desempenha papel fundamental na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas, a exemplo da germinação de sementes, fotomorfogênese, ritmo circadiano, alongamento do hipocótilo, florescimento e mais recente, a nutrição (Wang, 2015; Sakuraba et al., 2018; Sakuraba e Yanagisawa, 2018; Soares et al., 2021; Wang et al., 2022).

Esse fotorreceptor é composto por uma apoproteína, que é sintetizada no citosol, e um cromóforo, no qual é um tetrapirrol linear sintetizado no plastídeo, e que juntos formam uma holoproteína (Wang et al., 2022). A união do cromóforo com a apoproteína ocorre no citoplasma, entretanto, a ativação do fitocromo ocorre no núcleo, onde há a interação da forma ativa com os componentes de sinalização e regulação da transcrição de genes dependentes da luz, e que estão relacionados com o início das respostas fisiológicas controladas pelos fitocromos (Klose et al., 2020).

A atividade fotosensorial do fitocromo resulta da sua capacidade de mudar a conformação da molécula. Em plantas cultivadas no escuro, os fitocromos são sintetizados na forma inativa (Fv, absorve luz vermelha), entretanto, a exposição do tecido vegetal a luz faz com que a forma inativa seja interconvertida para a forma ativa (Fve, absorve vermelho extremo) (Figura 1) (Li et al., 2011). Essa propriedade permite que os fitocromos estabeleça o equilíbrio dinâmico dependendo das condições de luz.

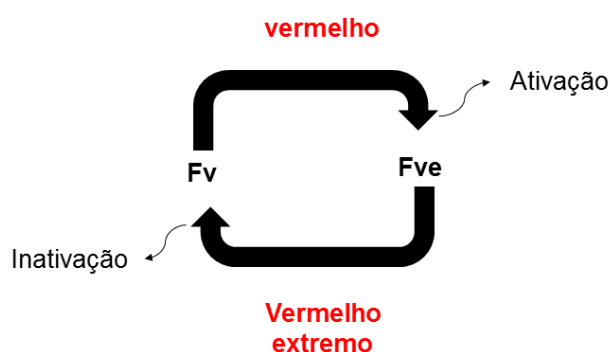


Figura 1. Esquema ilustrando fotoconversão dos fitocromos da forma inativa (Fv) para forma ativa (Fve).

Em tomateiro, foram identificados cinco genes que codificam para as apoproteínas, denominados PHYA, PHYB1, PHYB2, PHYE e PHYF (phyA, phyB1, phyB2, phyE e phyF) (Pratt et al., 1997). Os diferentes membros da família dos fitocromos monitoram o mesmo sinal luminoso, contudo, desencadeiam respostas fisiológicas distintas (Bae e Choi, 2008). Foi observado em plântulas e plantas adultas de tomateiro maior abundância do gene de *PHYA*, seguido por *PHYB1*, *PHYE*, *PHYB2* e *PHYF* (Hauser et al., 1997). A caracterização dos fitocromos e o entendimento dos seus papéis fisiológicos tem sido possível através de análises transgênicas e utilização de mutantes em diversas espécies, incluindo o tomateiro.

2.2.1. Caracterização morfofisiológica dos mutantes em phyB de tomateiro

De modo geral, os mutantes com perda de função de phyB (*phyB*) são caracterizados pela sua incapacidade de desestiolar sob luz vermelha contínua, resultando no alongamento do hipocótilo e menores cotilédones, além disso, as plantas apresentam leve diminuição na concentração de clorofilas quando cultivadas sob luz branca (Van Tuinen et al., 1995). Em estudo recente, o cultivo de *phyB1* e *phyB2* sob luz solar resultou em plantas com menor produção de biomassa total, concentração de clorofilas a e b, condutância estomática e transpiração (Mereb et al., 2020).

2.3. Tomateiro como planta modelo alternativo a *Arabidopsis Thaliana*

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das espécies mais consumidas mundialmente. Isso está relacionado ao seu fruto ser uma importante fonte de vitamina C, ácido fólico e carotenoides, a exemplo do licopeno (Perveen et al., 2015). Aliado a isso, essa planta tem sido considerada como modelo adicional à *Arabidopsis* para estudo da fotomorfogênese.

Assim como em *Arabidopsis*, o tomateiro possui genoma relativamente pequeno e a maior parte são genes de cópia única e rapidamente transformáveis e regeneráveis (Pratt et al., 1997). Além disso, existem outros fatores que reforçam a utilização do tomateiro como planta modelo a exemplo: essa espécie já é bem caracterizada geneticamente; existe uma grande comunidade de cientistas trabalhando com ele; já existem diversos mutantes em fitocromos disponíveis; o tomateiro ainda oferece como vantagem a produção elevada de sementes e plântulas que facilitam a realização de análises; formação de frutos climatéricos, folhas compostas e raízes micorrízicas (Pratt et al., 1997; Carvalho et al., 2011).

2.4. Fitocromos no controle da nutrição de plantas

Na literatura é bem conhecida e explorada a modulação dos fitocromos desde germinação de sementes (Dechaine et al., 2009; Oh et al., 2009) até o florescimento (Andres et al., 2009; Brock et al., 2010). Além disso, tem sido revelada a participação desses fotorreceptores em alguns aspectos da nutrição de plantas.

Em um estudo com arroz, a iluminação das plântulas com a luz vermelha promoveu o aumento na atividade da enzima nitrato redutase. Além disso, esse efeito estimulador da luz vermelha foi contrabalanceado pela iluminação com luz vermelha extrema, indicando que a indução da atividade da nitrato redutase é modulada pelos fitocromos (Sasakawa e Yamamoto, 1979).

Já em *Arabidopsis*, a análise de mutantes fotomorfogênicos revelou a interação entre a sinalização da luz e o boro durante o crescimento e desenvolvimento das plantas (Kocábek et al., 2009). Os autores observaram que a habilidade do boro em estimular o alongamento do hipocótilo foi alterada pela luz azul e vermelha. Isso é, juntas, ambas as luzes amplificaram o estímulo provocado pelo boro no crescimento do hipocótilo, indicando que ambos fitocromos e criptocromos modulam a ação do boro no estímulo ao crescimento do hipocótilo em *Arabidopsis* (Kocábek et al., 2009).

Com a finalidade de verificar se o status nutricional do tomateiro é afetado pelo fitocromo A (*phyA*), Carvalho et al. (2016) realizaram um estudo utilizando o mutante deficiente em *phyA*, que foi submetido a deficiência de macronutrientes. Os autores verificaram que em condições de suficiência nutricional, *phyA* acumulou mais N, Ca, Mg e S na planta inteira, resultando em maior produção de massa seca. Quando o mutante foi submetido a deficiência de N, apresentou maior altura e já sob deficiência de P aumentou o índice de coloração verde. Além disso, sob deficiência de K as plantas acumularam menos N, P e S na planta inteira e que resultou em plantas com menor altura, área foliar, ICV e massa seca. Os resultados desse estudo revelaram que o mutante em *phyA* apresentou comportamento variado quanto a nutrição e crescimento em condições de deficiência nutricional, indicando que esse fotorreceptor é parte da sinalização de respostas a nutrição do tomateiro (Carvalho et al., 2016).

Ainda em *Arabidopsis*, foi observado que a luz vermelha estimulou a expressão de genes que codificam os transportadores de amônio e de nitrato, indicando que a sinalização da luz promove a absorção de nitrogênio por meio da regulação dos genes relacionados a transportadores que podem afetar a absorção desse elemento (Sakuraba e Yanagisawa, 2018). A avaliação de mutantes de *Arabidopsis* deficientes nos fitocromos B-9 e B-10 (*phyB-9* e *phyB-10*) revelou que esse fotorreceptor é um regulador positivo da absorção de P e que essa regulação ocorre através do controle da expressão de genes que codificam para os transportadores de P. Além disso, através de combinações de enxertia entre os mutantes em *phyB* e o WT, os autores ainda observaram que ambos fitocromos, da parte aérea e da raiz, estão envolvidos na regulação da absorção de P nas raízes e que esse controle ocorre de forma mais expressiva sob condições de deficiência desse elemento (Sakuraba et al., 2018).

2.5. Deficiência nutricional

A deficiência nutricional é um dos fatores que mais comprometem o crescimento e a produtividade das culturas (Patel et al., 2020). Aliado a isso, sabe-se que de modo geral, o N, P e K são os nutrientes mais responsivos pelas plantas cultivadas, e isso se deve à função metabólica desempenhada por esses elementos (Marschner, 2012; Prado, 2021). Por exemplo, o N é componente de aminoácidos, proteínas, coenzimas, bases nitrogenadas, pigmentos e participa de processos fundamentais como a absorção de nutrientes, fotossíntese, respiração e multiplicação e diferenciação celular (Prado, 2021). Já o P faz parte dos fosfolipídios das membranas e do armazenamento e transferência de energia na forma de ATP. Além disso, esse elemento também atua no processo de absorção de nutrientes, fotossíntese, síntese de proteínas, multiplicação e divisão celular (Marschner, 2012). O K desempenha papéis em diversos processos, incluindo atividade enzimática, pressão de turgor, síntese de proteínas e crescimento celular (Shin, 2017).

Em plantas de tomate os estudos indicam que o N, P e K são os nutrientes mais limitantes para o crescimento das plantas (Maia et al., 2019; De Andrade et al., 2021) causando desordens nutricionais que evoluem até atingir nível de tecidos e, portanto, sendo visíveis. A deficiência de N em plantas de tomate inicia nas folhas mais velhas

causando clorose uniforme (Maia et al., 2019). As plantas deficientes em P apresentam folhas velhas com coloração púrpura, que mais tarde desenvolve necrose nas margens (Maia et al., 2019; De Andrade et al., 2021). Enquanto a deficiência de K se inicia nas folhas mais velhas na forma de clorose marginal, evoluindo para necrose (De Andrade et al., 2019). As respostas das plantas a deficiência nutricional envolvem alterações moleculares, bioquímicas e fisiológicas específicas para cada nutriente (Marschner, 2012).

2.6. Enxertia como ferramenta de estudo da comunicação entre parte aérea-raiz

A enxertia consiste na união de duas partes de plantas distintas que se fundem, crescem e se desenvolvem em uma única planta. A parte que irá originar a parte aérea é chamada de enxerto e o sistema radicular é o porta-enxerto. Essa técnica vem sendo utilizada na agricultura para promover ganhos em qualidade, resistência a doenças, produtividade das culturas e para aumentar a tolerância aos estresses bióticos e abiótico (Thomas e Frank, 2019). Desde a descoberta de que existe uma interação e influência do porta-enxerto no enxerto, vários experimentos foram realizados para tentar estabelecer a base do transporte de substâncias entre ambas as partes (Albacete et al., 2015; Thomas e Frank, 2019). Além disso, a enxertia vem ganhando atenção como ferramenta de pesquisa, principalmente no estudo da comunicação entre parte aérea e raiz, pois permite que os pesquisadores separem e remontem o sistema de transporte a longa distância, permitindo a descoberta da comunicação intraorganismos (Thomas e Frank, 2019).

Independente da sua aplicação na agricultura, a enxertia vem sendo utilizada para estudo da fotomorfogênese através da utilização de mutantes. Por exemplo, chama a atenção o fato que, por meio de combinações de enxertia entre plantas do mutante de tomateiro high pigment1 (*hp1*), que amplifica o sinal da luz, e o mutante *aurea*, deficiente na biossíntese do fitocromo, foi mostrado que durante sinalização de resposta ao déficit hídrico houve participação desse fotorreceptor na biossíntese de prolina (Ferreira Júnior et al., 2018). Em um trabalho com *Arabidopsis*, os autores utilizaram da técnica de enxertia para verificar qual fitocromo, da parte aérea e raiz, estava associado com a regulação da absorção de P, utilizando plantas do genótipo

controle (WT) e do mutante em *phyB-9* (*phyB-9*) (Sakuraba et al., 2018). Foi observado que ambos fitocromos estão envolvidos na regulação da absorção de P pelas raízes, isso por que tanto a combinação WT/*phyB-9* quanto *phyB-9*/WT apresentaram menor absorção desse elemento em relação a WT/WT (Sakuraba et al., 2018).

3. Referências

Albacete A, Andújar CM, Martínez-Pérez A, Thompson AJ, Dodd IC, Pérez-Alfocea F (2015). Unravelling rootstock×scion interactions to improve food security. **Journal of Experimental Botany** 66: 2211–2226.

Andres F, Galbraith DW, Talon M, Domingo C (2009) Analysis of photoperiod sensitivity sheds light on the role of phytochromes in photoperiodic flowering in rice. **Plant Physiology** 151: 681-690.

Bae, G, Choi, G (2008) Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. **Annual Review of Plant Biology** 59: 281–311.

Brock MT, Maloof JN, Weinig C (2010) Genes underlying quantitative variation in ecologically important traits: PIF4 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4) is associated with variation in internode length, flowering time, and fruit set in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Ecology** 19: 1187-1199.

Carvalho RF, Moda LR, Silva, GP, Gavassi MA, Prado RM (2016) Nutrition in tomato (*Solanum lycopersicum* L) as affected by light: Revealing a new role of phytochrome A. **Australian Journal of Crop Science** 10:331–335.

Carvalho RF, Campos ML, Azevedo RA (2011) The role of phytochrome in stress tolerance. **Journal of Integrative Plant Biology** 53: 920–929.

Carvalho RF, Takaki M, Azevedo RA (2011) Plant pigments: The many faces of light perception. **Acta Physiologiae Plantarum** 33: 241–248.

De Andrade HAF, (2021) Nutritional status of cherry tomato with omission of macronutrients. **Revista Brasileira de Ciencias Agrarias** 16:1-7.

Dechaine JM, Gardner G, Weinig C (2009) Phytochromes differentially regulate seed germination responses to light quality and temperature cues during seed maturation. **Plant Cell and Environment** 32:1297-1309.

De Souza Osório CRW, Teixeira GCM, Barreto RF, Campos CN, Leal AJF, Teodoro PE, Prado RM (2020) Macronutrient deficiency in snap bean considering physiological, nutritional, and growth aspects. **PLoS ONE** 15:1–15.

Ferreira Júnior DC, Gaion LA, Souza Júnior, GS, Santos DMM, Carvalho RF (2018) Drought-induced proline synthesis depends on root-to-shoot communication mediated by light perception. **Acta Physiologiae Plantarum**, 40:1–5.

Hauser BA, Cordonnier-Pratt MM, Daniel-Vedele F, Pratt LH (1995) The phytochrome gene family in tomato includes a novel subfamily. **Plant Molecular Biology** 29: 1143–1155.

Hauser BA, Pratt LH, Cordonnier-Pratt MM (1997) Absolute quantification of five phytochrome transcripts in seedlings and mature plants of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Planta** 201: 379–387.

Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, Fankhauser C (2010) Light-regulated plant growth and development. **Current topics in developmental biology** 91: 29-66.

Klose C, Nagy F, Schaefer E (2020) Thermal Reversion of plant phytochromes. **Molecular Plant** 13: 386-397.

Kocábek T, Svoboda Z, Al-Zwi AM, Rolfe SA, Fellner M (2009) Boron-regulated hypocotyl elongation is affected in Arabidopsis mutants with defects in light signalling pathways. **Environmental and Experimental Botany** 67: 101–111.

LI J, Li G, Wang H, Deng XW (2011) Phytochrome Signaling Mechanisms. **The Arabidopsis Book** 9: e0148

Maia JTLS, Martinez HEP, Clemente JM, Ventrella MC, Milagres CC (2019) Growth, nutrient concentration, nutrient accumulation and visual symptoms of nutrient deficiencies in cherry tomato plants. **Semina:Ciencias Agrarias** 40: 585–598.

Marschner H (2012) **Mineral Nutrition of Higher Plants**. London: Academic Press p. 672.

Mawphlang OIL, Kharshiing EV (2017) Photoreceptor mediated plant growth responses: Implications for photoreceptor engineering toward improved performance in crops. **Frontiers in Plant Science** 8: 1–14.

Mereb EL, Alves FRR, Rezende MH, De Oliveira, EJ, Carvalho, RF, De Melo, HC (2020) Morphophysiological responses of tomato phytochrome mutants under sun and shade conditions. **Revista Brasileira de Botanica** 43:45–54.

Oh E, Kang H, Yamaguchi S, Park J, Lee D, Kamiya Y, Choi G (2009) Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during seed germination in *Arabidopsis*. **Plant Cell** 21: 403-419.

Patel M, Rangani J, Kumari A, Parida AK (2020) Mineral nutrient homeostasis, photosynthetic performance, and modulations of antioxidative defense components in two contrasting genotypes of *Arachis hypogaea* L. (peanut) for mitigation of nitrogen and/or phosphorus starvation. **Journal of Biotechnology** 323: 136–158.

Perveen R, Suleria HAR, Anjum FM, Butt MS, Pasha I, Ahmad S (2015) Tomato (*Solanum lycopersicum*) Carotenoids and Lycopenes Chemistry; Metabolism, Absorption, Nutrition, and Allied Health Claims—A Comprehensive Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 55: 919-929.

Prado RM (2021) **Mineral nutrition of tropical plants**. Cham: Springer International Publishing p.339.

Sakuraba Y, Kanno S, Mabuchi A, Monda K, Iba K, Yanagisawa S (2018) A phytochrome-B-mediated regulatory mechanism of phosphorus acquisition. **Nature Plants** 4:1089–1101.

Sakuraba Y, Yanagisawa S (2018) Light signalling-induced regulation of nutrient acquisition and utilisation in plants. **Seminars in Cell and Developmental Biology** 83:123–132.

Sasakawa H, Yamamoto Y (1979) Effects of Red, Far Red, and Blue Light on Enhancement of Nitrate Reductase Activity and on Nitrate Uptake in Etiolated Rice Seedlings. **Plant Physiology** 63:1098–1101.

Shin R (2017) Potassium sensing, signaling, and transport: Toward improved potassium use efficiency in plants. In: **Plant Macronutrient Use Efficiency: Molecular and Genomic Perspectives in Crop Plants**. Elsevier Inc p. 149–163.

Soares MB, Prado RM, Tenesaca LFL, Lúcio JCB, Carvalho RF (2021) Tomato phytochromes B1 and B2 are part of the responses to the nutritional stress induced by NPK deficiency. **Physiologia Plantarum** 173: 2238-2247.

