

A UTILIZAÇÃO DE *ARABIDOPSIS THALIANA* NO ENSINO

PAULO DE OLIVEIRA

Universidade de Évora, Departamento de Biologia,
Apartado 94, 7002-554 Évora

PREÂMBULO

«A parte mais difícil do ensino da Genética é a da explicação: é aqui que o trabalho prático pode ser de importância máxima. Uma explicação completa deve resultar numa compreensão total, mas esta compreensão poderá realmente ser obtida apenas com a participação activa do estudante. (...) Ensinar Genética prática contém por isso não só técnicas que têm de ser aprendidas mas também certas atitudes e objectivos, que vão todos no sentido de conseguir-se um curso satisfatório (...) ensinar Genética ao nível básico é normalmente um problema não somente tecnológico mas um problema educacional.» (traduzido de Antonovics [1973]). De acordo com estas palavras, possibilitar a prática da Genética é parte integrante de uma «explicação» digna desse nome. A via a escolher é que pode ser menos fácil de decidir, nomeadamente pela heterogeneidade de condições experimentais colocadas à disposição dos docentes, tanto nas Universidades como nas Escolas Secundárias. O presente trabalho pretende constituir uma base para a introdução da *Arabidopsis thaliana* no nosso ensino.

É conhecido o uso da *Drosophila melanogaster*, com a sua lista de mutantes, curto ciclo de vida e criação em frascos, no Ensino Universitário. Mas, a não ser que esta utilização se enquadre em trabalhos de investigação que justifiquem a permanente manutenção das linhas genéticas em laboratório, a actividade fora do período lectivo que essa manutenção exige constitui uma dispersão de esforços que justifica a escolha de outros organismos que tenham as mesmas virtualidades [Antonovics, 1973]. Para além disso, a transferência para as Escolas Secundárias do ensino prático baseado em *Drosophila melanogaster* exige condições relativamente exigentes, o que sem dúvida deve contribuir para a quase ausência de demonstração prática da Genética a este nível de ensino.

Uma planta de semente não requer manutenção permanente e, no caso da *Arabidopsis thaliana*, não exige condições especiais de cultura; pode, com o seu ciclo de vida razoavelmente curto, satisfazer os requisitos do ensino num semestre ou, ainda melhor, num ano lectivo. Não menos importante é o facto de esta crucífera se ter tornado, graças à relativa facilidade com que o seu genoma pode ser analisado e manipulado com métodos da Biologia Molecular, no mais explorado modelo genético para as plantas superiores, suplantando espécies estudadíssimas como a ervilheira, o tomateiro e mesmo o milho. Desenvolver a sua utilização, num departamento onde se ensina Genética e Fisiologia, contribui para acompanhar o progresso que é feito neste organismo-modelo e veicula a sua utilização em temas de investigação, enquanto abre oportunidades de ensino tanto a nível universitário como secundário.

Como indica o título, trata-se de um texto para utilização prática; não procura ser exaustivo sobre a *Arabidopsis thaliana* mas pretende fornecer todos os elementos orientadores de uma aplicação prática bem sucedida. Uma grande parte

da bibliografia citada é de fácil acesso e deverá complementar este texto conforme se julgue de interesse.

Nos dois capítulos (“Um guia para a utilização de *Arabidopsis thaliana*” e “A variação genética em *Arabidopsis thaliana*”), procurar-se-á ilustrar um conjunto de características da *Arabidopsis thaliana* relevantes para a sua utilização nos mais diversos fins — dentro da Genética e também da Fisiologia — acompanhadas das técnicas e estratégias de análise (que, sem necessidade de meios especializados, um docente do ensino secundário com a necessária formação universitária possa implementar) e das fontes bibliográficas e de germoplasma que possam interessar ao utilizador. Decorre assim que não se propõe este texto para o uso do leigo: é um texto técnico que visa acima de tudo promover a utilização profissional deste organismo para o ensino, o que se supõe vir a ser do interesse apenas de quem tem as bases conceptuais e a motivação necessárias para participar neste propósito de divulgação prática.

UM GUIA PARA A UTILIZAÇÃO DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

a. Escolha das sementes

A *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh é uma dicotiledónea anual que pertence à família Cruciferae (também conhecida por Brassicaceae) e se encontra distribuída por vários continentes (cf. segundo capítulo), principalmente nas regiões temperadas do hemisfério Norte, onde se conta Portugal — tanto no continente como nas Regiões Autónomas da Madeira e dos Açores — conhecendo-se também a sua ocorrência na República de Cabo Verde [Rédei, 1969; Ratcliffe, 1965].

As suas sementes são muito parecidas com as de *Capsella*, mas de reduzidas dimensões, podendo facilmente confundir-se com migalhas de pão ou grãos de areia: Rédei [1969] cita para sementes produzidas em laboratório um comprimento médio de 0,5 mm, e largura média de 0,32 mm. Para cada mililitro de semente limpa devem contar-se 50000 sementes (volume médio $20.5 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$). Estimativas do peso dessas sementes dão cerca de 50000 em cada grama, enquanto no caso das provenientes de colheitas no campo, por serem maiores, o número fica pelos 32000 por grama [Rédei, 1969].

i. Populações naturais

As suas sementes podem ser colhidas na Primavera, embora a época exacta varie segundo as características climáticas e a sazonalidade em cada população. Embora seja comum afirmar-se que as populações naturais de *Arabidopsis thaliana* são virtualmente isogénicas, resultado previsível da quase exclusiva autogamia das flores e tendo implícitos mecanismos de selecção dos genótipos melhor adaptados, a evidência experimental não confirma esta noção, aparentemente em virtude da manutenção de polimorfismos por heterose [Karbe & Röbbelen, 1968; Cetl, 1965; Kranz, 1976; Cetl, 1987]. Deste modo, para ter uma representação da diversidade genotípica numa população, o que pode interessar por exemplo se se projectarem experiências de selecção em laboratório, é importante que se maximize o número de plantas progenitoras donde se faz a colheita, e a mesma se faça ao longo de várias visitas a uma mesma população, caso alguma dessa diversidade se expresse em variações na fenologia da floração.

ii. Colecções

Alternativamente, e é por certo a opção mais comum, obtêm-se as sementes de colecções de germoplasma ou de laboratórios onde a *Arabidopsis thaliana* é estudada. A primeira colecção foi iniciada por Laibach em 1937 e visou desde logo abranger todas as localizações da planta [Röbbelen, 1965; Rédei, 1969; Kranz, 1976]; os trabalhos mais extensos de documentação da biodiversidade das populações de *Arabidopsis thaliana* têm associados os nomes de Röbbelen [1965], Kranz [1976] e Napp-Zinn [1976] na Alemanha, Cetl [1965, 1978] na Morávia, e Ratcliffe [1965] na Grã-Bretanha.

As colecções publicamente disponíveis incluem actualmente o Nottingham Arabidopsis Stock Centre no Reino Unido [www2] e o Arabidopsis Information Management Service nos Estados Unidos [www3], que integraram a colecção de Laibach e subsequentes adições, uma colecção Sendai no Japão [www4], e finalmente uma empresa comercial (Lehle Seeds [www4]), esta última com uma colecção mais restrita.

iii. Viabilidade

As sementes permanecem viáveis pelo menos 2 anos a +20 °C, com declínio acentuado a partir dos 4 ou 5 anos [Rédei, 1969], e dezenas de anos a -20 °C, se convenientemente secas [www2]. São geralmente fornecidas em tubos

de plástico de 0.5 ou 1.5 mL, que vedam a entrada de humidade; é norma colocá-las no frigorífico (+ 2 a + 6 °C), mal são recebidas, até sua utilização; caso se pretenda assegurar a redução do seu conteúdo em água, nomeadamente para serem congeladas, devem incubar-se no escuro a 32 °C durante 3 semanas (tratamentos de pós-maturação, cf. secção b-i [Rédei, 1969]).

b. Germinação e emergência das plântulas

i. Embebição

As sementes maduras requerem um período de hidratação para germinarem, o que pode ser realizado no próprio substrato onde as plantas irão crescer, ou em meios transitórios, seja agar a 0.75% contendo KNO₃ a 0.01%, em perlite regada, ou em papel de filtro molhado com água. Para aumentar a uniformidade cronológica das culturas, é recomendado estratificar as sementes, isto é, realizar a sua embebição a temperaturas próximas do ponto de congelação. Os procedimentos de estratificação a empregar variam segundo certos detalhes do tratamento ou preferência dos utilizadores: por exempli o Nottingham Arabidopsis Stock Centre recomenda 5 dias no frio, após a sementeira no solo [www2]; usando placas de Petri com uma folha de papel de filtro molhada, a estratificação pode ser feita a 4 °C durante 7 dias, antes de proceder a outras manipulações [Valvekens *et al.*, 1988]. Em todos os casos, pode ser melhor iniciar a embebição à temperatura ambiente, durante 1 hora, antes de transferir para o frio [Lawrence, 1966; Antonovics, 1973].

Terminada a estratificação, transferem-se as sementes uma a uma para a superfície do substrato de cultura, sem as enterrar, usando uma pinça micro-cirúrgica ou um pincel fino. No caso da pinça, há que ter o cuidado de não danificar as sementes; para tal, é recomendável molhar as pontas da pinça e procurar, com um mero toque das duas pontas segurando cada semente, fazer com que ela adira a uma dessas pontas — este procedimento funciona desde que se tenha evitado que as sementes agregassem entre si durante a embebição. Uma alternativa apresentada como muito conveniente é realizar uma suspensão das sementes em agar líquido (a 0.1%), tal que se conheça o número de sementes por unidade de volume dessa suspensão e se possa, pela regulação dos volumes pipetados, assegurar uma rápida e precisa distribuição da sementeira [Rédei, 1967].

A germinação transitória em agar, seguida de transplante para o solo, justifica-se em diversos procedimentos pelo reduzido espaço que as plântulas ocupam durante as manipulações que venham a ser necessárias. Neste caso têm sido recomendados esquemas de embebição mais complexos para assegurar a uniformidade do desenvolvimento das plantas. Van der Veen [1965] preconizou que as sementes fossem primeiro incubadas a 32 °C durante 3 semanas no escuro e a seco (passo de pós-maturação), semeadas no agar contendo KNO₃, e mantidas 24 horas em temperatura ambiente e à luz (passo de germinação propriamente dita), depois no escuro durante 2 a 3 dias (passo de estiolação), após o que os hipocótilos atingiam 1 a 1.5 cm; finalmente, mais 2 dias de novo à luz (passo de recuperação) antes de transferir para o solo. Esta transferência era preparada, logo antes da estiolação, cortando no agar, com um tubo de vidro, uma rodela à volta de cada semente: na altura da transferência bastava usar uma pequena espátula de modo essa realizar a operação sem tocar nas plântulas. A pequena porção de agar transferida serve de reserva de água para as plântulas (mas pode não dispensar, mesmo com rega por capilaridade, que se use um pequeno nebulizador) e acaba por desaparecer. Para mutagénesis nas sementes [Van der Veen, 1968] (cf. segundo capítulo, secção b), a exposição aos raios X (até 16 kR) faz-se a seguir ao passo de estiolação; com o mutagénio químico EMS, faz-se a seguir ao passo de pós-maturação

e requer o prolongamento do passo de germinação para 32 horas de modo a sincronizar com controlos não-mutagenizados¹.

A dormência das sementes (estado de não-resposta à embebição) de *Arabidopsis thaliana*, que pode durar vários meses após a plena maturação das mesmas, é um carácter altamente adaptativo e para o qual se supõe bastante variação entre populações (cf. segundo capítulo, secção a). Uma precaução elementar para verificar a dormência num lote de sementes é colocar uma amostra a embeber em papel de filtro e com luz: se não estiverem dormentes (e forem viáveis), hão-de ver-se as raízes primárias em crescimento quanto muito ao fim de 7 dias [Cetl *et al.*, 1970]. Se por este critério uma elevada proporção de sementes está dormente, então o passo de estratificação antes mencionado é indispensável, podendo alternativamente utilizar-se compostos como o ácido giberélico, acetaldeído a $\leq 0,01\%$, ou ainda raios X para provocar a germinação [Rédei, 1969]. Quando as sementes estão para germinar em agar, a estratificação (durante 5 dias no escuro a 10 °C) é feita antes de passarem à luz, portanto antes de iniciarem a germinação propriamente dita, estiolação, etc. [Van der Veen, 1968; Rédei, 1969].

A colheita de sementes imaturas, isto é, tiradas de frutos ainda verdes, permite atalhar a entrada em dormência e assim reduzir ao mínimo o intervalo de tempo entre gerações (cf. secção f-ii).

No fim das primeiras 24 horas de embebição em agar, considera-se que as sementes estão sincronizadas, em termos de desenvolvimento vegetativo, para entrarem em tratamentos de vernalização visando induzir uma transição precoce para a fase reprodutiva (cf. secção d-ii), a qual é distinta da estratificação precedente porque já se faz no material em germinação e não sobre sementes quiescentes ou até dormentes (isto é, quando se pretenda estratificar e induzir a transição para a fase reprodutiva num conjunto de sementes, o procedimento envolverá duas incubações no frio, entre as quais se intercala o passo de germinação à temperatura ambiente).

ii. Culturas em solo

Há duas opções para o substrato onde se faz a cultura: em solo ou em agar. No primeiro caso, a recomendação unânime é que se utilize um solo leve para *Arabidopsis thaliana*. Há diversas fórmulas propostas, geralmente misturas à base de areia ou turfa, eventualmente suplementadas com nutrientes minerais ou por solo de jardim ou composto.

A *Arabidopsis thaliana* é particularmente sensível a certos solos, e a adequação de uma mistura não é evidente senão por tentativa e erro. As razões para um mau resultado, para além das características mecânicas do substrato, podem implicar deficiências nutricionais ou a presença — ou desenvolvimento — de substâncias inibidoras; a natureza destes factores pode ser tão diversa, que cada utilizador acaba por chegar a um substrato preferido por pesquisa própria [Rédei & Zuber, 1967].

A importância da leveza do substrato, especialmente na camada superior onde se fez a sementeira, deve-se à fragilidade

¹ O requisito de luz para a germinação prende-se com a actividade de um sistema dual de fitocromos que regula a resposta à luz durante a germinação e em todo o desenvolvimento da planta, com efeitos antagónicos entre si, codificados pelos loci *PHYA* e *PHYB* [Kwok *et al.*, 1996]; *PHYA* é induzido pelo vermelho longínquo (FR) e inibido pelo vermelho (R), sendo a sua actividade favorecida quando a semente ou planta se encontra debaixo da sombra de outras plantas; uma razão R:FR baixa mantém a quiescência da semente, tal facto interpretando-se como uma estratégia de evitar a sombra. Mutantes deficientes para *PHYA* não têm esta nem outras respostas à razão R:FR.

das plântulas. Se com areia em proporção maioritária talvez não seja necessária nenhuma precaução com a compactação do solo, quando haja turfa ou composto em proporções significativas torna-se fundamental deixar cerca de 1 cm da superfície totalmente desprovido de compressão e finamente peneirado [Lawrence, 1966].

A densidade de sementeira, tendo em conta a competição entre plantas pelos nutrientes e consequente influência no grau de desenvolvimento que elas virão a atingir, é também factor importante a considerar (cf. secção f-iii,1).

