

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

RESPOSTAS À DEFICIÊNCIA DE FÓSFORO E SUAS RELAÇÕES COM A
TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM TRIGO

Laize Fraga Espindula
Engenheiro Agrônomo/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos à
obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase Melhoramento e Biotecnologia Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil
Maio de 2009

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que souberam me educar e mostraram como seguir no caminho do conhecimento, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus irmãos, Brenda, Gerusa e Luiz Filipe, distante de vocês enxerguei todo o valor da família, contem sempre comigo!

Ao meu noivo, Maurício, sem palavras para agradecer tanto amor, amizade e compreensão.

À minha segunda família, meu sogro Jorge, minha sogra Beatriz, obrigada pela acolhida, a minha cunhada Jordana e seu marido Rafael, por poder fazer parte desta grande família.

À minha irmã de coração, Tatiana Boff, minha amiga, companheira, orientadora, obrigada pelo apoio em todas as horas, vai sempre fazer parte da minha vida e da minha família, ainda mais agora que vou ser titia. Agradeço especialmente a liberação e uso de seus dados do mapeamento e os *primers* de Al utilizados nesse trabalho.

Aos professores da UFRGS, em especial aos da Escola Técnica e da Faculdade de Agronomia, aos que já me orientaram.

À Sandra Cristina K. Milach, pela orientação, amizade e oportunidades, exemplo de profissional e mãe.

À Carla Andréa Delatorre, pela amizade, orientação, conselhos, críticas, minha orientadora para sempre...

Ao Euclides Minella e à Embrapa Trigo, pelo auxílio e apoio neste projeto.

Aos meus amigos, Alice, Fábio e Jonatan ótimos funcionários e grandes amigos, sentirei saudades da hora do cafezinho e biscoitos.

Aos meus amigos, Paulo Roberto e Emerson Limberger, pelos ensinamentos, mesmo longe continuam em meu coração! À Danielle, Karine, Gustavo, Franceli, Emerson, Everton, Fausto, Luciane Vilela, Itamar, Fabiane, Naracelis, Mércio, Paula,

Tatiana a todos da pós-graduação, que permitiram que eu estivesse no mundo da pós, mesmo quando era somente uma bolsista de iniciação.

A todos os amigos da Faculdade de Agronomia, Cliciana, Kelly, Márcia, Divanilde, Marta, Mirela, Daiane, João Guilherme, Osmar, Márcio, Gustavo, Diego, Daniel, Douglas; do laboratório Ana, Graciela, Adriano, Carolina, Bianca, Vladirene estão em meu coração. Aos amigos de Passo Fundo e de Campinas, Franciely, Bruno, Luis Fernando, César, Renata, Hanna, Bruno, Daniel e Vanusia.

A todas as pessoas que se sintam parte deste trabalho e da minha vida, que de alguma forma me auxiliaram e contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Por fim, ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a FAPERGS – Fundação de Apoio a Pesquisa do Rio Grande do Sul, pelo apoio financeiro.

RESPOSTAS À DEFICIÊNCIA DE FÓSFORO E SUAS RELAÇÕES COM A TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM TRIGO¹

Autor: Laize Fraga Espindula

Orientador: Carla Andréa Delatorre

RESUMO

A inibição do crescimento das culturas causada na condição de solos ácidos, devido principalmente pela deficiência de fósforo (P) e toxidez de alumínio (Al), é um sério problema para a produção agrícola. Em trigo, a cv. Toropi foi identificada como altamente tolerante ao Al e, também apresenta tolerância à presença de baixo P, quando comparada a cultivar sensível, Anahuac. Para compreender os mecanismos de aclimatação de Toropi na coexistência dos estresses, análises genéticas e fisiológicas comparativas foram realizadas em plântulas sob condição de hidroponia. Análises relacionadas ao requerimento de P nos genótipos e na população segregante (Toropi X Anahuac) permitiram confirmar a tolerância de Toropi à deficiência de P pela maior capacidade de estabilizar os níveis de fosfato livre na parte aérea, possivelmente por regular mais adequadamente a translocação de P para parte aérea em comparação com Anahuac. Foram identificados QTLs (*Quantitative Trait Loci*) relacionados às características de deficiência de P e tolerância ao Al com ampla distribuição nos grupos de ligação. Quanto à característica de Al foi reforçada a superioridade do cromossomo 4DL na característica, contribuindo com cerca de 20% da variação fenotípica. Neste mesmo cromossomo, foi localizado um QTL para a concentração de fosfato livre nas raízes explicando cerca de 10% da característica, em apenas 4cM de distância. Colocalização de QTLs foi encontrada também no grupo de ligação 19. Análises genéticas pelo método de subtração supressiva, SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*) permitiram identificar sequências diferencialmente expressas relacionadas a ambos os estresses e avaliar seu comportamento temporal nos genótipos sob deficiência de P. Evidenciou-se uma complexa rede de ativação de genes em Toropi relacionada às mais diversas vias metabólicas, mas principalmente no metabolismo secundário e vias de sinalização. Análises enzimáticas relacionadas ao metabolismo antioxidativo sugerem comportamento diferencial de Toropi para a enzima catalase. A partir dos resultados pode-se inferir que, pelo menos parcialmente, há compartilhamento das rotas induzidas na resposta aos estresses de Al e P.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (164p.). Maio, 2009.

PHOSPHORUS DEFICIENCY RESPONSES AND ITS RELATIONSHIP TO ALUMINUM TOLERANCE IN WHEAT¹

Author: Laize Fraga Espindula
Adviser: Carla Andréa Delatorre

ABSTRACT

The inhibition of crop growth caused by acid soils mainly due to phosphorus (P) deficiency and aluminum (Al) toxicity is a significant problem to agriculture. In wheat, the cultivar Toropi was identified not only as highly tolerant to Al but also to low P availability, when compared to the sensitive cultivar Anahuac. Aiming to understand Toropi's acclimation mechanisms, in the co-existence of these stresses, genetic and physiologic analysis were performed in seedlings on hydroponics. Studying the P requirements, in both genotypes and in its segregating population (Toropi X Anahuac), allowed confirming Toropi's tolerance to P deficiency. It was due to its higher capacity of stabilizing shoot free phosphate levels caused by better regulation of P translocation to the shoot. QTLs (Quantitative Trait Loci) related to P deficiency and Al tolerance were identified distributed at several ligation groups. In relation to the trait Al tolerance it was reinforced the superiority of chromosome 4DL. It contributed with about 20% of the phenotypic variation. At this chromosome was also located, at 4 cM of distance, a QTL related to free phosphate in the roots explaining about 10% of this trait. QTL co-localization was found also at ligation group 19. Genetic analysis using suppressive subtraction, SSH (Suppression Subtractive Hybridization) permitted identification of differentially expressed sequences related to both stresses as well as evaluation of temporal behavior of sequences in the genotypes under P starvation. A complex gene activation network was observed in Toropi related to several metabolic pathways, especially to the secondary metabolism and transduction pathways. Enzymatic analysis of antioxidative metabolism suggested a differential behavior of the enzyme catalase for Toropi. Based on these results it is suggested that, at least partially, sharing of pathways exists between the responses to P and Al stresses.

¹ Máster of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (164p.). May, 2009.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Hipótese principal.....	4
1.2 Hipóteses secundárias.....	4
1.3 Objetivo principal.....	4
1.4 Objetivos específicos.....	4
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 A cultura do trigo e seus problemas de produção no Brasil.....	5
2.1 Fósforo e alumínio: interações no solo.....	7
2.2 Fósforo: do solo à planta.....	9
2.3 Alumínio: do solo à planta.....	13
2.4 Fósforo: da absorção a utilização pela planta.....	14
2.5 Alumínio: a toxidez e a tolerância.....	17
2.6 Fósforo e alumínio: respostas similares?.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Análise da concentração de fósforo.....	25
3.1.1 Preparo das sementes.....	25
3.1.2 Condições de crescimento.....	26
3.1.3 Determinação da concentração de fosfato livre e fósforo total.....	28
3.2 Avaliação da concentração de fósforo para mapeamento.....	30
3.2.1 Condições de crescimento.....	30
3.2.2 Avaliação fenotípica da população.....	30
3.2.3 Marcadores AFLP para mapeamento.....	32
3.2.4 Construção do mapa genético e identificação de QTLs.....	32
3.3 Metabolismo anti-oxidativo.....	33
3.3.1 Extração de proteína.....	33
3.3.2 Determinação de atividade enzimática.....	34
3.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	35
3.4 Análise da expressão gênica em resposta à deficiência de fósforo.....	36
3.4.1 Extração do RNA e síntese de cDNA.....	36
3.4.2 Determinação de seqüências expressas por hidridização subtrativa... ..	39
3.4.3 Determinação da expressão gênica e validação de seqüências diferencialmente expressas.....	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1 Comparação dos teores de fósforo em Toropi e Anahuac no tempo sob diferentes disponibilidades de fósforo.....	53

4.2	Avaliação fenotípica da progênie em diferentes disponibilidades de fósforo	61
4.3	Mapa de ligação molecular	72
4.3.1	Detecção de QTLs pela análise de regressão linear	72
4.3.2	Detecção de QTLs pela análise de intervalo composto	74
4.4	Metabolismo anti-oxidativo em resposta a fósforo	78
4.5	Sequências diferencialmente expressas na deficiência de P	84
4.6	Comparação da expressão relativa das sequências diferencialmente expressas na deficiência de P em Toropi e Anahuac	89
4.6.1	Efeito da deficiência de P sobre a expressão de sequências responsivas ao Al	93
4.6.2	Comparação das sequências diferencialmente expressas em deficiência de P com sequências depositadas em bancos de dados	99
4.7	Possível envolvimento das funções preditas das sequências das bibliotecas SSH na resposta à deficiência de P	106
4.7.1	Alterações no metabolismo	106
4.7.2	Estrutura e Desenvolvimento	114
4.7.3	Processamento de Informações	117
4.8	Expressão de genes relacionados à P e ao Al	125
5	CONCLUSÕES	129
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
7	VITA	149

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Componentes químicos e sua concentração final para solução nutritiva básica.....	27
2. Modelo de análise de variância para os parâmetros avaliados na fenotipagem quanto à deficiência de P, para os genótipos Toropi e Anahuac medidos após 240 horas em solução com 10 μ M e 1 mM de P, para raízes e parte aérea.	31
3. Modelo de análise de variância para a relação dos parâmetros avaliados entre tratamentos 10 μ M e 1mM de P na fenotipagem quanto à deficiência de P, para os genótipos Toropi e Anahuac.....	31
4. Seqüências iniciadoras para síntese de cDNA para condução do método SSH.....	37
5: Seqüências de adaptadores e iniciadores específicos.....	40
6. Relação de iniciadores para seqüências de cDNA diferencialmente expressas para trigo Toropi sob deficiência de fósforo.....	43
7. Relação de iniciadores para seqüências de cDNA diferencialmente expressas em ápices radiculares de trigo cultivar Toropi em resposta ao Al por 1h e descrição de possíveis funções (Boff, 2006).....	46
8. Análise de variância para massa seca (mg) medido após 240 horas em solução com 10 μ M e 1000 μ M de P, para os genótipos de trigo Toropi e Anahuac, para raízes e parte aérea.	62
9. Análise de variância para concentração de Pi livre (g Pi. Kg MS ⁻¹) medido após 240 horas em solução com 10 μ M e 1000 μ M de P, para os cultivares Toropi e Anahuac, para raízes e parte aérea.	63
10. Análise de variância para quantidade de Pi livre (mol) medido após 240 horas em solução com 10 μ M e 1000 μ M de P, para os genótipos de trigo Toropi e Anahuac, para raízes e parte aérea.	65
11. Análise de variância para razão da concentração de Pi livre na raiz entre plantas submetidas a 10 e 1000 μ M de P, por 240 horas para os cultivares de trigo Toropi e Anahuac.....	68
12. Análise de variância para razão da concentração de Pi livre na parte aérea entre plantas submetidas a 10 μ M e 1000 μ M de P por 240 horas, para os cultivares de trigo Toropi e Anahuac.	68
13. Análise de variância para razão da quantidade de P (mol) na raiz entre plantas submetidas a 10 μ M e 1000 μ M de P por 240 horas, para os cultivares de trigo Toropi e Anahuac.....	68

14. Análise de variância para razão da quantidade de P (mol) na parte aérea entre plantas submetidas a 10 μ M e 1000 μ M de P por 240 horas, para os cultivares de trigo Toropi e Anahuac.	68
15. Análise de correlação para oito características fenotípicas analisadas. CRRP (crescimento relativo da raiz), CPLR (concentração Pi livre na raiz), CPLS (concentração de Pi livre na partea aérea), RCPL (razão da concentração de Pi livre).	71
16. QTLs significativos pela análise de regressão linear na população de linhagens recombinantes (F7) Toropi X Anahuac. CRRP (crescimento relativo da raiz), CPLR (concentração Pi livre na raiz), CPLS (concentração de Pi livre na partea aérea), RCPL (razão da concentração de Pi livre).	73
17. QTLs significativos pela análise por intervalo composto da população de linhagens recombinantes (F7) Toropi X Anahuac. CRRP (crescimento relativa da raiz), CPLR (concentração Pi livre na raiz), CPLS (concentração de Pi livre na partea aérea), RCPL (razão da concentração de Pi livre).	74
18. Expressão relativa das sequências gênicas da biblioteca subtrativa de ápices radiculares do cultivar de trigo Toropi em resposta a deficiência de P por 24, 120 e 240 horas.	88
19. Classificação do BLASTn dos cDNAs diferencialmente expressos do genótipo Toropi quanto à deficiência de P.	63
20. Classificação do BLASTx no banco de proteína de trigo dos cDNAs diferencialmente expressos do genótipo Toropi.	66