Teixeira GCM, Prado RMP, Oliveira KS, Buchelt AC, Rocha AMS, Santos MS (2021) Nutritional deficiency in scarlet eggplant limits its growth by modifying the absorption and use efficiency of macronutrients. **PLoS ONE** 16: 1–20 2021.

Thomas HR, Frank MH (2019) Connecting the pieces: uncovering the molecular basis for long-distance communication through plant grafting. **New Phytologist** 223: 582–589.

Van Tuinen, Ageeth, Kerckhoffs, Huub J., Nagatani, Akira, Kendrick, Richard E., Koornneef, M. A (1995) Temporarily Red Light-Insensitive Mutant of Tomato. **Plant Physiology** 108: 939–947.

Xu J, Guo Z, Jiang X, Ahammed GJ, Zhou Y (2021) Light regulation of horticultural crop nutrient uptake and utilization. **Horticultural Plant Journal** 7:367-379.

Wang H, Wang H (2015) Phytochrome signaling: Time to tighten up the loose ends. **Molecular Plant** 8: 540–551.

Wang P et al. (2022) Photomorphogenesis in plants: The central role of phytochrome interacting factors (PIFs). **Environmental and Experimental Botany**, 194:104

CAPÍTULO 2 - Tomato phytochromes B1 and B2 are part of the responses to the nutritional stress induced by NPK deficiency

ABSTRACT - Phytochromes are red-light photoreceptors that play an important role in regulating many responses of plants, including its nutritional control. Nutrient deficiency in plants has become a constraint for agricultural production; thus, we investigated the role of phytochromes B1 and B2 in the nutritional, physiological and growth changes of the control genotype (WT) and both *phyB1* and *phyB2* tomato mutants (deficient in phyB1 and phyB2) under nutritional sufficiency and individual deficiency of N, P and K. Under complete solution, the plants of phyB1 and phyB2 had a decreased N, P and K accumulation compared to WT and consequently a reduced content of chlorophyll and carotenoids, and dry weight production. In the condition of N deficiency, phyB1 had decreased N absorption, pigments concentration and plant dry weight, while increased oxidative stress of membranes (MDA content). Similarly, phyB2 also had reduced N absorption. The deficiency of phyB1 mitigated the effects of P deficiency as phyB1 mutant had improved nutritional and physiological responses, increasing plant dry weight production. In contrast, phyB2 reduced N accumulation, quantum efficiency of photosystem II (Fv/Fm) and the concentration of pigments, while it increased MDA. Under K deficiency, phyB1 displayed a reduced P accumulation, as well as the total concentration of chlorophylls and carotenoids and K use efficiency. An increased concentration of MDA was found in phyB2 plants, as well as a reduction in chlorophylls concentration and in the use efficiency of K. Together, these results indicate a new perspective on the control of phytochromes in the nutrition of tomato plants under nutritional stress.

1. Introduction

The understanding of the mode of action of photoreceptors on plant development and responses to abiotic stress has been growing in recent years due to analysis of photomorphogenic mutants (Franklin and Quail 2010). Phytochromes are red-light photoreceptors that absorb wavelengths within the range of red (600-700 nm) and extreme red (700-750 nm) (Carvalho et al. 2016; Mawphlang and Kharshiing 2017). The molecular characterization of phytochromes was made for several species, including one of the most important vegetables in the world: tomato (*Solanum lycopersicum* L.). This species is considered as an alternative model plant to *Arabidopsis thaliana* for the study of photomorphogenesis (Pratt et al. 1997). In tomato plants, phytochromes are encoded by five genes: *PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYE*, and *PHYF* (Hauser et al. 1995); however, the individual functions of phytochromes in plants cultivated under abiotic stresses were poorly investigated.

The deficiency of phyB1 and phyB2 in tomato plants results in reduced chlorophyll content and biomass production during the vegetative phase, indicating that this photoreceptor acts in the control of chlorophyll synthesis in addition to dry weight production (Mereb et al. 2020). For instance, the participation of phytochromes in plant nutrition has been shown in *Arabidopsis*, where phytochrome B (phyB) induces the activation of genes encoding for phosphorus transporters. PhyB participation was found to be more physiologically relevant in P-deficient conditions (Sakuraba et al. 2018).

Nutrients participate actively in multiple physiological processes in plants to increase dry matter production and, consequently, the growth and development of crops (Prado 2020). Nitrogen (N), phosphorus (P), and potassium (K) are the most limiting nutrients for tomato plants (Maia et al. 2019). In regions with poor-income settings, there are restrictions on the use of chemical fertilizers, which limits plant growth. Hence, adapted genotypes are required to this kind of environmental condition. NPK deficiencies trigger a series of physiological, biochemical, and metabolic disorders related to NPK function in the plant metabolism. For example, plants with inadequate supply of NPK usually exhibit stunted growth, lower pigment content and

quantum efficiency of photosystem II, and high levels of lipid peroxidation in chloroplasts (Kumar Tewari et al. 2007; Chen et al. 2018).

To the author's knowledge, the only study that reported the mode of action of phytochromes in tomatoes, specifically phytochrome A (phyA) under conditions of nutritional sufficiency and macronutrients deficiency, was performed by Carvalho et al. (2016). In that study, phyA deficiency favored N absorption and the production of dry weight under a nutrient sufficiency condition. It was also observed that phyA deficiency had no effect on N- and P-deficient plants. However, reduced N and P absorption lead to a lower dry matter production in K-deficient plants (Carvalho et al. 2016).

The responses of plants mediated by phytochromes have already been extensively investigated in *Arabidopsis*, and the findings indicate that this photoreceptor can modulate positive or negative responses in conditions of macronutrient sufficiency and deficiency. In this sense, we hypothesized that phyB1 and phyB2 participate in the signaling responses of tomato plants triggered by NPK deficiency. We assumed that the deficiency of these photoreceptors would affect the absorption of NPK, the nutritional efficiency, physiology, and growth of tomatoes. To our knowledge, this is the first study that presents such a broad characterization of phyB1 and phyB2-deficient mutants, focusing on plant nutrition. In addition, based on the rudimentary knowledge of plant responses to phytochrome deficiency, it will provide bases for agricultural practice to improve the use of more adapted genotypes to agricultural environment and increase crop production.

2. Materials and methods

2.1. Growth conditions and plant material

The experiment was conducted inside a greenhouse at the São Paulo State University (Unesp), in Jaboticabal, Brazil, and lasted for 37 days after sowing (DAS). We used the *Solanum lycopersicum* L. cv. Moneymaker as wild-type (WT) and photomorphogenic mutants defective for the genes *PHYB1* and *PHYB2* that encode

PHYB1 (*phyB1*) and PHYB2 (*phyB2*) apoproteins in the cv Moneymaker background (van Tuinen et al. 1999).

The air temperature and humidity data were monitored inside the growth room, with the observed mean temperature day/night of $24 \pm 2^\circ\text{C}$ and relative humidity $40 \pm 5\%$. The photon flux density was approximately $70 \mu\text{mol of photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, and the photoperiod was maintained at 12h/12h.

Seeds of *phyB1*, *phyB2* and WT were placed in polystyrene trays to germinate, which were filled with a mixture of the commercial substrate BioPlant® (composed of sphagnum peat, vermiculite, coconut fiber, rice husk, husk pine, and additives containing calcium), and expanded vermiculite in a volumetric proportion 1: 1 (v: v). At 20 DAS, the plants were transferred to propylene pots (2 L) containing the nutrient solution of Hoagland and Arnon (1950). The solution was initially diluted to 25% ionic strength and after ten days, the concentration was increased to 50%, remaining at this concentration until the end of the experiment. The nutrient solution was prepared with deionized water, continuously aerated with the aid of the water pump and changed at 30 DAS. The pH value of the solution was measured on a daily basis and maintained at 5.5 ± 0.5 , with the aid of sodium hydroxide and hydrochloric acid solutions, both at 1%.

2.2. Treatments and experimental design

Three experiments were carried out in a 3x2 factorial scheme, with the first factor being the mutant cultivars of tomato plants (WT, *phyB1* and *phyB2*) and the second factor defined as the nutrient solution, which was either complete (containing 15 mmol L^{-1} of N, 1 mmol L^{-1} of P and 6 mmol L^{-1} of K), deficient in N (1 mmol L^{-1} of N using NH_4NO_3 as source, 1 mmol L^{-1} of P and 6 mmol L^{-1} of K), P (15 mmol L^{-1} of N, 0 mmol L^{-1} of P and 6 mmol L^{-1} of K) and K (15 mmol L^{-1} of N, 1 mmol L^{-1} of P and 0 mmol L^{-1} of K) (Table 1). A completely randomized design with six replications was adopted, and one replicate was formed by four plants.

2.3. Performed analyses

2.3.1. Quantum efficiency of PSII (Fv/Fm) and pigments content

The quantum efficiency of PSII was measured between 7:00 and 8:00 h. The third fully expanded leaves were dark-adapted for 30 min using clips, and then the minimal (F0) and maximal fluorescence (Fm), as well as the Fv/Fm were obtained using a portable fluorometer (Opti-Sciences, Os30P). Total chlorophyll and carotenoids contents were determined according to the methodology described by Lichtenthaler (1987). Fresh samples (0.025 - 0.030 g) of the leaves were collected from tomato plants of each treatment, and the readings were performed in a Beckman DU 640 spectrophotometer at 663, 647 and 470 nm to acquire the respective contents of chlorophyll a, b and carotenoids, based on fresh weight. The total chlorophyll content was a result of the sum between the concentrations of chlorophyll a and b.

Tabela 1. Composition of nutrient solutions used to induce N, P, and K deficiencies in *Solanum lycopersicum* L. The values are correspondent to a 100% nutrient solution which was diluted to 25% and 50%.

Sources mol L ⁻¹	Treatment			
	Complete	-N	-P	-K
		mL L ⁻¹		
KH ₂ PO ₄	1	1	-	-
KNO ₃	5	-	-	-
Ca (NO ₃) ₂ . 5H ₂ O	5	-	5	5
MgSO ₄	2	2	2	2
KCL	-	5	6	-
CaCl ₂ . 2H ₂ O	-	5	-	-
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	-	1
NH ₄ NO ₃	-	0.5	2.5	2
Micronutrients*	1	1	1	1
Fe-EDDHA**	1	1	1	1

*In 1L: 2.86 g H₃BO₃; 1.81 g MnCl₂. 4H₂O; 0.10 g ZnCl₂; 0.04 g CuCl₂; 0.02 g H₂MoO₄H₂O.
 ** In 1L: 83.33 g Fe-EDDHA

2.3.2. Lipidic peroxidation

Lipid peroxidation was determined in shoots samples (stem and leaves), which were collected, washed, immersed in liquid N₂, and stored at -80°C, following the methodology of thiobarbituric acid described by Heath and Packer (1968). The reactive

metabolites of cell membranes, especially malondialdehyde (MDA), react with thiobarbituric acid and can be quantified with spectrophotometry. Briefly, shoot tissue (0.3g) was homogenized with 1 mL trichloroacetic acid and polyvinylpyrrolidone (20%). Subsequently, the samples were transferred into tubes and centrifuged at 10,000 g for 15 min. The supernatant was blended with 1 mL of trichloroacetic acid 20% (m/v) and thiobarbituric acid 0.5% (m/v), and then incubated in a water bath at 95°C for 30 min. After this period, samples were centrifuged at 11,000 g for 5 min. The readings were performed in a spectrophotometer at 535 and 600 nm, the concentration of MDA was determined using the coefficient $1.55 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Gratão et al. 2012), and the results were expressed as nmol g^{-1} of fresh weight.

2.3.3. Growth parameters

The plants were harvested at 37 DAS and separated into shoots and roots. The plant material was washed in running water with a detergent solution (0.1% v/v), followed by an HCl solution (0.3% v/v), and deionized water. Subsequently, the material was dried in an oven with forced air circulation ($65 \pm 5^\circ\text{C}$) until constant weight to determine the shoot, root and plant dry weight.

2.3.4. Nutrient concentration and use efficiency

The concentrations of N, P, and K in the shoots were determined as described by Bataglia et al. (1983). Based on the N, P, and K concentrations and the shoot dry weight, nutrient accumulation was calculated. The nutrient use efficiency was calculated according to the equation $(\text{shoot dry weight})^2 / (\text{accumulation of the respective nutrient})$ (Siddiqi & Glass 1981).

2.4. Statistical analysis

All data were submitted to a bidirectional analysis of variance (ANOVA) by the F test ($p \leq 0.05$) after checking for homogeneity of variances (teste W de Shapiro-Wilks). When significant, the Tukey multiple comparison test of was applied to compare the

means of the genotypes under each nutrient solution at a 5% probability level. The same test was used to compare the deficiency of each nutrient with the complete nutrient solution, within each genotype, using the statistical software AgroEstat®.

3. Results

3.1. Complete nutrient solution

The phytochromes deficiency altered the accumulation of nutrients in tomato plants (Fig. 1). Both *phyB1* and *phyB2* mutant plants accumulated less N, P and K in comparison to WT (Fig. 1). However, none of the mutants differed from WT in terms of MDA concentration (Fig. 2A). In contrast, *phyB1* and *phyB2* displayed a lower content of Chl *a+b* and carotenoids (Fig. 2B, C) than WT grown under the complete nutrient solution. These alterations in the contents of pigments did not alter the Fv/Fm ratio as none of the mutants Fv/Fm ratio differed from WT (Fig. 2D). Reductions in the use efficiency of N, P and K were also observed in both *phyB1* and *phyB2* plants (Fig. 3), which resulted in lower shoot and plant dry weights than WT (Fig. 4A, C). There was no difference between the root dry weight of *phyB2* and WT. However, these genotypes showed higher root dry weight than *phyB1* plants (Fig. 4B).

3.2. Nitrogen deficiency (-N)

A comparison of means revealed that the interaction between genotypes (*phyB1*, *phyB2* and WT) and N deficiency was significant on P and K accumulations (Fig. 1B,C), MDA, carotenoids, Fv/Fm (Fig. 2A,C,D), N use efficiency (Fig. 3A), shoot, root and plant dry weight (Fig. 4).

Regardless of the genotype, the N accumulation by plants cultivated under N deficiency was lower than plants grown under complete nutrient solution. Conversely, *phyB1* and *phyB2* plants had lower N accumulation than WT (Fig. 1A). Both mutants and WT accumulated less P and K (Fig. 1B, C) in comparison to plants subjected to

the complete solution; however, no differences were observed between *phyB1*, *phyB2* and WT.

The plants of *phyB1* and *phyB2* cultivated under N deficiency had an increased MDA concentration (Fig. 2A), which was not verified in WT, compared to the complete nutrition treatment. However, *phyB1* mutant showed higher levels of MDA than WT and *phyB2* when cultivated under N deficiency (Fig. 2A). The concentrations of Chl *a+b* and carotenoids were reduced in N-deficient plants (Fig. 2B, C). However, a more severe reduction was observed in *phyB1* compared to WT. Interestingly, N deficiency did not affect the Fv/Fm ratio in WT and *phyB1*, but the *phyB2* mutant displayed a lower Fv/Fm in comparison to the *phyB2* plants cultivated under complete solution and compared to *phyB1* and WT in all treatments (Fig. 2D).

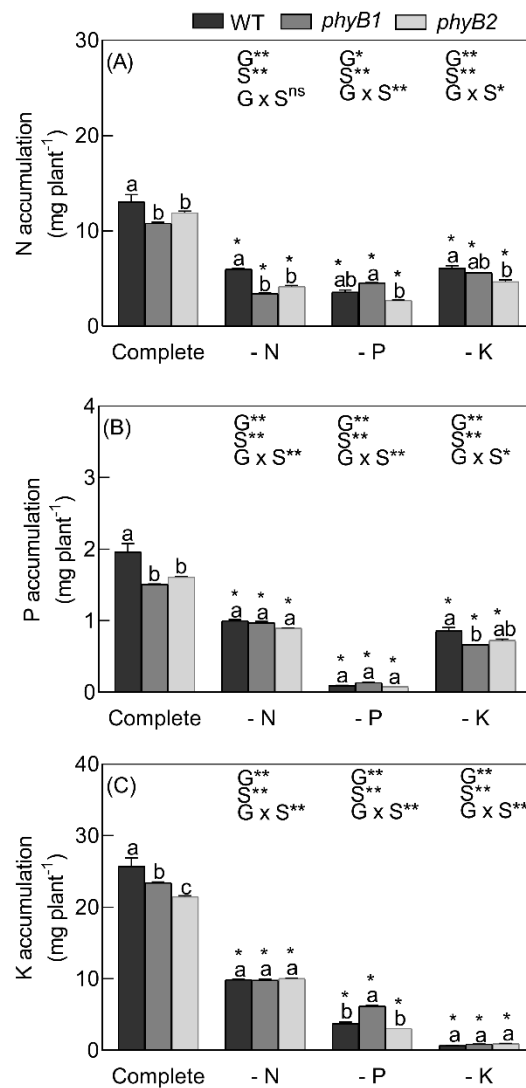


Figure 1. Nutrient accumulation in the shoots of tomato mutants deficient in *phyB1*, *phyB2*, and the WT grown under complete or deficient (-) nutrient solution. (A) N, (B) P, and (C) K. Values are the means $\pm$ SE of each treatment ($n = 4$ replicates, containing four plants each). Letters above the bars represent the differences in the means between the genotypes within each solution, and asterisks on top of bars indicate significant differences between the nutritional treatment and the complete solution; both were calculated using Tukey's test ($p < 0.05$). G represents genotype, S represents nutrient solution, and G x S represents the interaction between factors.

A significant and interactive effect caused by N deficiency was observed in the utilization of N by the mutant cultivars and WT. Both *phyB1* and *phyB2* plants and WT had a reduced use efficiency of N compared to the plants cultivated under complete solution (Fig 3A); nevertheless, no differences were observed between genotypes. The use efficiencies of P and K were lower in N-deficient plants, regardless of the genotype.

However, *phyB1* presented lower P and K use efficiency (Fig. 3B, C) compared to WT. Conversely, no differences were observed in the use efficiency of P between all plants in N-deficient conditions, while *phyB2* had a lower use efficiency of K than WT (Fig 3C).

The shoot and plant dry weights of the mutants *phyB1*, *phyB2*, and WT decreased when these were cultivated under N deficiency (Fig. 4A, C). In addition, shoot and plant dry weights were similar in mutants and WT, and the root dry weight decreased only in *phyB2* and WT plants grown under N deficiency; however, *phyB1* and *phyB2* mutants presented lower root dry weight than WT (Fig. 4B).

