

FORMAÇÃO DE AERÊNQUIMA EM RAÍZES DE MILHO SOB ESTRESSE DE FÓSFORO¹

GRACIELLE TEODORA DA COSTA PINTO COELHO², ISABEL REGINA PRAZERES DE SOUZA³, NEWTON PORTILHO CARNEIRO³, ROBERT EUGENE SCHAFFERT³, ROSANGELA LUCI BRAN-DÃO², VERA MARIA CARVALHO ALVES³, LUCIANO VILELA PAIVA⁴ e ANDRÉA ALMEIDA CARNEIRO^{3,5}

¹*Este trabalho é integrante do projeto “New approach for improving phosphorus acquisition and aluminum tolerance of plants in marginal soils” financiado pela Mc Knight Foundation.*

²*Doutoranda, Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 37, Lavras, MG, 37200-000. Bolsista da Capes e CNPq.*

³*Pesquisadores Embrapa Milho e Sorgo. Caixa Postal 151, Sete Lagoas, MG, 35701-970*

⁴*Professor do Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 37, Lavras, MG, 37200-000*

⁵*andrea@cnpmc.embrapa.br. (autora para correspondência)*

Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.5, n.3, p.443-449, 2006

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi verificar, sob estresse de fósforo (P), possíveis alterações anatômicas em raízes da linhagem de milho A188 e de sua versão transgênica, carregando a construção gênica AtPT2::GUS. Plantas AtPT2::GUS foram utilizadas como controle positivo para a validação do estresse de P, uma vez que esse promotor direciona a expressão do gene repórter GUS somente para raízes sob deficiência de fósforo. Plantas das linhagens de milho A188 e de sua versão transgênica foram crescidas em solução nutritiva com e sem a adição de P. Após 15 dias da imposição do estresse, as raízes das plântulas foram coletadas e submetidas à coloração histoquímica de GUS e às análises anatômicas. A formação de aerênquimas foi observada entre 5 e 7,5 cm do ápice radicular, em condições de estresse de P, compreendendo as secções distal e medial das raízes. A presença de aerênquima foi observada em ambas as raízes de plântulas, transgênicas e não-transgênicas. Verificando-se assim, que raízes de plantas de milho da linhagem A188, sob estresse de P, apresentam modificação anatômica (aerênquimas), que parece ser uma adaptação das plantas visando reduzir os custos metabólicos para crescimento e exploração do solo.

Palavras-chave: Linhagem, promotor AtPT2, solução nutritiva, *Zea mays* L

AERENCHYMA FORMATION IN MAIZE PLANTS UNDER PHOSPHORUS DEFICIENCY

ABSTRACT - The objective of this work was to verify, under phosphorus stress (P), possible alterations to the root anatomy of maize inbred line A188 and its transgenic version having the genetic construction AtPT2::GUS. AtPT2::GUS plants were used as a positive control to validate the P stress, once this promoter directs GUS reporter gene expression only to the roots under P deficiency. Plants from inbred line A188 and its transgenic version were grown in nutrient solution with or without P. Fifteen days after initiating P stress, the root of seedlings were collected and submitted to the histochemi-

cal assay of GUS and to anatomical analyses. The formation of aerenchyma was observed 5 to 7.5 cm from the root apex in the P stress environment, containing the distal and medial zones of the roots. The presence of aerenchyma was observed in roots of both transgenic and non-transgenic seedlings. Thus, it could be verified that roots from inbred line A188, under P stress, show anatomic modifications (aerenchyma), which seem to be an adaptation of the plant aiming to reduce metabolic root costs for growth and soil exploration.

Key words: Inbred line, AtPT2 promoter, nutrient solution, *Zea mays* L

O fósforo (P) é um macronutriente essencial para o crescimento e o desenvolvimento de todos os organismos, uma vez que esse mineral está envolvido em funções básicas, como formação de ácidos nucleicos, fosfolipídios, metabolismo energético, ativação de metabolismo intermediário e regulação enzimática, através das cascatas de tradução de sinais (Abel *et al.*, 2002; Rausch & Bucher, 2002; Schünmann *et al.*, 2004). Entretanto, é um dos nutrientes menos disponíveis no solo, encontrado frequentemente em concentrações similares à dos micronutrientes (Barber, 1984). Sendo assim, este nutriente é considerado um dos fatores mais limitantes para o desenvolvimento de plantas em ecossistemas naturais.