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Solos ácidos no mundo – áreas predominantes (World Soil Resources, FAO, 1991).	7
2. Demonstração da retirada do endosperma de plântulas de trigo germinadas após 72 horas. A) plântula de trigo com endosperma; B) plântula de trigo com seu endosperma retirado ao lado; C) exemplos de plântulas de trigo momento antes de serem colocadas em tratamento.....	26
3. Sistema de condução experimental em potes com soluções de tratamento aeradas, com tampa de tela em <i>nylon</i> onde são colocadas as plântulas de trigo em contato com a solução (foto ilustrativa).....	27
4. Curva padrão de fosfato em comprimento de onda de 820 nm e a equação representativa da regressão linear.	29
5. Curva padrão de BSA, calibrada para proteína em comprimento de onda de 595 nm.....	34
6. Otimização de ciclos de PCR para a síntese de dupla fita de cDNA.	39
7. Otimização dos ciclos de PCR, ciclo ótimo entre 16 e 20 ciclos. BC – <i>Bulk</i> controle; BE - <i>Bulk</i> estresse; 1 - amostra purificada ; 2 – amostra não purificada . .	39
8. Teste de ligação do adaptador 1, utilizado iniciador 1 específico para o adaptador 1 em ambos os <i>testers</i> 1 e 2R. M – Marcador 100pb; 1 - amostra purificada ; 2 – amostra não purificada.	40
9. Amplificação por PCR dos fragmentos diferencialmente expressos, fragmentos pronto para clonagem. M – marcador 100pb; 1 - amostra purificada ; 2 – amostra não purificada.....	41
10. Alinhamento múltiplo de seqüências diferencialmente expressas para trigo Toropi em resposta a deficiência de fósforo.	43
11. Padrão de fluorescência para o corante SYBR Green (em vermelho) e a referência padrão ROX (em azul).	48
12. Etapas de amplificação em PCR em tempo real. Ciclos (stage), repetições (reps), temperatura em C° (caixa superior) e tempo min (caixa inferior).	49
13. Teor de fósforo (g P kg MS ⁻¹) livre e total de endosperma retirado de plântulas de trigo germinadas. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey 5%.	53
14. Concentração (g P.kg MS ⁻¹) de fósforo livre na parte aérea e no sistema radicular do cultivar de trigo Toropi, em três tempos de exposição, 24 horas,	

120 horas e 240 horas, na presença (+P, 1000 μ mol.L ⁻¹) e ausência (-P) de fósforo.	56
15. Concentração (g P.kg MS ⁻¹) de fósforo livre na parte aérea e sistema radicular do cultivar de trigo Anahuac, em três tempos de exposição, 24 horas, 120 horas e 240 horas, na presença (+P, 1000 μ mol.L ⁻¹) e ausência (-P) de fósforo.	56
16. Proporção de Pi livre entre parte aérea e sistema radicular, em três tempos de exposição, 24 horas, 120 horas e 240 horas, na presença (+P, 1000 μ mol.L ⁻¹) e ausência (-P) de fósforo, para os genótipos de trigo Toropi e Anahuac.	57
17. Concentração (g P.kg MS ⁻¹) de fósforo total na parte aérea e no sistema radicular no cultivar de trigo Toropi, em três tempos de exposição, 24 horas, 120 horas e 240 horas, na presença (+P, 1mmol.L ⁻¹) e ausência (-P) de fósforo....	58
18. Concentração (g P.kg MS ⁻¹) de fósforo total na parte aérea e no sistema radicular do cultivar de trigo Anahuac, em três tempos de exposição, 24 horas, 120 horas e 240 horas, na presença (+P, 1mmol.L ⁻¹) e ausência (-P) de fósforo....	59
19. Massa seca (mg) dos cultivares de trigo Toropi e Anahuac, em condições de baixo P (10 μ M) e alto P (1000 μ M) nas raízes (barras claras) e na parte aérea (barras escuras) após 240 horas.....	63
20. Concentração de Pi livre (g.kg ⁻¹ MS) nos cultivares de trigo Toropi e Anahuac, em condições de baixo P (10 μ M) e alto P (1000 μ M) nas raízes (barras claras) e parte aérea (barras escuras) após 240 horas. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05) dentro dos genótipos.....	64
21. Quantidade total (mol) de Pi livre nos cultivares de trigo Toropi e Anahuac, em condições de baixo P (10 μ M) e alto P (1000 μ M) nas raízes (barras claras) e parte aérea (barras escuras) após 240 horas.	65
22. Distribuição de frequências da concentração de Pi livre (g.kg ⁻¹ MS) na parte aérea da população F6 Toropi X Anahuac após 240 horas de tratamento de baixo P (10 μ M) em solução hidropônica.	66
23. Distribuição de frequências da concentração de Pi livre (g.kg ⁻¹ MS) na raiz da população F6 ToropiXAnahuac após 240 h de tratamento de alto P (1000 μ M) em solução hidropônica.....	66
24. Distribuição de frequências da concentração de Pi livre (g.kg ⁻¹ MS) na parte aérea da população F6 Toropi X Anahuac após 240 h de tratamento de alto P (1000 μ M) em solução hidropônica.	67
25. Distribuição de frequências da razão da concentração de Pi livre em baixo P (10 μ M)/alto P (1000 μ M) na raiz da população F6 ToropiXAnahuac após 240 h de tratamento em solução hidropônica.....	69
26. Distribuição de frequências da razão da concentração de Pi livre em baixo P(10 μ M)/alto P (1000 μ M) na parte aérea da população F6 ToropiXAnahuac após 240 h de tratamento em solução hidropônica.	69
27. Mapa molecular para cromossomo 4D de trigo. Modificado de Pestsova <i>et al.</i> , 2000; Raman <i>et al.</i> , 2005; Song <i>et al.</i> , 2005.....	72
28. Mapa de ligação de trigo com identificação de QTLs para tolerância ao alumínio e à deficiência de fósforo (quadrados cinzas localizam QTLs para	

tolerância à deficiência de P, quadrados pretos para tolerância ao Al) por análise de intervalo composto.	76
29. Atividade enzimática da catalase (CAT) ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) em raízes nos genótipos de trigo Toropi e Anahuac na presença e ausência de P em três tempos de exposição 24, 120 e 240 horas.	80
30. Atividade enzimática da glutathiona redutase (GR) ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) em raízes dos genótipos de trigo Toropi e Anahuac na presença e ausência de P em três tempos de exposição 24, 120 e 240 horas.	82
31. Gel não desnaturante para atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) em raízes no genótipo de trigo Toropi na presença (+P) e ausência de P (-P) em três tempos de exposição 24, 120 e 240 horas.	82
32. Gel não desnaturante para atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) em raízes do genótipo de trigo Anahuac na presença (+P) e ausência de P (-P) em três tempos de exposição 24, 120 e 240 horas.	83
33. Curva de dissociação e amplificação em PCR em tempo real para controle endógeno 28S rRNA.	87
34. Expressão relativa temporal de genes com expressão em Anahuac superior a Toropi, diferencialmente expressos sob deficiência de P, em raízes de trigo genótipos Toropi (barras pretas) e Anahuac (barras brancas) depois de 24, 120 e 240 horas da deficiência de P, em relação à suficiência.	91
35. Expressão relativa temporal de genes com expressão em Toropi superior a Anahuac, diferencialmente expressos sob deficiência de P, em raízes de trigo genótipos Toropi (barras pretas) e Anahuac (barras brancas) depois de 24, 120 e 240 horas da deficiência de P, em relação à suficiência.	92
36. Expressão relativa temporal de genes com expressão em Toropi superior a Anahuac às 120 horas, diferencialmente expressos sob deficiência de P, em raízes de trigo genótipos Toropi (barras pretas) e Anahuac (barras brancas) depois de 24, 120 e 240 horas da deficiência de P, em relação à suficiência.	93
37. Expressão relativa temporal de genes com expressão em Anahuac superior a Toropi até as 240 horas, diferencialmente expressos na presença de Al tóxico, em raízes de trigo genótipos Toropi (barras pretas) e Anahuac (barras brancas) depois de 24, 120 e 240 horas da deficiência de P, em relação à suficiência.	95
38. Expressão relativa temporal de genes com expressão em Toropi superior a Anahuac em pelo menos um tempo, diferencialmente expressos na presença de Al tóxico, em raízes de trigo genótipos Toropi (barras pretas) e Anahuac (barras brancas) depois de 24, 120 e 240 horas da deficiência de P, em relação à suficiência.	96
39. Expressão relativa temporal de genes com expressão em Toropi superior a Anahuac pelo menos dois tempos, diferencialmente expressos na presença de Al tóxico, em raízes de trigo genótipos Toropi (barras pretas) e Anahuac (barras brancas) depois de 24, 120 e 240 horas da deficiência de P, em relação à suficiência.	97
40. Expressão relativa temporal de genes diferencialmente expressos na presença de Al tóxico, com expressão em raízes de trigo genótipos Toropi (barras pretas) e Anahuac (barras brancas) depois de 24, 120 e 240 horas da deficiência de P, em relação à suficiência.	98

41. Esquema simplificado da rota do chiquimato e dos flavonóides em plantas (Adaptado de Lillo *et al.*, 2008). Caixas cinzas indicam as enzimas diferencialmente expressas para SSH, as setas pretas indicam a expressão do gene em Toropi com o prolongamento do estresse de P..... 111
42. Expressão relativa temporal do gene *PTF1* em raízes de trigo genótipos Toropi (barras pretas) e Anahuac (barras brancas) depois de 24, 120 and 240 horas da deficiência de P, em relação à suficiência..... 125
43. Expressão relativa temporal do gene *TaALTM1* em raízes de trigo genótipos Toropi (barras pretas) e Anahuac (barras brancas) depois de 24, 120 e 240 horas da deficiência de P (P não adicionado), em relação à suficiência (1000 μ M). 127

1 INTRODUÇÃO

A inibição do crescimento das plantas causada pelos solos ácidos, especialmente devido à deficiência de fósforo (P) e ao estresse de alumínio (Al), é um problema para a produção de muitas culturas agrícolas de importância mundial. Valores de pH de solos inferiores a 5, que caracterizam solos com alta acidez, ocorrem naturalmente em solos tropicais e subtropicais, como é o caso do Brasil.

Em solos ácidos, a escassez de P torna-se mais elevada devido à combinação com Al proveniente da camada dos argilominerais acidificados, interferindo diretamente na atividade e absorção de P na raiz.

A utilização de fertilizantes, a correção e a manutenção do pH através da calagem são práticas utilizadas no mundo para permitir o desenvolvimento vegetal adequado em solos com presença de Al e baixo P disponível. A aplicação de fosfato em solos ácidos, pela elevada fixação deste nutriente, devido, principalmente, a reações com alumínio e ferro, resulta em baixa eficiência da adubação fosfatada. Além disso, no Brasil, com o advento do sistema de cultivo de semeadura direta, a prática de incorporação do calcário, recomendada na calagem, não é mais executada nas áreas que adotam este sistema, o que gera um gradiente de pH nas camadas superficiais do solo onde se encontram a maioria das raízes. Quanto mais profunda a camada, menor a correção do pH, maior o efeito da toxidez do Al e menor disponibilidade de P. Assim, a

zona de crescimento radicular fica limitada e por conseqüência, o volume de solo explorado.

O estudo do potencial genético-adaptativo de culturas tolerantes ao Al tóxico e a deficiência de P em solos é um aspecto importante no Brasil e regiões da América Tropical. A co-ocorrência destes estresses sugere a possibilidade das plantas terem desenvolvidos mecanismos similares de adaptação. Já se tem caracterizado espécies vegetais que apresentam tolerância ao Al tóxico e à deficiência de P, conjuntamente ou separadamente. Entre as culturas avaliadas encontra-se o trigo (*Triticum aestivum*). No mundo, o trigo é uma cultura de grande importância, pois é a base da alimentação ocidental. No Brasil, é a cultura de maior movimentação comercial e importação, devido a dificuldades de produção encontradas, como os problemas dos solos ácidos e a condições climáticas instáveis, resultando em rendimentos extremamente variáveis.

O uso de cultivares tolerantes às condições de solos ácidos tem sido considerado uma alternativa eficiente para aumentar a produção de trigo. Diferenças entre variedades de trigo quanto à habilidade de extração ou uso de P podem estar relacionadas com o grau de tolerância dessas variedades à toxidez de Al, comum nos solos brasileiros onde estas são cultivadas (Baligar & Fageria, 1999). Variedades de trigo tolerantes ao Al são menos prejudicadas do que as sensíveis, em solos ácidos e com baixa disponibilidade de P. Entretanto, nem sempre a habilidade de absorção e a utilização de P estão relacionadas diretamente com a tolerância ao Al.

A capacidade de aproveitamento do P resulta da habilidade de absorção (extração/absorção propriamente dita), de translocação e de utilização (Baligar & Fageria, 1999). O Al prejudica a absorção de P de duas formas: reduz o crescimento do sistema radicular e liga-se ao P, tanto na superfície quanto no interior das células, formando compostos de baixa solubilidade (Clarkson, 1966; Foy, 1976). Desta forma,

ocorre redução na absorção de P, bem como precipitação do nutriente nas raízes, restringindo a sua translocação para a parte aérea.

O genótipo Toropi é conhecido por sua tolerância ao Al, além disso, tem se mostrado tolerante também a falta de fósforo inorgânico (Pi) no solo. Há, portanto, a possibilidade de estudar os processos envolvidos na habilidade de obtenção de Pi (extrair/absorver) em resposta a deficiência de P e identificar os mecanismos usados para utilizar mais eficientemente o Pi em relação a cultivares sensíveis nessas condições (Silva, 2007). Estes conhecimentos podem no futuro auxiliar na escolha de genitores que utilizem mecanismos complementares permitindo a obtenção de genótipos superiores aos pais.

Dentre os mecanismos externos de tolerância ao Al propostos, citam-se a exsudação de ácidos orgânicos, a exsudação de compostos fenólicos e rizodeposições; muitas evidências apontam para o papel central dos ácidos orgânicos na detoxificação do Al (Ma *et al.*, 2001). A exsudação de ácidos orgânicos é uma estratégia para disponibilizar P, assim há uma associação entre a tolerância à deficiência de P e à toxidez de Al, que deve ser explorada.

Além da exsudação de ácidos orgânicos como mecanismos de adaptação das plantas tolerantes ao Al e a deficiência de P, há processos de aclimação das plantas a vários estresses abióticos por meio de respostas de proteção oxidativa e sinalização que podem ser similares (Gapper & Dolan, 2006; Mullineaux *et al.*, 2006; Dat *et al.*, 2000; Karpinski *et al.*, 1999; Dat *et al.*, 1998; Foyer *et al.*, 1997; Prasad *et al.*, 1994; Bowler *et al.*, 1992).