3.3. Phosphorus deficiency (-P)

The ANOVA revealed a significant interaction ($p \leq 0.05$) between genotype and nutrient solution for all variables evaluated (Figs 1-4). When exposed to P deficiency, all genotypes accumulated less N, P, and K than plants cultivated under the complete nutrient solution (Fig. 1). None of the phytochrome mutants differed from the WT in the levels of N and P under P deficiency (Fig. 1A,B). However, *phyB1* accumulated more N than *phyB2*. Phytochrome B1 appeared to play an important role in K accumulation, as the *phyB1* mutant showed a higher accumulation of this macronutrient than WT and *phyB2* (Fig. 1C).

The plants of *phyB1*, *phyB2* and WT had an increased MDA concentration when cultivated under P deficiency compared to the treatment with complete solution; however, *phyB1* presented higher levels of MDA than WT and *phyB2* under P deficiency (Fig. 2A). Nevertheless, all genotypes displayed reduced concentrations of Chl *a+b* and carotenoids (Fig. 2B, C), leading to a decreased Fv/Fm ratio (Fig. 2D). A more severe reduction in pigment accumulation and Fv/Fm was observed in *phyB2* mutant compared to WT and *phyB1*. On the other hand, *phyB1* plants showed a similar accumulation of pigments than WT, as well as a higher Fv/Fm ratio than WT and *phyB2* under P deficient conditions.

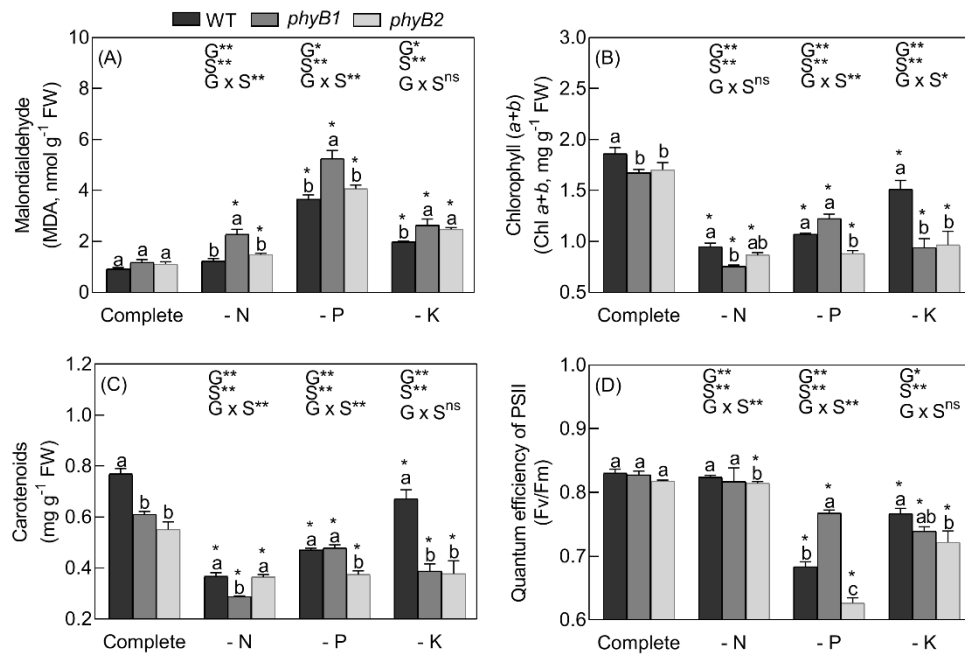


Figure 2. (A) Malondialdehyde (MDA), (B) chlorophyll a + b, (C) carotenoid content and (D) quantum efficiency of PSII (Fv/Fm) of tomato mutants deficient in *phyB1*, *phyB2*, and the WT grown under complete or deficient (-) nutrient solution. Values are the means $\pm$ SE of each treatment (n = 4 replicates, containing four plants each). Letters above the bars represent the differences in the means between the genotypes within each solution, and asterisks on top of bars indicate significant differences between the nutritional treatment and the complete solution; both were calculated using Tukey's test ($p < 0.05$). G represents genotype, S represents nutrient solution, and G x S represents the interaction between factors.

The use efficiency of N was lower in *phyB1*, *phyB2* and WT plants grown under P deficiency compared to plants cultivated under complete solution (Fig. 3A). P-stressed *phyB1* mutant had a higher N use efficiency than WT and *phyB2* (WT and *phyB2* having similar results). Under P deficiency, the use efficiency of N increased as well both in the mutants and WT; however, *phyB1* presented a higher efficiency than WT and *phyB2* (Fig. 3B).

It was possible to observe that shoot and plant dry weights were reduced because of P deficiency in all genotypes compared to plants cultivated under complete solution (Fig. 4A, C). In addition, P-stressed *phyB1* plants had a higher root dry weight than the plants cultivated under complete solution, while *phyB2* plants displayed a reduced root dry weight under the same condition (Fig. 4B). Both mutants showed similar results in relation to WT, but *phyB1* presented a higher root dry weight than *phyB2*. However, *phyB1* displayed a higher shoot dry weight than WT and *phyB2*.

3.4. Potassium deficiency (-K)

The ANOVA ($p \leq 0.05$) showed that the genotypes behaved differently in solutions with/without K for the variables N, P and K accumulation (Fig. 1), Chl *a+b* (Fig. 2B), N, P and K use efficiency, shoot and plant dry weights (Fig. 4A,C).

Plants cultivated under K deficiency accumulated less N, P and K in relation to the ones grown under complete solution (Fig. 1). In addition, *phyB1* and *phyB2* mutants grown in this deficient condition showed similar K accumulation than WT (Fig. 1C). While *phyB2* had a lower N accumulation than WT, *phyB1* showed a lower accumulation of P (Fig. 1B).

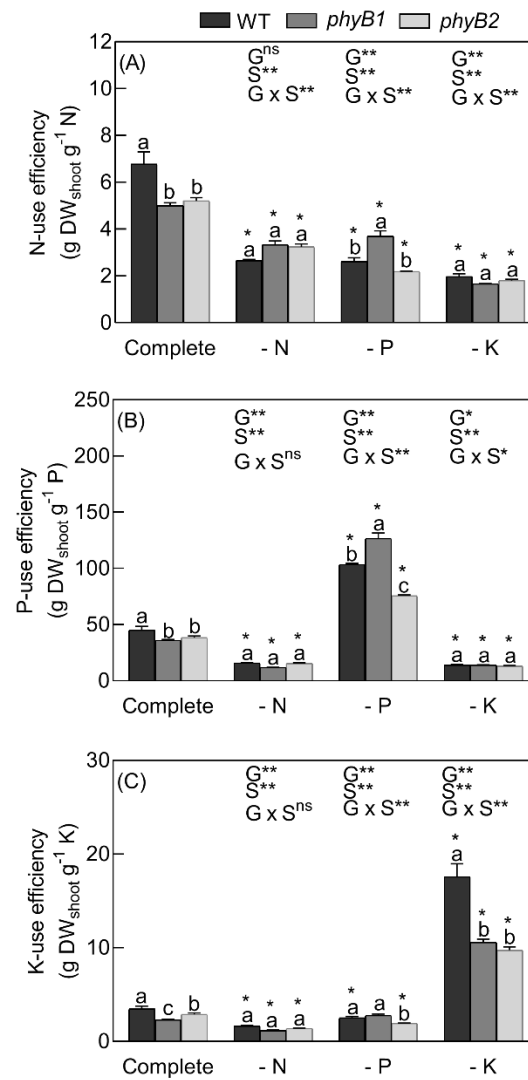


Figure 3. Nutrient use efficiency of tomato mutants deficient in *phyB1*, *phyB2*, and the WT grown under complete or deficient (-) nutrient solution. (A) N, (B), and (C) K. Values are the means $\pm$ SE of each treatment (n = 4 replicates, containing four plants each). Letters above the bars represent the differences in the means between the genotypes within each solution, and asterisks on top of bars indicate significant differences between the nutritional treatment and the complete solution; both were calculated using Tukey's test (p < 0.05). SDW represents shoot dry weight; G represents genotype, S represents nutrient solution, and G x S represents the interaction between factors.

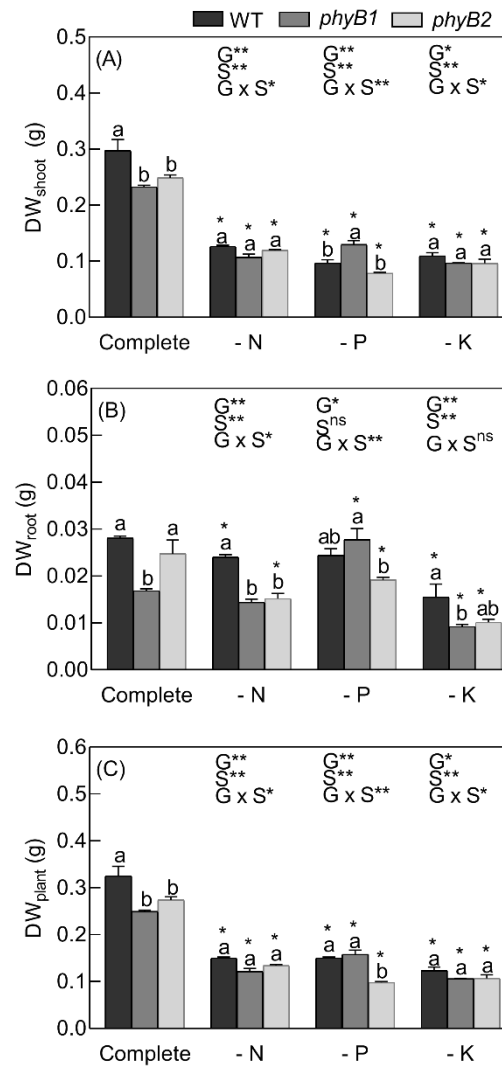


Figure 4. (A) Shoot, (B) root, and (C) plant dry weight of tomato mutants deficient in *phyB1*, *phyB2*, and the WT grown under complete or deficient (-) nutrient solution. Values are the means $\pm$ SE of each treatment (n = 4 replicates, containing four plants each). Letters above the bars represent the differences in the means between the genotypes within each solution, and asterisks on top of bars indicate significant differences between the nutritional treatment and the complete solution; both were calculated using Tukey's test ($p < 0.05$). G represents genotype, S represents nutrient solution, and G x S represents the interaction between factors.

Regardless of the genotype, K deficiency increased lipid peroxidation, as revealed by the analysis of MDA concentration in plants. The mutant *phyB1* showed higher levels of MDA than WT and *phyB2*, and *phyB2* was similar to WT (Fig. 2A). When submitted to a K-deficiency condition, *phyB1*, *phyB2* and WT displayed reduced chlorophyll *a+b* levels compared to plants cultivated under complete solution. Interestingly, the phytochrome B mutants *phyB1* and *phyB2* had lower concentrations

of Chl *a+b* (Fig. 2B) than WT plants grown under K deficiency. Regardless of the genotype, the plants grown under K deficiency had lower carotenoid content and Fv/Fm ratio (Figs. 2C, D) than the ones grown under complete solution. Moreover, the carotenoid content and Fv/Fm ratio were lower in the phytochrome mutants than WT.

K deficiency negatively affected the use efficiency of N and P in *phyB1*, *phyB2* and WT compared to the complete treatment (Fig. 3A, B). On the other hand, in all genotypes, K deficiency increased the use efficiency of this nutrient (Fig. 3C). Although the phytochrome mutants used in this study presented similar statistical results concerning the use efficiency of N and P (Fig. 3A, B), *phyB1* and *phyB2* showed a lower K use efficiency under K deficiency than WT (Fig. 3C).

Regardless of genotype, K-stressed plants presented lower root dry weight than plants grown under complete solution (Fig. 4B). Furthermore, *phyB1* plants displayed a lower production of root dry weight compared to WT and *phyB2*, and *phyB2* was statistically similar to WT (Fig. 4B). On the other hand, shoot and plant dry weights were reduced due to K deficiency in all genotypes (Fig. 4A, C); however, *phyB1*, *phyB2*, and WT displayed statistically similar results concerning these variables.

4. Discussion

In order to improve the nutritional management of crops of high economic importance, such as tomatoes, research is needed to elucidate the relationships between absorbed nutrients, their accumulation, and their effects on plant metabolism, both under nutritional sufficiency and deficiency. Moreover, studies demonstrated that phytochromes can be an important part of the plant's responses to nutritional deficiency. For instance, under nutritional sufficiency, a negative control of *phyA* in tomatoes was observed as N absorption and accumulation and the production of dry weight were reduced in *phyA* (Carvalho et al. 2016). Carvalho et al (2016) also observed that the role of *phyA* on nutritional relationships in tomatoes is complex because other types of phytochromes may be part of these responses. For example, the *phyB* family has been shown to participate to many abiotic stress responses (Junior et al. 2021). Thus, we hypothesized that *phyB1* and *phyB2* are part of the tomato plants' response to nutrient deficiency.

4.1. Complete nutrient solution

One of the roles of the red light that is perceived by phytochromes is related to N, P, and K absorption by plants (Sakuraba & Yanagisawa 2018). Our results suggest that tomatoes *phyB1* and *phyB2* are positive regulators of N, P, and K absorption under nutritional sufficiency, as their accumulations were lower in the mutants in comparison to WT (Fig. 1). No differences were observed in MDA concentration and Fv/Fm ratio between mutants and WT (Fig. 2A, D) supplied with a complete nutrient solution. However, *phyB1* and *phyB2* had a reduced concentration of Chl *a+b* and carotenoids (Fig. 2B, C) compared to WT. The interaction between phytochromes and pigments was reported in previous studies, in which the authors suggested that the lower concentration of chlorophyll in *phyB1* mutants is due to the participation of this photoreceptor in chlorophyll biosynthesis, and the development of chloroplasts (Zhao et al. 2013). Previous studies also reported that phytochromes suppress chlorophyll degradation and the levels of lipid peroxidation in thylakoids (Joshi et al. 1991). Those results pointed out the positive role of phyB in chlorophylls, in addition to the synthesis of carotenoids and their accumulation in plants grown under nutritional sufficiency.

The deficiency of PHYB1 and PHYB2 caused a reduction in the use efficiency of N, P, and K, which might indicate that these phytochromes participate in the regulation of the activity of nitrate reductase, the enzyme responsible for the metabolism of N (Sakuraba & Yanagisawa 2018). Moreover, the lower N accumulation may have reduced the absorption of other nutrients, such as P and K due to the interaction between these nutrients (Cavalcante et al. 2019), and led to a reduction in N use efficiency and consequently of the other nutrients (Fig. 3). It was also observed that *phyB1* and *phyB2* decreased the shoot and whole plant biomass production (Fig. 4A, C), highlighting the importance of tomato phyB as a positive regulator of pigment production, nutritional efficiency and growth. This was an expected result, seen that active phytochromes control the allocation of biomass, and its deficiency may reduce vegetative biomass accumulation in tomato plants (Mereb et al. 2020).

4.2. Nitrogen deficiency (-N)

The biological functions of N are directly related to the process of ionic absorption, given its part in the structural composition of amino acids, proteins and chlorophyll, in addition to its role in the synthesis of antioxidant compounds such as enzymes (Marschner 2012; Prado 2020; Zhang et al. 2017). Therefore, N deficiency led to a reduced accumulation of this element by shoots, causing a ionic imbalance due to a reduction in the absorption of P and K in both mutants and the control compared to the complete nutrient solution (Fig. 1). In addition, the nutritional imbalance promoted an increase in the lipid peroxidation of membranes (MDA) of *phyB1* and *phyB2* and a decrease in the production of photosynthetic pigments, as shown in the results of the mutants and WT (Fig. 2). The strong relationship found between N and the metabolism of P and K led to a reduction in the use efficiency of N, P and K in all genotypes studied (Fig. 3); thus, the plants converted a lower amount of nutrients into biomass, as pointed out in the results of the shoots, roots, and the whole plants' dry weight (Fig. 4).

The deficiency of *phyB1* and *phyB2* reduced N absorption, suggesting that regardless of the status of N in the plant, phytochromes act on N absorption. In addition, the similar results of P accumulation observed in *phyB1* and *phyB2* in comparison to WT indicate that these photoreceptors are not part of the signaling for P absorption in conditions of N deficiency (Fig. 1). On the other hand, in *phyB* mutants, K accumulation was also similar to the control genotype, which suggests that the capacity of K absorption in N-deficient plants is also not under the control of this photoreceptor.

Plants *phyB1* in N-deficient conditions displayed an increased level of MDA and reduced concentration of photosynthetic pigments (Fig. 2A, C), whereas *phyB2* mutants had an increased concentration of MDA and decreased chlorophylls (Fig. 2B, D) regardless of N deficiency. These results suggest different mechanisms of action of *phyB1* and *phyB2* in the antioxidant system, as well as a production of photosynthetic pigments, where *phyB1* acts in association with N, while *phyB2* does not.

These nutritional and physiological changes triggered by N deficiency were not sufficient to cause damages in the functioning of the photosynthetic apparatus, as

shown by the Fv/Fm ratio in all genotypes (Fig. 2D). In N-deficient plants, the functions displayed by *phyB1* did not seem to compromise the absorption and metabolism of N and K as the use efficiency of both elements by mutant plants was equivalent to that of the control genotype (Fig. 3A, C). However, the deficiency of this photoreceptor caused a reduction in the use efficiency of P (Fig. 3B). Thus, *phyB1* plants deficient in N did not modify the dry weight of shoots or whole plants compared to WT (Fig. 3A, C). However, the results of root dry weight suggest that *phyB1* deficiency diminished the root system's development (Fig. 3B). In tomato plants cultivated under N deficiency, *phyB2* did not compromise the N metabolism as the N use efficiency was similar between *phyB2* and control (Fig. 3A). In contrast, the deficiency of this photoreceptor reduces the use efficiency of K and the dry weight of the roots (Fig. 4).