A rega mais conveniente, em experiências que não envolvam grandes espaços, é por capilaridade: os recipientes (vasos ou placas de alvéolos) contendo o solo são colocados dentro de tabuleiros com água, deixando que esta penetre por baixo e chegue até à superfície antes mesmo de se semear. A capilaridade tem diversas vantagens: o nível da água no tabuleiro permite controlar a suficiência da água nas raízes, assegura um bom arejamento das raízes e evita alterações na estrutura do solo ou lixiviação por acção da gravidade. Quando se façam grandes sementeiras, em viveiros ou em estufas, o sistema de nebulização programada será talvez o mais vantajoso.

iii. Culturas em agar

As sementes germinam facilmente em agar, e as plantas, dentro de certas condições, podem completar o seu ciclo de vida inteiramente neste substrato. Nomeadamente para caracteres de variação contínua, em cuja análise genética se requer uma redução ao mínimo da componente não-genotípica, verificou-se que a cultura em tubos contendo meio nutritivo com agar oferece uma uniformidade de condições ideal [Griffing & Scholl, 1991]. A produção de sementes, porém, é bastante reduzida quando se compara com as culturas em solo [Rédei, 1975].

Os cuidados de assépsia que prevalecem em trabalhos de microbiologia têm neste caso de ser observados rigorosamente, com autoclavagem do substrato, recipientes e utensílios de manipulação, e realização das manipulações em atmosfera estéril. A eliminação de microrganismos contaminantes das sementes, especialmente quando o agar contenha fontes de carbono orgânicas como sacarose ou glucose, não pode ser dispensada; os protocolos de esterilização da superfície das sementes variam com os autores, alguns empregando hipoclorito, outros misturas de peróxido de hidrogénio com etanol, etc. (cf. apêndice). Só no caso de experiências com mutagénios químicos a esterilização parece ser contraproducente [Rédei, 1969], pelo que o ciclo de vida tem de ser completado em solo.

Dada a enorme importância que este sistema tem para a selecção de mutantes (cf. capítulo 2, secção b-iv), qualquer utilizador da *Arabidopsis thaliana* deve estar preparado para fazer a germinação em agar. Os requisitos de assépsia podem ser razoavelmente aproximados utilizando uma vulgar panela de pressão em vez do autoclave para a esterilização do substrato e restantes materiais, e de um bico de Bunsen para esterilizar a atmosfera¹, pelo que esta técnica não será particularmente difícil de aplicar mesmo em escolas secundárias.

As fórmulas dos meios de cultura em agar, e respectivas referências, encontram-se no apêndice; os nutrientes são minerais, à excepção de 1 – 2 % de sacarose ou glucose; a concentração de agar é bastante crítica, não saindo da gama dos 0,5 a 0,8% (w/v).

¹

Também contribui para a assépsia: borrifar previamente o volume de ar sobre a bancada de trabalho com álcool a 70%; lavar e desinfetar as mãos com etanol a 70%; usar uma bata esterilizada (em panela de pressão); cobrir os cabelos com uma touca; colocar uma máscara de cirurgião para a boca e o nariz.

Caso se façam as sementeiras em placas de Petri e enquanto não se faça o transplante para outro substrato, é importante que sejam colocadas aproximadamente na vertical para orientar o crescimento da raiz e parte aérea correctamente. Schiefelbein & Sommerville [1990] faziam esta reorientação 48 horas após a sementeira.

Também se fazem culturas hidropónicas com *Arabidopsis thaliana*, sendo utilizadas em geral plântulas germinadas em agar cuja cultura é continuada em flutuação no meio nutritivo [Meyerowitz, 1987].

c. Desenvolvimento vegetativo

Ao fim de 7 ou quanto muito (no solo) 10 dias após a sementeira, a maior parte senão todas as plântulas já são visíveis pelo aparecimento dos dois cotilédones verdes que se expandem e abrem perpendicularmente ao hipocótilo, e também da raiz primária (quando a germinação se realiza em agar). As posições de sementeira que por esta altura não dão sinais de germinação (o que no caso do solo pode dever-se à semente ter sido enterrada um pouco abaixo da superfície) são em regra preenchidas de novo com mais sementes devidamente embebidas — se houver, na sequência, duas plântulas a emergir numa posição, isso é fácil de detectar precocemente e de corrigir, removendo uma delas.

i. Morfologia

O desenvolvimento da plântula, a partir da emergência dos cotilédones, passa a depender dos nutrientes e da luz¹; numa primeira fase, o meristema apical caulinar limita-se praticamente a projectar, com grande regularidade temporal, novos primórdios foliares, segundo uma filotáxia que parece ser variável nesta espécie, produzindo-se uma roseta característica; há um progressivo alongamento dos pecíolos e dos limbos, e surgimento de uma nítida serração da margem do limbo nas novas folhas — esta heterofilia parece dever-se ao alargamento do meristema à medida que a planta se desenvolve [Rédei, 1969]. As folhas apresentam tricomas (pelos) ramificados. É raro haver ramificação do caule nesta fase do crescimento, isto é, não se devem observar duas ou mais rosetas associadas a um mesmo sistema radicular.

A raiz é apumada, sem crescimento secundário; o meristema da raiz primária [Scheres *et al.*, 1996] individualiza-se a partir de um primórdio no embrião derivado da célula hipofísea, enquanto os das raízes secundárias se desenvolvem pós-embriónariamente a partir de grupos de células do periciclo que entram em divisão². A genética destes processos de desenvolvimento encontra-se ainda pouco explorada [Scheres *et al.*, 1996].

¹ Existem dois modelos de crescimento na germinação: com luz suficiente, o modelo que funciona por defeito consiste da expansão dos cotilédones, que ficam verdes (processo que neste contexto recebe o nome de fotomorfogénese, por oposição ao de escotomorfogénese ou resposta ao escuro [Kwok *et al.*, 1996]); com luz insuficiente, dá-se o alongamento do hipocótilo, sem expansão cotiledonar nem produção de clorofila (estiolação), fruto da indução de uma bateria de genes repressores da fotomorfogénese (*COP1*, *COP8*, *COP9*, *COP10*, *COP11*, *DET1*, *FUS4*, *FUS5*, *FUS11*, *FUS12*), mas sem interferência com a acção do sistema *PHYA/PHYB*; todos eles foram identificados através de mutantes que não alongavam os hipocótilos no escuro [Kwok *et al.*, 1996]; sabe-se que alguns alvos desta repressão são genes da fotossíntese, nomeadamente *RBCS* (ribulose-5-bifosfato carboxilase subunidade pequena) *CAB* (proteínas que ligam a clorofila a) e *CHS* (chalcone sintetase).

² O gene *ALF4* parece ser necessário à transição que leva as células do periciclo a iniciar os primórdios de raízes laterais [Scheres *et al.*, 1996].

O crescimento radicular orienta-se em resposta a três ordens de estímulos: a gravidade, que leva a um crescimento preferencialmente na vertical e para baixo; a luz, que orienta o crescimento na direcção oposta à sua proveniência; e o toque, que tanto pode ser num grão de areia ou na superfície do agar, e que provoca uma curvatura da ponta da raiz, como que a contornar o que é percebido como um obstáculo¹.

Apesar de não ser uma planta muito susceptível a nemátodes parasitas (*cyst nematodes* em inglês) das raízes, o facto de se ter conseguido adaptar a *Arabidopsis thaliana* à investigação nesta área [Sijmons *et al.*, 1991], constituindo um bom modelo para a dissecção experimental das interacções genéticas com os patógenos, leva a perguntar se não poderá vir a tentar-se o mesmo para o estudo de endomicorrizas, apesar da provável ausência deste tipo de associações em crucíferas [Marschner, 1995].

Do meristema apical caulinar partem todas as folhas da roseta e restantes primórdios, incluindo gemas axilares, da parte aérea. Dado que a morfologia de toda a parte aérea acaba, em última análise, por assentar na fisiologia desta minúscula estrutura, interessa compreender a sua anatomia (figura 1.1). Distinguem-se três regiões no meristema apical caulinar de *Arabidopsis thaliana* [Meyerowitz, 1997]: uma zona central (CZ), com actividade mitótica relativamente reduzida, presumivelmente apenas para continuação da estrutura, uma zona periférica (PZ) com elevada actividade mitótica, donde se formam os primórdios foliares por divisão periclinal, e uma zona basal (sob a CZ e a PZ), onde as divisões celulares são segundo o eixo de crescimento (como nas células proximais dos pró-meristemas radiculares [Scheres *et al.*, 1996]), daí se diferenciando as estruturas da medula, feixes vasculares e córtex².

¹ A intervenção das auxinas no gravitropismo da raiz é mediada pelos *loci* *AXR1* e (também para o gravitropismo do hipocótilo) *AXR2* e *DWF*, cujos mutantes são relativamente insensíveis a estas fitohormonas e, pleiotropicamente, deficientes na resposta gravitrópica; também se reconhecem outros *loci*, *AUX1* e *AGR1*, cuja intervenção na resposta gravitrópica não parece envolver a sinalização por auxinas; a resposta fototrópica das raízes é deficiente em mutantes nos *loci* *RPT1*, *RPT2* e *WAV1*; finalmente, os *loci* *WAV2*, *WAV3* e *WAV4* parecem, através dos padrões anormais de crescimento dos seus mutantes, relacionar-se com o controlo da rotação da raiz quando responde ao toque [Okada & Shimura, 1992]. Os mutantes *axr1*⁻ apresentam um crescimento anormal da parte aérea e do desenvolvimento dos estames, pelo que é um *locus* com expressão em vários tecidos onde actuam as auxinas [Estelle & Somerville, 1987]. Mutantes insensíveis ao etileno, com diversas alterações da morfologia dos cotilédones e hipocótilo durante a germinação, permitiram identificar os genes *ETR*, *EIN1*, *EIN2*, *ETO1* e *HLS1* [Okada & Shimura, 1992]. O gene *RHD6* também responde ao etileno, mas nas raízes, determinando o posicionamento correcto dos primórdios dos pelos radiculares [Dolan & Roberts, 1995].

² O *locus* *STM* favorece a manutenção da proliferação no meristema apical caulinar, inibindo a diferenciação celular, e foi identificado através de mutantes que não constituíam o primórdio deste meristema durante a embriogénese; *CLV1* e *CLV3* regulam o tamanho do meristema, controlando o ritmo das divisões celulares (os mutantes têm meristemas gigantes e, entre outras anomalias, produzem carpelos supranumerários nas flores) [Meyerowitz 1997]. *DIM* [Takahashi *et al.*, 1995] é um gene necessário ao alongamento das células pós-meristemáticas, e os seus mutantes são deficientes na reorganização das microfibrilhas de celulose das paredes, necessária a esse processo, dando plantas anãs células diminutas (algo surpreendentemente, descobriu-se que um segmento de *DIM* tem homologia com um gene humano de função desconhecida que é expresso em mioblastos!). Especificamente para as estruturas derivadas da camada L1 (a mais superficial do meristema) os genes *GL1* e *TTG* complementam-se para a diferenciação dos tricomas na epiderme (pleiotropicamente, *TTG* contribui ainda para a distribuição dos pelos absorventes na epiderme das raízes); também foi identificado um *locus*, *TMM*, que parece regular o espaçamento dos estomas, por um mecanismo de repressão lateral da determinação destas estruturas [Dolan & Roberts, 1995].

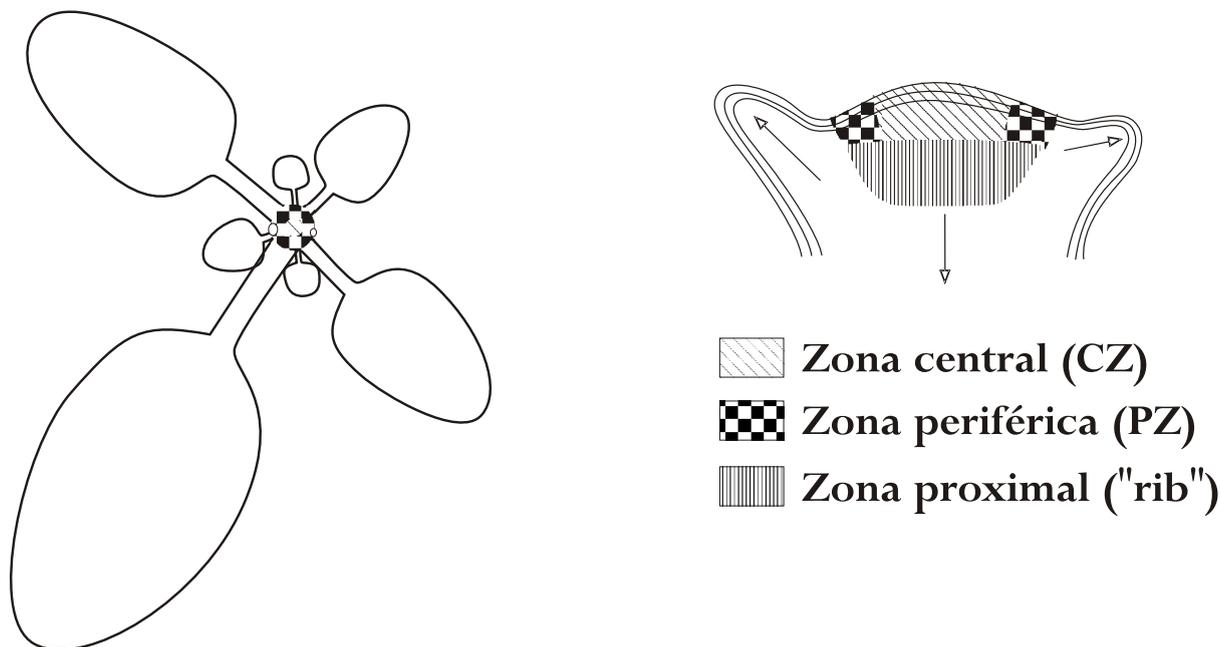


Figura 1.1 — Meristema apical caulinar na fase de desenvolvimento vegetativo de *Arabidopsis thaliana* (fase de roseta). À esquerda, esquema de uma planta vista de topo, com as folhas irradiando do centro onde (fora de escala para melhor se evidenciar) se situa o meristema com as suas zonas central e periférica, e onde se representam dois primórdios foliares. À direita, corte longitudinal atravessando o centro do mesmo meristema, ilustrando a delimitação aproximada das zonas central, periférica e proximal ("rib" em inglês), e onde também se mostra a sua distribuição em relação às duas camadas superficiais da parte aérea (segundo Meyerowitz [1997]). As setas representam as direcções de crescimento a partir da PZ, na formação e desenvolvimento dos primórdios foliares, e a partir da zona proximal, na extensão dos tecidos do córtex e da medula do caule. Em meristemas florais observa-se uma anatomia semelhante.

Também não há crescimento secundário da parte aérea.

ii. Luz, temperatura e controlo de infestações

A luz que se fornece às plantas pode ser um factor determinante não só para o vigor vegetativo que irão desenvolver, mas também para o tempo e quantidade de produção de flores e frutos. Os regimes de luz podem ser: ao ar livre, com a luz solar incidindo de preferência indirectamente; em estufa, com a luz solar por vezes suplementada artificialmente para prolongar o fotoperíodo; ou em câmara de crescimento, com luz artificial fluorescente suplementada com lâmpadas incandescentes (estas últimas contribuindo luz em comprimentos de onda do vermelho longínquo).