Estudos de interferência do Al tóxico e baixo P no desenvolvimento das plantas contribuirão para o entendimento da inter-relação desses elementos e dos mecanismos de tolerância associados aos estresses.

1.1 Hipótese principal

Plantas sob condições de estresse de deficiência de P induzem processos similares aos induzidos sob condições de estresse de Al.

1.2 Hipóteses secundárias

1. Toropi e Anahuac diferem na concentração de P nos tecidos sob disponibilidades de P contrastantes, demonstrando diferenças de captação e alocação de P.
2. QTLs para tolerância a deficiência de P e para a tolerância ao Al colocalizam-se.
3. A maior capacidade antioxidante de Toropi está envolvida na tolerância à deficiência de P.
4. Sequências gênicas induzidas por Al também são induzidas pela deficiência de P;
5. Sequências gênicas induzidas pela deficiência de P apenas em Toropi estão envolvidas com a tolerância a este estresse.

1.3 Objetivo principal

Comparar processos relacionados à aclimação aos estresses de deficiência de P e de toxidez de Al buscando identificar se há associação entre as respostas a estes estresses.

1.4 Objetivos específicos

1. Comparar temporalmente os teores de P nos tecidos dos cultivares de trigo Toropi (tolerante) e Anahuac (sensível) sob disponibilidades de fósforo contrastantes.
2. Fenotipar a população de linhagens segregantes do cruzamento Toropi X Anahuac em relação a tolerância à deficiência de P.

3. Identificar QTLs relacionados à tolerância à deficiência de P e comparar sua distribuição no mapa genético com a de QTLs relacionados à tolerância ao Al.
4. Caracterizar os padrões enzimáticos do metabolismo antioxidativo em resposta à deficiência de P.
5. Identificar e validar sequências gênicas expressas em resposta à deficiência de P.
6. Avaliar a expressão de sequências gênicas induzidas por Al, em condições de ausência de Al e deficiência de P.
7. Comparar os processos de resposta dos cultivares Toropi e Anahuac quanto à tolerância a deficiência de P e a presença de Al.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do trigo e seus problemas de produção no Brasil

O trigo é um cereal de inverno originário da região do “Crescente fértil”, localizada na região montanhosa do sudoeste da Ásia, por volta de 8 a 10 mil anos atrás. Trigos ancestrais diplóides *Triticum monococcum* e *Triticum monococcum* ssp. *aegilopoides* são ainda encontrados nesta região (Heun *et al.*, 1997).

O trigo atualmente cultivado, *Triticum aestivum*, foi encontrado em regiões mais distante do Crescente Fértil, num corredor que se estende da Armênia ao sudoeste do mar Cáspio no Irã (Dvorak *et al.*, 1998a). Nesta região *Aegilops tauschii* var. *stragulata* é predominante. Se supõe que hibridizações naturais de *Aegilops* com o gênero *Triticum* e uma série de eventos independentes tenham produzido o *T. aestivum*, constituindo o *pool* de genes do trigo comum atual (Talbert *et al.*, 1998). A espécie ancestral do trigo comum, *Triticum turgidum* ssp. *dicoccum*, doadora de maior porcentagem do genoma atual (AABB), foi descoberta em uma série de sítios arqueológicos na Síria que datam 7 mil e 500 anos A.C. (Gill & Friebe, 2002).

Atualmente, se aceita que o trigo comum é uma espécie hexaplóide ($2n=6x=42$), constituída de três genomas (AABBDD). Segundo Dvorak *et al.* (1998b), a espécie tetraplóide *T. turgidum* (AABB) possui o genoma A em comum com *T. monococcum*, e estudos moleculares não diferiram-no de *T. urartu*, sendo este o doador do genoma A para os trigos poliplóides. Já o genoma D foi originado de *Aegilops tauschii* pela

hibridização de *T. turgidum* e *Aegilops tauschii* var. *strangulata* cerca de 7 mil anos atrás. Estudos moleculares comprovaram que o genoma B é originário de *Aegilops speltoides* (Wang *et al.*, 1997).

Botanicamente, o trigo pertence à família Poaceae e tribo Triticeae (NCBI *Taxonomy*, 2008). É uma espécie autógama, com flores perfeitas que, em condições normais de cultivo, apresenta baixa frequência de polinização cruzada. Atualmente, cultivam-se no mundo trigos de inverno e de primavera. Os trigos de inverno, em seu estágio inicial de desenvolvimento, necessitam passar por um período de vernalização, a temperaturas próximas a 0°C, para completar o ciclo reprodutivo. O trigo cultivado no Brasil é de hábito primaveril e a maioria das cultivares é insensível ao fotoperíodo (Embrapa/CNPT, 2008).

O trigo ocupa o segundo lugar em produção mundial entre os cereais, chegando a 600 milhões de toneladas de grãos, em primeiro lugar está o milho com 780 milhões de toneladas em 2007. No mesmo ano, os países líderes em produção de trigo eram a China com 110 milhões em primeiro lugar, em segundo a Índia com 74 milhões, em terceiro os Estados Unidos com 54 milhões e em quarto a Rússia com 50 milhões de toneladas. O Brasil é o 23º colocado atingindo uma produção de quatro milhões de toneladas, com produtividade média de 2,2 t ha⁻¹ e 1,8 milhões de hectares plantados (FAOStat, 2008).

Segundo a Bracale (2008), a safra de 2008/09 está estimada em 5,7 milhões de t de grãos, e não supre a demanda do consumo anual brasileiro que tem se mantido em torno de 10 milhões de toneladas. Este déficit entre demanda e produção implica na importação deste cereal. Em 2005, o Brasil importou cinco milhões de toneladas de grãos ao custo de 650 milhões de dólares, contribuindo para o déficit da balança comercial (FAOStat, 2008).

Apesar de responder por 90% da produção nacional de trigo, no Sul do Brasil, os rendimentos ainda são baixos e a insustentabilidade é devido a vários fatores: como severa pressão de doenças como ferrugens, helmintosporiose, manchas, oídio e giberela; inconstância climática com chuvas variáveis e intensidade excessiva; geadas no florescimento, chuvas na colheita e por último as condições edáficas, solos ácidos com alto nível de Al solúvel e forte fixação do P.

2.1 Fósforo e alumínio: interações no solo

Os solos ácidos estão distribuídos em 30-40% das terras no mundo, em mais de 50% das terras aráveis (von Uexküll & Mutert, 1995). As regiões tropicais e subtropicais contam com 60% dos solos ácidos no mundo devido à elevada intemperização dos solos e liberação de H^+ , principalmente dos argilominerais. Mas, o mais relevante é que estas áreas estão localizadas em países em desenvolvimento situados na América do Sul, África Central e Sudeste da Ásia onde a produção de alimentos pode ser crítica (Vitorello *et al.*, 2005) (Figura 1). No Brasil, cerca de 500 milhões de hectares possuem solos ácidos, compreendendo 68% do território.

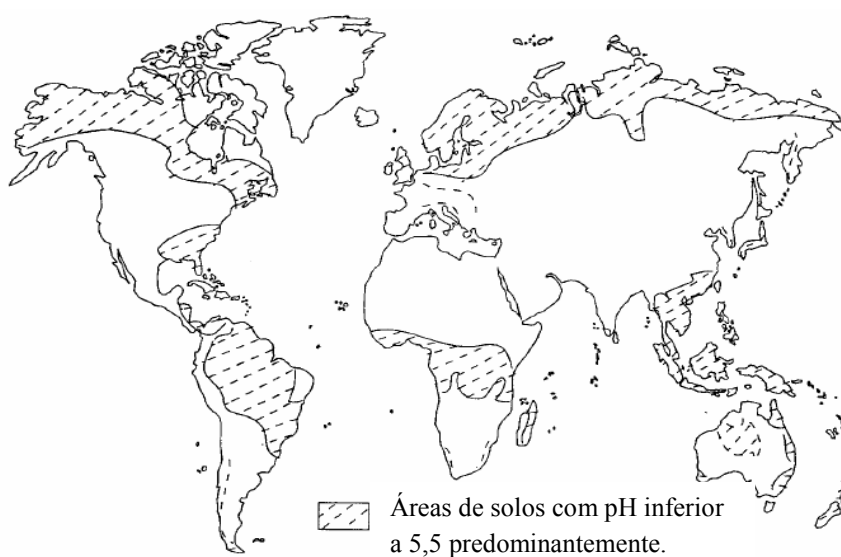


FIGURA 1. Solos ácidos no mundo – áreas predominantes (World Soil Resources, FAO, 1991).

Além das áreas com acidez natural, os níveis de acidez dos solos estão aumentando em decorrência de atividades humanas. Entre os motivos da acidificação antropogênica dos solos estão a atividade de mineração e poluentes industriais associados a chuvas ácidas. No setor agrícola a nitrificação e o uso intensivo de fertilizantes amoniacais tendem a acidificar o solo (Rengel & Zhang, 2003).

Em solos ácidos a escassez de P é mais elevada devido à combinação com Al proveniente da camada dos argilominerais acidificados, interferindo diretamente na atividade e absorção de P na raiz e membrana celular (Gessa *et al.*, 2005). O mecanismo da interação de P/Al ocorre através da reação de adsorção/precipitação na superfície de raiz e no espaço intercelular formando um composto insolúvel $\text{Al}(\text{OH})_2\text{H}_2\text{PO}_4$, resultando em sintomas de deficiência de P (Clarkson, 1967).

Vários autores têm obtido evidências para a presença de polímeros Al-OH-PO_4 em solução diluída de nutrientes em pH de 4.1 a 4.8 (Munns, 1965; White *et al.*, 1976; Blamey *et al.*, 1983). Esta forma é precipitada em altos valores de pH ou em altas concentrações.

Os meios e soluções nutritivas que fazem o uso de Al e fosfatos combinados podem estar subestimando as suas concentrações e alterando o nível de toxidez do Al. O mais comum é perceber a complexação e a polinucleação do Al com o Pi (Lindsay, 1979).

Nos solos a correção e a manutenção do pH através da calagem é a prática mais utilizada no mundo para permitir o desenvolvimento vegetal adequado em solos com presença de Al. No entanto, no Brasil, com o advento do sistema de cultivo de semeadura direta, a prática de incorporação do calcário, recomendada na calagem, não é mais executada nas áreas que adotam este sistema, o que gera um gradiente de pH nas camadas superficiais do solo onde se encontra a maior quantidade de raízes. Quanto

mais profunda a camada, menor a correção do pH, maior o efeito da toxidez do Al e menor disponibilidade de P. Assim, a zona de crescimento radicular fica limitada.

2.2 Fósforo: do solo à planta

O P (P) é um macronutriente absorvido principalmente na forma de ortofosfato (Pi), a partir da sua forma primária H_2PO_4^- , extremamente insolúvel em muitos solos devido à reação com outros minerais (Schachtman *et al.*, 1998; Abel *et al.*, 2002).

Nos solos, apesar do P ser abundante, entre 30% e 80% deste apresenta-se na forma orgânica, requerendo mineralização antes de poder ser absorvido pelas plantas (Vance *et al.*, 2003). O P é um dos nutrientes mais indisponíveis, sendo um dos elementos mais críticos para a produção agrícola, devido a formação de sais insolúveis com cálcio, ferro e Al, elevada retenção por parte da matriz do solo (Leal & Velloso, 1973), falta de reposição natural.

A concentração de Pi na solução do solo é baixa (2 a $10\mu\text{M}$), advinda da intemperização do mineral primário, apatita e, sua disponibilidade se dá em função das oscilações de P lábil no solo (Raghothama, 1999) e mineralização das formas orgânicas. O conteúdo acessível de Pi muitas vezes está abaixo do nível necessário para uma ótima performance das culturas (Novais & Barros, 1997; Sanchez & Salinas, 1981; Schachtman *et al.*, 1998; Ticconi & Abel, 2004). A fim de amenizar os problemas de deficiência de Pi na agricultura, na última metade do século, tem-se utilizado em extensas áreas grande quantidade de fertilizantes concentrados com Pi, trazendo um grande aumento na produtividade das culturas, mas parte deste Pi não é imediatamente recuperada do solo, pois cerca de 80% torna-se adsorvido ou complexado na fração orgânica (Raghothama, 1999). Segundo FAO (2008), em 2006, o consumo brasileiro de fertilizante fosfatado alcançou três milhões de toneladas.

Em sistemas de alta produtividade agrícola que empregam variedades modernas, há uma demanda maior de P e outros minerais do que aquela fornecida pela intemperização mineral, dessorção e dissolução de superfícies minerais, difusão e mineralização da matéria orgânica. O uso de P tem aumentado a uma taxa superior ao da produtividade das culturas, o que tem trazido muitos problemas. Primeiro, a eficiência de utilização de Pi pelas plantas tem sido cada vez mais baixa, segundo, o uso intensivo de fertilizantes contendo Pi pode causar danos ambientais severos, como a eutroficação e hipoxia das águas e terceiro, é estimado que os recursos não-renováveis de rochas de Pi sejam exauridos nos próximos 60-90 anos (Yuan & Liu, 2008).

Segundo Lynch (2007) uma nova era agrícola está emergindo, pressionados principalmente pelos agricultores com pouco acesso a fertilizantes e que querem aumentar a produtividade de suas culturas e áreas agricultáveis. Variedades responsivas a alta fertilidade que geram altos custos de produção serão substituídas por variedades tolerantes a solos com baixa fertilidade. Há grandes variações genéticas entre e dentro de espécies para produtividade em solos inférteis. As causas dessas variações aos poucos estão sendo entendidas. Como exemplo, as variações observadas na rizosfera, onde ocorrem modificações no efluxo de prótons, ácidos orgânicos e enzimas, são importantes para a mobilização de nutrientes como o P e metais de transição, e para evitar a toxidez do Al. Diferenças entre cultivares de trigo brasileiras, na tolerância à deficiência de P por exemplo, foram determinadas por autores como Miranda (1985), Rosa & Camargo (1990), Soon (1992) e Abichequer *et al.* (2003).