4.3. Phosphorus deficiency (-P)

One of the main functions of P in plants is energy transfer and storage in the form of ATP, which requires inorganic phosphate for its formation. This energy is used by plants to pump nutrients into cells by active absorption (Marschner 2012). In this sense, plants grown on lower P content had a decreased accumulation of P that caused an antagonistic effect on the absorption of N and K (Fig. 1). In P-deficient plants, *phyB1* accumulated more N than *phyB2*; however, the mutants showed a similar accumulation of N and P than WT (Fig. 1A, B). This suggests that the *phyB* family is not part of N and P absorption signaling under P deficiency. In this study, it was found that K absorption is under the control of *phyB1* as the deficiency of this photoreceptor resulted in a higher accumulation of K (Fig. 1C), which was significantly higher in *phyB1* than WT and *phyB2*.

The low availability of P increased MDA concentration (Fig. 2A), which in this study can be associated with the decrease in chlorophyll and carotenoids contents (Fig. 2B,C), thus resulting in lower efficiency of the energy transfer (Fv/Fm; Fig. 2D) compared to a complete nutrient solution (Patel et al. 2020b; Shi et al. 2020). However, under the same condition, lipid peroxidation in *phyB1* plants exceeded the values obtained in WT and *phyB2*. This result shows the beneficial control of *phyB1* in lipidic peroxidation and cell membrane integrity, which was significantly higher than *phyB2*. Previous studies demonstrated that increased levels of hydrogen peroxide (signaling

molecule) might be necessary for enabling plants to activate their defense system and restore the redox homeostasis, thus favoring plants' growth and enhancing their resistance to abiotic stress (Hung et al., 2005; Niu & Liao, 2016). Therefore, we assumed that this may also occur for MDA based on our *phyB1* results (increase in MDA and shoot dry weight), an observation that needs to be clarified in the future. The higher increase in lipidic peroxidation observed in *phyB1* mutant plants was not enough to induce modifications in the concentration of photosynthetic pigments in comparison to WT (Fig. 2B, C), which increased the efficiency of photosystem II (Fig. 2D). However, *phyB2* decreased the accumulation of pigments and the Fv/Fm ratio, suggesting that, under natural conditions, phyB2 positively participates in the synthesis of chlorophyll and carotenoids and consequently modulates the energy transfer to the photosystem II under P deficiency.

In this study, we verified that all genotypes had a lower use efficiency of N when plants were cultivated under P deficiency (Fig 3A). However, there was an increase in P use efficiency (Fig. 3B) that can be an adaptive strategy of the genotypes to maintain their metabolic functions in response to P starvation (Patel et al. 2020b). Furthermore, *phyB2* and WT plants showed a reduced use efficiency of K compared to plants grown under complete nutrient solution. However, P deficiency did not affect K-use efficiency in *phyB1* plants (Fig. 3C). Based on these results, it is reasonable to say that phyB1 acts as a negative regulator of the nutritional responses and the efficiency of photosynthetic apparatus in P-deficient tomato plants. On the other hand, phyB2 contributed positively in controlling the damages of lipid peroxidation, pigment accumulation, efficiency of photosystem II, and the use of P and K in the metabolism.

As expected, there was a reduction in shoot and plant dry weights in *phyB1*, *phyB2* and WT grown under P-deficiency (Figs. 4A and C). In contrast, the root dry weight was lower in *phyB2* mutants and higher in *phyB1*, maybe due to an adaptive strategy developed by *phyB1* mutant to improve the absorption of this element in conditions of nutritional deficiency (Cavalcante et al. 2019). It was observed that the deficiency of phyB1 increased shoot biomass production (Fig. 4A), which could support the hypothesis of phyB1 negative control of shoot biomass production in response to P deficiency. This result is of paramount importance as it brings a new perspective on the use of tomato mutants in agriculture, considering that the deficiency of phyB1

mitigated the damages of P deficiency. Furthermore, the results showed that *phyB1* negatively controls root dry weight in a more intensive manner than *phyB2*. It is also suggested that *phyB2* is negatively involved in the regulation of plant biomass production under low P supply.

4.4. Potassium deficiency (-K)

Considering that K stimulates the uptake and transport of nitrate as well as the transcriptional levels of phosphates transporters genes (Ma et al. 2012; Rubio et al. 2014; Santos et al. 2017), a deficiency condition of K might result in reduced absorption rates of K, N and P by *phyB* mutants, as well as in WT. In this study, the deficiency of *phyB1* did not cause variations in N absorption, but the results revealed that *phyB1* positively regulates P absorption as the mutant had reduced P accumulation compared to WT (Fig. 1B). On the other hand, *phyB2* plants had a reduced N accumulation under K-deficiency and none of the *phyB* mutants caused variations in K accumulation (Fig. 1C). These results reveal that *phyB1* induces the accumulation of P under natural conditions, while *phyB2* is involved in N and P accumulation in the K-dependent pathway. Thus, this can be associated with the phytochromes participation in the synthesis and regulation of nitrate reductase activity, which in this study seemed to be controlled by *phyB2*. In addition, K participates in the synthesis of ATP that is used by plants in active absorption of P (Hafsi et al. 2014).

Previous studies reported that an adequate supply of K enables plants to maintain membrane integrity, produce secondary metabolites and defense-related compounds that favor the antioxidant mechanism (Wang et al. 2013). K deficiency increased lipid peroxidation of membranes, as evidenced by the higher production of MDA in all genotypes (Fig. 2A), especially in *phyB1* and *phyB2*, suggesting the involvement of these photoreceptors in the maintenance of membrane integrity. Furthermore, all genotypes decreased chlorophyll and carotenoids content, as well as the efficiency of photosystem II (Figs. 2B-D) under K deficiency; however, this decrease was more severe in *phyB1* and *phyB2* mutants. In a study conducted with cotton plants, K deficiency reduced the concentration of chlorophylls and altered the ultrastructure of chloroplasts, which showed fewer grana (Zhao et al. 2001). Furthermore, it was reported that *phyB* plays a major role in the synthesis of

chlorophylls, development of chloroplasts and formation of grana (Zhao et al. 2013), thus justifying the results obtained in this study. In a previous study with *phyA*, *phyB1*, and *phyB2* tomato mutants, Kreslavski et al. (2020) reported that the deficiency of these phytochromes reduced the photosystem II activity, and the reduction was proportional to the number of missing phytochromes, which might also be attributed to a lower concentration of photosynthetic pigments.

The plants of all genotypes grown under K deficiency displayed lower N- and P-use efficiency (Fig. 3A, B). However, *phyB1*, *phyB2* and WT had a higher K-use efficiency (Fig. 3C), probably as a defense strategy developed by plants given the low amount of K in plant tissues. Consequently, plants reduced their production of shoot, root and whole plant dry weights because of the lower absorption and capacity to metabolize and convert nutrients in dry matter. In addition, under a K-deficient condition, N- and P-use efficiency of *phyB* mutants remained similar to WT, as well as shoot and plant dry weights (Fig. 4A, C), even though the deficiency of *phyB1* and *phyB2* led to a reduction of the K-use efficiency (Fig. 3C).

We suggest that red light-mediated *phyB1* positively regulates P absorption and accumulation as well as the photosynthetic pigments in K-deficient tomatoes. On the other hand, the responses of *phyB2* mutant suggest that this photoreceptor is involved in inducing N absorption. However, the molecular, biochemical, and physiological mechanisms in which phytochromes control the nutrition, physiology, and growth of tomato plants grown under nutritional deficiency remain unclear.

So far, the pieces of evidence from our study indicate that *phyB1* and *phyB2* mediated by red light signaling positively modulate the growth of tomato plants, ensuring proper nutrition by promoting the absorption and metabolism of N, P and K, the concentration of photosynthetic pigments, and dry matter production. However, when cultivated under nutrient deficiency, the nature of the responses induced by these photoreceptors varies in function of the deficient nutrient. We also believe that our findings are novel and can contribute to breeding programs identifying new cultivars that are less sensitive to NPK deficiency.

Acknowledgements

The support of the São Paulo State University (UNESP) is gratefully acknowledged. Authors would like to extend their sincere appreciation to Pedro Luís da Costa Aguiar Alves for providing the greenhouse of his laboratory, where the experiment was carried out. This research project was funded by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil, Code 001.

Author Contributions

M.B.S., R.M.P and R.F.C. designed the experiment. M.B.S. performed the experiment. L.F.L.T and J.C.B.L helped in all performed analyses. M.B.S. wrote the manuscript. R.M.P. and R.F.C. revised the manuscript. All authors read and approved the manuscript. R.F.C is the corresponding author.

Data availability statement

Data sharing is not applicable to this article as all new obtained data is already contained within this article.

References

- Bataglia OC, Teixeira JPF, Furlani PR, Furlani AMC, Gallo JR (1983) Métodos de análise química de plantas. B téc Inst Agron 78:48
- Carvalho RF, Moda LR, Silva GP, Gavassi MA, Prado RM (2016) Nutrition in tomato (*Solanum lycopersicum* L) as affected by light: Revealing a new role of phytochrome A. Aust J Crop Sci 10: 331–335
- Cavalcante VS, Prado R de M, Vasconcelos R de L, Almeida HJ de, Silva TR da (2019) Growth and nutritional efficiency of watermelon plants grown under macronutrient deficiencies. HortScience 54: 742–738

- Chen C-T, Lee C-L, Yeh D-M (2018) Effects of Nitrogen, Phosphorus, Potassium, Calcium, or Magnesium Deficiency on Growth and Photosynthesis of *Eustoma*. *HortScience* 53: 795–798
- Franklin KA, Quail PH (2010) Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *J Exp Bot* 61: 11–24
- El Gendy AG, El Gohary AE, Omer EA, Hendawy SF, Hussein MS, Petrova V, Stancheva I (2015) Effect of nitrogen and potassium fertilizer on herbage and oil yield of chervil plant (*Anthriscus cerefolium* L.). *Ind Crops Prod* 69: 167–174
- Gratão PL, Monteiro CC, Carvalho RF, Tezotto T, Piotto FA, Peres LEP, Azevedo RA (2012) Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. *Plant Physiol Biochem* 56: 79–96
- Hafsi C, Debez A, Abdelly C (2014) Potassium deficiency in plants: Effects and signaling cascades. *Acta Physiol Plant* 36: 1055–1070
- Hauser BA, Cordonnier-Pratt MM, Daniel-Vedele F, Pratt LH (1995) The phytochrome gene family in tomato includes a novel subfamily. *Plant Mol Biol* 29: 1143–1155
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* 125: 189–198
- Hoagland, DR, Arnon D (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Circ Calif Agric* 347: 32
- Hung SH, Yu CW, Lin CH (2005) Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot Bull Acad Sin* 46: 1–10
- Joshi PN, Biswal B, Biswal UC (1991) Effect of u.v.-A on aging of wheat leaves and role of phytochrome. *Environ Exp Bot* 31: 267–276
- Junior CAS, D'Amico-Damião V, Carvalho RF (2021) Phytochrome type B family: The abiotic stress responses signaller in plants. *Ann Appl Biol* 178: 135–148

Kerckhoffs LHJ, Kelmenson PM, Schreuder MEL, Kendrick CI, Kendrick RE, Hanhart CJ, Koornneef M, Pratt LH, Cordonnier-Pratt MM (1999) Characterization of the gene encoding the apoprotein of phytochrome B2 in tomato, and identification of molecular lesions in two mutant alleles. *Mol Gen Genet* 261: 901–907

Kreslavski VD, Strokina V V., Pashkovskiy PP, Balakhnina TI, Voloshin RA, Alwasel S, Kosobryukhov AA, Allakhverdiev SI (2020) Deficiencies in phytochromes A and B and cryptochrome 1 affect the resistance of the photosynthetic apparatus to high-intensity light in *Solanum lycopersicum*. *J Photochem Photobiol B Biol* 210: 111976

Kumar Tewari R, Kumar P, Sharma PN (2007) Oxidative Stress and Antioxidant Responses in Young Leaves of Mulberry Plants Grown Under Nitrogen, Phosphorus or Potassium Deficiency. *J Integr Plant Biol* 49: 313–322

Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods Enzymol* 148: 350–382

Ma TL, Wu WH, Wang Y (2012) Transcriptome analysis of rice root responses to potassium deficiency. *BMC Plant Biol* 12: 1–13

Maia JTLS, Martinez HEP, Clemente JM, Ventrella MC, Do Carmo Milagres C (2019) Growth, nutrient concentration, nutrient accumulation and visual symptoms of nutrient deficiencies in cherry tomato plants. *Semin Agrar* 40: 585–598

Marschner H (2012) *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 3rd editio Ed. Academic Press, London

Mawphlang OIL, Kharshiing E V. (2017) Photoreceptor mediated plant growth responses: Implications for photoreceptor engineering toward improved performance in crops. *Front Plant Sci* 8: 1–14

Mereb EL, Alves FRR, Rezende MH, Oliveira EJ De, Carvalho RF, Melo HC De (2020) Morphophysiological responses of tomato phytochrome mutants under sun and shade conditions. *Rev Bras Bot* 43: 45–54

Niu L, Liao W (2016) Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: Crosstalk with nitric oxide and calcium. *Front Plant Sci* 7: 1–14

Patel M, Rangani J, Kumari A, Parida AK (2020) Mineral nutrient homeostasis, photosynthetic performance, and modulations of antioxidative defense components in two contrasting genotypes of *Arachis hypogaea* L. (peanut) for mitigation of nitrogen and/or phosphorus starvation. *J Biotechnol* 323: 136–158

Prado R (2020) *Nutrição de Plantas*, 2a edição Ed. Editora Unesp, Jaboticabal

Pratt LH, Cordonnier-Pratt MM, Kelmenson PM, Lazarova GI, Kubota T, Alba RM (1997) The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant, Cell Environ* 20: 672–677

Rubio F, Fon M, Ródenas R, Nieves-Cordones M, Alemán F, Rivero RM, Martínez V (2014) A low K⁺ signal is required for functional high-affinity K⁺ uptake through HAK5 transporters. *Physiol Plant* 152: 558–570

Sakuraba Y, Kanno S, Mabuchi A, Monda K, Iba K, Yanagisawa S (2018) A phytochrome-B-mediated regulatory mechanism of phosphorus acquisition. *Nat Plants* 4: 1089–1101

Sakuraba Y, Yanagisawa S (2018) Light signalling-induced regulation of nutrient acquisition and utilisation in plants. *Semin Cell Dev Biol* 83: 123–132

Santos EF, Macedo FG, Zanchim BJ, Lima GPP, Lavres J (2017) Prognosis of physiological disorders in physic nut to N, P, and K deficiency during initial growth. *Plant Physiol Biochem* 115: 249–258

Shi Q, Pang J, Yong JWH, Bai C, Pereira CG, Song Q, Wu D, Dong Q, Cheng X, Wang F, Zheng J, Liu Y, Lambers H (2020) Phosphorus-fertilisation has differential effects on leaf growth and photosynthetic capacity of *Arachis hypogaea* L. *Plant Soil* 447: 99–116

Siddiqi MY, Glass ADM (1981) Utilization index: A modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. *J Plant Nutr* 4: 289–302

van Tuinen, Ageeth, Kerckhoffs, Huub J., Nagatani, Akira, Kendrick, Richard E., and Koornneef M (1995) A Temporarily Red Light-Insensitive Mutant of Tomato. 939–947

Wang M, Zheng Q, Shen Q, Guo S (2013) The critical role of potassium in plant stress response. *Int J Mol Sci* 14: 7370–7390

Zhang Z, Lynch JP, Zhang B, Wang Q (2017) NPK deficiency modulates oxidative stress in plants. Elsevier Inc.

Zhao D, Oosterhuis DM, Bednarz CW (2001) Influence of potassium deficiency on photosynthesis, chlorophyll content, and chloroplast ultrastructure of cotton plants. *Photosynthetica* 39: 103–109

Zhao J, Zhou J jun, Wang Y ying, Gu J wei, Xie X zhi (2013) Positive Regulation of Phytochrome B on Chlorophyll Biosynthesis and Chloroplast Development in Rice. *Rice Sci* 20: 243–248

CAPÍTULO 3 - O Fitocromo B1 de tomateiro modula as respostas a deficiência de N, P e K através da comunicação parte aérea-raiz

Resumo

Embora os fitocromos estejam envolvidos na expressão de genes de transportadores de nutrientes e participem da sinalização de respostas em plantas sob deficiência nutricional, nós verificamos se a interação entre o fitocromo B1 (phyB1) e N, P e K ocorre reciprocamente a partir da comunicação entre parte aérea e raiz. Para isso, utilizamos combinações de enxertia entre o genótipo controle (WT) e o mutante deficiente em phyB1 de tomateiro (phyB1) sob suficiência nutricional e deficiência individual de N, P e K. Em condição de suficiência nutricional, phyB1 da parte aérea estimula a absorção de N e P nas raízes além de aumentar a condutância estomática, transpiração e produção de massa seca, enquanto phyB1 radicular regula a produção de clorofilas na parte aérea. Sob deficiência de N, as plantas enxertadas com perda de função de phyB1 da parte aérea transpiraram mais e foram menos eficientes no uso da água. Entretanto a combinação entre WT/phyB1 atenuou os danos provocados pela deficiência de N, pois aumentou a massa seca da planta inteira. Sob deficiência de P, a perda de função de phyB1 radicular diminuiu a absorção de N e aumentou a produção de malondialdeído (MDA), enquanto a deficiência de ambos phyB1 prejudicou a eficiência de uso da água das plantas deficiente em P. Em tomateiros sob deficiência de K, a absorção de N e K está sob controle de ambos fitocromos, da parte aérea e da raiz; enquanto phyB1 da parte aérea regula produção de MDA e aumenta a fotossíntese. Nós concluímos que phyB1 faz parte da comunicação entre parte aérea-raiz no controle das respostas nutricionais, fisiológicas e de crescimento do tomateiro.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum* L., luz vermelha, phyB1, mutante, deficiência nutricional

1. Introdução

Um dos principais fatores que limita a produção agrícola no mundo é a deficiência nutricional (Patel et al., 2020a). De modo geral, o nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) são os elementos que mais limitam o crescimento das plantas devido esses elementos são considerados os mais responsivos pelas plantas (Marschner, 2012). Compreender as respostas das culturas à deficiência de N, P e K torna-se fundamental para a melhoria da eficiência do uso desses elementos e a redução da adubação.