A *Arabidopsis thaliana* cresce bem ao ar livre, desde que nas horas de maior intensidade luminosa fique protegida da irradiação directa; a colocação das plantas deve ser de tal maneira, perto de um canto formado por duas paredes ou sob uma pala, de modo a que a só recebam luz solar directa no início ou no fim do dia; em sendo observado este cuidado, pode dizer-se que a luz nas condições de Portugal não constitui qualquer problema e que as plantas suportam bem variações entre dias enevoados e dias límpidos, seja de Verão ou de Inverno (assume-se, nesta afirmação, que as restantes condições de crescimento não são de modo a implicarem *stress* para as plantas). Uma medição realizada em

29 de Agosto de 1995¹, num dia de céu limpo, deu um máximo de 325 $\mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ recebido pelas plantas (que não pareciam dar sinais de excesso ou falta de luz) em penumbra e através de uma rede protectora de plástico de cor branca, até ao momento, cerca das 19 horas, em que a luz solar passou a incidir directamente (passou a 700 $\mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, mas declinando rapidamente). Quanto à luz artificial, parece dever ficar no intervalo entre os 100 e os 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ [Estelle & Sommerville, 1987; Putterill *et al.*, 1995].

O fotoperíodo utilizado tem grande importância no controlo do desenvolvimento (cf. secção d-ii). Dado que com a *Arabidopsis thaliana* um fotoperíodo curto (por exemplo 8 horas de luz por cada 24 horas) não é propício ao desenvolvimento das inflorescências, mesmo que já se tenha dado a transição para a fase reprodutora, pode nessas condições maximizar-se o crescimento estritamente vegetativo; com este retardamento do desenvolvimento reprodutivo, as plantas continuam (se bem que não indefinidamente) a desenvolver-se vegetativamente, pela expansão das folhas da roseta e prolongamento e ramificação das raízes.

A temperatura considerada ideal para o crescimento em laboratório da *Arabidopsis thaliana* situa-se entre os 22 e os 25 °C. É frequente, em câmaras de crescimento, baixar-se a temperatura em 2 a 4 °C durante o período nocturno (por exemplo 22 °C de dia com 70% de humidade relativa e 18 °C de noite com 80%, usando fotoperíodo longo [Antonovics, 1973]). Esta margem de temperatura define-se pela maior velocidade de crescimento atingida, por isso deduz-se que temperaturas mais elevadas ou mais baixas reduzem o crescimento. Estes limites foram definidos em génotipos provenientes da Europa Central, e é conhecida a sensibilidade de alguns desses génotipos a temperaturas da ordem dos 30 °C, que em certos casos são análogas a mutantes sensíveis à temperatura que recuperam o crescimento normal por suplementação com nutrientes orgânicos [Griffing & Scholl, 1991; Rédei, 1969]. Dada a larga distribuição desta espécie [Kranz, 1976], inclusivamente nas regiões mediterrânicas, é possível que as condições geralmente tidas como “óptimas” tenham de ser verificados com amostras de outras proveniências com climas bastante diferentes.

Se o crescimento é feito em agar, dado que se faz em compartimentos isolados (tubos ou placas de Petri), coloca-se o problema da temperatura no interior dos mesmos, que pode elevar-se muito.

Tanto ao ar livre como em estufa a presença de outros organismos é inevitável: algas, musgos e fungos são comuns, mas estes últimos podem ser patogénicos e, pelo menos em estufa, têm de ser controlados com fungicidas; a maior ameaça para as culturas de *Arabidopsis thaliana*, porém, está nos insectos, e acima de tudo os afídeos, que nas culturas ao ar livre são presença certa a partir da Primavera. Outras presenças indesejáveis são larvas de insectos, que podem devorar dezenas de plantas cada uma. A solução adoptada por um viveiro para a eliminação de insectos [comunicação pessoal de George Coupland, John Innes Centre, Norwich] é a fumigação periódica com nicotina.

iii. Nutrientes e densidade de sementeira

A *Arabidopsis thaliana* adapta-se a praticamente qualquer regime nutritivo, seja ele pobre ou rico, para conseguir completar o seu ciclo de vida com a produção de algumas sementes pelo menos [Sroka, 1967]. Mas é também em

¹ As unidades SI são $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ou $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$, nem sempre sendo possível converter exactamente de unidades como lux, $\mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ou $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. O autor cinge-se em cada caso às informações disponíveis da literatura ou do aparelho utilizado.

resposta à nutrição disponível que esta planta exhibe o máximo da sua plasticidade fenotípica em todos os seus caracteres [Pigliucci *et al.*, 1995]. Se por exemplo o experimentador quiser obter 10000 sementes por planta, o que se diz ser possível cultivando em solo [Meyerowitz, 1987], terá de saber otimizar, além das condições de luz e temperatura, a nutrição mineral.

Em primeiro lugar, a disponibilidade dos nutrientes implica limites à densidade de sementeira; por outras palavras, o factor densidade é tanto mais importante quanto mais pobre for o substrato [Myerscough & Marshall, 1967], o que até pode ser explorado na utilização de *Arabidopsis thaliana* como bioindicador. Embora seja possível semear até 10 indivíduos por cm^2 , os espaçamentos de 5 cm são o recomendado para culturas em solo [Lawrence, 1966]. Mesmo que se pretenda compensar o efeito de uma maior densidade por suplementação do solo com nutrientes, há que contar ainda com outro limite, que é o da sombra de uns indivíduos sobre os outros.

É de admitir que vários laboratórios a trabalhar regularmente com *Arabidopsis thaliana* tiveram de passar algum tempo a testar diferentes combinações de substratos até conseguirem chegar a uma que satisfizesse as necessidades que tinham de rendimento e reprodutibilidade. Em lugar de recomendar-se uma receita baseada em produtos que se possam encontrar disponíveis comercialmente em Portugal, visto que não foram testados, é preferível formular algumas sugestões gerais quanto à sua escolha: a areia, quando devidamente tratada ([Myerscough & Marshall, 1967]; cf. terceiro capítulo, secção a), constitui sempre um substrato adequado, mesmo que relativamente pobre. A suplementação da areia com soluções nutritivas é uma possibilidade óbvia [Myerscough & Marshall, 1967], mas que se pode revelar muito trabalhosa se exigir vários adiconamentos ao longo de uma experiência, para além dos riscos de hiperosmolaridade; pode ter como alternativa vantajosa a intercalação de uma camada de granulado nutritivo perto da base do recipiente para o substrato, a qual se vai libertando progressivamente com o movimento de capilaridade da água de rega. A suplementação com composto, turfa ou solo tem a desvantagem de poder ser menos reprodutível, mas pode ser mais benéfica para as plantas e será do maior interesse na utilização da *Arabidopsis thaliana* como organismo bio-indicador.

Quanto à estrutura do substrato, a figura 1.2 ilustra o que parece ser o consenso para a cultura de *Arabidopsis thaliana* [Lawrence, 1966; Cetl *et al.*, 1970].

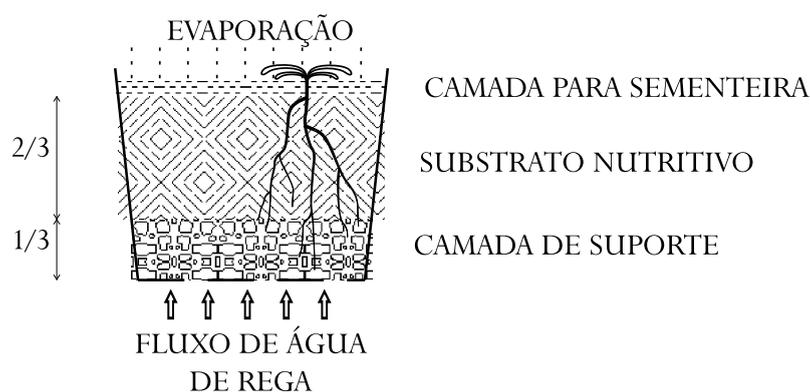


Figura 1.2 — Esquema da estrutura do solo a utilizar em culturas de *Arabidopsis thaliana*. A camada de sementeira deve ter até 1 cm de espessura, ser totalmente livre de compactação, e finamente peneirada; a camada intermédia (substrato nutritivo) deve corresponder a 2/3 do restante (por exemplo 4 cm, ou 10 cm), ficando 1/3 para a camada de suporte, por exemplo cascalho (respectivamente, 2 ou 5 cm).

d. Desenvolvimento dos eixos florais

Neste trabalho o termo indução floral designa uma mudança no padrão de crescimento da parte aérea, em que cessa a formação de novas folhas na roseta e o eixo do caule irá prolongar-se e ramificar-se para servir de suporte a uma ou mais inflorescências. O termo inglês usado para esta transição é *bolting* (um dos significados do verbo *to bolt* é endireitar), pois resulta num crescimento na vertical do caule e suas ramificações.

i. Morfologia

A partir da indução floral, o comportamento do meristema apical caulinar, se bem que com a mesma estrutura interna, resulta numa morfologia marcadamente diferente da parte aérea: os entrenós passam a ser muito mais longos, cada nó produz uma folha apiciolada e uma gema axilar, e o número de nós é limitado; depois do último nó foliar inicia-se uma inflorescência em cacho simples, sem brácteas, de tipo indeterminado e acropétala (isto é, a ordem de maturação das flores, centrípeta, começa na mais antiga, junto à última gema axilar, e continua no sentido do ápice) [Gola *et al.*, 1959]. A figura 1.3 esquematiza uma planta nesta fase.

Cada gema axilar, por sua vez, pode também desenvolver pelo menos um eixo que recapitula todo este processo, inclusivamente produzindo uma ou mais gemas axilares (figura 1.4) — a ramificação do caule é, assim, também indeterminada¹.

¹

A resposta à sombra, mediada pela indução do gene *PHYA*, traduz-se também nesta fase do desenvolvimento por uma menor ramificação do caule e aceleração da floração, interpretável como uma estratégia “altruísta” de encerramento do ciclo de vida, na impossibilidade de atingir um maior desenvolvimento vegetativo [Callahan *et al.*, 1997]. O crescimento indeterminado dos eixos florais é mantido pela actividade do já referido locus *TFL*, que inibe a expressão de *LFY* e de outro iniciador das inflorescências, *API*, no meristema apical caulinar; pelo contrário, a actividade do gene *AG*, para além de participar na determinação dos estames e carpelos das flores, implica a cessação da CZ do meristema, como o sugerem os mutantes *ag⁻*, cujas flores são aparentemente indeterminadas, com várias repetições de sépalas-pétalas-pétalas [Meyerowitz, 1997].

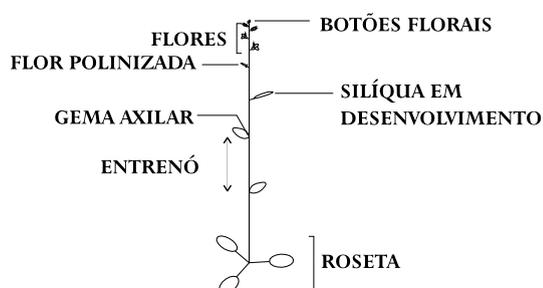


Figura 1.3 — Esquema de uma *Arabidopsis thaliana* nas primeiras fases de desenvolvimento do eixo floral principal.

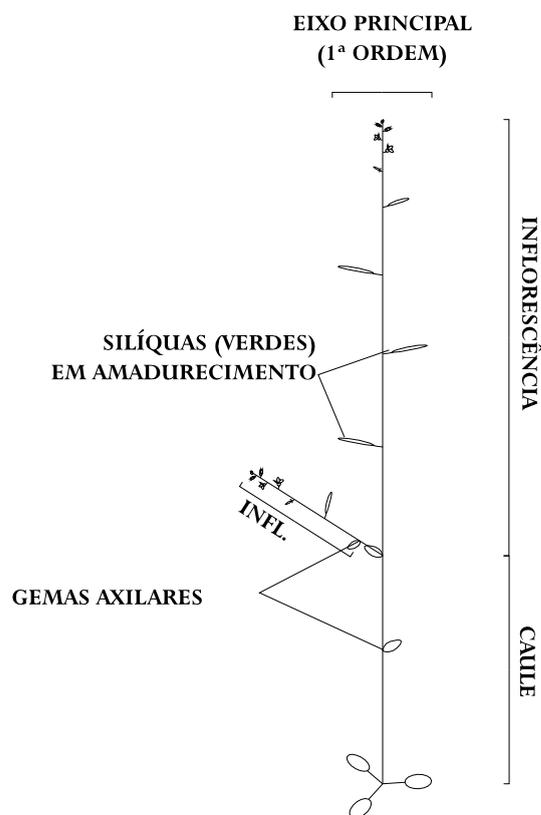


Figura 1.4 — Esquema da mesma planta da figura 1.3 numa fase de desenvolvimento posterior, já com uma ramificação desenvolvida.

O momento da transição do crescimento em roseta para o crescimento vertical é uma característica importante para o estudo da variação em *Arabidopsis thaliana* (cf. segundo capítulo, secção a). Nas formas de floração precoce (cf. secção seguinte), esta transição é prontamente assinalada pela presença de um botão no centro da roseta que, com fotoperíodo longo, em poucos dias deverá começar a subir por alongamento dos entrenós do caule; nas formas de floração tardia, essa transição pode ser muito anterior ao alongamento do caule, sendo considerado mais rigoroso observar directamente os primórdios florais (que se evidenciam por serem mais redondos e pálidos que os foliares) para confirmara a passagem para a fase reprodutiva em cada planta [Cetl *et al.*, 1970].

A filotáxia da inserção das folhas e flores parece não seguir um padrão uniforme para a espécie [discussão em Müller, 1965].

ii. Sinais para o início do desenvolvimento dos eixos florais

A *Arabidopsis thaliana* é uma espécie de dia longo facultativo, isto é, na natureza o crescimento na vertical inicia-se quando o período de escuro dura menos de 12 horas, mas esta limitação parece não ser rígida: se se mantiver a planta com fotoperíodo curto (por exemplo 8 horas de luz por cada 24 horas) ela levará mais tempo a iniciar este

crescimento, mas acaba por fazê-lo.

Quando se disponha de uma câmara de crescimento, e se pretenda um ciclo de desenvolvimento e reprodução rápido, o melhor regime é a iluminação contínua [Antonovics, 1973; Cetl 1965]. Nas condições de Portugal, quando a cultura seja feita ao ar livre ou se, dentro de uma estufa, não houver suplementação da luz natural, as sementeiras têm de ser feitas entre a Primavera ou meio do Verão, para que as plantas possam florescer ainda com fotoperíodo longo; senão, podem só produzir flores na Primavera seguinte.

No sentido de se poder controlar a época em que as plantas iniciam o crescimento vertical é também necessário conhecer as características das plantas com que se trabalha, em termos de indução e desenvolvimento dos eixos florais, que nesta espécie variam muito entre populações (cf. segundo capítulo, secção a). Em particular, há proveniências que requerem um período de vernalização, ou seja de permanência a temperaturas baixas. Sem vernalização, o tempo para a indução floral, mesmo que com fotoperíodo longo, pode variar entre 3 a 4 semanas (floração precoce) e cerca de 6 meses (floração tardia) após a sementeira [Napp-Zinn, 1976]; com vernalização, as plantas de floração tardia podem florir muito mais precocemente [Ratcliffe, 1965; Kranz, 1976], o que em termos de utilização laboratorial pode ser muito importante, não só em termos do tempo dispendido mas também para facilitar a comparação com plantas de floração precoce.