O cultivar de trigo Toropi é considerado tolerante á deficiência de P, com maior habilidade de absorção e utilização de P, sendo utilizado como fonte melhoradora (Ben & Rosa, 1983; Camargo & Felício, 1987; Abichequer & Bohnen, 1998; Ben & Dechen, 1998; Freitas *et al.*, 1999; Abichequer *et al.*, 2003; Camargo *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*,

2008) e o cultivar Anahuac é considerado sensível à deficiência de P em experimentos realizados em solo.

Muitos autores utilizam a eficiência de uso de nutrientes para identificar a variabilidade de plantas. No entanto, a eficiência de uso não é um parâmetro bem caracterizado. Para Gourley *et al.* (1993 e 1994), eficiência de nutrientes mede a capacidade da planta em adquirir e utilizar nutrientes para uma determinada produção. Lynch (1998) define eficiência de nutrientes como a habilidade do sistema em converter entradas para desejáveis saídas, e minimizar as perdas na conversão. Camargo & Felício (1987) classificaram, cultivares de trigo, com base na razão do peso seco da parte aérea e a quantidade de P presente no tecido. Segundo Batten (1992) deve-se ter cuidado na comparação de eficiência, pois genótipos com maior capacidade de aquisição de P_i do solo podem ser considerados ineficientes por possuírem maior concentração de P nos tecidos. Por outro lado, em condições de deficiência de nutrientes, no caso P, a maior quantidade de P obtido e utilizado pelo genótipo o faz mais tolerante a deficiência. Assim, o termo tolerância é utilizado como a capacidade de suportar uma condição adversa com desenvolvimento normal. Em um genótipo tolerante há pelo menos três fatores envolvidos: a capacidade de aquisição, de absorção e de utilização do nutriente pela planta.

A capacidade de aquisição de P do solo pela planta baseia-se na superior habilidade para capturar P_i do solo. Esta se dá entre outras razões pela alteração na morfologia ou arquitetura da raiz, aumentando a proporção de superfície da raiz e o volume de solo, conseqüentemente, aumentando a exploração do solo. A absorção de P pelas plantas é proporcional à densidade das raízes. Isto reflete em aumento da proporção raiz-parte aérea, no número de raízes laterais e no número e tamanho dos pêlos radiculares (Kochian *et al.*, 2004, Raghothama, 1999). Bioquimicamente, cita-se a ação de ácidos orgânicos e de fosfatases secretadas mobilizando compostos orgânicos

no solo, ou agindo na matriz do solo. Existe uma série de estudos que averiguou, em diversas espécies, produção e secreção de ácidos orgânicos para a rizosfera, a fim de solubilizar P em condições de deficiência (Shen *et al.*, 2002; Nuruzzaman *et al.*, 2006). O aumento do Pi, via aumento da mobilização e reciclagem, também é obtido através da secreção de fosfatases endógenas, RNAases e da liberação de prótons. A captura do Pi pode ser incrementada também devido ao aumento da absorção, através da maior indução de transportadores de Pi de alta afinidade (Tadano & Sakai, 1991; Raghothama, 1999).

A absorção de Pi do solo pelas plantas ocorre através de um processo de co-transporte com próton (H^+), via um gradiente eletroquímico de membrana gerado com o consumo de ATP (Sakano, 1990). Análises cinéticas propõem dois mecanismos de absorção de Pi, compostos por dois sistemas cineticamente diferentes de absorção: transporte de alta afinidade e de baixa afinidade (Furihata *et al.*, 1992, Schachtman *et al.*, 1998) ou baixa (μM) e alta (mM) concentração de Pi no meio externo, respectivamente. Em solos com deficiência de Pi, o sistema de transporte de alta afinidade é bastante funcional nas raízes (Aono *et al.*, 2001). Transportadores de alta afinidade são proteínas integrais de membrana que translocam Pi do meio contendo concentrações μM para o citoplasma (Raghothama, 1999, Chen *et al.*, 2008). Genes de transportadores de Pi são codificados por uma grande família de genes no genoma, esses genes são chamados de *PHT* (*Phosphate High Transporters*). Em arabidopsis, oito de nove transportadores de Pi são expressos na raiz (Mudge *et al.*, 2002). Em arroz, no mínimo 10 dos transportadores PHT1 são expressos na raiz (Paszowski *et al.*, 2002). Até o momento não foram identificados transportadores de baixa afinidade expressos em raízes (Murchael & Raghothama, 1996), o que é compreensível ao se considerar que as plantas evoluíram sob baixa disponibilidade de P.

2.3 Alumínio: do solo à planta

O Al é um metal leve, correspondendo a 7% da massa da crosta terrestre, sendo o terceiro mais abundante elemento depois do oxigênio e silício (Delhaize & Ryan, 1995). O Al está nos minerais incluindo hidróxidos, aluminossilicatos, sulfatos e fosfatos. As plantas, de alguma forma, sempre estão expostas ao Al, mas, muitas dessas formas são óxidos e aluminossilicatos que não causam toxidez às plantas. Entretanto, quando solos começam a acidificar, o Al é solubilizado formando um cátion trivalente que é tóxico (Al^{3+}) (Ma *et al.*, 2001).

Nos solos ácidos, uma apreciável porção da capacidade de troca de cátions (CTC) é preenchida por íons Al. Estes íons são referidos como Al trocável e formam a maior reserva do Al presente na solução do solo, podendo estar na solução do solo pela troca com outros cátions nas camadas dos minerais. O Al trocável é uma mistura de íons de Al monoméricos (Al^{3+} , $AlOH^{2+}$, $Al(OH)_2^+$). A possibilidade de troca vai depender da CTC do solo e o grau de saturação do Al. A liberação do Al é fortemente dependente do pH, diminuindo com o aumento do pH, até tornar-se indisponível em pH superior a 5,5 (Curtin & Smillie, 1983).

Na solução do solo, proporções significantes de Al solúvel estão presentes como complexos com ligantes orgânicos (David & Driscoll, 1984). A complexação do Al ocorre predominantemente com grupos funcionais orgânicos contendo oxigênio (COOH, fenólicos, enólicos e grupos alifáticos-OH, cetônicos e grupos funcionais éster), aqueles contendo nitrogênio (aminoácidos e porfirinas) geralmente formam complexos fracos (Stevenson & Vance, 1996).

O Al possui forte ligação com compostos doadores de oxigênio, como as moléculas presentes nas raízes, a camada de mucigel ao redor das raízes é a primeira a ser afetada, seguida pelo ápice da raiz, que por muito tempo tem sido considerado o

sítio primário de ação para a toxidez do Al. O principal sítio de absorção do Al ocorre nas células da coifa que protegem o ápice da raiz (Gregory, 2006; Miyasaka & Hawes, 2001). Uma vez ultrapassada a camada de mucigel, o Al se difunde rapidamente através das células da coifa, causando ruptura da membrana plasmática e interferência no transporte celular, até chegar as células corticais do ápice da raiz onde o Al se difunde mais lentamente. Não há evidência que o Al alcance as células em divisão no meristema primário da raiz rápido o suficiente para causar os danos que normalmente seguem a exposição ao Al (Bennet *et al.*, 1984).

A toxidez do Al é comumente o maior fator limitante na produção das culturas em solos ácidos. Nas plantas, o sintoma inicial é a inibição do crescimento radicular e a indução da formação de raízes laterais, as quais também têm o alongamento inibido (Foy, 1988). A inibição do crescimento ocorre devido ao aumento da impedância ao alongamento e redução da divisão celular das raízes (Kochian, 1995). Com o crescimento radicular restrito, é reduzida a habilidade da planta em explorar o solo, conseqüentemente, a capacidade de capturar nutrientes e água, torna-se muito menor. Como resultado, a planta produz menos biomassa, tem sua parte aérea reduzida, e apresenta sintomas dos mais variados estresses. Além do efeito indireto na absorção de nutrientes, a toxidez do Al também interfere diretamente com a atividade de absorção de íons que ocorre na membrana plasmática das células da raiz (Kochian, 1995). O Al reduz a absorção, principalmente, do Ca e do P (Huang *et al.*, 1996, Nichol *et al.*, 1993).

2.4 Fósforo: da absorção a utilização pela planta

O P é o único ânion capaz de participar da ligação diéster, sendo portanto um importante elemento estrutural de muitas macromoléculas, como ácidos nucléicos, e fosfolípídeos de membranas. O P também participa de muitos processos celulares, incluindo a transferência de energia na assimilação de carbono e na respiração e, a

regulação de inúmeras enzimas em diversos processos. Outro importante papel do P é a regulação de rotas de transdução, através da fosforilação em resposta a estímulos ambientais e ao desenvolvimento da planta. Logo, a disponibilidade de P no solo tem um profundo efeito no crescimento da planta e produtividade das culturas (Ticconi & Abel, 2004).

Em resposta a baixos níveis de Pi disponível na rizosfera, as plantas têm desenvolvido mecanismos altamente especializados para adquirir e utilizar o Pi do ambiente, como alterações morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e moleculares. Além das respostas bioquímicas de captura e extração de P do solo, outras adaptações metabólicas ao estresse de deficiência de Pi estão envolvidas nos processos fisiológicos, como a utilização de rotas glicolíticas e respiratórias alternativas, que evitam os passos metabólicos que requerem Pi ou adenilato (Duff *et al.*, 1989). A deficiência de Pi também resulta no aumento da acumulação de antocianina (para proteger as folhas da fotoinibição, resultado da pressão de excitação do fotossistema II), mudanças no metabolismo dos carboidratos (aumento no conteúdo de amido) e mudanças na composição dos lipídeos do tilacóide (reduzindo o teor de fosfolipídeos e aumentando o de galactolipídeos e sulfolipídeos, para economizar Pi).

Hamburger *et al.* (2002) identificaram em *A. thaliana*, o gene *PHO1*, que codifica uma proteína envolvida no controle do transporte a longa distância de P no xilema. Em *A. thaliana*, a família *PHO1* é composta por 11 membros, e apenas dois deles estão envolvidos no carregamento do xilema (Stefanovic *et al.*, 2007). Muitos genes envolvidos na resposta a deficiência de Pi têm sido clonados, e demonstram a importância do controle transcricional e pós-transcricional, como exemplo fatores de transcrição e microRNAs. Em plantas, o sistema regulatório para a deficiência de Pi é complexo e começa a ser elucidado. Há evidência de uma complexa resposta transcricional, envolvimento de transdução de hormônios no controle e resposta de

deficiência de Pi e a existência de uma regulação dependente do status de Pi local e sinais de longa-distância (Franco-Zorrilla *et al.* 2004, Delatorre *et al.*, 2004).

Usando uma linhagem transgênica de *Arabidopsis thaliana* contendo o transgene *AtPSI::GUS*, Rubio *et a.* (2001) identificaram o mutante *phr1*, o qual é parcialmente defeituoso na expressão de genes responsivos a Pi. O gene *PHR1* codifica um fator de transcrição MYB. Este fator de transcrição foi localizado no núcleo, liga-se a uma seqüência palindrômica imperfeita de 8-bp no promotor de genes responsivos a Pi, e se mostrou necessário para indução gênica em condições de baixo Pi. *PHR1* é regulado pela ligação a *SIZ1*, o qual funciona como SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) E3 ligase (Miura *et al.*, 2005). Estudos com cevada confirmaram a sua importância promotora na indução de transportadores de fosfato de alta afinidade (Schunmann *et al.*, 2004). Na cascata de transdução de sinais, *PHR1*, controla parcialmente a expressão de *PHF1*, que é um facilitador do tráfego para transportadores de fosfato, envolvido na localização de transportadores na membrana plasmática (Gonzalez *et al.*, 2005).

OsPTF1 foi identificado como um fator de transcrição com domínio básico *helix-loop-helix* para a tolerância à deficiência de P em arroz (Yi *et al.*, 2005). *OsPTF1* afeta a expressão de 158 genes em arroz, vários são relatados na deficiência ao P.

Outro mecanismo pós-transcricional envolvido na regulação das respostas em plantas na deficiência de P envolve a atuação de um microRNA, o miR399, onde sua superexpressão conduz a acumulação de fosfato na célula devido a um defeito na remobilização de fosfato nas folhas (Fujii *et al.*, 2005).

Análises de transcriptoma têm conseguido identificar além de fatores de transcrição, centenas de genes que apresentam mudanças em suas expressões em condições de deficiência de P em diversas espécies (Wasaki *et al.*, 2003, Misson *et al.*, 2005, Morcuende *et al.*, 2007).

Nas plantas, para a tolerância à deficiência de P, como para a maioria das características agrônômicas, observa-se uma distribuição fenotípica contínua, o que significa que a característica é controlada por muitos genes. Assim, a identificação de QTLs (*Quantitative Trait Locus*) torna-se o ponto de partida para analisar a base molecular da característica de tolerância à deficiência de P. Em arroz, dois QTLs foram responsáveis pelo conteúdo de P absorvido e 20,7% do total da variação fenotípica. Um QTL de pequeno efeito é associado com a eficiência de utilização de P. Isto sugere que a eficiência em absorver P é mais fortemente associada à tolerância que a eficiência de utilização de P (Ming *et al.*, 2000).

Diferenças genotípicas para deficiência em P para o trigo têm sido bem documentadas (Gahoonia *et al.*, 1999; Horst *et al.*, 1993; Manske *et al.*, 2001; Osborne & Rengel, 2002; Ozturk *et al.*, 2005), indicando que há possibilidade de aumentar a tolerância à deficiência a P em trigo através de fontes genéticas. Entretanto, o conhecimento da base genética da tolerância em trigo é ainda limitado.

Li *et al.* (1999a) estudando regiões relacionadas à tolerância a deficiência em P em linhagens nuli-tetrassômicas, derivadas de trigo comum, deduziram estarem envolvidos os cromossomos 1A, 4A, 7A, 3B, 5A, 5B e 7D. Em cevada, os cromossomos 1R, 2R e 7R. Em *Thinopyrum ponticum*, tem sido relatado como envolvidos na tolerância à deficiência em P os cromossomos 4E e 6E (Li *et al.*, 1999b, Liu *et al.*, 2001). Porém, ainda faltam estudos de QTLs para tolerância à deficiência em P em trigo.