Para garantir a sobrevivência em solos com baixas concentrações de P, as plantas desenvolveram diversas adaptações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares (Muchhal, 1999; Karthikeyan *et al.*, 2002; Hammond *et al.*, 2004). Essas adaptações são, geralmente, observadas nas raízes, por ser esse órgão especializado na fixação, absorção, reserva e condução de nutrientes e água. Modificação anatômica, como a formação de aerênquimas, tem sido visualizada em raízes de plantas em condições de estresse nutricional de nitrogênio (He *et al.*, 1992), fósforo (Drew *et al.*, 1989; He *et al.*, 1992; Fan *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2003) e sulfato (Bouranis *et al.*, 2005). Aerênquima é uma adaptação estrutural encontrada comumente em raízes de

plantas em condições de encharcamento ou em habitats aquáticos (Evans, 2003), onde ele facilita a difusão de gases entre as raízes e a parte aérea (Lopes *et al.*, 2005). Entretanto, a sua presença em plantas crescidas sob estresse nutricional não é bem compreendida. De acordo com Fan *et al.* (2003), a formação de aerênquima em plantas de feijão ou de milho mantidas sob estresse de fósforo é uma resposta adaptativa positiva relacionada à baixa disponibilidade de P, que apresenta variação intraespecífica, podendo estar relacionada com a diminuição da taxa respiratória radicular e, conseqüentemente, com um decréscimo no requerimento de fósforo nesses locais, aumentando, assim, a eficiência metabólica para maior crescimento e exploração do solo.

Estudos procurando entender a relação existente entre a formação de aerênquimas em raízes e a tolerância ao estresse de fósforo seriam bastante desejáveis, uma vez que os programas de melhoramento visando aumentar a eficiência no uso de fósforo em plantas têm encontrado dificuldades, principalmente devido à inexistência de métodos confiáveis de *screening* (casa de vegetação/solução nutritiva) na fase de plântulas, passíveis de serem realizados em condições controladas. De acordo com Alves *et al.* (1999), para determinar a eficiência de aquisição de fósforo, é necessário que sejam feitas avaliações em campo, utilizando-se áreas contrastantes quanto aos níveis de fósforo e conduzindo-se

ensaios até a fase de produção de grãos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar possíveis alterações anatômicas em raízes de milho, que possam estar relacionadas com a deficiência de P e, futuramente, serem utilizadas para a diferenciação entre linhagens sensíveis ou tolerantes a este tipo de estresse. As plantas transgênicas, contendo a construção gênica AtPT2::GUS, foram utilizadas como controle positivo, monitorando a resposta de plantas de milho ao estresse de P. O promotor AtPT2 foi isolado de um gene que codifica para uma proteína transportadora de fosfato de *Arabidopsis thaliana* (Muchhal & Raghothama, 1999), e utilizado por Karthikeyan et al. (2002) e Coelho (2005) para direcionar a expressão gênica de genes repórteres para as raízes de tabaco e milho, respectivamente, sob deficiência de fósforo.

Plantas transgênicas de milho contendo a construção AtPT2::GUS foram geradas por Coelho (2005) e suas sementes estocadas em câmara fria à 10°C e 30% de umidade. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento com temperatura diurna entre 27°C e 28°C, com o fotoperíodo de 12 h e a umidade relativa de 75%. Vinte sementes das linhagens A188 e de sua versão transgênica foram desinfestadas superficialmente em 1,25% hipoclorito de sódio, durante 10 min, sob agitação. Após a desinfestação, as sementes foram enxaguadas três vezes em água destilada e colocadas para germinar em papel Germitest (J ProLab, São José dos Pinhais, PR) embebido em água destilada, sob aeração. Transcorridos cinco dias, dez sementes de cada linhagem, transgênicas e não-transgênicas, foram transferidas para a solução nutritiva completa de Magnavaca (1982), e as demais foram transferidas para a mesma solução sem P, por 15 dias. Ao final desse período, as raízes das plântulas foram coletadas e sub-