A vernalização requer, para que se dê uma indução floral precoce, temperaturas perto do ponto de congelação (em termos experimentais, pois ecologicamente admite-se que até aos 10 ou mesmo 15 °C serão efectivos [Ratcliffe, 1965]) e fotoperíodo curto [Laibach, 1965]; as fases de desenvolvimento onde tem de ser aplicada correspondem à semente em germinação (cf. secção b-i) ou então só a partir dos 15 a 20 dias após a germinação [Rédei, 1969]. Concluída a vernalização, que pode ter de durar 3 semanas ou até mais [Cetl *et al.*, 1970; ver também Ratcliffe, 1965], as plantas são colocadas à temperatura ambiente e mantidas em fotoperíodo longo para produzirem flores precocemente. Se tal não acontecer (vernalização insuficiente), pode tentar compensar-se com alta intensidade luminosa ou com aplicação de cinetina [Rédei, 1969].

- iii. Correlação entre o desenvolvimento da roseta e o momento de transição para a fase reprodutiva

O número de folhas da roseta, dentro das mesmas condições ambientais e com o mesmo genótipo, depende do tempo que medeia entre a germinação e a indução floral, mas cada folha da roseta continua a desenvolver-se mesmo depois de terem sido acrescentadas outras folhas novas. Pode dizer-se que a assimilação pela planta a partir da indução floral depende do desenvolvimento da parte vegetativa: indivíduos com floração retardada, seja porque foram cultivados em fotoperíodo curto seja porque têm certas mutações, mostram um crescimento vertical muito vigoroso, e um maior número de flores que o normal [Rédei, 1969; Coupland, 1995]¹.

Experiências de competição (em condições de estufa) entre os mutantes de floração tardia, nos *loci* *GI*, *CO* e *LD* e

¹ Os mutantes nos *loci* *GI*, *CO* e *LD* têm um atraso da floração em dias longos, mas quando se aplica no meristema apical caulinar o antimetabolito 5-bromodesoxiuridina (BrdU), que retarda transientemente a actividade mitótica nesta estrutura, têm um comportamento normal [Rédei 1975]; *CO* é responsável pela indução do *locus* *LFY*, que participa na iniciação da inflorescência [Simon *et al.*, 1996].

indivíduos normais mostraram a possibilidade de um maior *fitness* destes mutantes [Rédei, 1969], mas as características de muitas populações naturais, que têm floração precoce (cf. segundo capítulo, secção a) levam a colocar alguma precaução neste resultado: as condições naturais nem sempre favorecem fenótipos de floração tardia, apesar do seu vigor vegetativo ser previsivelmente maior. Acrescente-se que, apesar de haver uma correlação positiva entre o tempo de transição para o crescimento vertical e o número de folhas da roseta, o número de frutos em plantas de floração tardia pode ser mais reduzido [Pigliucci & Schlichting, 1995].

e. Polinização

Embora tecnicamente não seja fácil, a polinização cruzada em *Arabidopsis thaliana* figura obrigatoriamente entre as manipulações desta planta que é importante dominar. Procurar-se-ão transmitir neste capítulo as recomendações dos que a praticam por rotina e juntar algumas observações próprias.

i. Morfologia da flor

As flores de *Arabidopsis thaliana* são, como as das crucíferas em geral (figura 1.5)¹, constituídas por 4 sépalas verdes, alternando radialmente com 4 pétalas brancas, 6 estames (2 dos quais mais curtos) com antera e pólen amarelos, e 2 carpelos cujos estigmas estão fundidos e exibem, na altura da receptividade, pelos transparentes relativamente longos, a formar uma estrutura em “escova”. Nessa altura, uma flor de *Arabidopsis thaliana* tem aproximadamente 2,5 mm de comprimento desde a base do cálice [Antonovics, 1973].

ii. Desenvolvimento da flor e procedimento para a polinização artificial

(1) Inflorescência

Ao longo do eixo de cada inflorescência há flores em sucessivos estádios de desenvolvimento, pelo que em qualquer momento da fase reprodutiva de uma planta é possível encontrar uma ou mais flores em cada inflorescência que

¹ Os loci *AP2*, *AP3*, *PI* e *AG* são, conjuntamente, os responsáveis pela determinação da identidade dos órgãos florais (figura 1.5). A expressão de *AG* abrange o círculo central do meristema floral e é circundada pela zona de expressão de *AP2*, com o qual não se sobrepõe; formando uma coroa intermédia, que se sobrepõe parcialmente às duas áreas definidas pela expressão de *AP2* e *AG*, está a expressão de *AP3* e *PI*. Correlacionando os fenótipos dos mutantes em cada um destes loci com esta distribuição da expressão dos quatro genes, concluiu-se que, da periferia para o centro, e por ordem cronológica na ontogenia, *AP2* sozinho determina as sépalas, *AP2* + *AP3* + *PI* determinam as pétalas, *AP3* + *PI* + *AG* determinam os estames, e *AG* sozinho determina os carpelos. *AG* também suprime o crescimento indeterminado do meristema floral (cf. secção d-i). Mutações nestes loci resultam em alterações na identidade dos órgãos florais, e por isso se diz que estes genes são homeóticos: por exemplo os fenótipos *ap2*⁻, caracterizam-se por duas coroas simétricas de estames e carpelos (estes na periferia e no centro), pois verifica-se que a expressão de *AG* passa a alargar-se à zona de expressão de *AP2*; no caso dos *ap3*⁻, há duas coroas de sépalas e duas de carpelos. Já o espaçamento entre os primórdios florais (mas não vegetativos) é determinado pelo locus *PAN*, reconhecido através de mutantes com pétalas em excesso (todas as referências relevantes a estes genes estão revistas por Meyerowitz [1997]).

estejam em condições para remoção das anteras (emasculação) e subsequente polinização¹. As restantes flores, que deverão ficar auto-polinizadas, não têm de ser removidas após a polinização, pois a ordem das flores nas inflorescências não se altera e a posição das flores manipuladas pode ser registada sem ambiguidades.

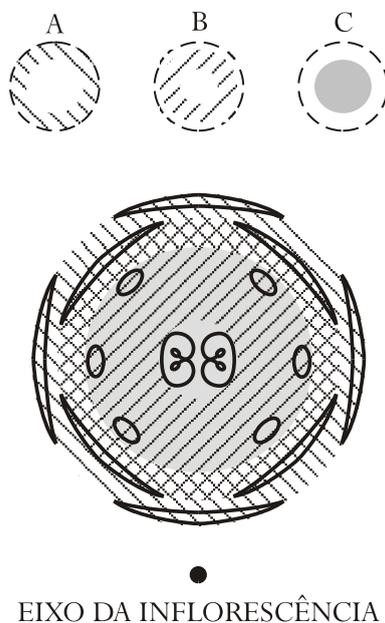


Figura 1.5 — Diagrama floral (traço grosso) e modelo «ABC» (*vide* texto) de determinação dos órgãos florais a partir do meristema floral. O círculo a tracejado define o limite do meristema floral para melhor situar a localização dos mRNAs de cada gene. A = $AP2$, B = $AP3 + PI$, C = AG .

(2) *Emasculação*

O desenvolvimento da flor é ligeiramente protogínico, ou seja, o gineceu adianta-se no seu crescimento ao longo do eixo da flor em relação ao androceu [Antonovics, 1973; Estelle & Sommerville, 1987]; posteriormente, com a corola bem aberta, já os estames atingiram o estigma e as flores encontram-se auto-polinizadas. A ântese dá-se ainda antes dos estames mais compridos alcançarem o estigma, e essa etapa marca o último estágio do desenvolvimento da flor em que é possível obviar a autopolinização por remoção das anteras. Identifica-se esta fase a olho nu pelo facto de as pétalas já serem mais compridas que as sépalas (a flor tem 2 mm de comprimento), mas não o suficiente para que a corola se encontre totalmente aberta, antes continuando as pétalas paralelas ao eixo de simetria da flor. Em fases mais precoces, dado que a flor é (ainda) mais pequena e porque as sépalas ainda encerram por completo os estames, é mais

¹ O locus *ER* está envolvido em diversos aspectos do crescimento das inflorescências, sendo o mutante induzido por Rédei (numa linha Landsberg, cf. terceiro capítulo, secção a) caracterizado por uma disposição anormal das flores na inflorescência, presumivelmente por deficiência do crescimento do eixo que as suporta: uma imagem característica deste mutante é a aglomeração de botões florais, flores e frutos no topo da inflorescência. A maior rigidez dos eixos florais está na origem do nome erecta dado a este fenótipo, mas a expressão desta mutação observa-se na morfologia de várias outras estruturas (por exemplo, pedicelos e frutos curtos). Esta linha (abreviadamente designada Ler) tornou-se talvez no principal *background* para a indução de mutações (cf. segundo capítulo, secção b), pela conveniência de efectuar as polinizações neste tipo “compacto” de inflorescência.

difícil de manipular. No entanto, como também há flores numa fase em que o estigma chega a projectar-se além dos limites das sépalas, também é possível realizar-se a polinização prévia à ântese sem danificar as flores e até sem emasculá-las. Nesse caso, recobrando-se completamente o estigma com o pólen do parceiro de cruzamento, a possibilidade de autopolinização pode ser diminuta [Antonovics, 1973].

A emasculação pode ser feita com o auxílio de uma lupa binocular, mas é frequente as inflorescências crescerem a uma altura que já não podem ser focadas por este instrumento. Uma lupa de mão em posição fixa ou um óculo de relojoeiro (5 - 10×) são geralmente preferíveis. Em qualquer caso, é indispensável uma iluminação suplementar das flores para realizar a operação.

Segura-se a flor que se escolheu para emasculiar entre o polegar e o indicador de uma mão, enquanto com a outra mão as anteras são removidas com uma pinça ou uma tesoura microcirúrgica. Qualquer dano ao gineceu, à corola ou ao cálice, mesmo que se trate dum leve quebra de uma das peças florais de protecção, pode comprometer o êxito da polinização — esta é uma tarefa que requer bastante prática para começar a dar resultado por rotina.

Alternativamente, pode construir-se um dispositivo de sucção dos estames para um tubo de calibre adequado, accionado pelo operador por intermédio de um pedal eléctrico [Rédei, 1969].

Segundo parece, com suficiente treino e perícia chegam a poder executar-se 20 a 30 polinizações artificiais por hora [Estelle & Sommerville, 1986]. As flores polinizadas após emasculação podem dar cerca de 20 sementes híbridas cada uma, pelo que na maior parte das circunstâncias apenas algumas flores terão de ser polinizadas para conseguir-se uma F_1 suficientemente grande. Se se pretenderem grandes números de semente híbrida — mas abdicando da possibilidade de cruzamentos recíprocos — então é preferível recorrer a mutantes que facilitam a polinização cruzada, nomeadamente a do mutante “as” (*asymmetric rosette leaves*), que desenvolve o gineceu prematuramente, alguns dias antes da ântese [Barabas & Rédei, 1971]. Actualmente são preferidos os mutantes “ms” (*male sterile*) que têm tão pouco pólen, ou mesmo nenhum, que só se reproduzem quando polinizados artificialmente [Antonovics, 1973; Estelle & Sommerville, 1986].

(3) Colheita e aplicação do pólen

O pólen, que não é particularmente abundante, deve ser obtido de flores plenamente desenvolvidas (corolas abertas) e recolhido num pequeno quadrado de papel, que se dobra ao longo da diagonal de modo a formar um vértice que se direcciona para o estigma. Alternativamente, usa-se um pincel para realizar a transferência do pólen recolhido para o estigma.

(4) Prática dos cruzamentos

A emasculação requer que as sementeiras tenham sido feitas em pequenos vasos (ou caixas rasas, se isso melhorar as possibilidades de utilizar uma lupa binocular para a polinização), de preferência com uma planta cada. Dependendo do número de tentativas que se considera necessário, assim se dimensiona o número de plantas a preparar.

Se se pretenderem fazer cruzamentos recíprocos, para a detecção (ou rejeição) de efeitos maternos ou hereditariedade citoplásmica, ambos os génotipos a cruzar terão de ser emasculados.

Os pólenes, dado que esta planta produz pouca quantidade, serão preferencialmente colectados de culturas em massa

feitas à parte (não necessariamente em simultâneo com as dos parceiros de cruzamento, mas neste caso deverão ser conservados no frigorífico ou no congelador).

A auto-polinização na própria flor que se emasculou é uma possibilidade, pelo que os progenitores têm de estar marcados geneticamente, tal que o feminino seja homocigótico para um alelo recessivo em relação ao alelo que provém do pólen: deste modo, só as verdadeiras F_1 (derivadas do pólen transmitido artificialmente) apresentarão o fenótipo dominante, distinguindo-se das plantas resultantes de autopolinização apresentadoras do fenótipo recessivo. É sempre de contar com uma percentagem de falsas F_1 , por isso a vantagem de um reconhecimento precoce do fenótipo materno na descendência deve guiar a escolha da mutação marcador.

O retrocruzamento da F_1 , polinizando-a com o pólen do genótipo materno, acarreta trabalho de cruzamentos desnecessário, pois a F_2 obtida por autopolinização é fácil de obter e em grandes quantidades; quando se está a analisar a segregação de um fenótipo mutante induzido, o retrocruzamento tem a desvantagem de não permitir observar a segregação de outros genes que possam ter sido mudados em simultâneo com o que se estuda [Last & Fink, 1988].

f. Frutos

Uma vez polinizadas as flores, o primeiro sinal do desenvolvimento dos frutos é o alongamento do gineceu, antes mesmo da senescência dos restantes órgãos florais. Este crescimento prolonga-se até uma extensão para lá de 1 cm, produzindo-se uma silíqua verde, e ligeiramente encurvada, que ao fim de 2 semanas pós-polinização começa a amadurecer. As sementes estão maduras (e eventualmente em dormência) quando a silíqua está totalmente seca — a qual se abre espontaneamente ao mais leve toque, para as libertar.

i. Morfologia

Conforme à anatomia do ovário [Sessions & Zambryski, 1995], o fruto é biloculado com um septo mediano (chamado replo), resultante da fusão das margens desses carpelos (figura 1.6). As sementes, de inserção parietal nas margens dos lóculos, ficam por isso ligadas ao septo enquanto se desenvolvem e amadurecem¹.

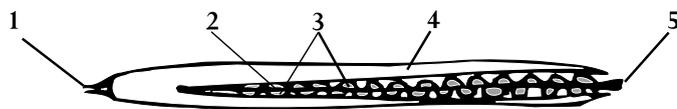


Figura 1.6 — Silíqua madura. Desenho segundo ilustrações em Sessions & Zambryski [1995]. 1, pedicelo; 2, replo; 3, sementes (acinzentado); 4, valva; 5, vestígio do estigma.

ii. Colheita das sementes

Como já referido anteriormente (cf. secção b-i), caso se pretenda evitar que as sementes entrem em dormência, é importante colhê-las antes do amadurecimento final dos frutos, por exemplo quando começam a transitar do verde para o amarelado e o tegumento das sementes ainda é relativamente descolorido; é necessário bastante cuidado na

¹ Diversos alelos mutantes do *locus ETT* [Sessions & Zambryski, 1995] caracterizam-se por alterações na construção do gineceu (e desenvolvimento da silíqua, quando não sejam estéreis), atribuíveis a erros na coordenação da informação posicional *sensu* Wolpert dentro do carpelo entre ovário, estilete e estigma, e entre os dois lóculos, etc..

manipulação destes embriões, e a sua sementeira tem de ser imediata.