2.5 Alumínio: a toxidez e a tolerância

A toxidez do Al é observada nas plantas pela inibição do crescimento radicular, acumulação de Al na superfície das raízes, indução da síntese de calose e acumulação de lignina formando uma cicatriz no ápice da raiz (Sivaguru & Horst, 1998). Há

também a peroxidação na membrana plasmática e inibição do transporte nos canais de cálcio, alterando a transcrição e inibição da síntese de DNA (Fukuda *et al*, 2007).

A tolerância ao Al decorre de mecanismos apoplásticos e simplásticos. Os mecanismos apoplásticos incluem a permeabilidade seletiva das membranas, a indução de uma barreira de pH na rizosfera e a liberação de compostos quelantes (Kochian, 1995). Pesquisas têm se concentrado no estudo da liberação de ácidos orgânicos, onde as raízes em presença do estresse liberam ânions de ácidos orgânicos que quelam os íons Al e assim, evitam a interação com componentes celulares e a penetração no simplasto da raiz. Uma mucilagem viscosa, consistindo principalmente de polissacarídeos, também é secretada pelas raízes e pode atuar como uma barreira ao Al (Kochian, 2004). Os mecanismos simplásticos incluem a atenuação da toxidez internamente a célula, por ácidos orgânicos, proteínas e outros ligantes, a acumulação do Al no vacúolo e a ativação de enzimas Al-tolerantes (Kochian, 2004).

Uma grande correlação entre a exsudação de ácidos orgânicos e os níveis de tolerância ao Al foi encontrada em muitas espécies. Os dois primeiros genes identificados na tolerância ao Al são relacionados aos ácidos orgânicos, como é o caso do *TaALMT1*, transportador constitutivo de malato encontrado em trigo (Sasaki *et al.*, 2004) e *SbMATE*, um transportador de citrato ativado pelo Al encontrado no sorgo e cevada (Furukawa *et al.*, 2007; Magalhães *et al.*, 2007). Ambos os genes são expressos no ápice das raízes apenas em linhagens tolerantes ao Al. Em sorgo, *SbMATE* é controlado pelo loci Alt_{SB} , explicando mais de 80% da variação fenotípica na população estudada por Magalhães *et al.* (2004, 2007). Recentemente, um fator de transcrição, STOP1, foi identificado em pH baixo e associado a tolerância ao Al em *Arabidopsis thaliana*. Este fator de transcrição é exigido para a expressão de *AtALMT1*, homólogo de *TaALMT1* (Iuchi *et al.*, 2007).

Em trigo, vários estudos indicam que o malato está envolvido na tolerância primária ao Al em diversos genótipos tolerantes (Papernik *et al.* 2001; Ishikawa *et al.* 2000; Huang *et al.* 1996; Pellet *et al.* 1996; Delhaize *et al.* 1993). Sugere-se que a limitação do mecanismo da tolerância, através da liberação de malato, esteja relacionada à ativação de seu transportador na membrana plasmática das células da raiz. Como é o caso do ALMT1 (*Aluminium Malato Transporter*) de trigo, mapeado por Raman *et al.* (2005).

Não há consenso sobre o tempo de resposta fisiológica e dos processos celulares na tolerância ao Al. Em alguns sistemas, sintomas e respostas são detectados rapidamente e em outros são somente discerníveis depois de um longo tempo de exposição ao Al (Ma *et al.*, 2001; Kochian *et al.*, 2005). Isto sugere que a toxidez de Al esteja envolvida não apenas como uma resposta direta da planta, mas um distúrbio geral de sua homeostase.

Apesar de uma grande parte do Al presente no solo interagir com os mecanismos apoplásticos, uma pequena fração entra no simplasto e interage no interior das células das raízes, ocorrendo rápida inibição da expansão e alongamento da raiz. Em prolongadas exposições ao Al, este interage com o núcleo das células das raízes resultando na inibição da divisão e distúrbios do citoesqueleto (Kochian *et al.*, 2005). Por ser o Al bastante reativo, pode atuar em diferentes alvos, em diferentes rotas do crescimento radicular ou organelas, causando danos: como na parede celular, na membrana plasmática, em rotas de transdução de sinais, no citoesqueleto e no DNA nuclear (Kochian *et al.*, 2005).

Importância se deve dar a interação do Al com a membrana plasmática na tolerância, dado a sua importância para a integridade celular. Nas raízes, o cátion Al pode interagir fortemente com a superfície negativa da membrana plasmática causando alteração na sua e no potencial eletroquímico. Uma vez alterada a superfície da

membrana plasmática, todo o ambiente iônico próximo as raízes é alterado, causando distúrbios no processo de transporte de íons.

A síntese de calose (β -1,3-glicana) é dependente da presença de cálcio. Tem-se sugerido que a interferência do Al na superfície da membrana pode aumentar o cálcio na célula, estimulando a sua síntese. A síntese de calose na membrana plasmática é rapidamente ativada em exposição ao Al, e sua acumulação no apoplasto, tem sido usada como uma medida de resposta rápida da toxidez de Al. Sob estresse de Al, a acumulação de calose pode levar a um dano celular pela inibição do transporte intercelular através dos plasmodesmos (Sivaguru *et al.*, 2000).

Em Triticeae, até pouco tempo atrás a genética da tolerância ao Al era considerada de herança simples ou qualitativa, herdável, sendo atribuída a poucos genes de efeito maior, mas recentes estudos têm evidenciado que a tolerância ao Al em trigo para alguns genótipos é uma característica multigênica possuindo diferentes mecanismos fisiológicos de resposta (Ryan *et al.*, 2009).

Através de análises de QTLs, foi identificado um QTL na região distal do cromossomo 4DL, que explicou cerca de 50% da variação fenotípica para a tolerância ao Al (Raman *et al.* 2005). Um segundo mecanismo de tolerância ao Al em trigo foi localizado no cromossomo 4BL (Ryan *et al.*, 2008). Outros *loci* têm sido mapeados em trigo, no braço longo do cromossomo 4D, são chamados de Alt_{BH} ou Alt₂ (Milla & Gustafson, 2001).

A descoberta da variação genética para a tolerância ao Al ocorreu há mais de 100 anos, a partir do cultivo do trigo na região Sul do Brasil em áreas que apresentavam severa acidez de solo e toxidez por Al. Na região de origem do trigo não há ocorrência de solos ácidos. Através dos esforços de melhoristas brasileiros para alavancar as áreas produtoras de trigo foram selecionados genótipos de trigo que não possuíam a

característica de “crestamento”, como na época era chamado o sintoma causado por níveis elevados de Al tóxico e deficiência de P nos solos ácidos.

Devido à forte associação entre a tolerância ao crestamento e desempenho superior, a tolerância ao Al foi a primeira característica selecionada nos programas de melhoramento de trigo brasileiros, dando origem a primeira cultivar tolerante ao crestamento em 1914, Polyssu. Polyssu foi cruzada com uma série de linhagens desenvolvidas pelo melhorista Alfredo Chaves, as linhagens AC, como foram denominadas, possuindo superior tolerância e produtividade em solos ácidos. A partir destes cruzamentos, diversas cultivares foram obtidas e perduraram no Brasil por várias décadas, Frontana, Colonias, Frontiera, Maringa, BH1146 e Toropi, e serviram de fonte de genes para outros programas de melhoramento contribuindo para a expansão do trigo no mundo nas áreas com solos ácidos (Rengel, 2003). Os principais genótipos de trigo utilizados como fonte de tolerância à toxidez de Al no mundo são brasileiros.

2.6 Fósforo e alumínio: respostas similares?

O conceito de estresse em plantas pode ser definido como uma condição desfavorável ou substância que afeta ou bloqueia o metabolismo, o crescimento, ou o desenvolvimento. Há uma diferença entre os efeitos de estresses de longo e curto período, assim como entre eventos de baixo estresse, que podem ser parcialmente compensados por aclimação e mecanismos de reparo e, eventos de estresse alto ou crônico, que podem causar danos consideráveis e eventualmente, levam a morte celular da planta (Lichtenthaler, 1996).

No início do estresse quando as plantas são confrontadas com uma situação crítica, devido ao declínio das funções fisiológicas, processos de reparo e metabolismo de aclimação são ativados e alterações morfológicas são geradas.

Os mecanismos que conferem tolerância a íons de metais tóxicos em plantas incluem: evitar fisicamente áreas contaminadas, exsudação de agentes complexantes na rizosfera, ligação na parede celular, efluxo dos íons metálicos do simplasto, prevenção da translocação dos íons para a parte aérea, complexação com vários ligantes no simplasto, transporte dos complexos metal-ligante para o interior do vacúolo, estocagem dos íons no vacúolo pela complexação com ligantes vacuolares e modificações enzimáticas para minimizar o dano causado pela toxidez (Ma *et al.*, 2001; Prasad, 1995).

Já os mecanismos que conferem a capacidade de aquisição de nutriente em condições de deficiência em plantas incluem: alteração nos aspectos de aquisição, utilização e morfologia, na tentativa de adquirir e maximizar os recursos escassos, compreendendo o aumento no alongamento e volume das raízes, remobilização dos nutrientes do vacúolo, modificações enzimáticas e rotas de atalho (Raghothama, 1999).

Existe uma série de estudos que avaliou, em diversas espécies, produção e secreção de ácidos orgânicos para a rizosfera, a fim de solubilizar P em condições de deficiência, bem como complexar o Al. Malato e citrato são os ácidos orgânicos predominantemente secretados pelas raízes sob deficiência de P (Raghothama, 1999). Em trigo, os ácidos orgânicos malato e citrato têm papel principal na detoxificação do Al (Ma *et al.*, 2001, Ryan *et al.*, 2009). Aumento na atividade de fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilase em resposta à deficiência de P foi encontrado em muitas plantas, confirmando a importância dos ácidos orgânicos. Além disso, deficiência de P pode conduzir a ativação e síntese dos transportadores de ânions ou canais que secretam ácidos orgânicos (Raghothama, 1999), como também observados na toxidez por Al. A exsudação de ácidos orgânicos tem sido um dos mais relevantes estudos na resposta à deficiência de P e à toxidez ao Al. Jones *et al.* (1996a e b) observaram aumento na

concentração de ácidos orgânicos na solução de solo de 70 para 200 μM , sob condições de deficiência de P e toxidez de Al.

Além da exsudação de ácidos orgânicos como mecanismos de adaptação das plantas tolerantes ao Al e a deficiência de P, há processos de aclimatação por meio de respostas de proteção oxidativas e sinalização que são bastante estudados (Bowler *et al.*, 1992; Prasad *et al.*, 1994; Foyer *et al.*, 1997; Dat *et al.*, 1998; Karpinski *et al.*, 1999; Dat *et al.*, 2000; Polle e Schützendübel, 2002; Gapper e Dolan, 2006; Mullineaux *et al.*, 2006). Esses sistemas de defesa podem remover ou neutralizar oxi-radicaís e seus intermediários. As plantas têm desenvolvido muitos mecanismos para prevenir ou amenizar os danos que as espécies reativas de oxigênio (ERO) podem causar em diferentes compartimentos celulares (Foyer & Noctor, 2003).

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos a fim de detalhar a expressão e identificar genes em diversos estresses. Análises de transcriptoma como a Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH) tem sido utilizadas com sucesso em várias espécies para isolar genes envolvidos em respostas a estresses bióticos e abióticos (Zhang *et al.*, 2005; Venkatachalam *et al.*, 2007).

Fukuda *et al.* (2007) têm relatado que a deficiência de P geralmente influencia os produtos finais do metabolismo de carbono como a secreção de ácidos orgânicos nas raízes e acumulação de amido. Já o estresse por Al, também afeta a exsudação de ácidos orgânicos e alteração da estrutura da parede celular. Entretanto, as respostas para deficiência de P e estresse por Al e suas redes metabólicas ainda não são claras. Assim, para a identificação dos mecanismos adaptativos para deficiência de P e estresse ao Al têm sido propostas análises de transcriptoma. Estudos de transcriptoma para deficiência de P (Wasaki *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008) e tolerância ao Al (Guo *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Kumari *et al.*, 2008), conduzidos separadamente, foram realizados em diferentes espécies. Em trigo, para o cultivar Toropi, Boff (2006)

desenvolveu biblioteca de sequências expressas em ápices radiculares em resposta a exposição por uma hora ao Al. Porém estudos de transcriptoma realizados para a deficiência de P e a tolerância ao Al conjuntamente são poucos (Fukuda *et al.*, 2007).

Estudos de interferência do Al e P no desenvolvimento das plantas contribuirão para o entendimento da inter-relação desses elementos no desenvolvimento da planta possibilitando a obtenção de genótipos eficazes e produtivos em solos ácidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os genótipos utilizados foram Toropi, Anahuac e uma população de 90 linhagens recombinantes F_8 (RILs – *Recombinant Inbred Lines*) oriundas do cruzamento Toropi X Anahuac desenvolvida pelo Dr. Euclides Minella e fornecidas pela Embrapa Trigo/CNPT – Passo Fundo. Estudos foram conduzidos com os mesmos genótipos por Boff (2006) e Costa *et al.* (2008) para tolerância ao Al e Silva (2007) para a deficiência de P.

Os experimentos de análise de concentração de P, de expressão gênica e de mapeamento foram conduzidos nos laboratórios do Departamento de Plantas de Lavoura, da Faculdade de Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As sequências obtidas da análise de expressão gênica foram seqüenciadas no Laboratório ATCGene, no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.1 Análise da concentração de fósforo

3.1.1 Preparo das sementes

Sementes dos genótipos Toropi e Anahuac foram superficialmente esterilizadas via imersão em etanol 70%, seguida de uma solução de 4% de hipoclorito de sódio, durante 3 minutos sob agitação contínua, seguida de tríplice lavagem com água destilada.

As sementes foram distribuídas em papel germinador e colocadas em câmara incubadora, na temperatura de $23^{\circ}\text{C}(\pm 1)$, durante 72 horas. Após atingirem um comprimento mínimo de 10 mm de raiz, o endosperma foi retirado por meio de corte (FIGURA 2).



FIGURA 2. Demonstração da retirada do endosperma de plântulas de trigo germinadas após 72 horas. A) plântula de trigo com endosperma; B) plântula de trigo com seu endosperma retirado ao lado; C) exemplos de plântulas de trigo momento antes de serem colocadas em tratamento.