A deficiência de N diminui a sua absorção e concentração em todas as partes das plantas de citrus e amendoim, causando desbalanço nutricional, inibição no crescimento, diminuição da concentração de pigmentos fotossintéticos e assimilação de CO₂ (De Souza Osório et al., 2020; Patel et al., 2020b; Huang et al., 2021). Além disso, o P é requerido em diversos processos metabólicos na planta, a exemplo da formação da molécula de ATP, utilizada como fonte de energia celular (Prado, 2021). Foi relatado que em plantas deficientes em P houve diminuição da fotossíntese e da condutância estomática além da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos cloroplastos (Hernández e Munné-Bosch, 2015). Já a deficiência de K é conhecida por causar danos na fotossíntese, transpiração e condutância estomática (Pandey e Mahiwal, 2015).

Não é surpresa que a luz modula a nutrição em plantas (Carvalho et al., 2016; Sakuraba e Yanagisawa, 2018; Soares et al., 2021; D'Amico-Damião et al., 2022), e, recentemente, tem se tornado cada vez mais evidente a função dos fotorreceptores nessa resposta. A família dos fitocromos B (phyB), está envolvida nas respostas ao estresse por deficiência nutricional (Carvalho et al., 2016; Sakuraba et al., 2018; Soares et al., 2021), e em estudo prévio, a perda de função de phyB-9 e phyB-10 resultou na redução da absorção de P em plantas de *Arabidopsis Thaliana*. Os mesmos autores também verificaram diminuição na expressão de genes dos transportadores de alta afinidade de P, indicando que a luz vermelha faz parte da ativação da absorção de P, especialmente sob deficiência desse nutriente (Sakuraba et al., 2018).

Mostramos recentemente que phyB1 de tomateiro é um regulador positivo da absorção de N, síntese de pigmentos e produção de massa seca sob deficiência de N (Soares et al., 2021). Além disso, a perda de função desse fotorreceptor atenuou os danos provocados pela deficiência de P, uma vez que as plantas do mutante aumentaram a produção de massa seca comparado ao genótipo controle (Soares et al., 2021). Sob deficiência de K, phyB1 mostrou ser regulador positivo da absorção de P bem como da produção de pigmentos (Soares et al., 2021). Isso sugere um forte controle de phyB1 sobre as respostas nutricionais induzidas por N, P e K. Dessa forma, para realização do presente trabalho, hipotetizamos que a interação entre phyB1 e N, P e K ocorre, reciprocamente, a partir da comunicação entre a parte aérea

e raiz. Pela primeira vez, nós exploramos o papel do gene *PHYB1* de tomateiro nas respostas a deficiência de N, P e K utilizando o mutante fotomorfogênético *phyB1* e enxertia para entender a participação desse fotorreceptor na comunicação parte aérea-raiz.

2. Material e Métodos

2.1. Condições de crescimento, material vegetal e enxertia

O experimento foi conduzido em sala de crescimento e casa de vegetação da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brasil, por 65 dias após a semeadura (DAS). Foram utilizadas plantas de *Solanum lycopersicum* L. cv. Moneymaker como tipo selvagem (MM) e do mutante fotomorfogênético *phyB1*, que é defeitivo no gene *PHYB1* que codifica a apoproteína PHYB1 (Van Tuinen et al., 1995).

Sementes de *phyB1* e MM foram colocadas em bandejas de poliestireno para germinar, as quais foram preenchidas previamente com uma mistura do substrato comercial BioPlant® (composto de turfa de esfagno, vermiculita, fibra de coco, casca de arroz, casca de pinus e aditivos contendo cálcio) e vermiculita expandida na proporção volumétrica 1:1 (v:v). Dezesete DAS, no mesmo substrato, as plantas foram transferidas para vasos de 200 mL (uma planta por vaso) e realizada a enxertia.

Plantas com dezessete dias foram enxertadas pelo método de garfagem em fenda simples, com auxílio de lâmina de bisturi e cliques de enxertia para obter as seguintes combinações de enxertia: MM/MM, *phyB1/phyB1*, MM/*phyB1*, *phyB1*/MM (enxerto/porta-enxerto). Após a enxertia, a base dos vasos foi submersa em água (em câmara úmida flutuante a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e alta umidade relativa: $85\% \pm 10\%$) sob fotoperíodo de 12 h a $70 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, até a cicatrização completa do ponto de enxerto (20 dias após a enxertia, DAE) (Figura 1A).

Após a cicatrização da enxertia, as raízes das plantas enxertadas foram lavadas com água deionizada para retirar o excesso do substrato, e as plantas foram transferidas para vasos de $1,7 \text{ dm}^3$ contendo areia de textura média, que foi previamente descontaminada com solução de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e lavada

com água deionizada. Os vasos foram transferidos para casa de vegetação e irrigados diariamente com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) para nutrir as plantas e manter a umidade próxima à capacidade máxima de retenção de água. A solução nutritiva foi inicialmente diluída em 25% de força iônica e após dez dias, a concentração foi aumentada para 50%, permanecendo nesta concentração até o final do experimento. A solução nutritiva foi preparada com água deionizada, e o valor de pH da solução foi mantido em $5,5 \pm 0,5$ utilizando soluções de hidróxido de sódio e ácido clorídrico, ambos a 1%. Os dados de temperatura e umidade do ar foram monitorados diariamente dentro da casa de vegetação. Houve variação na umidade relativa máxima ($85,1 \pm 9\%$) e mínima ($33 \pm 12\%$), e na temperatura máxima ($28,7 \pm 10\text{ °C}$) e mínima ($14,7 \pm 7\text{ °C}$).

2.2. Tratamentos e delineamento experimental

Três experimentos foram realizados em esquema fatorial 4×2 , sendo o primeiro fator composto pelas combinações de enxertia entre as plantas de tomateiro (MM/MM, *phyB1/phyB1*, MM/*phyB1*, *phyB1/MM*), e o segundo fator definido como a solução nutritiva, que era completa (contendo 15 mmol L^{-1} de N, 1 mmol L^{-1} de P e 6 mmol L^{-1} de K), deficiente em N (1 mmol L^{-1} de N utilizando como fonte NH_4NO_3), omissão de P (0 mmol L^{-1}), ou com omissão de K (0 mmol L^{-1}) na solução nutritiva (Tabela 1). Foi adotado o delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições e a unidade experimental formada por uma planta.

Tabela 2. Composição da solução nutritiva utilizada para induzir as deficiências de N, P e K em *Solanum lycopersicum* L. Os valores são correspondentes a uma solução a 100% que foi diluída para 25% e 50% de força iônica.

Fontes mol L ⁻¹	Tratamentos			
	Completa	-N	-P	-K
		mL L ⁻¹		
KH ₂ PO ₄	1	1	-	-
KNO ₃	5	-	-	-
Ca (NO ₃) ₂ . 5H ₂ O	5	-	5	5
MgSO ₄	2	2	2	2
KCL	-	5	6	-
CaCl ₂ . 2H ₂ O	-	5	-	-
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	-	1
NH ₄ NO ₃	-	0.5	2.5	2
Micronutrientes*	1	1	1	1
Fe-EDDHA**	1	1	1	1

*Em 1L: 2,86 g H₃BO₃; 1,81 g MnCl₂. 4H₂O; 0,10 g ZnCl₂; 0,04 g CuCl₂; 0,02 g H₂MoO₄H₂O.
 ** Em 1L: 83,33 g Fe-EDDHA

2.3. Análises realizadas

2.3.1. Trocas gasosas

A atividade fotossintética, condutância estomática e a transpiração foram medidas considerando a terceira folha completamente expandida a partir do ápice, utilizando o analisador de gás infravermelho (Li-6400, Licor, EUA) com radiação fotossinteticamente ativa de 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura foliar a 25 °C. A eficiência do uso da água foi calculada dividindo-se atividade fotossintética pela transpiração.

2.3.2. Eficiência quântica do FSII (Fv/Fm) e concentração de pigmentos

A eficiência quântica do PSII foi medida entre 7:00 e 8:00 h. A terceira folha totalmente expandida foi adaptada ao escuro por 30 min usando cliques, e então a fluorescência mínima (F0) e máxima (Fm), bem como Fv/Fm foram obtidas utilizando fluorômetro portátil (Opti-Sciences, Os30P). As concentrações de clorofila total (Chl total) e carotenoides foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Lichtenthaler (1987). Amostras frescas (0,025 - 0,030 g) das folhas foram coletadas das plantas de tomate de cada tratamento, e as leituras foram realizadas em

espectrofotômetro Beckman DU 640 a 663, 647 e 470 nm para obter as respectivas concentrações de clorofila *a*, *b* e carotenoides, com base na massa fresca. A concentração de Chl total foi resultado da soma entre as concentrações de clorofila *a* e *b*.

2.3.3. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada em amostras da parte aérea (caule e folhas), que foram coletadas, lavadas, imersas em N₂ líquido e armazenadas a -80°C, seguindo a metodologia do ácido tiobarbitúrico descrita por Heath and Packer (1968). Os metabólitos reativos das membranas celulares, principalmente o malondialdeído (MDA), reagem com o ácido tiobarbitúrico e podem ser quantificados por espectrofotometria. Resumidamente, o tecido da parte aérea (0,3 g) foi homogeneizado com 1 mL de ácido tricloroacético e polivinilpirrolidona (20%). Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos e centrifugadas a 10.000 g por 15 min. O sobrenadante foi misturado com 1 mL de ácido tricloroacético 20% (m/v) e ácido tiobarbitúrico 0,5% (m/v), e depois incubado em banho maria a 95°C por 30 min. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 11.000 g por 5 min. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 535 e 600 nm, a concentração de MDA foi determinada pelo coeficiente $1,55 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (GRATÃO et al., 2012), e os resultados foram expressos em nmol g⁻¹ de massa fresca.

2.3.4. Parâmetros de crescimento

As plantas foram coletadas aos 65 DAS e separadas em parte aérea e raiz. O material vegetal foi lavado em água corrente com solução detergente (0,1% v/v), seguida de solução de HCl (0,3% v/v) e água deionizada. Posteriormente, o material foi seco em estufa com circulação forçada de ar (65 ± 5°C) até peso constante para determinação da massa seca da parte aérea, raiz e planta inteira.

2.3.5. Teor, acúmulo e eficiência de uso de N, P e K

Os teores de N, P e K na parte aérea foram determinadas conforme metodologia descrita por Bataglia et al. (1983). O acúmulo de nutrientes foi calculado com base nos teores de N, P e K e na massa seca da parte aérea. A eficiência de uso de nutrientes foi calculada de acordo com a equação $(\text{massa seca da parte aérea})^2 / (\text{acúmulo do respectivo nutriente})$ (Siddiqi e Glass, 1981). Não foi possível determinar o teor de K nas plantas deficientes em N e P devido esses tratamentos terem limitado consideravelmente o crescimento das plantas. Dessa forma, nós sugerimos que em pesquisas futuras seja utilizado um número maior de plantas como unidade experimental.

2.4. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância bidirecional (ANOVA) pelo teste F ($p \leq 0.05$), após verificação da homogeneidade das variâncias (teste W de Shapiro-Wilks). Quando significativo, foi aplicado o teste de comparação múltipla t-student para comparar as médias dos genótipos sob cada solução nutritiva, a 5% de probabilidade. O mesmo teste foi utilizado para comparar a deficiência de cada nutriente com a solução nutritiva completa, dentro de cada genótipo, utilizando o software estatístico Agroestat.

3. Resultados

3.1. Solução completa

Nas plantas sob suficiência nutricional, MM/MM e MM/*phyB1* (enxerto/porta-enxerto) induziram maior acúmulo de N em relação a *phyB1/phyB1* e *phyB1/MM* (Figura 1a), enquanto o acúmulo de fósforo foi semelhante entre as plantas de MM/*phyB1*, MM/MM, *phyB1/phyB1* e menor em *phyB1/MM*. (Figura 1b). Além disso, os genótipos não diferiram quanto o acúmulo de K (Figura 1c).

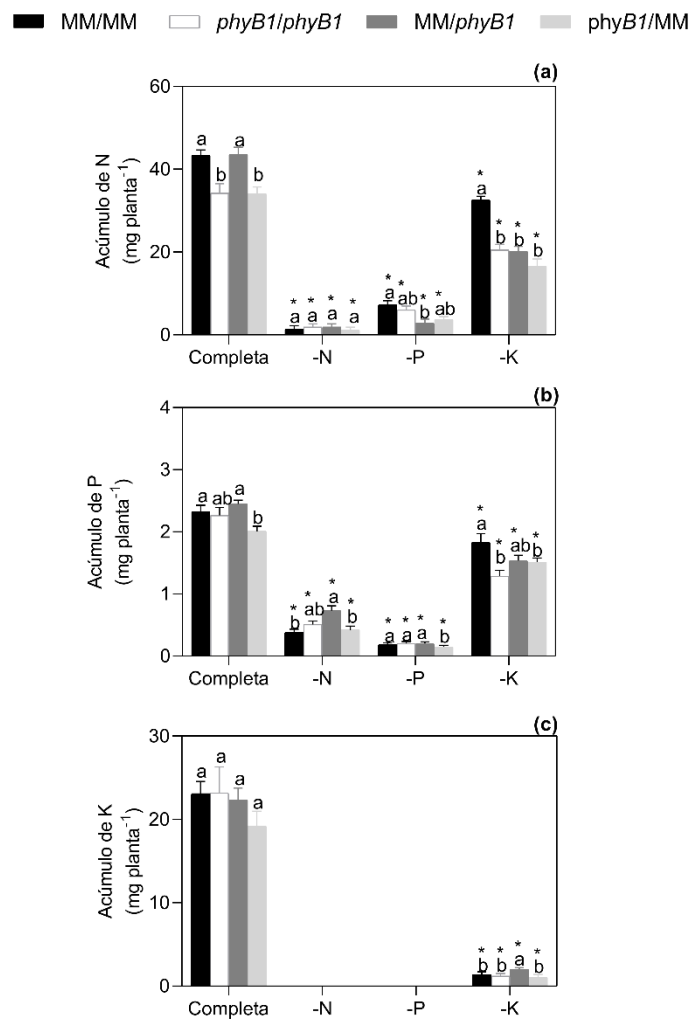


Figura 1. Acúmulo de nutrientes na parte aérea dos autos enxertos e das combinações de enxertia entre WT e *phyB1*, cultivados sob solução completa ou deficiente (-). (a) N, (b) P, e (c) K. Os valores são as médias $\pm$ DP de cada tratamento (n=4 repetições, contendo uma planta cada). As letras acima das barras representam as diferenças nas médias entre os genótipos dentro de cada solução, e os asteriscos no topo das barras indicam diferenças significativas entre o tratamento nutricional e a solução completa; ambos foram calculados pelo teste de t-student ($p < 0,05$). Não foi possível determinar o teor de potássio nas plantas deficientes em N e P devido esses tratamentos terem limitado o crescimento das plantas.

A respeito da peroxidação lipídica, expressa como a concentração de MDA, nós observamos maior concentração em *phyB1/phyB1* e menor em *phyB1/WT*, que não diferiram estatisticamente de MM/*phyB1* e MM/MM (Figura 2a). Além disso, os enxertos de *phyB1* e MM enxertados no porta-enxerto *phyB1* apresentaram menor concentração de Chl total e carotenoides em relação ao MM/MM, enquanto *phyB1/MM*

não diferiu do genótipo controle (MM/MM) quanto a concentração de clorofilas (Figura 2b), mas produziu menos carotenóides (Figura 2c). Apesar das diferentes respostas fisiológicas, os genótipos não diferiram quanto a eficiência quântica do FSII (Figura 2d).

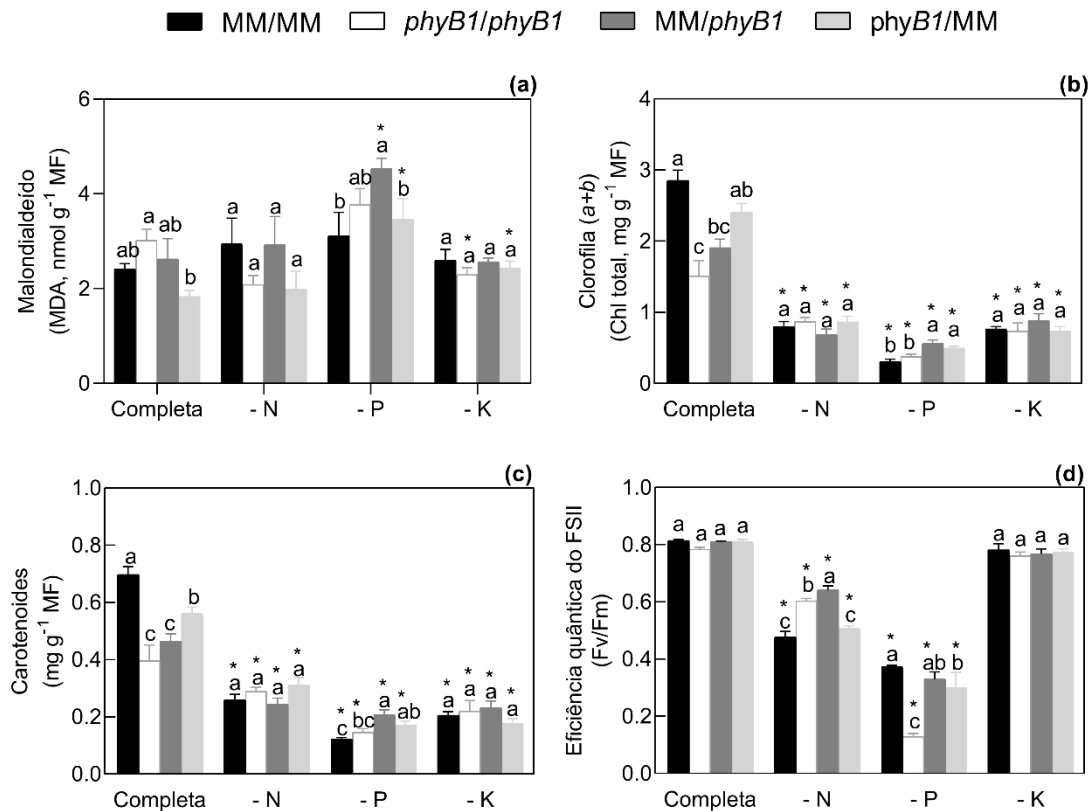


Figura 2. (a) Malondialdeído (MDA), (b) clorofila a+b, (c) carotenóides e (d) eficiência quântica do PSII (Fv/Fm) dos autos enxertos e das combinações de enxertia entre WT e *phyB1*, cultivados sob solução completa ou deficiente (-). Os valores são as médias $\pm$ DP de cada tratamento (n=4 repetições, contendo uma planta cada). As letras acima das barras representam as diferenças nas médias entre os genótipos dentro de cada solução, e os asteriscos no topo das barras indicam diferenças significativas entre o tratamento nutricional e a solução completa; ambos foram calculados pelo teste t-student ($p < 0,05$).