Quando se fazem sementeiras densas, e principalmente pela tendência dos eixos florais para se ramificarem e encurvarem, é bastante provável que estes se entrelacem de tal maneira que a colheita das síliquas uma a uma seja complicada e morosa. Mas devem ser poucas as situações, como quando se pretende a colheita de sementes antes da maturação, em que colher uma a uma seja necessário — há meios expeditos de fazer colheitas em conjunto: cessando-se a rega, as plantas secam em poucas semanas (em geral completando a maturação das sementes), para em seguida poderem cortar-se os eixos florais pela base, separando-os das rosetas, e transferirem-se todos os frutos presentes nesse emaranhado para uma folha de papel suficientemente grande (tanto a operação de corte como a de transferência implicam algum cuidado para que se minimize a queda de sementes); o papel é em seguida enrolado à volta dos eixos florais, o que permite a recolha da maior parte das sementes, que são finalmente separadas do resto do material vegetal passando-as por um crivo (ou um vulgar passador) com cerca de 1 mm de malha.

Quando se pretendem individualizar as descendências de cada planta, seja para contagem de letais (cf. segundo capítulo, secção b-iii) ou para análise de segregações, então as plantas têm de estar completamente separadas entre si, ou por espaçamento ou por sementeira individual em vasos. Feenstra [1967] verificou que a protecção lateral dos eixos florais, com uma manga de polietileno, faz com que quase não se percam sementes — sem dúvida porque as protege das deslocções de ar. Mal comece a aparecer a primeira flor do eixo principal, um tripé de 30 cm de altura por 7 cm de lado é enterrado em redor da planta, sendo-lhe fixada a manga com clips, deixando um espaço de arejamento rente ao solo, eventualmente suplementado de pequenos orifícios a 5 cm do solo. Na altura da colheita soltam-se os clips, corta-se a base dos eixos florais, sela-se a manga apertando-a a essa base, em seguida pressionando-a lateralmente para soltar as sementes, analogamente ao descrito acima. O problema deste processo, em estufa pelo menos, é a dificuldade acrescida em combater os afídeos e outros insectos. Existe uma variante deste procedimento (“pods-a-plenty”), usando garrafas de plástico de 1.5 litros fixadas à margem dos vasos [www1/4].

iii. Factores determinantes da produção de sementes

(1) *Factores ambientais*

Vários estudos, alguns dos quais bastante detalhados, [Pigliucci *et al.*, 1995], identificaram o nível de nutrientes, em comparação com o de rega ou de iluminação, como o factor que mais distintamente influencia a produção de sementes. A nutrição das plantas influencia nomeadamente a ramificação do caule e conseqüente número de inflorescências, entre outros caracteres [Pigliucci & Schlichting, 1995].

Se é importante obter muitas sementes por planta, a sementeira deve fazer-se em solo; o espaçamento dado e a riqueza nutritiva do substrato devem ser tais que providenciam o máximo de crescimento das plantas — eventualmente amplificado por regimes de fotoperíodo e temperatura que adiem a floração para que a roseta atinja grandes dimensões. Uma vez induzida a floração, o fotoperíodo deve ser longo, a temperatura próxima dos 25 °C e os nutrientes disponíveis suficientes para suprir as vigorosas plantas que se desenvolveram. Meyerowitz [1987] refere que em condições adequadas uma só planta produz frutos quase indefinidamente, sendo possível chegar-se às 10000 e mesmo às 50000 sementes por indivíduo.

(2) *Factores genéticos*

Em heterozigóticos produzidos por polinização cruzada entre linhas homozigóticas de *Arabidopsis thaliana* [Cetl, 1987], o número de sementes é a característica onde mais fortemente se expressa a heterose; em contraste, as características temporais (número de dias desde a germinação até ao primórdio floral, etc., até à maturação da primeira silíqua, assim como o correlato número de folhas na roseta) mantém-se inalterada nos heterozigóticos. É assim de esperar que, quando se realizem cruzamentos entre progenitores de *backgrounds* genéticos diferentes, as F_1 produzam mais sementes (talvez para cima do dobro, segundo os dados desse estudo) que os respectivos progenitores crescendo em paralelo e nas mesmas condições. Quando se trate de cruzamentos entre linhas puras com o mesmo *background* (por exemplo entre um mutante homozigótico e a linha onde foi induzida a mutação) tal efeito de heterose deverá ser mais a excepção do que a regra, embora o trabalho de Cetl [1987] indicasse a possibilidade de sobredominância num *locus* ser determinante dessa heterose — por isso, quando se verifique esse efeito num heterozigótico contendo essa nova mutação, é importante estar alerta para a eventualidade no sentido de ser submetida à análise genética.

A VARIAÇÃO GENÉTICA EM *ARABIDOPSIS THALIANA*

g. Populações naturais

Desde há décadas que se reconhece na *Arabidopsis thaliana* uma notória diversidade natural no que concerne aos tempos de floração, à qual se atribui grande parte da capacidade desta espécie de colonizar os mais diversos habitats, desde a Noruega até ao arquipélago de Cabo Verde, do planalto do Pamir à Alemanha e à Líbia [Rédei, 1969]. O facto de ser uma planta autógâmica levaria a supor que cada população seja constituída por apenas algumas linhas puras, ou mesmo ser virtualmente isogénica. Porém, a realidade não parece ser essa: amostragens relativamente abrangentes revelaram que numa determinada população pode existir heterogeneidade genética e que uma larga proporção dos indivíduos dão descendências marcadamente heterogéneas também [Cetl, 1965, 1987; Karbe & Röbbelen, 1968; Napp-Zinn, 1976; Kranz, 1976]. Tal deve-se provavelmente a situações de polimorfismo equilibrado, isto é, à manutenção de uma proporção significativa de heterozigóticos em diversos *loci* na população, por vantagem em relação aos homozigóticos (heterose) [Kranz, 1976; Usmanov *et al.*, 1978; Cetl, 1987]; a tendência para o polimorfismo é um pouco facilitada pela polinização cruzada [Cetl, 1987], provavelmente mediada por insectos, que se pode presumir atingir mais de 2% em populações naturais [Lawrence & Snape, 1971].

i. A floração e a dormência na adaptação aos habitats

A *Arabidopsis thaliana* é considerada, em função da sua localização predominante, uma espécie europeia, mas certos autores vêem o seu centro de origem nas regiões do Afeganistão, Tadjiquistão, e cordilheira dos Himalaias, onde ocorrem muitas das outras espécies do mesmo género [Rédei, 1969]. Em todo o caso, a sua diversificação fisiológica na Europa e costa norte de África tem levado à sua utilização como modelo de adaptação ecológica para muitas espécies anuais com distribuição semelhante [Ratcliffe, 1965].

Segundo Laibach [1965], as espécies anuais são classificadas em anuais de inverno que se desenvolvem vegetativamente durante o outono e inverno para florirem na primavera, e anuais de verão que só germinam depois de passarem o inverno como sementes. Na *Arabidopsis thaliana* há populações de inverno assim como as há de verão, o que se considera reflectir o potencial adaptativo da espécie a diversos climas, solos e fitocenoses; o reconhecimento precoce desta variação levou a que as colecções de germoplasma tivessem sempre sido caracterizadas não só em termos de morfologia como também de tempo de floração [Rédei, 1969; Röbbelen, 1965]. O comportamento sazonal da *Arabidopsis thaliana* na Inglaterra central é paralelo ao de outras plantas anuais, o que não só indica uma convergência fisiológica entre diferentes espécies, mas acima de tudo sugere que os caracteres determinantes da época de germinação e de floração podem ter uma forte correlação com a adaptação geográfica [Ratcliffe, 1965]. Em conformidade, Ratcliffe procurou estabelecer uma classificação para as populações europeias e da bacia mediterrânica, subordinando-as às regiões climáticas correspondentes. Segundo as temperaturas e regime de chuvas, assim em cada população prevaleceriam os genótipos que germinem e floresçam nas épocas mais propícias à permanência dessas populações. Deste modo, Ratcliffe [1965] definiu 4 classes de populações de *Arabidopsis thaliana* segundo a localização geográfica e postulou os padrões de dormência das sementes e indução floral mais adequados

(tabela 2.1):

Tabela 2.1 — Características climáticas e adaptação fisiológica correspondente em *Arabidopsis thaliana*, segundo Ratcliffe [1965]

Populações	Pluv. máx	Temp.inv.	Temp.verão	Germinação	Vernal.*	Dormência*
mediterrânicas	inverno	frio	elevada	outono	±?	??
atlânticas	inverno	frio	moderada	outono	+	provável
nórdicas	(uniforme)	muito frio	fresca	out./fim inv.	++	??
continentais	verão	muito frio	elevada	primavera	-	variável

* note-se a indefinição quanto à classe mediterrânica

Esta classificação visa estabelecer uma correspondência idealizada entre o ciclo anual de cada população e as condições em que o mesmo se desenrola; assim, no clima atlântico — tipificado pela Grã-Bretanha central — a dormência termina entre Agosto e Setembro, o que com o solo molhado implica germinação e crescimento o mais tardar no outono mas, por causa do fotoperíodo curto e também da baixa temperatura, obriga em princípio a atravessar o inverno sem haver produção de flores: as plantas continuam desenvolvendo a roseta, enquanto se sujeitam a temperaturas próximas de 0 °C (o que constitui uma fase de vernalização), e é a partir de Janeiro-Março que a actividade de reprodução realmente começa para em Março-Maio efectivar-se a maturação das sementes (as variações temporais neste esquema acompanham a latitude: quanto mais ao Sul, mais cedo se dá a floração e produção da semente). A dormência é assim um meio de evitar que estas sementes germinem logo a seguir à sua maturação, ainda na primavera e início de verão, pois supõe-se que a época mais seca do verão seria altamente prejudicial ao desenvolvimento das plantas, consequentemente com o risco de desperdício de recursos genéticos.

No entanto, o controlo da dormência constitui apenas uma parte das adaptações fisiológicas aos habitats demonstradas em *Arabidopsis thaliana*: nestas populações que tipificam o regime atlântico, a indução floral é fortemente dependente de um período de frio (a vernalização referida na tabela 2.1, cf. primeiro capítulo, secção d-ii) que previne a precocidade, neste caso a da floração (evitando que se dê entre o outono e início do inverno).

Em contraste, as populações mediterrânicas não deverão requerer dormência — só no outono a água proveniente das chuvas permitirá a germinação; e “talvez” não tenham requisito de vernalização porque o clima só temporariamente propicia temperaturas próximas da congelação. O fotoperíodo, já sendo curto, não conduz ao desenvolvimento precoce da inflorescência. No extremo oposto encontram-se as populações nórdicas, com um estrito e prolongado requisito de vernalização, coincidente com invernos longos, mas uma provável ausência de dormência, devido aos verões breves. Como se vê, segundo este esquema geral trata-se de três classes que se separam arbitrariamente no que parecem ser gradientes fisiológicos de requisito de

vernalização (oposta à precocidade de floração) e de dormência (figura 2.1).

Quanto às populações em clima continental, onde as temperaturas de outono são mais baixas e o solo mais seco que no clima atlântico, não tenderão a germinar antes do inverno, e se o fizerem não têm condições para florir senão na primavera. Para isso deverá contribuir um período de dormência que as faça não responder à humidade do solo durante o verão. Por conseguinte, em geral passam o inverno como sementes e germinam na primavera, mas têm de ser indiferentes à vernalização.

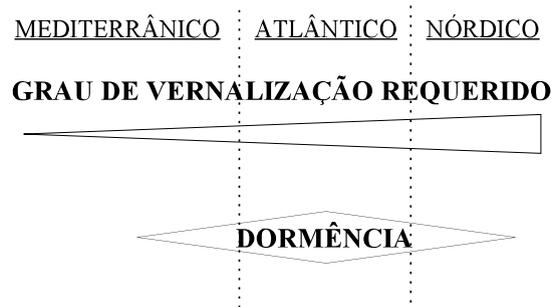


Figura 2.1 — Gradientes fisiológicos, do grau de dormência das sementes e do requisito de vernalização para indução floral, das populações de *Arabidopsis thaliana* segundo os três regimes climáticos não-continentais da Europa.

Indubitavelmente estas correlações com as características dos habitats são sugestivas do significado adaptativo do ajustamento da duração da dormência nas sementes e da sensibilidade a sinais como a temperatura para efectivar-se a indução floral; mas são demasiado redutoras, por exemplo em relação às variações entre anos sucessivos: há populações no clima continental que podem ser “anual de inverno” num ano e no ano seguinte “anual de verão”, apenas em função das flutuações climáticas [Laibach, 1965]. Por isso talvez seja menos significativo tentar submeter a variação em *Arabidopsis thaliana* aos conceitos genéricos de ciclo de inverno ou de verão, apesar da sua conveniência, para em lugar disso referir as populações em termos de dormência e de tempo de floração, precoce ou tardia (cf. secção iii).

A eventual validade da subdivisão das populações de *Arabidopsis thaliana* segundo as grandes regiões climáticas da Europa não deixa, em todo o caso, de perder-se a nível local. Um exemplo bem documentado de heterogeneidade local é o de populações presentes numa região relativamente pequena da Morávia, distribuídas por diversas altitudes [Cetl, 1965, 1978], onde a baixas altitudes (e temperaturas mais altas) predominam ciclos de inverno e nas maiores altitudes um ciclo de verão. Muitas destas populações pareciam conter bastante heterogeneidade de tempos de floração [Cetl, 1965], e demonstrou-se que essa heterogeneidade era determinada geneticamente [Cetl, 1987]. Outro exemplo de heterogeneidade local em *Arabidopsis thaliana* foi relatado em no Tadjiquistão [Usmanov *et al.*, 1978]. Uma explicação sugerida para os padrões genoclinais observados refere que a colonização das altitudes mais elevadas foi feita a partir das zonas baixas, acompanhando duas migrações humanas ocorridas séculos atrás, e que nas condições climáticas de maior altitude o requisito de vernalização da planta para indução floral teria deixado de conferir vantagem adaptativa; em virtude disso, ter-se-iam fixado nessas populações genes recessivos aos quais parece estar

associada uma perda da sensibilidade à vernalização (revisto em Cetl [1987]).

Em contraste com a vernalização, o fotoperíodo não influencia a indução floral, limitando-se a promover o crescimento vertical do caule [cf. a discussão em Ratcliffe, 1965]. Cetl [1978] concluiu, aliás em concordância com Napp-Zinn [1976], que existe uma equivalência, em termos de valor adaptativo, entre a variação na fisiologia da dormência das sementes e na da indução floral — assim, é o conjunto das condições de fotoperíodo e temperatura, e o estado de dormência, junto com a eventual contingência de um requisito de vernalização, que determinam no outono qual é o comportamento das populações. Adicionalmente, registre-se que persiste no solo uma reserva de sementes de *Arabidopsis thaliana* que não germinam mesmo tendo condições, permanecendo viáveis mas dormentes para anos subsequentes [Ratcliffe, 1976], o que acrescenta alguma complexidade ao quadro de adaptações desta espécie no sentido de assegurar a sua permanência nos habitats.

ii. Ecótipos de *Arabidopsis thaliana*

O termo ecótipo refere uma população para a qual se define um conjunto de características com suposto valor adaptativo para o respectivo habitat natural. Em *Arabidopsis thaliana* essas adaptações são quase sempre de carácter fisiológico, designadamente as que determinam as épocas de germinação e de reprodução, em contraste com as características morfológicas, que dada a sua plasticidade apresentam variações não-adaptativas — mas a existência de heterogeneidade para o crescimento da roseta já foi evidenciada em populações naturais [Karbe & Röbbelen, 1968]. Mais ainda, é comum verificar-se heterogeneidade genética, precisamente nas características de maior valor adaptativo, dentro de cada ecótipo: assim, numa aparente uniformidade fenotípica para cada proveniência pode albergar-se uma reserva de diversidade genética importante.