3.1.2 Condições de crescimento

As plântulas foram selecionadas com tamanho similar de radícula e distribuídas de forma equidistante (2 cm) sobre telas plásticas adaptadas a tampas de recipientes plásticos de 3,0 L de capacidade, que continham solução nutritiva. Os recipientes foram mantidos em câmara (FIGURA 3) sob luz constante, com temperatura de $21^{\circ}\text{C}\pm 1$ e ligados a um sistema de aeração contínua da solução nutritiva, a qual foi renovada a cada 48 horas.



FIGURA 3. Sistema de condução experimental em potes com soluções de tratamento aeradas, com tampa de tela em *nylon* onde são colocadas as plântulas de trigo em contato com a solução (foto ilustrativa).

As plântulas com endosperma removido foram submetidas ao estresse de P via solução nutritiva sem adição de P (-P), durante 24, 120 e 240 horas. No tratamento controle, as plântulas permaneceram em solução nutritiva nos mesmos tempos citados, porém com adição de 1mM de P na forma de KH_2PO_4 (+P).

A solução nutritiva básica é descrita na TABELA 1 e foi descrita por Camargo & Oliveira (1981) e adaptada por Dornelles (1994) e Nava *et al.* (2005).

TABELA 1. Componentes químicos e sua concentração final para solução nutritiva básica.

Componente químico	Concentração final (mM)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,435
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	4
CuSO_4	0,0003
GeoFe- 6*	0,009
H_3BO_3	0,01
KNO_3	4
MgSO_4	2
MnSO_4	0,002
Na_2MoO_4	0,0001
NaCl	0,003
ZnSO_4	0,0008

* Nome comercial.

Os experimentos seguiram o delineamento experimental de blocos casualizados, com duas repetições de dez plântulas, tendo sido analisados de maneira independente.

3.1.3 Determinação da concentração de fosfato livre e fósforo total

Para determinar a concentração de P na planta foi necessária a obtenção do peso de matéria seca de raízes e parte aérea. Dez plântulas foram seccionadas na ocasião da coleta, lavadas com água destilada, mantidas em nitrogênio líquido, maceradas, secas em estufa de ventilação forçada a 60 °C por 48 horas e pesadas.

Para análise de Pi livre e P total, foi utilizado o método de Ames (1966) com modificações. A extração de Pi livre foi realizada em 0,5 ml de TCA 10 % (ácido tricloro-acético), durante 30 min sob temperatura de 4 °C. Aliquotas do extrato foram retiradas, acrescentando-se a elas uma solução redutora, que continha molibdato de amônio 4,2 g L⁻¹ em H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ e ácido ascórbico 150 g L⁻¹ (6:1 v/v). Após incubação por 1 h a 37 °C avaliou-se a absorbância em espectrofotômetro ultravioleta-visível, modelo Spectronic Gênesis II, em 820 nm, comparando-se com a curva calibrada (0–1500 µmol L⁻¹ de KH₂PO₄) (FIGURA 4).

Para obtenção de P total foi necessário levar os tecidos a cinzas. A extração de P total foi realizada utilizando 100 mg da amostra em peso seco, acrescentado 0,3 mL de solução alcoólica contendo 10% de nitrato de magnésio (Mg(NO₃)₂ em etanol 95%) em tubo de ensaio, agitando o tubo sobre chama até obter fumaça límpida. Acrescentou-se às cinzas 0,3 mL de HCl 0,5 mol L⁻¹, após incubação por 15 min a 37°C, adicionou-se a mesma solução redutora da extração de Pi livre, procedendo os mesmos passos.

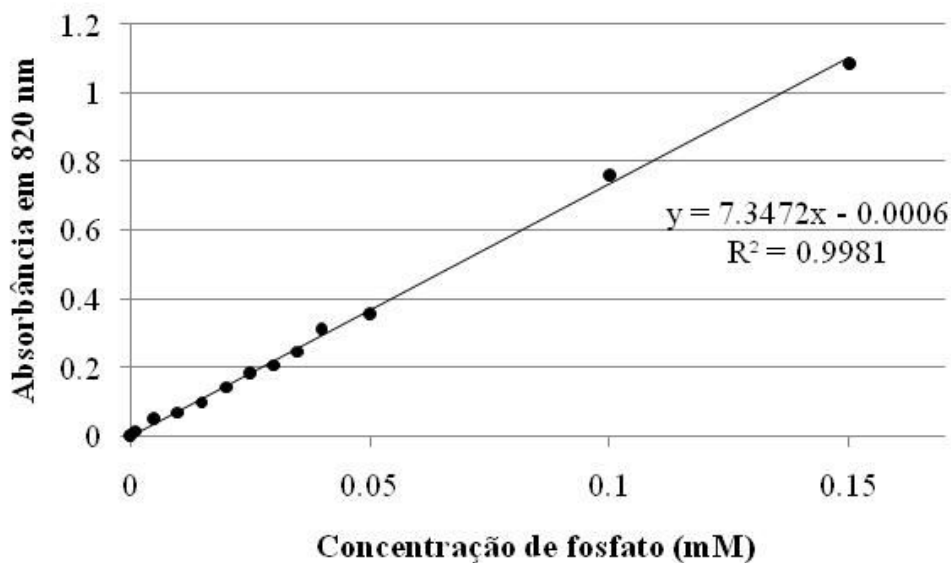


FIGURA 4. Curva padrão de fosfato em comprimento de onda de 820 nm e a equação representativa da regressão linear.

As quantidades de Pi livre e P total nas raízes e na parte aérea foram calculadas pela multiplicação da concentração de Pi livre e P total obtida pela matéria seca respectiva de cada parte da plântula. A quantidade total de Pi livre e P total foi obtida pela soma das quantidades de P obtidas nas raízes e na parte aérea. A eficiência de translocação de Pi (ET) foi calculada como a razão entre as quantidades de Pi livre na parte aérea e na plântula (Li *et al.*, 1991). A concentração de Pi livre e P total dos endospermas também foi determinada.

$$ET = \text{Pi na Parte aérea} / \text{Pi na plântula}$$

Para a análise estatística, utilizou-se o programa SAS (*Statistical Analysis System*), sendo os dados submetidos à análise de variância. A comparação entre médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5 %.

3.2 Avaliação da concentração de fósforo para mapeamento

3.2.1 Condições de crescimento

A população de 90 linhagens recombinantes (RILs – *Recombinant Inbred Lines*) derivada do cruzamento dos genótipos Toropi X Anahuac foi utilizada para a fenotipagem quanto à tolerância à deficiência de P, tendo os pais como testemunhas.

As sementes foram preparadas conforme descrito no item 3.1.1. As plântulas em solução nutritiva foram mantidas em câmara sob luz constante, com temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e ligados a um sistema de aeração da solução nutritiva.

Os materiais foram avaliados após 240 horas de exposição em baixo P ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de KH_2PO_4) e alto P ($1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ de KH_2PO_4) adicionados em solução nutritiva básica (TABELA 1) em condições de hidroponia. A solução nutritiva completa foi trocada a cada 48 horas de condução do experimento. As doses de P para a diferenciação dos genótipos e linhagens quanto à tolerância à deficiência de P foram definidas segundo Silva (2007).

3.2.2 Avaliação fenotípica da população

Para a fenotipagem da população à deficiência de P foi determinada a concentração de Pi livre nas plantas conforme descrito no item 3.1.3.

Os parâmetros avaliados na fenotipagem foram a concentração de Pi livre - CPL ($\text{g Pi livre.kg de peso seco}^{-1}$) e a quantidade de Pi livre – QPL (mol) e matéria seca MS - (mg) nas raízes (R) e na parte aérea (S) para baixo P e alto P, seguindo o modelo de análise de variância apresentado na TABELA 2. As relações adimensionais entre os parâmetros de baixo/alto P ($10\mu\text{M}/1000\mu\text{M}$ de P) na solução também foram avaliadas, sendo concentração de Pi livre relativa - RCPL [$(\text{g Pi livre} \cdot \text{kg de peso seco}^{-1}$ em baixo

P) . (kg de peso seco . g Pi livre⁻¹ em alto P)], quantidade de Pi livre relativa - RQPL (mol de P em baixo P. mol de P em alto P⁻¹) e matéria seca - RMS (mg em baixo P . mg em alto P⁻¹) nas raízes e na parte aérea seguindo o modelo de análise de variância apresentado na TABELA 3.

TABELA 2. Modelo de análise de variância para os parâmetros avaliados na fenotipagem quanto à deficiência de P, para os genótipos Toropi e Anahuac medidos após 240 horas em solução com 10µM e 1 mM de P, para raízes e parte aérea.

Causas da variação	GL	QM	F teste
Genótipo (G)	1	SQ^G/GL^G	QM^G/QM^{Erro}
Repetição (R)	2	SQ^R/GL^R	QM^R/QM^{Erro}
Tratamento (T)	3	SQ^T/GL^T	QM^T/QM^{Erro}
G x T	3	SQ^{GT}/GL^{GT}	QM^{GT}/QM^{Erro}
G x R x T	10	SQ^{GRT}/GL^{GRT}	QM^{GRT}/QM^{Erro}
Erro	40	SQ^{Erro}/GL^{Erro}	
Total	59		

Os experimentos seguiram o delineamento experimental de blocos casualizados, com três repetições de três plântulas cada, tendo sido analisados de maneira independente, totalizando 636 amostras. Para a análise estatística, utilizou-se o programa SAS (*Statistical Analysis System*), sendo os dados submetidos à análise de variância. A comparação entre médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5 %.

TABELA 3. Modelo de análise de variância para a relação dos parâmetros avaliados entre tratamentos 10µM e 1mM de P na fenotipagem quanto à deficiência de P, para os genótipos Toropi e Anahuac.

Causas da variação	GL	QM	F teste
Genótipo (G)	1	SQ^G/GL^G	QM^G/QM^{Erro}
Repetição (R)	2	SQ^R/GL^R	QM^R/QM^{Erro}
Erro	11	SQ^{Erro}/GL^{Erro}	
Total	14		

3.2.3 Marcadores AFLP para mapeamento

Os marcadores “*Amplified Fragment Length Polymorphism*” (AFLP) e marcadores microssatélites mapeados no cromossomo 4D, *Xgdm129* (Pestsova *et al.*, 2000), *Xbarc105*, *Xbarc334* e *Xbarc1118* (Song *et al.*, 2005) polimórficos identificados previamente, a partir de população de linhagens recombinantes F₇ (RILs) de Toropi X Anahuac por Boff (2006), foram utilizados para mapeamento de mesma população fenotipada quanto à tolerância à deficiência de P. A técnica de AFLP utilizada por Boff (2006) seguiu o protocolo de Vos *et al.* (1995) com algumas adaptações. As enzimas de restrição utilizadas foram MseI, como corte frequente e PstI com corte raro. Foram utilizadas 24 reações de amplificação seletiva que geraram fragmentos polimórficos e com padrão de segregação consistente. A partir dessas 24 reações foram identificados 282 marcadores.

As sequências dos iniciadores dos marcadores microssatélites (*SSR – Simple Sequence Repeats*) utilizados estão disponíveis no *GrainGenes*. As amplificações seguiram protocolos descritos por Song *et al.* (2005), Gupta *et al.* (2002) e Pestsova *et al.* (2000).

3.2.4 Construção do mapa genético e identificação de QTLs

Os marcadores polimórficos analisados por Boff (2006) deram origem a uma planilha de presença e ausência, respectivamente. Esses dados foram transformados por códigos A e B, para entrada no programa Mapmaker/Exp 3.0 (Lander *et al.*, 1987) para identificação de grupos de ligação através de frequências de recombinação calculadas pela função genética de Kosambi (Kosambi, 1944). Análises prévias da população segregante foram realizadas pelo teste χ^2 segundo a proporção de segregação 1:1.

Os valores fenotípicos analisados para deficiência de P que se mostraram significativamente diferentes para os genótipos Toropi e Anahuac, segundo a análise de variância a 5%, foram utilizados para análise de mapeamento por intervalo simples e composto para identificação de associação com a tolerância ao Al e a deficiência de P pelo programa Windows QTL Cartographer (Wang *et al.*, 2007). O nível de significância de LOD para detectar QTLs foi de 2,5 e varredura de 2 cM para análise de intervalo composto (Zheng, 1994).

3.3 Metabolismo anti-oxidativo

3.3.1 Extração de proteína

Plantas dos genótipos Toropi e Anahuac foram cultivadas conforme descrito no item 3.1.2. Cinco plântulas de cada tratamento foram seccionadas e coletadas as raízes, as quais foram lavadas com água destilada e congeladas. As amostras em volume 3:1 de tampão fosfato e tecido foram maceradas com auxílio de cadinho e pistilo resfriado em gelo. A solução tampão fosfato continha 100 mM de tampão de fosfato de potássio a pH 7,5, 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 3 mM de DL-ditioneitol (DTT). O homogeneizado macerado foi centrifugado a 13.000 g por 20 min a 4°C e o sobrenadante foi retirado em novo tubo e armazenado em alíquotas a -20°C.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando curva calibrada por BSA (*Bovine Serum Albumine*) (FIGURA 5). A absorbância foi determinada em espectrofotômetro ultravioleta-visível, modelo Spectronic Gênesis II, em 595 nm.