Não foi observado diferenças entre os genótipos quanto a taxa fotossintética e eficiência do uso da água (Figuras 3a e 3d). Por outro lado, enxertos de *phyB1* induziram a menor condutância estomática, em relação aos enxertos de MM (Figura 3b) e apenas *phyB1/MM* apresentou menor transpiração, comparado a MM/MM (Figura 3c).

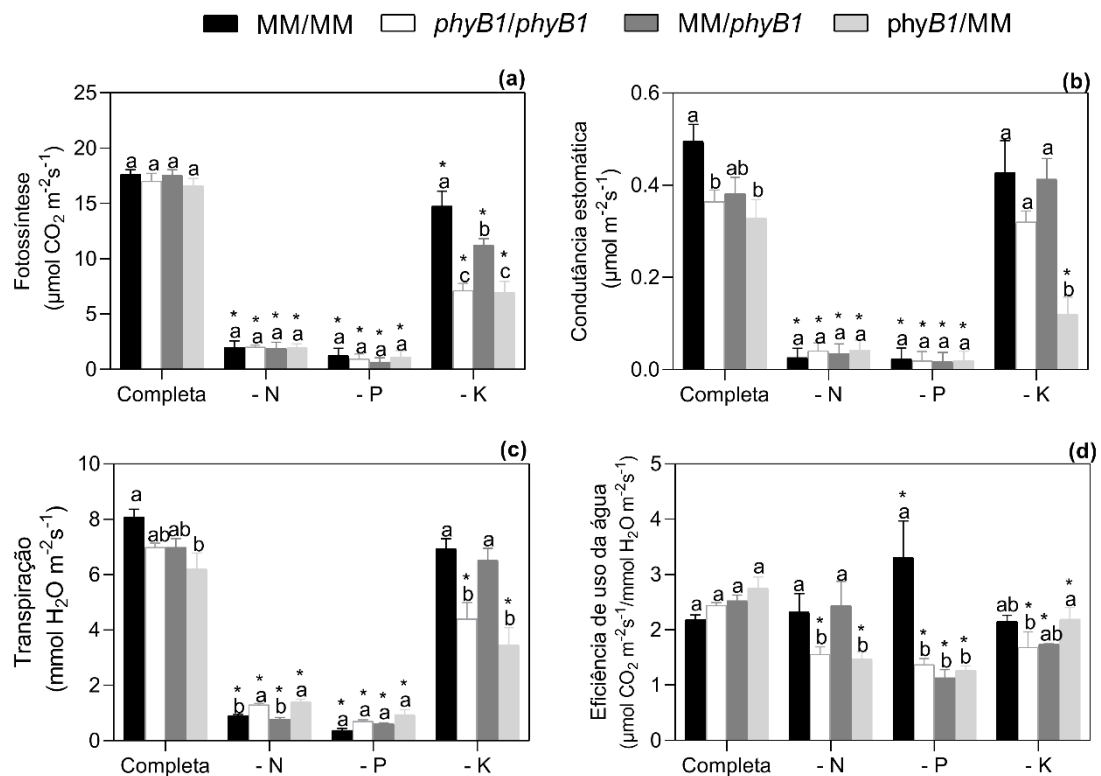


Figura 3. (a) Fotossíntese, (b) condutância estomática, (c) transpiração e (d) eficiência de uso da água dos autos enxertos e das combinações de enxertia entre WT e *phyB1*, cultivados sob solução completa ou deficiente (-). Os valores são as médias $\pm$ DP de cada tratamento (n=4 repetições, contendo uma planta cada). As letras acima das barras representam as diferenças nas médias entre os genótipos dentro de cada solução, e os asteriscos no topo das barras indicam diferenças significativas entre o tratamento nutricional e a solução completa; ambos foram calculados pelo teste t-student ($p < 0,05$).

A eficiência de uso de N foi maior em *phyB1/phyB1* em relação ao MM/MM e os demais genótipos (Figura 4a). Por outro lado, os genótipos apresentaram eficiência de uso de P e K semelhantes (Figuras 4b e 4c).

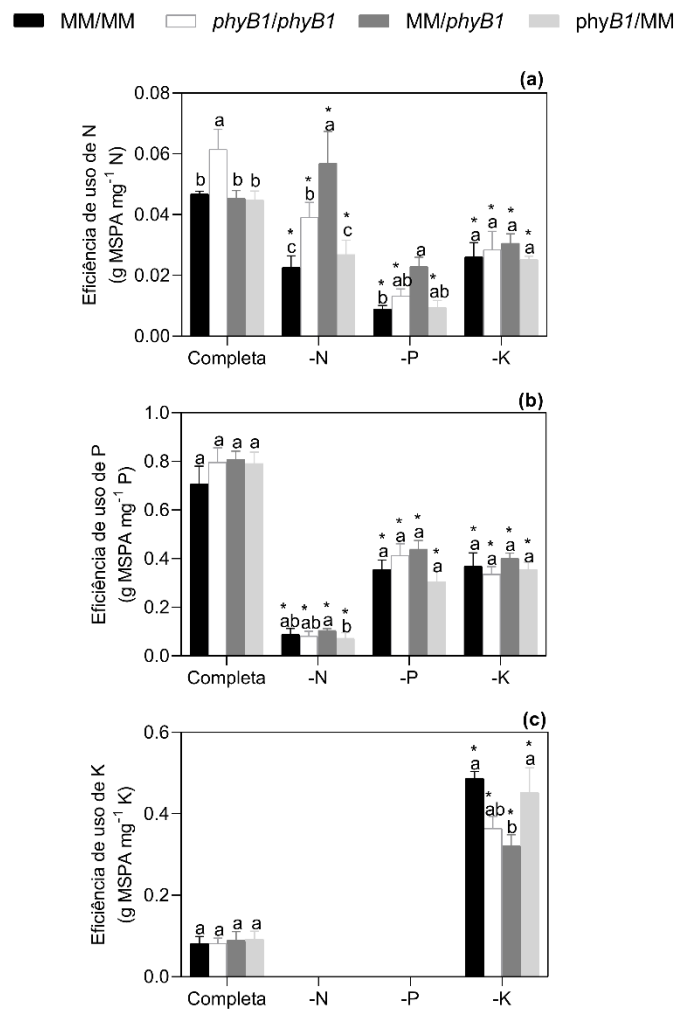


Figura 4. Eficiência de uso de nutrientes dos autos enxertos e das combinações de enxertia entre WT e *phyB1*, cultivados sob solução completa ou deficiente (-). (a) N, (b) P, e (c) K. Os valores são as médias $\pm$ DP de cada tratamento (n=4 repetições, contendo uma planta cada). As letras acima das barras representam as diferenças nas médias entre os genótipos dentro de cada solução, e os asteriscos no topo das barras indicam diferenças significativas entre o tratamento nutricional e a solução completa; ambos foram calculados pelo teste t-student ($p < 0,05$). Não foi possível determinar o teor de potássio nas plantas deficientes em N e P devido esses tratamentos terem limitado o crescimento das plantas.

Nós observamos que MM/MM não diferiu de MM/*phyB1* e *phyB1/phyB1* quanto a massa seca da parte aérea, entretanto a menor produção de massa seca foi verificada em *phyB1/MM*, em relação ao genótipo controle (Figura 5a). Além disso, padrão similar foi observado para massa seca da raiz e massa seca da planta entre os genótipos no qual MM/MM foi superior às demais combinações de enxertia (Figuras 5b e 5c).

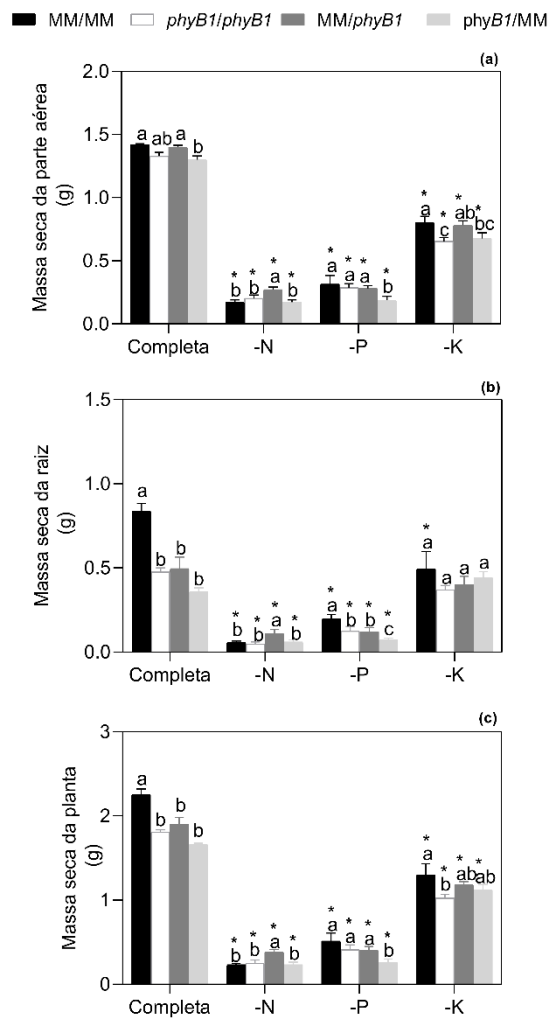


Figura 5. Massa seca da (a) parte aérea, (b) raiz e (c) planta inteira dos autos enxertos e das combinações de enxertia entre WT e *phyB1*, cultivados sob solução completa ou deficiente (-). (a) N, (b) P, e (c) K. Os valores são as médias $\pm$ DP de cada tratamento (n=4 repetições, contendo uma planta cada). As letras acima das barras representam as diferenças nas médias entre os genótipos dentro de cada solução, e os asteriscos no topo das barras indicam diferenças significativas entre o tratamento nutricional e a solução completa; ambos foram calculados pelo teste t-student ($p < 0,05$).

3.2. Deficiência de nitrogênio (-N)

A comparação de médias mostrou que não houve efeito significativo dos fatores genótipo e solução nutritiva na concentração de MDA e da interação entre eles no acúmulo e eficiência de uso de fósforo, fotossíntese e massa seca da parte aérea (Tabelas 1A-4A).

A deficiência de N diminuiu o acúmulo de N bem como de P e K na parte aérea, comparado ao tratamento completo (Figura 1). O menor acúmulo de nutrientes causado pela deficiência de N provocou o decréscimo na Chl total e carotenoides e na eficiência quântica do PSII (Figuras 2b-d). Entretanto, as combinações de enxertia apresentaram acúmulo de N, concentração de Chl total e carotenoides semelhantes. Independente do tratamento nutricional, as plantas de MM/*phyB1* acumularam mais P em relação a MM/MM e os demais genótipos (Figura 1b). Além disso, *phyB1/phyB1* e MM/*phyB1* apresentaram maior eficiência quântica do PSII em relação a MM/MM e *phyB1/MM* (Figura 2d).

Independente do genótipo, as plantas cultivadas na deficiência de N diminuíram a fotossíntese, condutância estomática e transpiração, em relação ao tratamento completo (Figuras 3a-c). Entretanto, apenas *phyB1/phyB1* e *phyB1/MM* apresentaram redução na eficiência de uso da água, comparado as plantas do tratamento completo (Figura 3d). Sob deficiência de N, *phyB1/MM* e *phyB1/phyB1* transpiraram mais em relação a MM/MM e MM/*phyB1* (Figura 3c). Contudo, maior eficiência de uso da água foi verificado em plantas obtidas com enxerto de MM em relação aos de *phyB1* (MM/*phyB1* e MM/MM) (Figura 3d).

A baixa disponibilidade de N também comprometeu o crescimento das plantas pois diminuiu as eficiências de uso de N e P (Figuras 4a e 4b), e, conseqüentemente, a produção de massa seca da parte aérea, da raiz e na planta inteira (Figura 5), comparado ao tratamento completo. As plantas de MM/*phyB1* e *phyB1/phyB1* deficientes em N apresentaram maior eficiência de uso de N em relação ao MM/MM e *phyB1/MM*, enquanto o genótipo não teve efeito significativo na eficiência de uso de P (Figura 4a). Dessa forma, as plantas de MM/*phyB1* deficientes em N produziram mais massa seca na raiz e na planta inteira, comparado a MM/MM. Por outro lado, independente do tratamento nutricional, MM/*phyB1* e *phyB1/phyB1* não diferiram de WT/WT quanto a massa seca da parte aérea, mas MM/*phyB1* produziu mais massa seca nessa parte da planta, comparado a *phyB1/phyB1* e *phyB1/MM* (Figura 5).

3.3. Deficiência de fósforo (-P)

A comparação de médias mostrou que não houve efeito significativo da interação genótipo e solução nutritiva no acúmulo de P, concentração de MDA, fotossíntese, condutância estomática, eficiência de uso de P e massa seca (Tabelas 1A-4A).

A deficiência de P diminuiu o acúmulo de N e P na parte aérea das plantas, entretanto, as plantas de MM/*phyB1* deficientes em P, acumularam menos N que MM/MM e os demais genótipos e juntamente com *phyB1/phyB1* não diferiram do genótipo controle quanto o acúmulo de P, enquanto menor acúmulo desse nutriente foi observado em *phyB1/MM*, independente do tratamento nutricional (Figuras 1a e 1b).

Independente do tratamento nutricional, MM/*phyB1* e *phyB1/phyB1* aumentaram a concentração de MDA enquanto MM/MM e *phyB1/MM* apresentaram menor concentração do radical (Figura 2a). As plantas deficientes em P diminuíram a concentração de Chl total e carotenoides (Figuras 2b e 2c), contudo, MM/*phyB1* e *phyB1/MM* apresentaram maior concentração de pigmentos em relação a MM/MM. A deficiência de P também diminuiu a eficiência quântica do FSII (Figura 2d), fotossíntese, condutância estomática e transpiração das plantas, em relação ao tratamento completo (Figuras 3a-c). Porém, as combinações *phyB1/phyB1* e *phyB1/MM* apresentaram menor eficiência quântica do FSII e condutância estomática em relação ao MM/MM, enquanto a fotossíntese e transpiração foram semelhantes entre os genótipos. As plantas de MM/MM deficientes em fósforo aumentaram a eficiência de uso da água e foi superior aos demais genótipos, que apresentaram menor eficiência em relação as plantas do tratamento completo (Figura 3d).

A deficiência de P diminuiu a eficiência de uso de N e P o que resultou em menor produção de massa seca na parte aérea, na raiz e na planta inteira (Figura 4). Entretanto, MM/*phyB1* foi mais eficiente no uso de N em relação a MM/MM enquanto a eficiência de uso de P foi semelhante entre os genótipos. Independente da condição nutricional, *phyB1/MM* produziu menos massa seca na parte aérea e na planta inteira em relação a MM/MM e os demais genótipos (Figuras 5a e 5c). A massa seca de raiz foi maior em MM/MM e menor em *phyB1/MM* (Figura 5b).

3.4. Deficiência de potássio (-K)

A comparação de médias mostrou que não houve efeito significativo da interação genótipo e solução nutritiva no acúmulo de P e K, condutância estomática, transpiração, eficiência de uso de N e P e massa seca (Tabelas 1A-4A).

A deficiência de K diminuiu o acúmulo de K das plantas de tomateiro, em relação ao tratamento completo (Figura 1). Entretanto, as plantas de MM/MM deficientes em K acumularam mais N em relação as demais combinações de enxertia e juntamente com MM/*phyB1* acumularam mais P comparado aos enxertos de *phyB1* (*phyB1/phyB1* e *phyB1/MM*), independente da condição nutricional (Figuras 1a e 1b).

As plantas de *phyB1/phyB1* e *phyB1/MM* deficientes em K diminuíram e aumentaram respectivamente, a concentração de MDA na parte aérea, em relação ao tratamento completo, entretanto, não foi observado diferenças entre os genótipos (Figura 2a). Além disso, a deficiência de K também diminuiu a concentração de Chl total, carotenoides e a eficiência quântica do FSII, contudo, os genótipos não diferiram entre si (Figuras 2b-d). A fotossíntese diminuiu nos genótipos submetidos a deficiência de K, onde essa redução foi mais acentuada em *phyB1/phyB1*, *phyB1/MM* e *MM/phyB1*, comparado a *MM/MM* (Figura 2a). Por outro lado, a deficiência de K apenas diminuiu a condutância estomática das plantas de *phyB1/MM* (Figura 3b), que juntamente com *phyB1/phyB1* apresentaram os menores valores, em relação a *MM/MM*, independente da condição nutricional. Independente do genótipo, a deficiência de K diminuiu a transpiração (Figura 3c) e eficiência de uso da água das plantas (Figura 3d), entretanto foi observado que *phyB1/MM* e *phyB1/phyB1* transpiraram menos quando comparado a *MM/MM* e *MM/phyB1*.

Não foi observado efeito do genótipo na eficiência de uso de K. Por outro lado, a deficiência de K aumentou a eficiência de uso desse elemento, em relação as plantas do tratamento completo (Figura 4c). A menor eficiência no uso de K resultou na diminuição na produção de massa seca da parte aérea, da raiz e da planta inteira (Figura 5). Independente da condição nutricional, *phyB1/phyB1* e *phyB1/MM* produziram menos massa seca na parte aérea (Figura 5a) e juntamente com

MM/*phyB1* produziram menos massa seca na raiz (Figura 5b) e na planta inteira (Figura 5c), comparado a MM/MM.

4. Discussão

Existem crescentes evidências que mostram que o fitocromo B pode modular respostas a diferentes tipos de estresses (González et al., 2012). Recentemente, (Soares et al., 2021) mostraram que a perda de função de *phyB1* de tomateiro atenuou os danos provocados pela deficiência de P, e dessa forma, trouxe novas perspectivas para melhor entendimento da participação dos fotorreceptores nas respostas à nutrição. Sabe-se que *PHYB* é expresso na parte aérea e na raiz. Nesse sentido, nós estudamos a comunicação entre aérea e raiz na sinalização de respostas nutricionais, fisiológicas e de crescimento em tomateiros sob deficiência nutricional. Para isso, nós utilizamos o mutante de tomateiro deficiente em *phyB1* e seu genótipo controle (MM) em combinações de enxertia sob condições de suficiência e deficiência de NPK.