Sabendo-se isto, o uso do termo ecótipo em referência a linhas puras utilizadas nas mais diversas manipulações laboratoriais é incorrecto. Mesmo nos “ecótipos” com que se trabalha em laboratório, apesar de apresentarem heterogeneidade e mesmo que recém-obtidos das colecções de germoplasma estabelecidas, se tem de questionar se são ainda representativos das populações originais (ou de quaisquer populações naturais de *Arabidopsis thaliana*): nas sucessivas gerações de manutenção *ex-situ* é extremamente difícil controlar a erosão genética, não só por via da eventual fixação de alelos mas sobretudo pela diminuição da frequência de génotipos heterozigóticos, sem os factores que na natureza os contrabalançam. Tais considerações podem não ter grande relevância para a maior parte do trabalho com *Arabidopsis thaliana*, mas terão de ser levadas em conta para o estudo da relação entre o património genético das populações e os padrões de adaptação desta espécie.

As investigações mais detalhadas sobre variação natural foram levadas a cabo sobretudo na Alemanha, Morávia e Grã-Bretanha. Pelo contrário, as referências às populações mediterrânicas de *Arabidopsis thaliana* assumem-se como hipotéticas e baseadas em extrapolações [Ratcliffe, 1965] — mesmo no estudo de colecções que por certo incluíam representantes de tais populações, pouco se refere explicitamente [Kranz, 1976]. Por

outras palavras, o conhecimento sobre populações como as que existem em Portugal é largamente superficial.

A ser aprofundado, esse conhecimento poderá complementar os dados sobre outras populações da Europa à cerca dos determinantes da dormência e da indução floral na espécie. Trata-se de um tema cujo interesse vai além da descrição da ecologia da espécie, e que tendo em conta a disponibilidade dos seus ecótipos para a análise experimental pode contribuir para o esclarecimento de questões em fisiologia com relevância não só para a *Arabidopsis thaliana* como, presumivelmente, para muitas outras espécies.

iii. Sistemas experimentais

O facto da *Arabidopsis thaliana* ter características tão adequadas à experimentação controlada deu lugar a sistemas experimentais que procuraram analisar, comparando as diferentes populações, os determinantes fisiológicos dos tempos de germinação e de floração.

- Ratcliffe [1965] vernalizou sementes em germinação durante 3 semanas a 0 – 5 °C, depois realizou o crescimento sob luz contínua a 20 °C. Deste modo demonstrou floração às 4 – 8 semanas pós-vernalização em raças inglesas mas não das montanhas da Escócia (clima nórdico), deduzindo que para estas o tratamento era insuficiente.
- Kranz [1976] utilizou representantes de diversas populações, que cresceram a 20 °C e com fotoperíodo longo (16 horas de luz para cada 24 h) durante as primeiras 2 semanas, seguindo-se 3 semanas de tratamento a 0 – 5 °C com fotoperíodo curto (8/24h de luz), após o que voltavam para as condições iniciais. O tempo de floração foi contado nas plantas submetidas à vernalização e comparado com controlos paralelos que permaneceram sempre nas condições iniciais. A diferença de número de dias, entre tratamentos e respectivos controlos, definiu um valor Δ que denotava a resposta ao tratamento; conseguiu graças a isso definir três classes: com Δ entre - 10 e + 10 dias, a mais frequente, não respondia marcadamente ao tratamento (tratar-se-iam de anuais de verão?); com $\Delta < - 10$ dias, também frequente, denotando uma redução do tempo para florir em resposta à vernalização (anuais de inverno típicas); com $\Delta > + 10$ dias, infrequente, o efeito oposto (vernalização induzia adiamento da floração).
- Cetl [1965] realizou a germinação de sementes em pós-dormência (isto é, certificando-se previamente que quase todas de cada lote germinavam, cf. primeiro capítulo, secção b-i), a que se seguiu o crescimento sob luz contínua a 25 ± 3 °C, sem vernalização. A contagem do tempo para a indução floral (desde a germinação até ao aparecimento dos primórdios florais no centro da roseta) foi feita apenas durante um período de 42 dias após a germinação, determinando-se a percentagem de plantas de cada amostra que atingissem esse estado (que se designaram “generativas”); as condições eram consideradas discriminantes entre anuais de verão e anuais de inverno (estas últimas, na totalidade ou quase, não são induzidas dentro deste tempo de observação). A covariação destas percentagens com a altitude e a temperatura média anual foi ainda estudada através de regressões e correlações para determinar os limiares de temperatura e altitude mais determinantes de uma selecção favorecendo plantas de floração tardia ou precoce [Cetl, 1978].

- Napp-Zinn [1976] cultivou as suas amostras do vale do Reno até poder determinar a idade no momento da floração (desde a sementeira), número de folhas na roseta e número de folhas no eixo floral, sem limitar o tempo de observação; deste modo caracterizou cada proveniência para os três caracteres, cuja variação ia por exemplo desde famílias com valores médios de tempo de floração de 24,6 dias até outras com 207 dias. Os três caracteres eram altamente correlacionados entre si, mas o tempo de floração contrariava os padrões segundo a altitude descritos por Cetl (floração tardia nas amostras a maior altitude).

Um dos principais problemas na comparação entre estes sistemas de análise é o facto de em geral estar a realizar-se uma observação, se bem que correlacionável com a variação adaptativa em estudo, diferente de uns para os outros: Ratcliffe e Kranz empregaram protocolos comparáveis de vernalização, mas o crescimento subsequente não foi nas mesmas condições, e só no caso de Kranz procurou-se uma quantificação por comparação com controlos; este, surpreendentemente, não deu quaisquer indicações à cerca das proveniências geográficas e sua correspondência com as classes definidas pelo valor de Δ (se não houvesse uma correlação com climas, então toda a argumentação desenvolvida por Ratcliffe seria invalidada). Cetl e Napp-Zinn usam estratégias semelhantes entre si, mas os dados não são comparáveis, pois nem Cetl determina os tempos médios de floração nem Napp-Zinn deu percentagens de indução num tempo pré-fixado; para além disso, as condições utilizadas por este último não foram especificadas, impedindo que um limiar de distinção entre populações precoces e tardias fosse estabelecido analogamente ao trabalho de Cetl — mesmo assim, a inversão dos padrões de covariação entre tempo de floração e altitude entre estas duas linhas de trabalho sublinha bem como é difícil generalizar sobre as relações entre variação fisiológica e influências climáticas, como Ratcliffe [1965] sugeriu inicialmente. Por isso estes trabalhos estão longe de ser conclusivos, mas o exposto poderá constituir um padrão para o delineamento de futuros estudos.

Apesar de se conhecer a heterogeneidade genotípica nos caracteres de floração dentro de várias populações, e das excelentes condições experimentais desenvolvidas para a *Arabidopsis thaliana*, poucos são os exemplos de selecção artificial [Rédei, 1969], e pelo que parece nunca numa perspectiva de correlação entre variação natural e adaptação aos habitats. As tentativas de análise genética destes caracteres, inclusivamente pelo estudo da distribuição de isoenzimas, não levaram ainda à identificação dos *loci* intervenientes, e não se conseguiram induzir mutantes que recapitem rigorosamente a variação natural [Kranz, 1976; Coupland, 1995].

Estas investigações, para terem significado, tiveram de basear-se em amostragens “de fresco” no campo [Ratcliffe, 1965; Cetl, 1965, 1978; Karbe & Röbbelen, 1968; Napp-Zinn, 1976; Usmanov *et al.*, 1978], pois o recurso às colecções de germoplasma [Kranz, 1976], não deixando de ter representatividade, não deixa também de implicar, pelo facto de se manterem as plantas em estufa, uma perda de informação e uma potencial causa para observações de significado discutível: em estufa deixam de estar em jogo as condições de selecção dos habitats naturais, o que conjugado com uma autogamia ainda maior que na natureza [Lawrence & Snape, 1971] implica uma inevitável redução da proporção de *loci* heterozigóticos; acrescente-

se, que pela tendência para uniformizar as condições ambientais (ainda por cima artificiais) com todas as populações da colecção, independentemente das especificidades das suas proveniências, se corre o risco de acelerar o afastamento entre as linhas mantidas em estufa e as populações naturais.

iv. Perspectivas

Para os objectivos propostos no presente trabalho (cf. preâmbulo), são de realçar três aspectos relacionados com a variação natural em *Arabidopsis thaliana*:

- A oportunidade de integrar as populações de *Arabidopsis thaliana* ocorrendo em Portugal com os esquemas explicativos da variação nos padrões de dormência e floração; estas populações podem servir também de modelo a estudos das mesmas características em outras espécies anuais coabitando nos mesmos ecossistemas;
- A variação natural, quando se encontrar associada a heterogeneidade genética nas amostragens feitas em populações naturais, pode dar lugar à demonstração didáctica de respostas à selecção artificial — o presumível valor adaptativo dessa variação pode adicionalmente conduzir à reflexão sobre temas de Biologia Evolutiva;
- Na prática com a *Arabidopsis thaliana*, e quando se utilizam sementes de colecções existentes, é importante conhecer os requisitos de dormência e de vernalização dos materiais que vão ser empregados, para que não haja surpresas (sementes que não germinam, plantas que não produzem flor).

h. Mutagénesse

As mutações ocorrem espontaneamente, mas a sua indução experimental com radiações ou com mutagénios químicos é indispensável para que a atinjam uma frequência aceitável para o isolamento sistemático de variantes genéticas. A quase totalidade dos fenótipos mutantes em *Arabidopsis thaliana* foi produzida desta maneira. Ao contrário da variação natural, que tende a restringir-se a caracteres de variação contínua como o tempo de floração ou o diâmetro da roseta [Kranz, 1976; Karbe & Röbbelen, 1968], a variação fenotípica provocada pela mutagénesse experimental resulta em princípio de uma única alteração no genoma, produzindo classes fenotípicas cuja segregação é fácil de analisar pela metodologia mendeliana. Outra diferença está na variedade de fenótipos induzidos [Kranz, 1976], potencialmente abrangente de todos os *loci* da espécie, restando ao experimentador a tarefa de reconhecê-los, por observação directa ou por selecção.

i. Mutagénios

As mutações resultam de erros de reparação ou de replicação do DNA, que para além de ocorrerem espontaneamente a uma taxa muito reduzida podem ser induzidas com o aumento do número de lesões a reparar, ou do número de erros de emparelhamento.

As radiações ionizantes (raios X, raios γ , neutrões rápidos) produzem indirectamente lesões no material

genético, através da formação de radicais livres e electrões aquosos no interior das células, que por sua vez reagem com o DNA e outras biomoléculas [Willson, 1982]. Nucleótidos destruídos ou alterados são reconhecidos por sistemas enzimáticos de reparação do DNA, que os substituem fazendo a estrutura voltar ao normal; no entanto, existe a possibilidade de ser introduzido um nucleótido diferente do original, e esse erro ser propagado através da replicação do DNA. Nessa instância, promoveu-se uma mutação a nível nucleotídico que pode ser ou não reconhecível a nível fenotípico. A radiação ultravioleta (UVB) é também mutagénica porque, ao ser absorvida directamente pelos nucleótidos, pode favorecer ligações covalentes entre pirimidinas vizinhas (na mesma cadeia ou entre cadeias complementares) que também podem dar origem a erros de reparação.

Apesar de terem constituído durante décadas a opção mais largamente utilizada para a produção artificial de mutantes, as radiações ionizantes, pelo equipamento especializado que exigem e sobretudo pela consciência que entretanto se adquiriu do risco de saúde que comporta o seu emprego, foram quase totalmente substituídas pelos mutagénios químicos, cujos riscos são muito mais fáceis de controlar.

Quanto a estes, há os que produzem o seu efeito por alquilação directa dos nucleótidos (diversos derivados de ácido metilsulfónico), e outros de acção dependente do metabolismo, como a nitrosometilureia (NMU, que é inibida por EDTA ou por venenos metabólicos), diversas nitrosaminas metiladas (cuja acção é mediada por hidrolases endógenas) e a metilnitrosoguanidina a pH ácido (cuja acção, ao contrário do NMU, é potenciada por venenos metabólicos) [Rédei, 1969]. De todos, o mais estudado e utilizado é o agente alquilante EMS (etilmetanosulfonato $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OSO}_2\text{CH}_3$ [Merck Index]), que ataca as guaninas produzindo O^6 -etilguaninas, as quais emparelham com timinas e assim dão origem a transições $\text{G} \rightarrow \text{A}$.

Todos os mutagénios, dependendo das doses utilizadas, podem dar indivíduos estéreis e também taxas de letalidade significativas, mas no caso do EMS a relação entre o número de mutantes detectáveis e a esterilidade dos mesmos é melhor do que usando radiações ionizantes [Rédei, 1969]. Outras razões para a popularidade actual do EMS incluem a simplicidade da sua utilização, incluindo a relativa segurança na sua manipulação — desde que haja cuidados elementares, nomeadamente o uso de luvas e bata, e manipulação em “hotte” por causa da libertação de fumos, seguindo-se a inactivação do mutagénio¹ de modo a evitar contaminação do meio ambiente. Todo o restante da presente secção reporta-se à mutagénese com EMS, mas deve ter-se em conta que diferentes mutagénios permitem em princípio isolar diferentes mutantes [Christianson, 1991].

ii. Estratégias de mutagénese e de avaliação

O material acessível à aplicação do mutagénio pode ser por exemplo pólen, sementes ou gemas, embora em *Arabidopsis thaliana* quase só se faça em sementes. O máximo de eficiência do mutagénio [Rédei, 1969]

¹ Não foi encontrada nenhuma referência ao protocolo de inactivação do EMS, talvez porque a maior parte dos utilizadores considere desnecessária a precaução e não a realize por rotina; uma estratégia de inactivação pode ser a de incubar o EMS usado com bactérias, leveduras, tecidos mortos, etc, seguido de autoclavagem desse material.

obtem-se quando, a par da permeabilização da semente, se sincroniza o tratamento com a actividade mitótica do embrião (por exemplo expor ao mutagénio 48 horas após o início da embebição com 0.1% KCl, à luz e a 24 °C); entre as estratégias de aumento da eficiência contam-se também o ajustamento do pH ao valor 5 (a pH 7, a eficiência aumenta acrescentando 1 mM ZnSO₄ à solução de embebição; analogamente, a pH 9, mas com 1 mM CuSO₄) ou permeabilizando as sementes ao EMS juntando-lhe 5% dimetilsulfóxido. Quase todos os trabalhos actuais adoptam a incubação à temperatura ambiente com 0,3% EMS (aproximadamente 24 mM) durante 16 horas [Estelle & Sommerville, 1987], mas a necessidade de optimização caso a caso [www4] recomenda a devida atenção ao trabalho sistemático de caracterização da mutagénese com EMS realizado nos anos 60 [Alderson, 1965] e em grande parte reproduzido por Rédei [1969].