metidas à detecção histoquímica da expressão do gene repórter GUS (Jefferson et al., 1987) e às análises anatômicas. Para a análise histoquímica da atividade do gene repórter GUS, as raízes coletadas foram imediatamente imersas em solução contendo 50 mM tampão fosfato de sódio (pH 7.0) e 1 mM ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-glucurônico (Clontech, CA, EUA) por 20 h a 37°C. Para as análises anatômicas, uma região de 10 cm acima do ápice das raízes foi seccionada à mão livre e fotodocumentada com o auxílio de um microscópio óptico modelo Axiosplan (Zeiss), com máquina fotográfica acoplada.

O estresse de fósforo foi confirmado pela expressão do gene repórter GUS (coloração azul) apenas nas raízes mantidas sob deficiência de P (Figura 1). O gene GUS estava sob o controle do promotor do gene AtPT2, o qual é expresso principalmente em raízes sob o estresse de P (Karthikeyan et al., 2002).

Os resultados das análises anatômicas mostraram que não ocorreu a formação de aerênquima em raízes de plantas de milho mantidas em solução nutritiva completa, independente de serem transgênicas ou não. Entretanto, sob a deficiência de P, ocorreu a formação de aerênquima tanto em raízes da linhagem transgênica de milho A188 quanto da não-transgênica (Figura 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Fan et al. (2003) e He et al. (1999), os quais verificaram que o estresse de P induziu a formação de aerênquima em raízes de milho. O primeiro sinal de início de formação de aerênquima observado foi a perda de turgor em grupos de células na parte mediana do córtex (Figura 2). A partir dessas células, a formação continuou radialmente em células circunvizinhas, semelhante à formação de um aerênquima lisígeno, o qual é caracterizado pela presença de espaços de gás