As informações obtidas serão úteis para potencializar os benefícios do *phyB1* reconhecendo em qual deficiência nutricional seria esperado maiores ganhos em processos nutricionais e fisiológicos e no crescimento da planta já que no mundo é comum deficiências de NPK especialmente em países subdesenvolvidos e poderá fortalecer a sustentabilidade dos cultivos.

4.1. Solução completa

Sob condições de suficiência nutricional, as plantas obtidas de enxertos com deficiência em *phyB1* (*phyB1/phyB1* e *phyB1/MM*) absorveram menos N em relação ao MM/MM (Figura 1a). Sabe-se que o fitocromo está envolvido na transcrição dos genes dos transportadores de nitrato, além disso, recentemente foi relatado que a perda de função de *phyB1* de tomateiro diminuiu o acúmulo de N na parte aérea (Sakuraba e Yanagisawa, 2018; Soares et al., 2021). Esses resultados aliados com os obtidos nesse trabalho reforçam a participação de *phyB1* na absorção de N e que parece ser coordenada pelo fitocromo da parte aérea. Além disso, nós observamos que apenas as plantas de *phyB1/MM* diminuíram a absorção de P, indicando que o

phyB1 da parte aérea também regula positivamente a absorção desse elemento. Esse resultado também pode ser atribuído ao fato desse fotorreceptor estar envolvido na expressão dos genes que codificam para transportadores de alta afinidade de P (Sakuraba et al., 2018). Por outro lado, todos os genótipos absorveram quantidades similares de K comparado a MM/MM (Figura 1c), sugerindo que ambos fitocromos, da parte aérea e da raiz não fazem parte do processo de absorção desse elemento.

Todas as combinações de enxertia apresentaram peroxidação lipídica das membranas semelhantes ao genótipo controle (MM/MM), entretanto, a maior produção de MDA foi observada em *phyB1/phyB1* (Figura 2a), o que pode ser justificado pela função dos fitocromos em suprimir a peroxidação lipídica das membranas dos tilacóides (Joshi et al., 1991). Dessa forma, as plantas de *phyB1/phyB1* e MM/*phyB1* diminuíram a concentração de clorofilas e juntamente com *phyB1*/MM produziram menos carotenoides em relação a MM/MM. Em um estudo com arroz foi observado menor concentração de clorofilas no mutante em phyB, sugerindo que esse fotorreceptor participa da síntese de clorofilas (Zhao et al., 2013). No nosso estudo, a síntese de clorofilas parece ser controlada pelo phyB1 da raiz, devido as plantas obtidas de porta-enxerto com deficiência de phyB1 terem apresentado menor concentração desse pigmento, enquanto os carotenoides estão sob controle de ambos fitocromos, da parte aérea e raiz. Apesar da deficiência de phyB1 ter induzido alterações na absorção de nutrientes e produção de pigmentos fotossintéticos, os resultados sugerem que phyB1 da parte aérea e da raiz não controlam a eficiência quântica do FSII (Figura 2d), fotossíntese (Figura 3a) e eficiência de uso da água (Figura 3d) do tomateiro. Por outro lado, a condutância estomática de *phyB1*/MM e *phyB1/phyB1* e a transpiração de *phyB1*/MM foi menor em relação a MM/MM (Figuras 3b e 3c). De acordo com Mereb et al. (2020), a menor condutância estomática e transpiração do mutante em fitocromo está associada com a menor densidade e índice estomático desse genótipo, especialmente em *phyB1*. Aliado a isso, nossos resultados sugerem o envolvimento de phyB1 da parte aérea de tomateiro na regulação positiva desses processos, sob suficiência nutricional.

A perda de função de ambos fitocromos da parte aérea e da raiz amplificou a eficiência de uso de N das plantas de tomateiro (Figura 4a), mas não modificou as eficiências de uso de P e K (Figura 4b). As plantas de MM/MM produziram maior

quantidade de massa seca na raiz e na planta inteira (Figuras 5b e 5c), em relação aos demais genótipos. Isso pode ter acontecido devido o genótipo controle ter acumulado maiores quantidades de N e P e que resultou em maior concentração de clorofilas e carotenoides, maior condutância estomática e transpiração. Por outro lado, a menor produção de massa seca de *phyB1/MM* (Figuras 5 e 2A) pode ter sido resultado da deficiência de *phyB1* da parte aérea, uma vez que os nossos resultados sugerem que esse fotorreceptor faz parte da sinalização para que a absorção de N e P ocorra na raiz, além de regular a assimilação de carbono.

4.2. Deficiência de nitrogênio (-N)

Depois do carbono, o N é o elemento mais demandado pelas plantas cultivadas, isso por que esse nutriente é componente estrutural de aminoácidos, proteínas, coenzimas e bases nitrogenadas (Marschner, 2012; Prado, 2021). Dessa forma, a deficiência de N diminuiu o acúmulo desse elemento (Figura 1a) e provocou desbalanço na absorção de P, em relação ao tratamento completo (Figura 1b). Entretanto, a diminuição na absorção de N ocorreu de forma semelhante entre os genótipos, sugerindo que ambos fitocromos não regulam esse processo sob deficiência de N. Enquanto *phyB1* da raiz regula negativamente a absorção de P, devido *MM/phyB1* ter acumulado mais desse elemento em relação a *MM/MM* (Figura 1b), independente da condição nutricional.

Sabe-se que a concentração de clorofilas está diretamente relacionada com os níveis de N na planta por ser constituinte dessa molécula (Um e Chen, 2021), o que justifica a diminuição dos pigmentos fotossintéticos nas plantas sob deficiência desse elemento (Figuras 2b e 2c). Entretanto, em tomateiros sob deficiência de N, os fitocromos não controlam a síntese de clorofilas e carotenoides. A deficiência de N ao inibir a biossíntese dos pigmentos de todas as combinações de enxertia, também reduziu a eficiência quântica do FSII, devido as clorofilas serem responsáveis pela absorção e transporte de energia aos FSII e FSI (Mu et al., 2017; Zhang et al., 2019). Além disso, as plantas de *MM/phyB1* e *phyB1/phyB1* apresentaram maior eficiência quântica do FSII em relação a *MM/MM*, que pode ser atribuído a utilização de *phyB1* como porta-enxerto e que amplificou essa resposta de forma independente de N.

Nós também observamos diminuição na fotossíntese de todas as combinações de enxertia submetidas a deficiência de N, fato que está associado com a diminuição na assimilação de carbono e da transpiração das plantas (Figuras 3a-c). Além disso, a deficiência de N diminuiu a eficiência do uso da água de todas as combinações de enxertia (Figura 3d). Apesar desses resultados, não foi observado participação dos fitocromos da parte aérea e da raiz no controle da condutância estomática sob deficiência de N (Figura 3b). Por outro lado, *phyB1/MM* e *phyB1/phyB1* transpiraram mais em relação ao *MM/MM* (Figura 3c) e que foi suficiente para diminuir a eficiência de uso da água desses genótipos (Figura 3d). Esses resultados sugerem que *phyB1* da parte aérea é um regulador positivo da transpiração em tomateiros deficientes em N, e sua deficiência resulta no maior consumo de água por carbono fixado, como observado nos resultados da eficiência de uso da água.

Estima-se que aproximadamente 5% da massa seca total da planta seja constituída por N (Marschner, 2012), além disso, esse elemento é considerado o que mais se relaciona com a produção de massa seca (Reis et al., 2009). Dessa forma, todos os genótipos cultivados sob deficiência de N diminuíram a eficiência de uso desse nutriente bem como a eficiência de uso de P (Figuras 4a e 4b), que associado com as demais modificações nutricionais e fisiológicas provocou decréscimo na produção de massa seca da parte aérea, da raiz e da planta inteira (Figuras 5 e 2A). Independente do N, *MM/phyB1* absorveu e acumulou mais P na parte aérea e que favoreceu a maior produção de massa seca nessa região desse genótipo. Além disso, a perda de função de *phyB1* da raiz favoreceu a produção de massa seca na raiz e na planta inteira de *MM/phyB1* sob deficiência de N. Essas respostas sugerem que *phyB1* radicular é um regulador negativo da produção de massa seca na raiz e na planta inteira de tomateiro, de modo dependente do N; e que também está associada a maior eficiência quântica do PSII, eficiência de uso da água e maior eficiência de uso de N desse genótipo.

Nossos resultados também sugerem que a utilização de *MM* como enxerto e do mutante defectivo em *phyB1* como porta-enxerto pode ser uma alternativa para atenuar os danos provocados pela deficiência de N em tomateiro.

4.3. Deficiência de fósforo (-P)

Em todos os genótipos, a omissão de P diminuiu a absorção desse elemento (Figura 1b) e provocou desbalanço na absorção de N (Figura 1a), fato que se deve ao P ser constituinte da molécula de ATP, utilizada no processo de absorção de nutrientes (Prado, 2021). Também foi observado que as plantas de *MM/phyB1* sob deficiência de P, reduziram a absorção de N em relação a *MM/MM*, que pode ser devido ao fato desse fotorreceptor estar envolvido na regulação da atividade de genes-chave que codificam os transportadores de nitrato (Sakuraba e Yanagisawa, 2018), que nesse caso, está sob controle de *phyB1* radicular e parece ser dependente do P. Além disso, independente da condição nutricional, as plantas de *phyB1/MM* acumularam menos P em relação ao *MM/MM*, que pode ser atribuído à deficiência de *phyB1* da parte aérea, que parece ter maior contribuição na sinalização de respostas a absorção desse nutriente do que o *phyB1* radicular, regulando positivamente esse processo.

A deficiência de P aumentou a peroxidação lipídica das membranas das plantas independente do genótipo (Figura 2a), entretanto, a maior produção de MDA ocorreu nas plantas deficientes em *phyB1* radicular (*MM/phyB1*). Recentemente foi demonstrado na literatura que *phyB1* está relacionado com a manutenção da integridade das membranas em tomateiro (Soares et al., 2021); aliado a isso, apesar do MDA ter sido quantificado na parte aérea, os resultados do nosso trabalho mostram que a sua produção está sob controle do fitocromo da raiz. Foi mostrado em estudos prévios que a concentração de clorofilas e carotenoides é menor em plantas deficientes em P (De Souza Osório et al., 2020; Patel et al., 2020a). Nossos resultados estão de acordo com esses achados, entretanto, essa redução foi menos acentuada em *MM/phyB1* e *phyB1/MM*, e maior em *MM/MM* (Figuras 2b e 2c), indicando que em plantas deficientes em P, a deficiência de ambos *phyB1*, da raiz e parte aérea, proporciona aumento na biossíntese de clorofilas e carotenoides. Como consequência da perda de pigmentos fotossintéticos, a deficiência de P também diminuiu a eficiência quântica do FSII, que pode ter sido uma estratégia para diminuir os danos por fotoinibição (Hernández e Munné-Bosch, 2015). Entretanto, nós observamos que *phyB1/phyB1* e *phyB1/MM* foram os que apresentaram menor eficiência na

transferência de energia para o FSII (Fv/Fm), comparado a MM/MM; indicando que o fitocromo B1 da parte aérea é um regulador positivo desse processo (Figura 2d). Nesse estudo, a deficiência de P também afetou negativamente as reações de trocas gasosas (Figura 3). Foi observado diminuição na fotossíntese (Figura 3a), que ocorreu devido à perda de pigmentos fotossintéticos além da menor assimilação de carbono, (Figura 3b) e menor transpiração (Figura 3c). Entretanto, em plantas deficientes em P, a transpiração não é regulada por phyB1 da parte aérea e da raiz. Com exceção de MM/MM, todas as demais combinações de enxertia diminuíram a eficiência de uso da água (Figura 3d), comparado ao tratamento completo, o que pode estar associado com a perda de função de phyB1, e que indica a participação desse fotorreceptor nas relações hídricas de modo dependente do P.

Nós verificamos que independente do genótipo, a deficiência de fósforo diminuiu as eficiências de uso de N e P e que resultou em menor conversão dos nutrientes em massa seca (Figuras 5 e 2A). Esses resultados já eram esperados uma vez que juntamente com o N e K, esse é um dos nutrientes mais responsivos pelas plantas e com isso, a sua baixa disponibilidade se constitui um fator limitante para o crescimento e desenvolvimento vegetal (Hernández e Munné-Bosch, 2015). Por outro lado, a perda de função de phyB1 radicular nas plantas de MM/*phyB1* deficientes em P aumentou a eficiência de uso de P em relação a MM/MM (Figura 4a). Independente do tratamento nutricional, *phyB1*/MM produziram menos massa seca na parte aérea e na planta inteira, em relação ao MM/MM. Esses resultados podem ser justificados pelo menor acúmulo de P e condutância estomática desse genótipo em relação ao MM/MM, mostrando que a deficiência de phyB1 da parte aérea afeta negativamente processos nutricionais e fisiológicos e consequentemente a produção de massa seca do tomateiro. Por outro lado, os resultados da massa seca da raiz apontam que ambos fitocromos da parte aérea e da raiz participam do processo de produção de massa seca nessa parte da planta.

4.4. Deficiência de potássio (-K)

Nós demonstramos que a deficiência de potássio diminuiu a sua absorção, bem como a absorção de N e P das plantas, independente do genótipo (Figura 1). Isso

pode ter ocorrido devido o K atuar na ativação de enzimas chaves para absorção de nutrientes, além de estimular a absorção de nitrato, uma vez que serve como cátion acompanhante (Blevins et al., 1978). Entretanto os genótipos deficientes em K acumularam menos N e K em relação ao MM/MM, sugerindo que ambos *phyB1* são reguladores positivos da absorção desses nutrientes de modo dependente do K; enquanto *phyB1* da parte aérea é um regulador positivo da absorção de P, independente do K.

A deficiência de K pode resultar em peroxidação lipídica das membranas (Du et al., 2019), e nós observamos que essa resposta é modulada por *phyB1* da parte aérea, visto que *phyB1/phyB1* e *phyB1/MM* aumentaram a concentração de MDA (Figura 2a). Além disso, o aumento na concentração de MDA pode ter provocado inibição da biossíntese e acelerado a biodegradação dos pigmentos (Figuras 2b e 2c) e aumentado os danos oxidativos, como observado nos menores resultados da eficiência quântica do FSII (Figura. 3d). Entretanto, essas modificações fisiológicas ocorreram de forma independente dos fitocromos. Nossos resultados também mostraram que a deficiência de K provocou uma considerável redução nos parâmetros fotossintéticos (fotossíntese, condutância estomática e transpiração), em relação ao tratamento completo (Figuras 3a-c). Sabe-se que a baixa disponibilidade de K nas plantas diminui a sua concentração nas células guardas e consequentemente compromete a regulação estomática (Hasanuzzaman et al., 2018). Dessa forma, a diminuição da condutância estomática minimizou a perda de água pela transpiração, entretanto, diminuiu a assimilação de carbono. Estudos prévios mostraram que a performance fotossintética pode ser aumentada em plantas transgênicas de arroz que super produzem fitocromos B (Kreslavski et al., 2018). Nesse sentido, as combinações de enxertia com perda de função de *phyB1* diminuíram a fotossíntese em relação ao MM/MM (Figura 3a). Entretanto, essa redução foi mais acentuada nas plantas deficientes em *phyB1* da parte aérea, indicando que esse fotorreceptor é um regulador positivo do processo fotossintético de modo dependente do K. A deficiência de *phyB1* da parte aérea também diminuiu a condutância estomática e a transpiração das plantas de tomateiro (Figuras 3b e 3c), independente do tratamento nutricional. Esse resultado indica que *phyB1* é um regulador positivo desses processos. Foi relatado anteriormente que a disponibilidade adequada de K para as plantas permite que essas

sejam mais eficientes no uso da água (Hasanuzzaman et al., 2018), o que justifica os menores resultados de eficiência do uso da água nas plantas deficientes nesse elemento em relação ao tratamento completo (Figura 3d).

As plantas enxertadas deficientes em K diminuíram a eficiência de uso de N e P, em relação as do tratamento completo (Figuras 4a e 4b). Entretanto, a eficiência de uso de K (Figura 4c) aumentou com a baixa disponibilidade desse elemento, o que pode ter sido uma estratégia adaptativa das plantas para manter o seu metabolismo. O K além de ser ativador de mais de 50 enzimas, também desempenha papel fundamental no transporte de solutos da parte aérea para a raiz via floema (Hafsi et al., 2014). Além disso, esse elemento também regula a biossíntese, conversão e alocação de metabólitos (Hasanuzzaman et al., 2018). Dessa forma, não é surpresa que a deficiência de K afetou negativamente a produção de massa seca na parte aérea, na raiz e na planta inteira (Figuras 5 e 2A). Independente da condição nutricional, a deficiência de *phyB1* da parte aérea (*phyB1/MM* e *phyB1/phyB1*) afetou negativamente a produção de massa seca nessa parte da planta. Além disso, a perda de função de ambos fitocromos, da parte aérea e da raiz diminuíram a massa seca na raiz e na planta inteira do tomateiro. Esses resultados mostram que tanto *phyB1* da parte aérea como da raiz estão envolvidos em alguma etapa metabólica na planta, seja nutricional ou fisiológica, e consequentemente participam da sinalização de respostas à produção de massa seca em tomateiro.

Em resumo, baseado nas respostas observadas nas combinações de enxertia entre o mutante em *phyB1* e MM, nós podemos concluir que o fitocromo B1 faz parte da comunicação entre parte aérea-raiz no controle das respostas nutricionais, fisiológicas e de crescimento do tomateiro. Além disso, a ação de ambos fitocromos, da parte aérea e da raiz sob essas respostas, pode ocorrer de forma independente ou dependente de N, P e K. A utilização do mutante de tomateiro com perda de função de *phyB1* pode ser uma ferramenta para entender melhor sobre o controle dos fitocromos na nutrição, fisiologia e crescimento das plantas. Os nossos resultados também trazem novas perspectivas para que futuros estudos explorem a manipulação do gene *PHYB1* como forma de melhorar a produtividade das culturas e atenuar os danos da deficiência nutricional.

5. Referências

Bataglia OC, Furlani AMC, Teixeira JPF, Furlani PR, Gallo JR (1983) **Métodos de análise química de plantas**. Campinas: IAC, 48p.