A geração (designada M₁) que se desenvolve das sementes mutagenizadas é quimérica, porque na semente de *Arabidopsis thaliana* existem duas células “geneticamente efectivas”, termo que designa as células precursoras da linha germinal dos meristemas caulinares. Ambas devem conter mutações, mas é extremamente improvável que contenham uma mutação no mesmo *locus*, e ainda menos que se trate da mesma mutação. Deste modo, uma dada mutação numa das células efectivas do embrião abrange apenas um sector da parte aérea, e por isso só uma parte dos frutos irão ser portadores dessa mutação [Müller, 1965]. Só na menos frequente eventualidade de terem ocorrido mutações dominantes se teria a detecção de fenótipos mutantes na geração M₁. Quanto às mutações recessivas, detectam-se na geração M₂ (proveniente das sementes que se encontram nos frutos da geração M₁), através dos homozigóticos segregando nos sectores portadores da respectiva mutação; a proporção destes homozigóticos na descendência de uma planta M₁, dado que provêm de apenas metade dos seus frutos, é por isso de 1 : 7 [Langridge, 1994; Rédei, 1969, 1975; Christianson, 1991]. No caso das mutações dominantes, espera-se pelo mesmo raciocínio uma proporção de 3 sementes M₂ mutantes para 5 normais [Christianson, 1991]. Sabe-se que a distribuição das duas linhagens por sectores, nas inflorescências nomeadamente, pode flutuar bastante [Müller, 1965], mas isso não é impeditivo de se fazerem, a partir das sementes M₂, estimativas aproximadas e relativamente reprodutíveis da eficiência dos mutagénios.

iii. A eficiência dos mutagénios

A eficiência de um mutagénio pode ser medida sem necessidade de cultivar a geração M₂: nas silíquas das plantas M₁ abertas antes de amadurecerem (senão as sementes caem) a falta de sementes permite estimar o número de letais embrionários resultantes da exposição ao mutagénio (teste de Müller). Essas posições vagas na silíqua representam outros tantos embriões cujo desenvolvimento não se pôde completar, e a comparação com controlos é que permite deduzir resultarem de mutações letais herdadas da M₁ onde se fez o tratamento — porque a expressão do respectivo *locus* causou letalidade seja nos gametófitos femininos seja

pós-zigoticamente na M_2 .¹

Uma regra empírica para a afinação preliminar do protocolo de mutagénese situa a ocorrência de 4 a 5% de plântulas deficientes em clorofila na M_2 como indicadora do regime óptimo de mutagénese [Rédei, 1975; Christianson, 1991].

Um método alternativo, muito conveniente para o teste preliminar de potenciais mutagénios químicos, consiste em misturar a substância mutagénica no agar onde se colocam segmentos da raiz [Rédei, 1969], e avaliar pela proporção dos segmentos que deixam de crescer com a exposição a essa substância.

A reversão de mutantes recessivos, nomeadamente os de pigmentação, pode observar-se pelo aparecimento de sectores normais logo na M_1 (e segregando mutantes na geração M_2) e serviu também para avaliação da eficiência de um protocolo de mutagénese. Verifica-se que muitos destes revertentes são na verdade supressores de mutações *missense* ou *nonsense* (isto é, mutações em *loci*, geralmente de tRNA, que por alterarem a tradução dos codões na síntese proteica, restituem pelo menos parcialmente a funcionalidade da proteína codificada no gene mutado) [Rédei, 1969].

iv. Selecção positiva dos mutantes

A busca de um novo mutante, se for orientada para um determinado tema de investigação, requer um esquema de selecção específico que permita identificar os raros indivíduos (geralmente M_2) que apresentam um fenótipo de interesse. Por outras palavras, se aquilo que se procura não tem implicações evidentes através da morfologia ou da pigmentação, o rastreio das M_2 de potencial interesse tem de fazer-se com recurso a sementeiras de grandes dimensões e através da evidência de uma diferença em relação às plantas normais que leve, nas fases iniciais do desenvolvimento, a uma discriminação segura. Para além disso, é indispensável que os indivíduos com fenótipos de interesse obtidos por mutagénese sejam submetidos à análise genética, para que valha a pena levar a cabo outros estudos de carácter bioquímico, fisiológico ou molecular [Estelle & Somerville, 1987; Schiefelbein & Sommerville, 1990, etc.]: a análise das descendências M_3 obtidas por autopolinização desses indivíduos (alguns dos fenótipos não voltam a aparecer, implicando que não sejam hereditários), e a determinação e localização do número de *loci* onde se produziram novos alelos, por cruzamento com indivíduos normais. Finalmente, o cruzamento entre os diferentes mutantes permite agrupá-los por grupos de complementação e ainda detectar interacções, como por exemplo epistasias, complementaridades, redundâncias, ligação cromossómica (cf. secção v), etc..

¹

Para quantificar a eficiência dos mutagénios por este método, pode adoptar-se a estimativa da frequência de plantas M_1 segregando letais embrionários, examinando as 5 primeiras silíquas (método M_1 ou m_a); ou a da proporção de letais embrionários em relação ao total de embriões (método M_2 ou m_c). Uma estimativa preliminar consiste em colher uma silíqua por planta M_1 e calcular a proporção das silíquas que segregam letais embrionários (m_b). Comparações podem ser feitas entre diferentes mutagénios, ou talvez mais significativamente entre protocolos de mutagénese com EMS: por exemplo, a variação de m_a ou m_c com o tempo de tratamento a uma determinada concentração, ou com diferentes concentrações num dado tempo. Mednik [1988] indicou que a estimativa mais precisa, com taxas de mutação baixas, é dada por m_a .

Nas revisões de Rédei [1969] e de Estelle & Sommerville [1986] encontram-se alguns dos sistemas de selecção utilizados há mais tempo. Segue-se no presente trabalho uma descrição alguns exemplos representativos de estratégias desenvolvidas entretanto.

(1) *Exemplos de estratégias de selecção*

- Langridge (revisto no texto desse autor de [1994]), baseado na expectativa de 1 mutante recessivo M_2 para 7 normais a partir de cada planta M_1 heterozigótica, calculou que o rastreio de grupos de 30 descendentes M_2 por planta M_1 dão uma probabilidade de 99% de detectar-se pelo menos uma segregante. Cultivadas 110 famílias M_2 em agar mínimo (solução de Knop suplementada com sacarose e microelementos, onde o Ferro se encontrava quelado com EDTA, cf. apêndice) identificou 9 que segregavam “letais” para as condições de cultura, isto é, plantas que germinavam mas não se desenvolviam normalmente, ou não se desenvolviam de todo. Suplementando o meio mínimo com misturas de aminoácidos essenciais, nucleótidos, diversos monossacáridos, dissacáridos ou vitaminas, de acordo com uma prática corrente em leveduras, Langridge conseguiu restaurar o crescimento em dois desses grupos de letais. Análises subsequentes identificaram um destes dois mutantes como sendo deficiente, a temperaturas superiores a 20 °C, para a produção de tiamina (vitamina B1). Este foi o primeiro passo da investigação desta via de biossíntese, continuada por Rédei¹.
- Estelle e Sommerville [1987] identificaram 13 indivíduos M_2 (num total de 300000) que, após germinação, não eram inibidos pela toxicidade da auxina 2,4-D a 5 μM , continuando a crescer (mas com morfologia muito alterada nas raízes e folhas, assim como na ramificação dos eixos florais e, em 8 dos mutantes, esterilidade por deficiência do crescimento dos estames). Por complementação determinou-se que este fenótipo de resistência à auxina definia, para 7 dos mutantes, um único locus (AXR1), tendo os heterozigóticos entre alelos mutantes um fenótipo normal (em termos da sensibilidade à auxina). Com base na proporção de mutantes recuperada (13/300000), os autores propuseram que os alelos mutantes, embora recessivos, não eram mutações nulas (para as quais as frequências típicas eram dez vezes superiores). O pleiotropismo dos fenótipos mutantes de AXR1 corrobora a diversidade de processos do desenvolvimento que são moduladas pelas auxinas. O rastreio foi feito em duplicado (duas vezes 150000 sementes M_2), para aumentar a possibilidade de isolar mutantes não-redundantes (isto é, que tivessem

¹ A tiamina é sintetizada a partir de pirimidina e tiazol, e 4 *loci* foram identificados nesta via metabólica: *PY* para a síntese da pirimidina, *TZ* para a síntese de tiazol, e *TH1* e *TH2* para pelo menos dois passos intermédios entre os dois precursores e a vitamina; os mutantes py^- e tz^- são discrimináveis pela suplementação de pirimidina ou tiazol, respectivamente, que não restabelecem o crescimento dos th^- . Há complementação intragénica em várias combinações heterozigóticas de alelos mutantes nesta via, isto é, os heterozigóticos contendo dois genes mutantes num mesmo *locus* podem ter um fenótipo normal [Rédei, 1969].

origem em eventos de mutação independentes)¹.

- Last e Fink [1988] isolaram mutantes deficientes para a síntese de triptofano, os primeiros auxotróficos que não envolviam a via de biossíntese da tiamina, adicionando ao meio de germinação para as M₂ 500 a 600 µM de 5-metil-antranilato, que as plantas normais metabolizam pela via de síntese do triptofano num composto tóxico, o 5-metil-triptofano (e também 40 a 50 µM de triptofano para favorecer o crescimento destes mutantes). Sem este procedimento de selecção, e porque as reservas de triptofano da semente permitiam algum crescimento após a germinação, tornar-se-ia impossível discriminar as plântulas com a deficiência. A proporção destas mutantes (55/180000) é característica de mutações nulas (usaram o mesmo protocolo que Estelle e Sommerville no exemplo anterior), embora neste caso se viesse a demonstrar a heterogeneidade genética destes mutantes, abarcando pelo menos 4 *loci* [www5]; o rastreio fazia-se com 600 a 900 sementes de cada vez, o que evidencia a conveniência das culturas em agar neste tipo de investigação. Dos 55 mutantes havia 43 que eram férteis e as 4 primeiras famílias analisadas eram deficientes no passo catalizado pela antranilatofosforibosiltransferase (locus TRP1), pelo facto de acumular-se nas plantas um derivado do precursor antranilato (um composto cuja fluorescência passou a constituir o marcador fenotípico para estes mutantes). O crescimento dos mutantes deficientes na síntese de triptofano não era normal, mas por sinal muito semelhante ao dos mutantes *axr1*⁻, o que se sugeriu dever-se à insuficiência de síntese da auxina (ácido indolacético) a partir do triptofano. Demonstrou-se a especificidade da deficiência porque só o próprio triptofano ou o indole, seu precursor imediato na mesma via metabólica, viabilizavam o crescimento destes mutantes.
- Okada & Shimura [1992] descrevem um sistema engenhoso de cultura em agar, em caixas paralelepípedas cuja posição pode ser estável e reprodutivelmente manipulada para produzir respostas de gravitropismo, fototropismo e de reacção ao toque que permitiram isolar e testar grande parte dos mutantes para genes envolvidos nestes comportamentos (cf. secção c-i). Depois da emergência da radícula e dos cotilédones, estando as caixas assentes sobre um dos lados (e sempre com a superfície do agar na vertical), ao rodá-las 90 graus (assentando sobre outro dos lados) promove-se um desvio também de 90 graus na direcção do crescimento tanto do hipocótilo como da raiz, que assim estarão a responder gravitropicamente, corrigindo a posição horizontal em que ficaram após a rotação. Os mutantes *axr1*⁻, *axr2*⁻, *dwf*⁻, *aux1*⁻ e *agr1*⁻ foram identificados por não terem esta resposta, isto é, continuarem o crescimento da raiz (e alguns casos do hipocótilo) na horizontal.
- Eide e colegas [1996] isolaram mutantes deficientes na aquisição de Ferro pelas raízes através de um sistema de colorimetria da ferrozina, que mede a actividade de uma ferrirreductase existente nos pelos radiculares: a simples imersão das raízes de pequenas plântulas numa solução de ferrozina, que muda de cor quando o ferro é reduzido, indicaria a actividade da ferrirreductase, a qual em plantas normais está

¹ Rédei [1975] mostra que em teoria o ideal para minimizar o problema da redundância é colher de cada planta M₁ um número suficiente de sementes (por exemplo as 30 de Langridge, no exemplo anterior), mas considera-se isso impraticável, preferindo-se o processamento da geração M₂ em massa [www1: "Compleat guide"].

presente apenas em condições de falta de Ferro. Identificaram essa ferrirreductase com o *locus IRT1*, cujos mutantes (6/10000) são deficientes na resposta a condições de fraca disponibilidade de Ferro no substrato.

v. Mapeamento

Um dos aspectos fundamentais do poder experimental da Genética clássica em *Arabidopsis thaliana* é o facto de ter apenas 5 grupos de ligação e, desde 1983, um mapa genético detalhado [Koornneef *et al.*, 1983; Bradley & Pruitt, 1992; www1/2/5]. Para além de caracterizar-se o fenótipo de um mutante, é importante determinar a sua posição no respectivo mapa de ligação, usando para isso marcadores cromossómicos adequados, eventualmente com a utilização de trissómicos [Rédei, 1969]. Apesar do avanço do mapa físico e da sequenciação sistemática do genoma de *Arabidopsis thaliana* (cf. secção c-iii,4), o mapeamento de ligação ainda vai sendo a via fundamental para a localização dos *loci* que vão sendo caracterizados. Já Meyerowitz e Pruitt [1985] descreviam uma série de mutantes de interesse como marcadores genéticos clássicos (morfológicos e enzimáticos), e entretanto a lista tem aumentado e sido acrescentada pelos marcadores de DNA polimórficos [Pruitt & Meyerowitz, 1976]. Para estes últimos, importa salientar a existência de cerca de 300 linhas recombinantes homocigóticas (estabelecidas a partir da F₈ de um cruzamento entre as linhas Landsberg erecta e Columbia), que permitem uma rápida localização, por RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), de qualquer gene, havendo até um *kit* que facilita uma localização inicial [Lister & Dean, 1993; www2].

Os grupos de ligação definidos por Rédei são a convenção utilizada presentemente. A sua relação com as duas nomenclaturas usadas para as linhas trissómicas isoladas nas universidades de Columbia e de Göttingen é a seguinte [Rédei, 1969]:

Grupo de ligação	1	2	3	4	5
trissómico (Columbia)	F	R	Y	C	N
trissómico (Göttingen)	-	III	I	II	IV

i. Transformação genética e exploração do genoma

Apresentar a *Arabidopsis thaliana*, como se pretende neste trabalho, não poderia prescindir de um aflorar da grande actividade envolvida com a análise molecular do seu genoma e da expressão dos seus genes. O presente capítulo visa apenas enquadrar a literatura nesta matéria, que constitui actualmente o principal foco de interesse nesta planta e motiva a sua dominância nas publicações em Genética de plantas superiores. O aprofundamento nesta matéria poderá ser satisfeito pela consulta de livros especializados e diversos artigos de revisão que se referenciam em diversas publicações electrónicas na World Wide Web sugeridas na bibliografia deste trabalho.

i. “Small is beautiful”¹

O rastreio de bancos genómicos e de cDNAs, para isolamento de genes, depende grandemente das características do genoma com que se trabalha. O reduzido conteúdo em DNA do núcleo de *Arabidopsis thaliana*, que se sabe de há muito ser talvez o mais pequeno de todas as angiospérmicas [Rédei, 1969], é um reflexo da extrema simplificação do genoma desta planta [Meyerowitz & Pruitt, 1985]: grande percentagem (cerca de 75%) deste genoma consiste de sequências únicas ou de baixa repetitividade, as quais se confirmaram serem presumíveis genes pela amostragem de clones λ [Pruitt & Meyerowitz, 1986]. As sequências altamente repetitivas, que em quase todas as angiospérmicas caracterizadas constituem um obstáculo ao encadeamento de clones de bancos genómicos por *chromosome walking*, encontram-se em reduzida percentagem e relativamente não-dispersas no genoma de *Arabidopsis thaliana*; em média, ocorrem apenas em cada 125 kb de sequência nucleotídica (1kb = 1000 pares de bases), por isso colocando muito menos problemas que as de outras espécies [Pruitt & Meyerowitz, 1986]. Não menos importante é o menor grau de duplicação das famílias genéticas que noutras plantas [Meyerowitz & Pruitt, 1985; McDowell *et al.*, 1996].