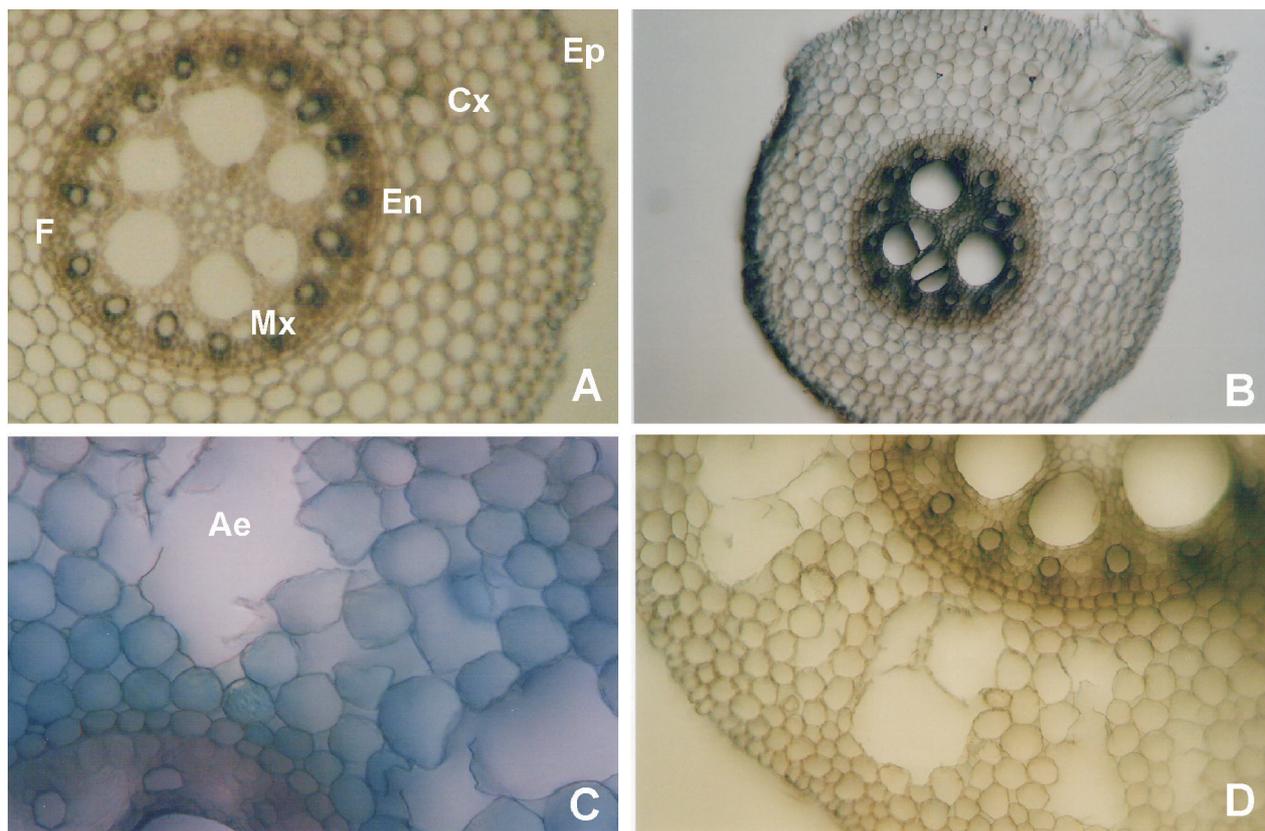


FIGURA 1. Secções transversais de raízes de milho mostrando a indução de aerênquima. (A) Raízes de milho da linhagem A188 transformada com a construção AtPT2::GUS e (B) raízes de milho da versão normal, crescidas em solução nutriente completa; (C) Raízes de milho transgênico e de sua versão normal (D) crescidas em solução nutriente sem P. Áreas azuis nas raízes indicam a expressão do gene repórter GUS, direcionado pelo promotor AtPT2. Cx: cortex, En: endoderme, Ep: epiderme, Ae: aerênquima, Mx: metaxilema, F: floema.

contínuos, oriundos da lise celular associada à atividade da celulase (Peng *et al.*, 2001).

Essa característica apresentada pela linhagem de milho A188 pode ser uma adaptação genótipo-específica, e possivelmente estar relacionada a uma maior eficiência na absorção ou translocação do P, o que depende de maiores estudos para confirmação de quaisquer mecanismos. Fan *et al.* (2003), trabalhando com genótipos contrastantes de feijão para o estresse de P, mostraram que ocorre maior formação de aerênquima em genótipos mais tolerantes a esse tipo de estresse.

Entretanto, os genótipos de feijão utilizados não eram linhagens isogênicas, e esse padrão poderia ter sido obtido apenas coincidentemente; portanto, mais estudos se fazem necessários.

O melhoramento tradicional para produção de cultivares mais adaptadas a solos de baixa concentração em fósforo pode ser grandemente impulsionado pela identificação de marcadores fenotípicos que possam ser utilizados nas fases iniciais do desenvolvimento da planta, para seleção de genótipos mais tolerantes a esse estresse. Com esse objetivo, na Embrapa Milho e Sorgo