Blevins DG, Barnett NM, Frost, WB (1978) Role of Potassium and Malate in Nitrate Uptake and Translocation by Wheat Seedlings. **Plant Physiology** 62: 784–788.

Carvalho RF, Moda LR, Silva, GP, Gavassi MA, Prado RM (2016) Nutrition in tomato (*Solanum lycopersicum* L) as affected by light: Revealing a new role of phytochrome A. **Australian Journal of Crop Science** 10:331–335.

D'Amico-Damião V, Barreto RF, Garcia LFO, Porto JS, Prado RM, Carvalho RF (2022) Cryptochrome 1a of tomato modulates nutritional deficiency responses. **Scientia Horticulturae** 291:

De Souza Osório CRW, Teixeira GCM, Barreto RF, Campos CN, Leal AJF, Teodoro PE, Prado RM (2020) Macronutrient deficiency in snap bean considering physiological, nutritional, and growth aspects. **PLoS ONE** 15:1–15.

Du Q, Zhao X-H, Jiang C-J, Wang X-G, Han Y, Wang J, Yu H-Q (2019) Effects of potassium deficiency on photosynthesis, chloroplast ultrastructure, ROS, and antioxidant activities in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Integrative Agriculture** 18:395–406.

González CV, Ibarra SE, Piccoli PN, Botto JF, Boccalandro HE (2012) Phytochrome B increases drought tolerance by enhancing ABA sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell and Environment** 35:1958–1968.

Gratão PL, Monteiro CM, Carvalho RF, Tezotto T, Piotto FA, Peres LEP, Azevedo RA (2012) Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry** 56:79–96.

Hafsi C, Debez A, Abdelly C (2014) Potassium deficiency in plants: Effects and signaling cascades. **Acta Physiologiae Plantarum** 36:1055–1070.

Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Nahar K, Hossain MS, Mahmud JA, Hossen MS, Masud AAC, Moumita, Fujita M (2018) Potassium: A vital regulator of plant responses and tolerance to abiotic stresses. **Agronomy** 8: 31

Heath RL, Packer L Photoperoxidation in isolated chloroplasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 125:189–198.

Hernández I, Munné-Bosch S (2015) Linking phosphorus availability with photo-oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany** 66:2889–2900.

Hoagland DR, Arnon DI (1950) **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: Circular 247, 32p.

Huang W-T, Xie Y-Z, Chen X-F, Zhang J, Chen H-H, Ye X, Guo J, Yang L-T, Chen L-S (2021) Growth, mineral nutrients, photosynthesis and related physiological parameters of citrus in response to nitrogen deficiency. **Agronomy** 11: 1859

Joshi PN, Biswal B, Biswal UC (1991) Effect of uv.-A on aging of wheat leaves and role of phytochrome. **Environmental and Experimental Botany** 31:267–276.

Kreslavski VD, Los DA, Schmitt F-J, Zharmukhamedov SK, Kuznetsov VV, Allakhverdiev (2018) The impact of the phytochromes on photosynthetic processes. **Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics** 1859:400–408.

Marschner H (2012) **Mineral Nutrition of Higher Plants**. London: Academic Press p. 672.

Mereb EL, Alves FRR, Rezende MH, De Oliveira, EJ, Carvalho, RF, De Melo, HC (2020) Morphophysiological responses of tomato phytochrome mutants under sun and shade conditions. **Revista Brasileira de Botanica** 43:45–54.

Mu X (2017) A RNA-seq analysis of the response of photosynthetic system to low nitrogen supply in maize leaf. **International Journal of Molecular Sciences** 18:1–12.

Mu X, Chen Y, Chen F, Yuan L, Mi G (2021) The physiological response of photosynthesis to nitrogen deficiency. **Plant Physiology and Biochemistry** 158:76–82.

Pandey GK, Mahiwal S (2020) **Role of potassium in plants**. Cham: Springer p.81.

Patel M, Rangani J, Kumari A, Parida AK (2020b) Mineral nutrient homeostasis, photosynthetic performance, and modulations of antioxidative defense components in two contrasting genotypes of *Arachis hypogaea* L. (peanut) for mitigation of nitrogen and/or phosphorus starvation. **Journal of Biotechnology** 323:136–158.

Prado RM (2021) **Mineral nutrition of tropical plants**. Cham: Springer International Publishing p.339.

Reis AR, Favarin JL, Malavolta E, Lavres Júnior J, Moraes MF (2009) Photosynthesis, chlorophylls, and SPAD readings in coffee leaves in relation to nitrogen supply. **Communications in Soil Science and Plant Analysis** 40:1512–1528.

Sakuraba Y, Kanno S, Mabuchi A, Monda K, Iba K, Yanagisawa S (2018) A phytochrome-B-mediated regulatory mechanism of phosphorus acquisition. **Nature Plants** 4:1089–1101.

Sakuraba Y, Yanagisawa S (2018) Light signalling-induced regulation of nutrient acquisition and utilization in plants. **Seminars in Cell and Developmental Biology** 83:123–132.

Siddiqi MY, Glass ADM (1981) Utilization index: A modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **Journal of Plant Nutrition** 4:289–302.

Soares MB, Prado RM, Tenesaca LFL, Lúcio JCB, Carvalho RF (2021) Tomato phytochromes B1 and B2 are part of the responses to the nutritional stress induced by NPK deficiency. **Physiologia Plantarum** 173: 2238-2247.

Van Tuinen, Ageeth, Kerckhoffs, Huub J., Nagatani, Akira, Kendrick, Richard E., Koornneef, M. A (1995) Temporarily Red Light-Insensitive Mutant of Tomato. **Plant Physiology** 108: 939–947.

Zhang Y, Liang Y, Zhao X, Jin X, Hou L, Shi Y, Ahammed GJ (2019) Silicon compensates phosphorus deficit-induced growth inhibition by improving photosynthetic capacity, antioxidant potential, and nutrient homeostasis in tomato. **Agronomy** 9:1–16.

Zhao J, Zhou J-J, Wang Y-Y, Gu J-W, Xie X-Z (2013) Positive Regulation of Phytochrome B on Chlorophyll Biosynthesis and Chloroplast Development in Rice. **Rice Science** 20:243–248.

APÊNDICE

Apêndice A – Material suplementar para o capítulo 3

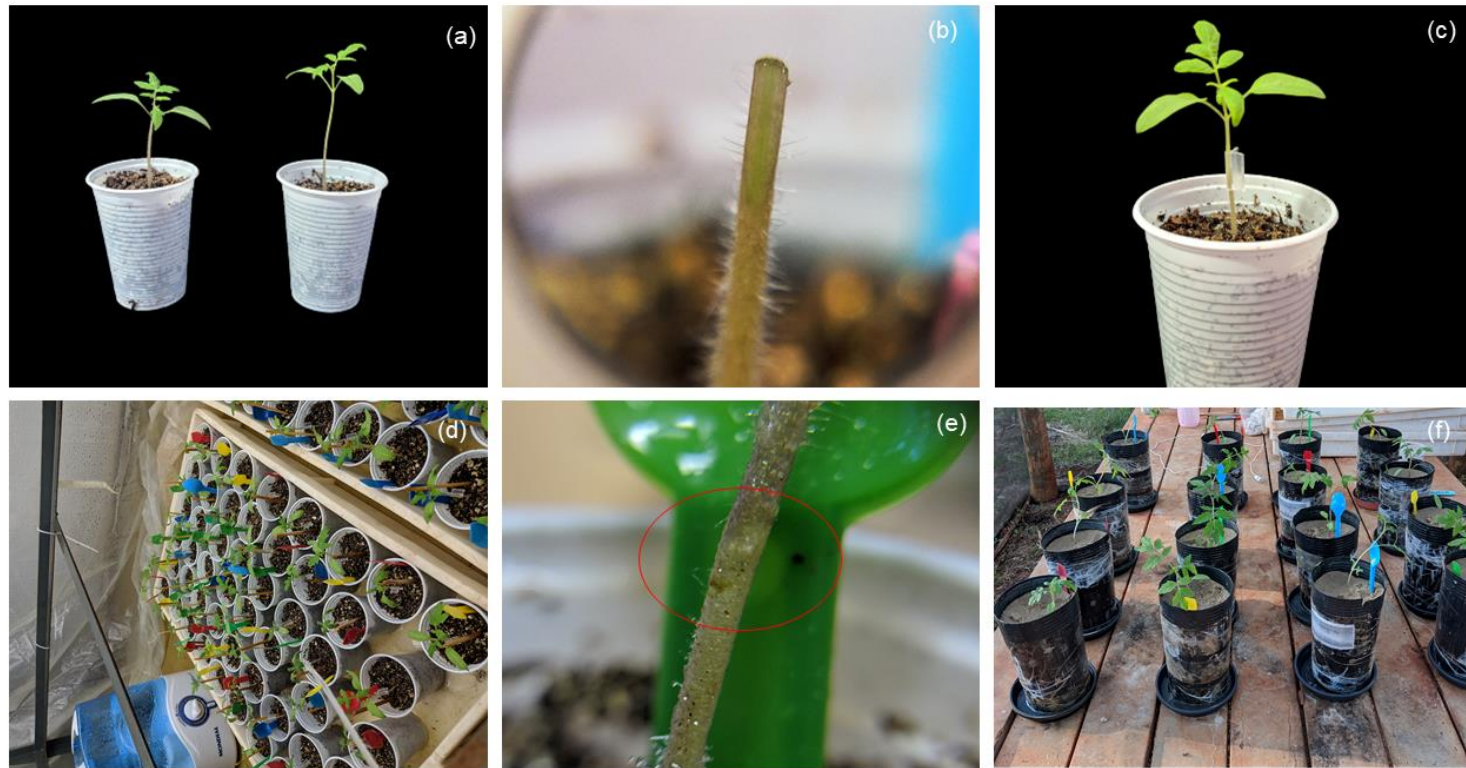


Figura 1A. Procedimentos para realização da enxertia. (a) Plântulas de MM (esquerda) e *phyB1* (direita) aos 17 dias após a semeadura; (b) detalhe do corte em bisel no porta-enxerto; (c) plantas enxertadas; (d) cicatrização da enxertia em câmara úmida; (e) união entre o enxerto e porta-enxerto; e (f) plantas enxertadas na casa de vegetação.

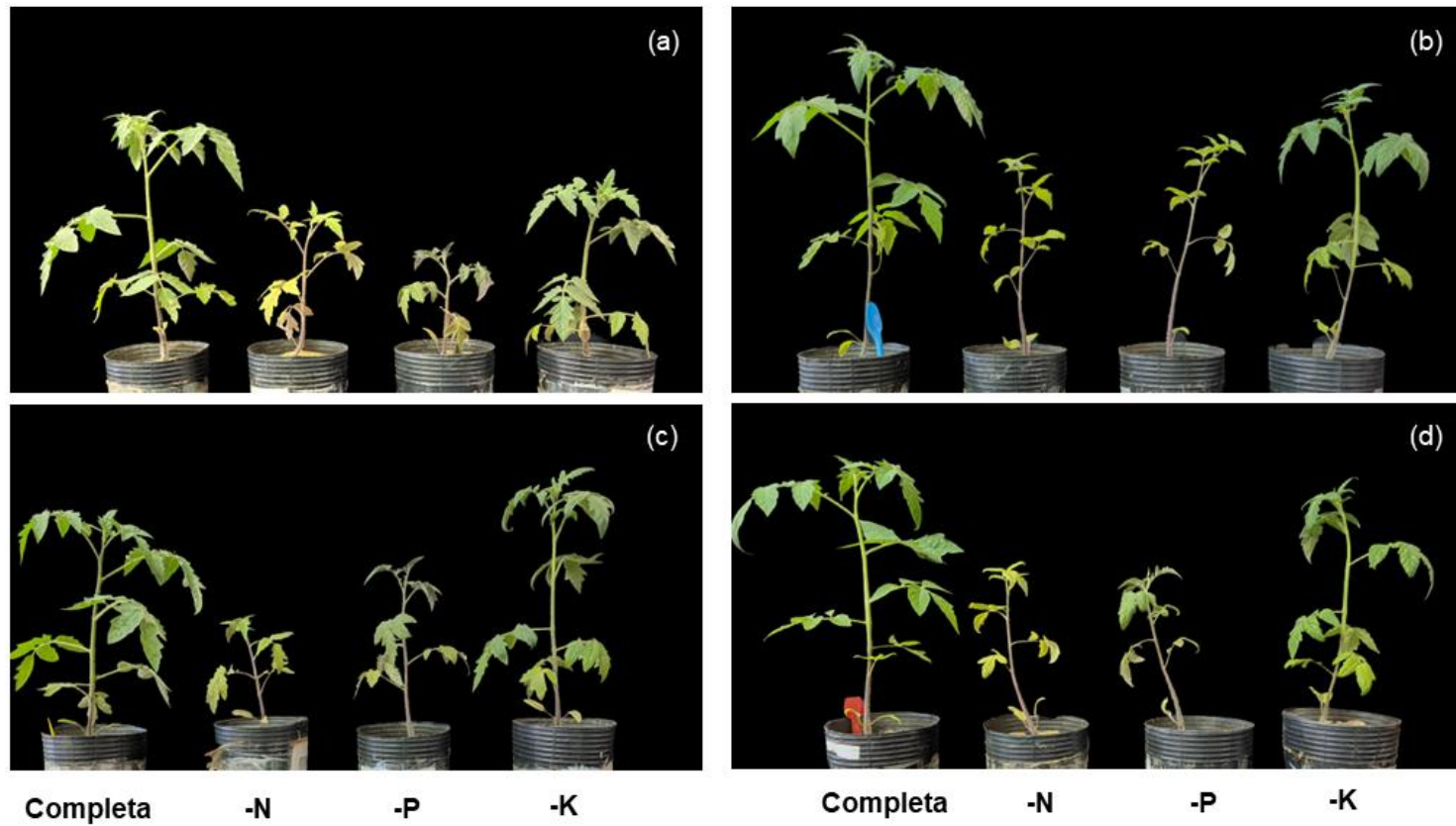


Figura 2A. Fenótipos dos autos enxertos e combinações de enxertia de tomateiro cv. Moneymaker (MM) e do mutante fotomorfogênico (*phyB1*) cultivados sob solução nutritiva completa ou deficiente (-). (a) MM/MM, (b) *phyB1/phyB1*, (c) MM/*phyB1* e (d) *phyB1*/MM.

Tabela 1A. ANOVA dos parâmetros nutricionais. Os valores do teste F estão apresentados para cada efeito principal ou interação dentro de cada tratamento nutricional.

Tratamento nutricional	Efeito ou interação	Acúmulo			Eficiência de uso		
		N	P	K	N	P	K
Deficiência de nitrogênio	Genótipo (G)	6,69**	6,39**		4,83*	1,35ns	
	Solução (S)	1238,57**	815,58**		10,67**	1052,90**	
	G x S	6,43**	1,41ns		4,25*	1,68ns	
Deficiência de fósforo	Genótipo (G)	9,75**	7,05**		8,28**	1,33ns	
	Solução (S)	1099,88**	3233,94**		325,90**	104,79**	
	G x S	8,12**	1,02 ^{ns}		7,96**	0,60ns	
Deficiência de potássio	Genótipo (G)	20,63**	4,45*	7,76**	1,90ns	0,54ns	1,64ns
	Solução (S)	174,20**	92,60**	2266,44**	47,14**	121,11**	448,95**
	G x S	4,87**	3,04ns	4,07*	1,45ns	0,52ns	2,32ns

Tabela 3A. ANOVA dos parâmetros fisiológicos. Os valores do teste F estão apresentados para cada efeito principal ou interação dentro de cada tratamento nutricional.

Tratamento nutricional	Efeito ou interação	MDA	Chl total	Carotenoides	Fv/Fm
Deficiência de nitrogênio	Genótipo (G)	2,51ns	4,96**	9,06**	17,00**
	Solução (S)	0,05ns	197,56**	134,63**	803,99**
	G x S	1,45ns	5,38**	9,83**	24,24**
Deficiência de fósforo	Genótipo (G)	3,34*	11,22**	4,82*	14,17**
	Solução (S)	24,89**	434,31**	422,38**	296,52**
	G x S	1,52ns	14,57**	13,02**	12,26**
Deficiência de potássio	Genótipo (G)	2,69ns	9,53**	7,18**	1,22ns
	Solução (S)	0,18ns	218,49**	202,12**	11,48**
	G x S	3,54*	10,20**	10,22**	0,13ns

Tabela 4A. ANOVA dos parâmetros fisiológicos. Os valores do teste F estão apresentados para cada efeito principal ou interação dentro de cada tratamento nutricional.

Tratamento nutricional	Efeito ou interação	Fotossíntese	Condutância estomática	Transpiração	Eficiência do uso da água
Deficiência de nitrogênio	Genótipo (G)	0,34ns	2,27ns	6,87**	1,82ns
	Solução (S)	1470,41**	271,90**	1798,80**	13,16**
	G x S	0,44ns	3,34*	17,39**	3,82*
Deficiência de fósforo	Genótipo (G)	0,30ns	2,84ns	1,75ns	4,47*
	Solução (S)	1249,51**	286,29**	981,43**	12,38**
	G x S	0,43ns	2,52ns	5,97**	9,49**
Deficiência de potássio	Genótipo (G)	11,13**	9,43**	11,11**	2,36ns
	Solução (S)	131,45**	4,80*	24,49**	20,63**
	G x S	6,95**	2,31ns	2,50ns	2,18ns

Tabela 5A. ANOVA dos parâmetros de crescimento. Os valores do teste F estão apresentados para cada efeito principal ou interação dentro de cada tratamento nutricional.

Tratamento nutricional	Efeito ou interação	Massa seca		
		Parte aérea	Raiz	Planta inteira
Deficiência de nitrogênio	Genótipo (G)	6,64**	6,69**	5,62**
	Solução (S)	4889,79**	542,21**	1182,98**
	G x S	3,07ns	9,06**	6,23**
Deficiência de fósforo	Genótipo (G)	2,82ns	18,14**	
	Solução (S)	462,42**	279,90**	
	G x S	1,61ns	0,33ns	
Deficiência de potássio	Genótipo (G)	6,53**	4,36*	6,89**
	Solução (S)	630,64**	5,58*	156,68**
	G x S	0,31ns	2,67ns	0,96ns