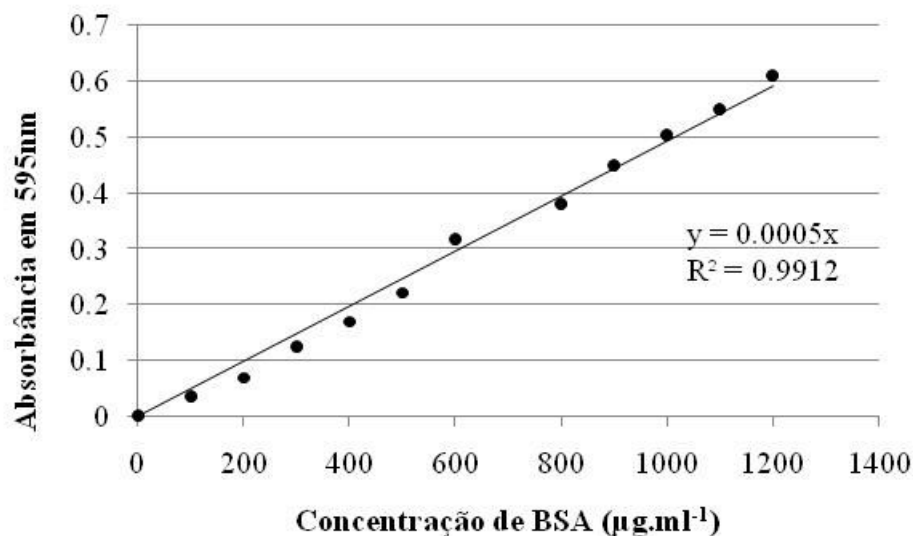


FIGURA 5. Curva padrão de BSA, calibrada para proteína em comprimento de onda de 595 nm.

3.3.2 Determinação de atividade enzimática

Foram realizadas análises da atividade enzimática por monitoramento da reação para as enzimas catalase (CAT) e glutathione redutase (GR) em espectrofotômetro conforme descrito por Azevedo *et al.* (1998). A atividade da CAT foi determinada em espectrofotômetro a 25°C em reação contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 2,5 µL de solução a 30% (v/v) de peróxido de hidrogênio, preparado imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada com a adição de 20 µL de extrato protéico vegetal e a atividade foi determinada pelo monitoramento da degradação do peróxido a 240 nm por 1 min a cada 5 s contra um branco livre de extrato.

A atividade de GR foi determinada em espectrofotômetro a 30°C, a partir de reação contendo 3 mL de 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5), 1 mM de 5,5 – ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico) (DNTB), 1 mM de glutathione oxidada (GSSG) e 0,1 mM de NADPH. A reação foi iniciada pela adição de 25 µL de extrato enzimático. A taxa de redução da GSSG foi acompanhada pelo monitoramento do aumento na absorbância a 412 nm durante 1 min.

3.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

A eletroforese foi conduzida verticalmente sob condições não desnaturantes em géis de poliacrilamida a 10% (m/v), revelados para atividade de superóxido dismutase (SOD) e GR. Uma corrente constante de 30 mA/gel foi aplicada por 4 horas para géis revelados para atividade de GR e 3 horas para géis revelados para atividade de SOD a 4°C. Os tampões de eletroforese e géis nativos foram preparados conforme descrito por Laemmli (1970), exceto o SDS que foi excluído. Quantidades iguais de 30 ng de proteína foram aplicadas em cada poço do gel, no primeiro poço foi aplicado o marcador padrão de atividade correspondente para GR e SOD.

Para revelação da atividade da GR em géis nativos foi utilizado o método descrito por Lee & Lee (2000) e modificado por Medici *et al.* (2004). Os géis foram lavados em água deionizada, e incubados no escuro por 30 min em temperatura ambiente em 50 mL de solução de reação contendo 0,25 mM de tampão Tris pH 7,5, 0,5 mM de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), 0,7 mM de 2,6-dicloro-N-(4-hidroxifenil)-1,4-benzoquinonaimina de sódio (DPIP), 3,4 mM de GSSG e 0,5 mM de NADPH.

Para a revelação da atividade de SOD após a separação eletroforética, foi realizada conforme protocolo descrito por Beauchamp e Fridovich (1971) e modificado por Azevedo *et al.* (1998). Os géis foram lavados em água deionizada e incubados no escuro por 30 min em temperatura ambiente, em solução contendo 50 mM de riboflavina, 0,1 mM de nitroblue tetrazolium (NBT) e 0,3% (v/v) de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED). Ao final deste período, os géis foram lavados com água deionizada e então iluminados em água até o surgimento de bandas descoloridas relativas à atividade da SOD, em um gel de revelação púrpura. Para paralisar a reação, os géis foram transferidos para ácido acético a 7% (v/v).

3.4 Análise da expressão gênica em resposta à deficiência de fósforo

3.4.1 Extração do RNA e síntese de cDNA

O material vegetal utilizado para análise da expressão gênica foi a cultivar Toropi por ser tolerante aos estresses em estudo. O preparo das sementes e as condições de crescimento seguiram conforme descrito nos itens 3.1.1 e 3.1.2.

Para proceder a síntese de cDNA (ácido desoxirribonucléico complementar) para ser utilizado no método de Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH), foram coletados os ápices radiculares (1cm) de quatro raízes de Toropi nos tempos de 24, 120 e 240 horas, para cada repetição biológica de cada tratamento, e imediatamente imersos em nitrogênio líquido. O isolamento do RNA total (ácido ribonucléico) foi realizado com kit “Concert™ Plant RNA Reagent, Invitrogen®”. Cada tratamento contou com duas repetições biológicas. O RNA total de cada tratamento e repetições foi quantificado em espectrofotômetro “Genesys 2™ Thermo Spectronic”, em comprimento de onda de 260 nm. Foram calculadas concentrações iguais de RNA (1µg/µl) em solução única, formando *bulk* controle com presença de 1 mM de P (BC) e *bulk* de estresse a P sem P (BE). Uma vez formado os *bulks*, realizou-se a transcrição reversa, de tal modo que fossem formados fragmentos de fita simples de cDNA de comprimento mais completo possível e, que possuísem na fita formada um sítio de endonuclease e extensão conhecida, para facilitar a identificação do cDNA de interesse. Assim, para síntese da fita simples de cDNA foi utilizada 1U da transcriptase reversa “SuperScript™II, Invitrogen®” e do iniciador composto por oligonucleotídeo(dT) modificado chamado Primer T, a fim de capturar a cauda poliA⁺ do mRNA presente no RNA total, e acrescentar um sítio de restrição para a endonuclease RsaI (em negrito) de Primer G.

Segundo Matz *et al.* (1999) quando a transcriptase reversa termina a fita na extremidade 5', adiciona uma cauda de citosina na extremidade 3' da fita simples de cDNA formada. Assim, adicionando um oligonucleotídeo (dG) modificado, como Primer G, ocorrerá um pareamento com a cauda de citosina formada pela transcriptase reversa, criando uma extensão do cDNA. Deste modo, é otimizada a captura de seqüências completas, pois quando a transcriptase reversa pausar antes do fim da seqüência original, não adicionará a cauda de citosina e assim não haverá o pareamento com o oligonucleotídeo(dG).

TABELA 4. Seqüências iniciadoras para síntese de cDNA para condução do método SSH.

Nome	Seqüência
Primer T	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT ₍₃₀₎ V N3' (V = A, G ou C, N= A, C, G ou T)
Primer G	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG 3'
Primer SS	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3'

A síntese da fita simples de cDNA foi realizada em duplicata para cada *bulk* (BC1, BC2 e BE1, BE2). Para cada reação foi utilizado 3 µL de RNA (3µg), 1 µL de PrimerT a 12µM, 1 µL de PrimerG a 12µM, em um volume total de 5 µL e incubada por 2 minutos a 70°C em termociclador “Eppendorf® Mastercycler”. As reações foram retiradas do termociclador e mantidas na bancada até atingir a temperatura ambiente, após foram adicionados 2 µL de tampão 5X para primeira fita (250 mM Tris-HCL, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1µL de ditiotretitol (DTT) a 20 mM e 1µL dNTP mix (10mM cada nucleotídeo), incubados novamente por 2 minutos a 42°C. Imediatamente após, incubados por 1 hora a 45°C. Ao final, procedeu-se a diluição adicionando 40 µL de tampão TE (10 mM Tris pH 7,6, 1mM EDTA) e aquecimento das reações a 72°C por 07 minutos para inativar a transcriptase reversa, armazenou-se a fita simples de cDNA - 20°C.

O desempenho e a qualidade da fita simples de cDNA da etapa anterior foi verificada em espectrofotômetro “Genesys 2™ Thermo Spectronic”. Uma vez formada a fita adequadamente, foram determinados os números ótimos de ciclos de PCR para os diferentes *bulks* (BC e BE). Para cada reação foram utilizados 35,5 µL de água deionizada, 5 µL tampão 10X, 1 µL dNTPs, 1 µL Primer SS (TABELA 4), 1,5 µL de MgCl₂, 1 µL Taq Platinum® Invitrogen e 2 µL da fita simples de cDNA e quantidade de água deionizada suficiente para completar 50 µL de solução para reação.

O número ótimo de ciclos, permite a formação de cópias completas das fitas simples de cDNA suficientes para que genes de rara expressão sejam amplificados, mas se deve utilizar o menor número de ciclos possíveis para visualizar em gel de agarose 1%, a fim de evitar a formação de produtos inespecíficos na reação. Preparada as reações, estas foram colocadas em termociclador “Eppendorf® Mastercycler” pré-aquecido e avaliados os ciclos de temperatura seguintes: inicialmente 95°C por 1 minuto, e após ciclos de 95°C por 15 segundos, mais 55°C por 30 segundos e 68°C por 4 minutos, sendo coletadas alíquotas de 5 µL a cada 12, 16, 20 e 24 ciclos (FIGURA 6). Estas foram visualizadas em gel de agarose 1%, coradas com brometo de etídeo (FIGURA 7), fotografadas e analisadas por programa “Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software 3.0”. De posse do número de ciclos ótimos de 18 vezes, procedeu-se a amplificação por PCR novamente com os *bulks*.

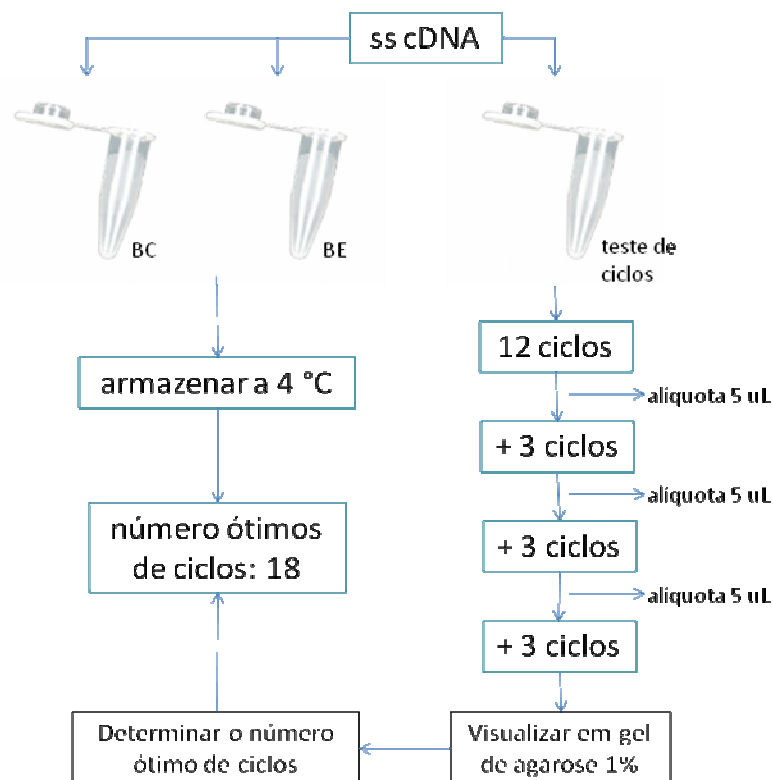


FIGURA 6. Otimização de ciclos de PCR para a síntese de dupla fita de cDNA.

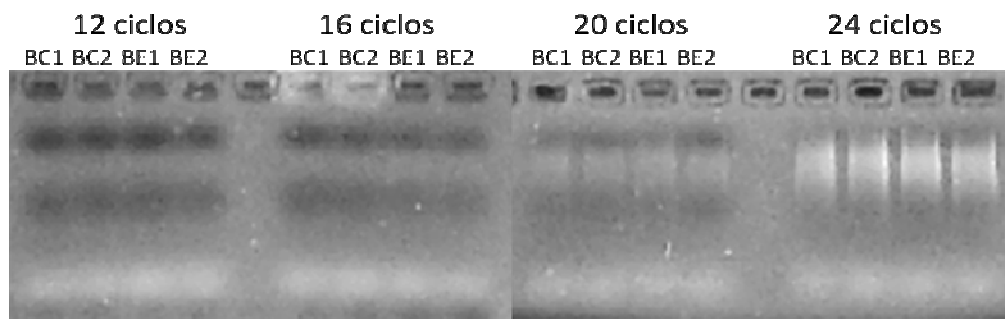


FIGURA 7. Otimização dos ciclos de PCR, ciclo ótimo entre 16 e 20 ciclos. BC – Bulk controle; BE - Bulk estresse; 1 - amostra purificada ; 2 – amostra não purificada .

3.4.2 Determinação de seqüências expressas por hidridização subtrativa

Os *bulks* - BC e BE – foram renomeados para seguir o método de SSH, propriamente dito. Cabe ressaltar que o método foi realizado em duplicata, para fins de teste, sendo utilizada uma purificação dos fragmentos do *driver* em coluna cromatográfica representada pela amostra 1, já na amostra 2 não se procedeu a purificação. O *bulk* estresse (BE) será representado pela população alvo ou *tester*, o *bulk*

controle (BC) o *driver*. Depois de realizado o PCR com o número de ciclos ótimos, procedeu-se separadamente, com o cDNA *tester* e *driver*, a clivagem com enzima de restrição Rsa I, sítio de restrição contido no inicializador Primer G.

As amostras clivadas do *driver* (BC) foram armazenadas e mantidas em -20°C , e com as amostras clivadas do *tester* (BE) foram conduzidas as ligações de adaptadores. O volume do *tester* foi dividido ao meio e adaptadores 1 e 2R (TABELA 5), foram ligados a cada metade do volume, passando a serem chamados de *tester* 1 e *tester* 2R, respectivamente. A eficiência de ligação foi testada com iniciadores específicos para os adaptadores (TABELA 5), após amplificação, foram visualizadas em gel de agarose 1% e coradas com brometo de etídeo (FIGURA 8).

TABELA 5: Seqüências de adaptadores e iniciadores específicos.