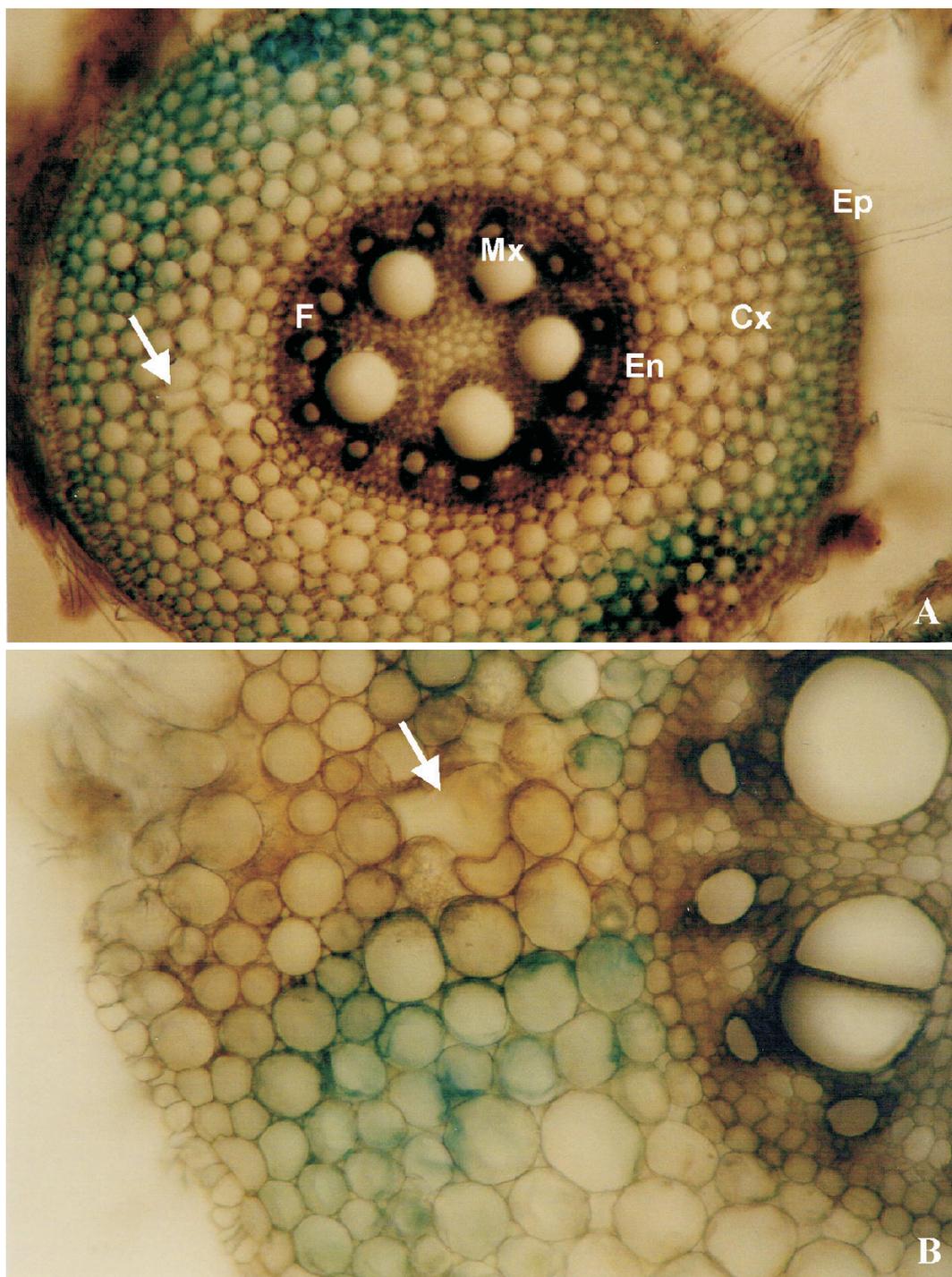


FIGURA 2. Secções transversais de raízes de milho mostrando os primeiros sinais da formação de aerênquima. As setas indicam (A) perda de turgor celular e (B) o início da formação de aerênquima no córtex de plantas de milho da versão transgênica da linhagem A188, expressando o gene repórter GUS (região azul) sob o comando do promotor AtPT2, induzível sob estresse de P.

estão sendo desenvolvidas pesquisas para melhor caracterização da formação de aerênquimas em raízes de genótipos contrastantes para tolerância ao estresse de P.

Agradecimentos

Ao Dr. K.G. Raghothama, do Departamento de Horticultura da Universidade de Purdue (USA) a utilização da construção gênica AtPT2::GUS.