Em suma, o genoma de *Arabidopsis thaliana* é, entre os das plantas superiores, aquele que melhor se presta às metodologias de análise da Biologia Molecular, e foi a partir da constatação da oportunidade que isto representava [Meyerowitz, 1987] que se verificou a crescente adopção desta planta como organismo-modelo. Nos cerca de 10 anos que entretanto passaram, as publicações, nesta área e nas que lhe são afins como é o caso da Fisiologia, ficaram literalmente inundadas com a que era até então considerada um organismo-modelo interessante, com genética “excelente”, mas não prioritário (refira-se que, por motivos semelhantes, o arroz (*Oryza sativa*) constitui actualmente o genoma-modelo para as gramíneas [Moore, 1995]).

A Genética Molecular de procariotas, leveduras e células animais conduziu à formulação de protocolos de manipulação da *Arabidopsis thaliana* por introdução de sequências de DNA, abrindo um novo caminho para o estabelecimento de variantes (as plantas transgénicas) complementar à mutagénese radiológica e química convencional, como se dá conta na secção seguinte.

ii. Revisão histórica das metodologias de transgénese em *Arabidopsis thaliana*

(1) *Transformação directa*

Nos anos 70 deram-se, à imagem dos modelos procarióticos de transformação com DNA, algumas tentativas de transferir genes de *Escherichia coli* para a *Arabidopsis thaliana*, na circunstância em mutantes no locus *PY* para a via da tiamina (cf secção b-v). Demonstrou-se que o DNA de *E. coli* era incorporado pelas células das sementes e integrava-se estavelmente nos cromossomas, chegando a produzir fenótipos normais [Rédei, 1975]. Os conhecimentos da época em matéria de Genética Molecular não eram suficientes para explicar algumas das observações, e esta linha de trabalho não parece ter tido continuação.

¹

Chavão em inglês que exprime a preferência pelo que é pequeno

(2) T-DNA

A produção de tumores em plantas, pelo *Agrobacterium tumefaciens* ou pelo *A. rhizogenes*, envolve a transferência de um segmento de um plasmídeo da bactéria (plasmídeo Ti ou Ri, respectivamente) para as células da planta, seguida da integração do DNA transferido (abreviadamente, T-DNA), com alta eficiência, nos cromossomas das células hospedeiras. O T-DNA contém sequências, no caso das provenientes do plasmídeo Ti de *A. tumefaciens*, que manipulam as respostas das células às auxinas e citocininas; daí resulta a proliferação desordenada das células transformadas, acompanhada pela abundante produção de um derivado de aminoácido (nopalina ou octopina consoante os plasmídeos Ti) nessas células, que a bactéria utiliza como fonte de carbono, azoto e energia — o que poderá dar a entender que a bactéria explora a planta forçando-a a sintetizar em grandes quantidades os nutrientes necessários para o seu próprio crescimento [Hohn, 1992].

As agrobactérias podem ser mantidas em culturas puras; por outro lado, a análise dos plasmídeos Ti e Ri mostrou que a transformação das células das plantas, e integração do T-DNA nos seus cromossomas, podia ser feita apenas com um par de sequências curtas, semelhantes entre si, designadas as *borders* (margens) direita e esquerda (figura 2.2). A partir daqui construíram-se plasmídeos recombinantes (figura 2.3), que do plasmídeo original retinham essas sequências mínimas assim como a origem de replicação para manutenção na bactéria (*ori_V*), e a de transferência do T-DNA (*ori_T*); nas várias versões de vectores incluem-se segmentos de DNA heterólogos para facilitar os procedimentos de selecção em vários hospedeiros, e ainda sítios únicos de reconhecimento por enzimas de restrição para a inserção dos genes de interesse.

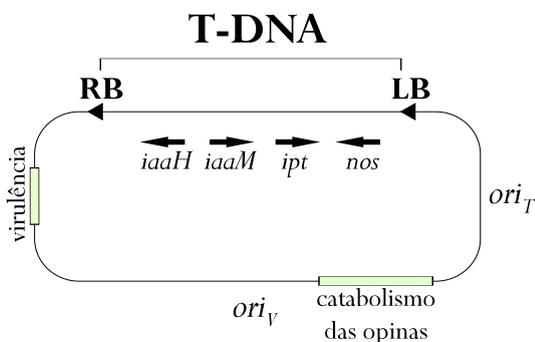


Figura 2.2 — Plasmídeo Ti (nopalina) de *Agrobacterium tumefaciens*. LB, RB: margens (*borders*) esquerda e direita do T-DNA; *iaaH*, *iaaM*: genes de síntese de auxina (estimulantes da formação de raízes); *ipt*: gene de síntese de citocininas (estimulantes de crescimento da parte aérea); *nos*: sintetase da nopalina; *ori_V*: origem de replicação na bactéria; *ori_T*: origem de transferência para a planta. As setas indicam o sentido em que se dá a transcrição. As caixas representam segmentos abrangendo os genes que conferem virulência e que codificam o catabolismo da nopalina.

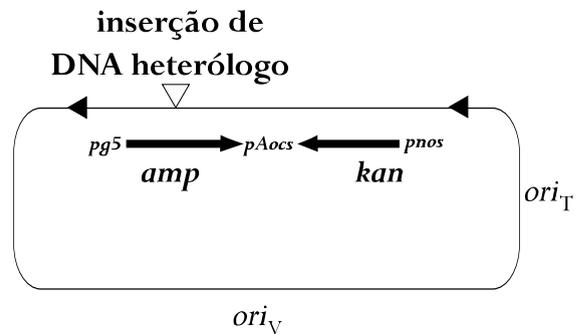


Figura 2.3 — Exemplo de um plasmídeo recombinante baseado no plasmídeo Ti. *pg5*, promotor do “gene 5” do T-DNA; *pnos*, promotor do gene *nos*; *pAocs*, sinal de poliadenilação do gene *ocs* (sintetase da octopina); *amp*, gene de resistência à ampicilina, para selecção de clones recombinantes (que, por inserção do DNA heterólogo, têm o gene *amp* inactivado e ficam susceptíveis ao antibiótico) em *E. coli*; *kan*, gene de resistência à kanamicina, do transposão Tn5, para selecção de plantas transformadas em placas de agar.

Um exemplo da estratégia a seguir para a transgénese usando estes plasmídeos recombinantes: insere-se no segmento limitado pelas *borders* do plasmídeo, por hipótese, um gene humano, em seguida transformam-se

células de *Agrobacterium* com uma preparação purificada desse plasmídeo e seleccionam-se as colónias transformadas; finalmente, suspensões destas células de *Agrobacterium* serão incubadas com células receptoras da *Arabidopsis thaliana* (ou doutra planta-hospedeiro), na presença de um antibiótico selectivo como a kanamicina, demonstrando-se a transferência do T-DNA com esse gene heterólogo nas células que, concomitantemente, receberam o gene que lhes confere resistência a esse antibiótico (o gene *nptII* no caso, cf. figura 2.3); o gene heterólogo ficará assim integrado num dos cromossomas das células transformadas, faltando apenas regenerar plantas transgênicas a partir das células transformadas [Estelle & Sommerville, 1986; Valvekens *et al.*, 1988; Koncz & Schell, 1992].

A primeira transformação bem sucedida com *Agrobacterium* foi publicada em 1985, utilizando discos foliares (de petúnia, tabaco ou tomateiro) cultivados em agar e inoculados com bactérias portadoras de plasmídeos recombinantes [Horsch *et al.*, 1985]. A regeneração de plantas transformadas passava pela indução de calos em meio selectivo (contendo higromicina), pois no plasmídeo também se inseria um gene de *Escherichia coli* conferindo resistência a esse antibiótico. Estas plantas (geração T₁), hemizigóticas para o DNA incorporado, cresciam e produziam descendência por autopolinização (geração T₂), onde segregavam homozigóticos. Porém, dada a reduzida fertilidade das T₁, só na geração T₃ se procedia à selecção dos transformantes, em agar contendo o mesmo antibiótico, seguida da sua transferência para solo para crescimento, análise fenotípica e reprodução.

(3) Regeneração a partir de explantes de raízes

Um melhoramento significativo da transformação de plantas com *Agrobacterium* [Valvekens *et al.*, 1988] consistiu em utilizar segmentos de raízes (desta vez o organismo-modelo já foi a *Arabidopsis thaliana*), e seleccionar os calos transformados usando um gene de resistência à Kanamicina (codificando a neomicinafosfotransferase II, *NPTII*), para regenerar as plantas T₁. Este sistema comprovou-se ser de maior eficiência e passou a ser a escolha, não só na *Arabidopsis thaliana* mas em diversas dicotiledóneas (como as já citadas petúnias, tomateiro, planta do tabaco, e ainda soja e outras).

Mesmo assim, o requisito de uma “reação de cicatrização” por parte do material a transformar, que fornece ao *Agrobacterium* os sinais de atracção química (libertação de fenóis simples [Hohn, 1992]) e também o substrato de adesão às paredes celulares das células vegetais, constituía uma barreira para a aplicação desta metodologia às monocotiledóneas, onde a transformação é muito ineficiente, pelo que outras metodologias (nomeadamente a transformação de protoplastos e o bombardeamento de meristemas caulinares com microprojecteis contendo DNA) mereceram bastante atenção. Mas os trabalhos de manipulação de *Arabidopsis thaliana* usando a transformação com o T-DNA de *Agrobacterium* foram entretanto começando a desbravar importantes aspectos da fisiologia das plantas superiores (cf. secção iii).

(4) Transformação in planta

Bechtold e colegas [Bechtold *et al.*, 1993; www4] apresentaram uma nova técnica de transformação (*vacuum infiltration*) que recapitula a infecção na natureza: o *Agrobacterium* é incubado, em suspensão, directamente

com plantas em crescimento (e não com explantes de raiz donde é necessário fazer regeneração), conseguindo realizar a transferência do plasmídeo. A selecção das plantas transformadas é feita em solo, usando um herbicida (BASTA — fosforinotricina), ao qual resistem pela presença de um gene existente no T-DNA. A principal diferença deste novo sistema, que parece ser largamente adoptado actualmente, é a possibilidade de aumentar grandemente o número de plantas transformadas com sucesso em cada experiência.

iii. Utilização das plantas transgénicas: exemplos

Uma vez obtidas plantas transformadas, analisados os fenótipos dos homozigóticos e construídos bancos genómicos a partir destes, está aberto o caminho ao isolamento e análise de sequências de DNA do genoma de *Arabidopsis thaliana*.

(1) Sinalização do DNA inserido com sequências do T-DNA ou com transposões

A inserção do T-DNA num genoma onde a densidade de genes é da ordem dos 75% faz com que seja bastante provável ela resultar na inactivação de algum gene. É por isso comum que os fenótipos mutantes sejam a expressão de mutações recessivas resultantes da inserção do segmento, contendo o T-DNA, na região codificante de um determinado *locus*. Por sinal, apesar da inserção ser em princípio ao acaso, é mais fácil que a mesma se dê em genes que são transcritos nas células que sofreram a transformação [Koncz & Schell, 1992].

Por hibridação com uma sonda específica para os elementos bacterianos do T-DNA (que não tenham homologias com sequências das plantas), podem encontrar-se os clones do banco genómico da planta transformada que contêm o(s) segmento(s) inserido(s), mas a melhor estratégia é recorrer à expressão dos genes de *Escherichia coli* presentes no T-DNA que conferem resistência a antibióticos para isolar, nos bancos genómicos das plantas T₃, os clones contendo o T-DNA. É frequente haver mais do que uma inserção no genoma, o que se demonstra por hibridação Southern, mas quando há apenas uma então pode estabelecer-se uma relação inambígua entre o fenótipo que se observa e a referida inserção. A homologia com clones de bancos genómicos não-transformados, usando como sonda o gene inactivado que ladeia o T-DNA, permite isolar o gene normal e estudá-lo. Portanto, o T-DNA funciona como uma “etiqueta” (*tag* em inglês) que assinala o fragmento inserido.

Trazendo muito maior sofisticação, ainda dentro da estratégia de marcação do genoma por inserção de sequências [Altman *et al.*, 1995], recorreu-se ao uso de transposões, segmentos de DNA mobilizáveis, isto é, capazes de excisar-se do cromossoma para voltarem a inserir-se noutra parte do genoma. Cruzando uma linha de *Arabidopsis thaliana* transgénica, contendo o transposão Ds^{ALS} (do milho) com uma linha também transgénica contendo o trans-activador Ac^{st} (a transposase que mobiliza o Ds^{ALS}) dá-se uma muito frequente transposição do elemento Ds^{ALS} nas F₁. Pela inserção (bastante aleatória) do transposão noutros pontos do genoma, esta F₁ é um mosaico genético contendo diversas mutações em linhagens celulares paralelas, podendo com bastante eficiência produzir inserções (donde muitas mutações) na linha germinal, seja

masculina ou feminina. Um elemento importante para a frequência de transposições é o promotor que regula a expressão da transposase. Na F_2 podem facilmente isolar-se hemizigóticos estáveis, isto é, contendo a nova inserção mas sem o gene da transposase. Estes hemizigóticos estáveis reconhecem-se pela ausência do gene marcador β -glucuronidase, em *cis* com o Ac^s , e pela resistência à Kanamicina (Kan^R), indicativa da reconstituição do gene *NPTII* por excisão do transposão nele inserido antes da F_1 [Honma *et al.*, 1993]. A eficiência deste sistema parece ser muito elevada, e tem o potencial de uniformizar melhor o espectro de sequências do genoma da *Arabidopsis thaliana* onde se dão as novas inserções, para além de dar a oportunidade de observar sectores ou inflorescências mutantes já na F_1 . Pelo menos outro sistema baseado em transposões foi publicado [Fedoroff & Smith, 1993; www6].

(2) *Anti-sense e K.O.*

Quando se pretende testar uma hipótese de acção de um determinado gene cuja sequência já foi isolada (gene-alvo), existe a possibilidade de, transformando uma planta normal com sequências desse gene, anular a acção do gene endógeno:

- Na via antisense, o T-DNA contém um gene quimérico que consiste dos exões do gene-alvo e um promotor (geralmente um promotor de expressão constitutiva proveniente do vírus do mosaico da couve-flor, CaMV) mas em orientação inversa, tal que é transcrita em todas as células a sequência complementar (antisense) à do mRNA do gene endógeno; a presença deste RNA antisense nas mesmas células onde o mRNA endógeno é expresso bloqueia a sua tradução, produzindo um fenótipo análogo à de ausência de expressão.