Literatura Citada

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

ALVES, V. M. C.; MAGALHÃES J. V.; VASCONCELOS C. A.; NOVAIS, R. F.; BAHIA FILHO, A. F. F. C.; FRANÇA, G. E.; FRANÇA, C. C. M. Acúmulo de nitrogênio e de fósforo em plantas de milho afetadas pelo suprimento parcial de fósforo às raízes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 23, p. 229-305, 1999.

BARBER, S.A.; SILVERBUSH, M. Plant root morphology and nutrient uptake. In: BARBER, S. A.; BOULDIN, D. R. (Ed.). **Roots, nutrient and water influx and plant growth**,. Madison: Soil Science Society of America / Crop Science Society of America / American Society of Agronomy, 1984. p. 65-88. (ASA. Special Publication, 49).

BOURANIS, D.L.; CHORIANOPOULOU, S.N.; KOLLI, C.; MANIOUP, P.; PROTONTARIOS, V.E.; SIYIANNIS, V.F.; HAWKESFORD, M.J. 2006. Dynamics of aerenchyma distribution in the cortex of sulfate-deprived adventitious roots of maize. **Annals of Botany**, 97: 675-704.

COELHO, G. T. C. P. **Análises do promotor do gene transportador de fosfato de *Arabidopsis***

thaliana - AtPT2 – em plantas de milho transgênicas. 2005. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 83 p. Agronomia/Fisiologia Vegetal

DREW, M. C.; SAKER, L. R. Ion transport to the xylem in aerenchymatous roots of *Zea mays* L. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 37, n. 174, p. 22-33, 1986.

EVANS D. E. Aerenchyma formation. **New Phytologist**, Oxford, v.161, p. 35-49, 2003.

FAN, M.; ZHU, J.; RICHARDS, C.; BROW, K.M.; LYNCH, J.P. Physiological roles for aerenchyma in phosphorus-stressed roots. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 30, p.1-14, 2003.

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

HE, C. J.; MORGAN, P. W.; DREW, M. C. Enhanced sensitivity to ethylene in nitrogen-starved or phosphate-starved roots of *Zea mays* L. during aerenchyma formation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 98, n. 1, p. 137-142, 1992.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAUGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 6, n. 13, p. 3001-3907, 1987.

KARTHIKEYAN, A.S.; VARADARAJAN, D.K.; MUKATIRA, U.T; D'USZO, M.P.; DAMZ, B.; RAGHOTAMA, K.G. Regulated Expression of *Arabidopsis* Phosphate Transporters. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 130, n. 1, p. 221-233, 2002.

LOPES, M. J. C. **Estresse oxidativo e análise anatômica em plantas de diferentes ciclos de**

seleção do milho ‘Saracura BRS-4154’ sob encharcamento contínuo. 2005. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 65 p. *Agronomia/Fisiologia Vegetal*

MA, Z.; BASKIN, T.I.; BROWN, K.M.; LYNCH, J.P. Regulation of root elongation under phosphorus stress involves changes in ethylene responsiveness. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 131, p. 1381-1390, 2003.

MAGNAVACA, R. **Genetic variability and the inheritance of aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.)**. 1982. 135 f. Thesis (Doctor of Philosophy) - University of Nebraska, Lincoln.

MUCHHAL, U.S.; RAGHOTAMA, K.G. Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. **Proceedings of the National Acade-**

my of Sciences of the United States of America, Washington, v. 96, n. 10, p. 5868-5872, 1999.

PENG, H.; CHAN, C.; SHILH, M.; YANG, S. F. Signaling events in the hypoxic induction of alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Bethesda v. 126, p. 742-749, 2001.

RAUSCH, C.; BUCHER, M. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. **Planta**, Berlin, v. 216, n. 1, p. 23-37, 2002.

SCHÜNEMANN, P. H. D.; RICHARDSON, A. E.; VICKERS, C. E.; DELHAIZE, E. Promoter analysis of the barley *pht1;1* phosphate transporter gene identifies regions controlling root expression and responsiveness to phosphate deprivation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 136, n. 4, p. 4205-4214, 2004.