Nome	Seqüência
Adaptador 1	5' CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGT 3'
Iniciador 1	5' CTAATACGACTCACTATAGGGC 3' 5'TCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGT 3'
Adaptador 2R	5' CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT 3'
Iniciador 2R	5' CTAATACGACTCACTATAGGGC 3' 5'AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT 3'

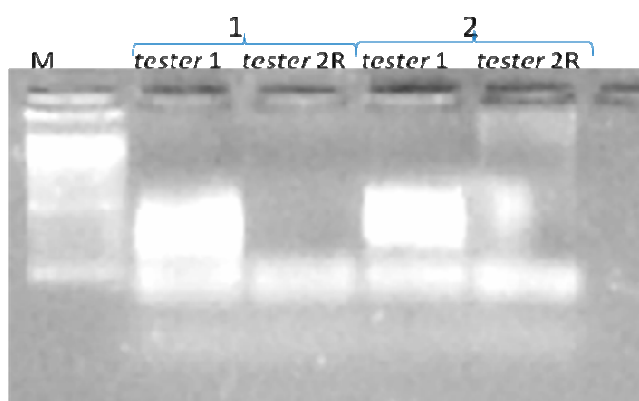


FIGURA 8. Teste de ligação do adaptador 1, utilizado iniciador 1 específico para o adaptador 1 em ambos os *testers* 1 e 2R. M – Marcador 100pb; 1 - amostra purificada ; 2 – amostra não purificada.

Obtidos os cDNA clivados dos *testers* 1 e 2R, a etapa seguinte foi realizar uma primeira hibridização com o cDNA clivado do *driver*. As amostras foram aquecidas a uma temperatura suficiente para desnaturar as fitas duplas e em seguida hibridizadas, dando origem a cDNAs híbridos de *tester-driver*.

Na segunda hibridização, as moléculas híbridas da expressão diferencial foram formadas. Um excesso de cDNA clivado do *driver*, anteriormente desnaturado, foi combinado com os híbridos formados na primeira hibridização, também anteriormente desnaturados. Ao final foram amplificados somente os fragmentos *tester* que não possuíam contrapartida no *pool* de fragmentos do *driver* (BC). Foi realizada uma PCR para confirmar a presença de fragmentos diferencialmente expressos, visualizados em gel de agarose 1% e coradas com brometo de etídeo (FIGURA 9).

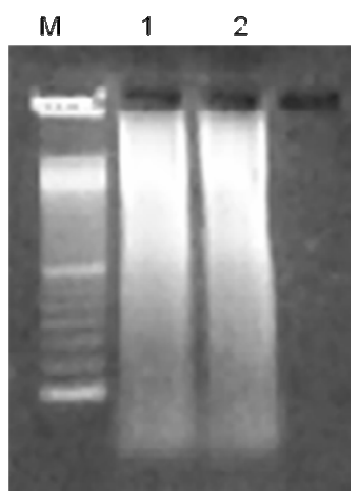


FIGURA 9. Amplificação por PCR dos fragmentos diferencialmente expressos, fragmentos pronto para clonagem. M – marcador 100pb; 1 - amostra purificada ; 2 – amostra não purificada.

Os fragmentos diferencialmente expressos foram clonados utilizando vetor “GEM-T Easy Vector System (Promega) no qual o sítio de clonagem interrompe o gene *lacZ*. Em seguida, os fragmentos foram inseridos em células competentes (*Escherichia coli*, linhagem XL1) por choque térmico.

As células foram crescidas em 04 placas de Petry, para cada amostragem, em meio LB/Agar com ampicilina ($50\mu\text{g.mL}^{-1}$) por 16 horas em incubadora a 37°C . Os clones positivos foram analisados por PCR, totalizando 200 clones positivos, sendo que 80 foram obtidos da amostra 1 e 120 da amostra 2. Os tamanhos dos fragmentos foram analisados, daqueles com tamanhos similares foi selecionado um clone representativo. Das colônias selecionadas, totalizando 96 clones, 64 tiveram seus plasmídeos isolados pelo kit “Concert™96 Plasmid Purification System”, 32 tiveram seus fragmentos purificados diretamente da amplificação de PCR pelo kit “*GFX PCR DNA and Gel Band Purification*”. As sequências dos fragmentos obtidos pelo sequenciador automático, ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer totalizaram 64 sequências adequadas.

Obtidas as sequências, estas foram analisadas por meio de ferramentas de bioinformática, inicialmente foi realizada a limpeza das sequências utilizando um sistema de verificação *on-line* de contaminantes, *Vecscreen*. Com as sequências puras realizou-se o Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*,1990), em Banco de Dados de proteínas e ESTs no NCBI (*National Center Biotechnology Information*).

As sequências foram alinhadas (FIGURA 10) com auxílio do programa *BioEdit*, e para cada sequência única, totalizando 33, foram projetados iniciadores para PCR em tempo real (TABELA 6) através de software *Primer3*.

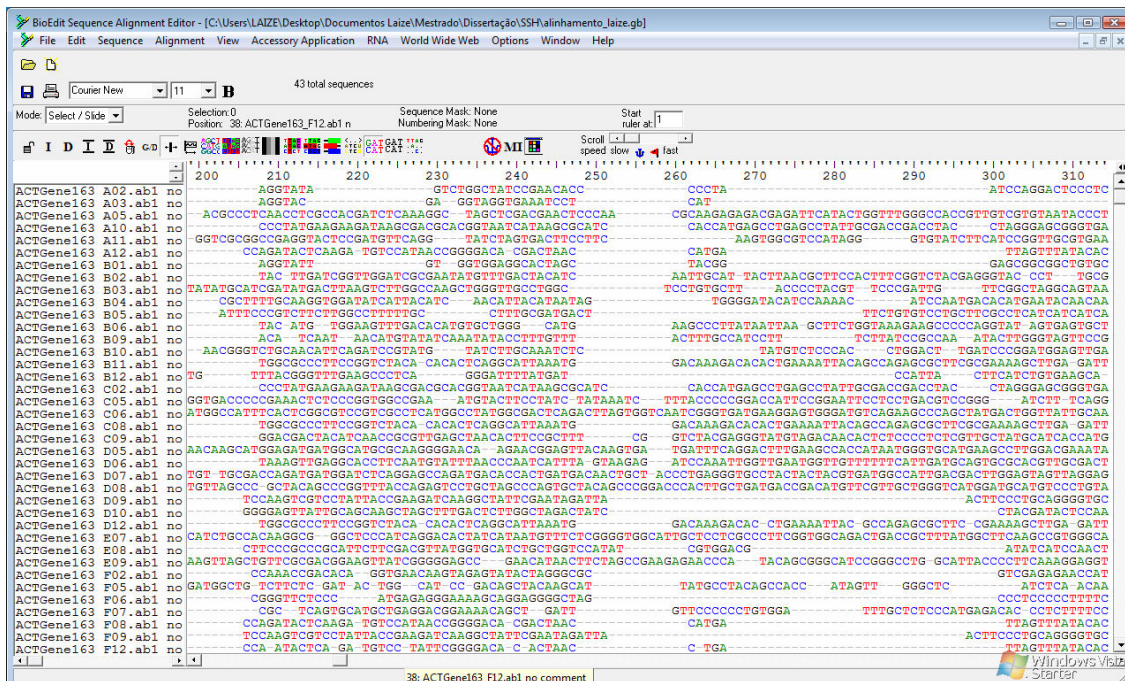


FIGURA 10. Alinhamento múltiplo de seqüências diferencialmente expressas para trigo Toropi em resposta a deficiência de fósforo.

TABELA 6. Relação de iniciadores para seqüências de cDNA diferencialmente expressas para trigo Toropi sob deficiência de fósforo.

Nome	Iniciador <i>forward</i>	Iniciador <i>reverse</i>	C°	Compr.
PiTr01	CGCACCAAGTCTCAAATG	ATATAGGTGGAGGGGCATGG	61	154
PiTr02	AACACCCCCTAATCCAGGAC	GGTACACGGAATTTGGAGGA	60	120
PiTr03	GGTTTTACACCCCTCGCTAC	GGCGGAGAAAGCAGAGTGTA	59	161
PiTr04	TCCCTTGCGGATCTTGTTAC	CCTCACACCCTCACACAATG	60	218
PiTr05	AACTCCCAACGCAAGAGAGA	CCAAGCACAAAGAACCTCA	60	158
PiTr06	TAACCGGGGACACGACTAAC	CCCGGGGTTAGAGTTAATGC	60	165
PiTr07	ATTGTGGTGGAGGCACTAGC	GAGCAGCACTCATGCAAAAA	60	129
PiTr08	GGAAATCCAGAATTCCACGA	AAATTGGACCTTGCAACAGG	60	212
PiTr09	TGTGCTTACCCCTACGTTCC	CCCGGCTTTGAATTAACAAA	60	204
PiTr10	TGATACGCTTTTGAAGGTG	CGATCAGGGGATAAGTTCCA	60	202
PiTr11	TTCGATGTTTACGGGTTTGA	CGTCACTCCGGATTCAATAAA	59	168
PiTr12	ACAATGCGCAAGTAGCCTTT	TCTACGAAATGCGTTGGACA	60	196
PiTr13	CGGGAGACAGTAGACATGA	ACTTGCCGGTAACGAGATTG	60	229
PiTr14	GGTAGTCCGCTTCCAGTGA	TGTTGATGGTTGACGAGACC	60	172
PiTr15	ATGTCTCCACCTGGACTTG	ATCGGAAGCAGCAAATGAAG	60	204
PiTr16	CGCGAGACATCCCTTGTTAT	AAGGGTGAATGTCAGGTTTC	60	178

Continuação TABELA 6. Relação de iniciadores para sequências de cDNA diferencialmente expressas para trigo Toropi sob deficiência de fósforo.

PiTr17	AATCGGGTGATGAAGGAGTG	GGAGCATATCATGCCCCATA	60	216
PiTr19	ACACTTCCGCTTTCGGTCTA	AAATGGGCACCACTGTAAGC	60	219
PiTr20	GGATCTCATTTGGGACTCCA	TCTAGATCCCCTGTTGGTT	59	162
PiTr21	CATTGGAGCAAGAACAAGCA	AAATAGCCTCGGGACGAAAT	60	163
PiTr22	GGGCCTTAATTACGGAGAGC	GCTGATGATGTGCTGATGCT	60	153
PiTr23	GGACTGCCTGTAGGTCCAAG	ACACGTGATCGTGATGGAGA	60	198
PiTr24	CAGGGGTGCACCACATAAC	CCCTGCGCCATATGATTTAG	60	152
PiTr25	GGGAGTTATTGCAGCAAGCTA	GAGGATGGCTCTTCCGTAGG	61	151
PiTr26	GGCTCCCATCAGGACACTAT	CCGAAGTAGCCATGAAGGAC	59	230
PiTr27	AAACCGACACAGGTGAACAA	GTCGCTACCCCTGGTATGT	60	150
PiTr28	CCGATCTTCTCCGATCACAT	GGGACAATGCCGAAGACTTA	60	248
PiTr29	TACACGCGGAGAGACAGATG	GAATACCAAGGTTGCCCGTA	60	240
PiTr30	TCATTGTTGTCACCGCTCAT	CATCAGCAGCATCGACTCAT	60	235
PiTr31	TAACCGGGGACACGACTAAC	CCCGGGGTTAGAGTTAATG	60	165
PiTr32	ATAAGCGACGCACGGTAATC	TCGCTTCTTTCCTGACGAT	60	208
PiTr33	GGACCGCCATGAACATCAC	GTGAAGGCGAGGAGAAGATT	61	151

3.4.3 Determinação da expressão gênica e validação de sequências diferencialmente expressas

O material vegetal utilizado foram os genótipos Toropi e Anahuac. As condições de crescimento foram as descritas no item 3.1.2. Amostras de três ápices radiculares para cada tratamento com três repetições foram coletadas e colocadas imediatamente em nitrogênio líquido. O isolamento do RNA total foi realizado com kit “Concert™ Plant RNA Reagent, Invitrogen®”. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro “Genesys 2™ Thermo Spectronic”, em comprimento de onda de 260 nm. Uma concentração de 3 µg de RNA total de cada tratamento foi tratada com “DNAse I Invitrogen®”, e se procedeu a formação da fita complementar com a transcriptase reversa “SuperScript™III, Invitrogen®” utilizando como iniciadores polidT. As amostras de

cDNA foram diluídas na proporção de 1:100 (cDNA: água destilada) e então conduzidas as amplificações.

Para a realização da amplificação pela PCR foi utilizado o equipamento “7300 Real-Time PCR System da Applied Biosystems” em placas contendo 96 poços “PCR-96M2 – HS – C Axygen®” com selador “MicroAmp™ Optical Adhesive Film Applied Biosystems”. Cada placa foi montada para um iniciador em particular (TABELA 4 e 5) e todas continham: amostras de cDNA em triplicata e um controle negativo.

Foram testados quatro diferentes genes constitutivos em trigo para atuar como controle endógeno na PCR em tempo real:

- gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (5’GAAATGCATCTTGCCTACCAAC TGT3’ e 5’CTGTGAGTAACCCCATTCATTATCATA3’),
- actina (5’GATCTGGCATCACACCTTCTAC3’ e 5’AGGAAGCTGGTAGCTC TTCTC3’),
- ubiquitina desenvolvido para arroz (5’ AACCAGCTGAGGCCCAAGA 3’ e 5’ACGATTGATTTAACCAGTCCATGA 3’),
- 28S rRNA, acesso GenBank AY049041, (5’ CTGATCTTCTGTGAAGGGT 3’ e 5’ TGATAGAACTCGTAATGGGC 3’).

Iniciadores desenvolvidos por Boff (2006) (TABELA 7) a partir de biblioteca de sequências diferencialmente expressas em ápices radiculares de Toropi expostos a Al por 1 hora, pelo método de hibridização subtrativa supressiva, foram utilizados para análise da expressão em PCR em tempo real. As sequências obtidas por Boff (2006) são descritas (TABELA 7) segundo sua possível função pela homologia e predição de genes a partir da base de dados do NCBI. As categorias funcionais utilizadas foram: metabolismo, estrutura e desenvolvimento, processamento de informações e outros que não obtiveram similaridade significativa ou não se encaixam nas categorias acima.

TABELA 7. Relação de iniciadores para seqüências de cDNA diferencialmente expressas em ápices radiculares de trigo cultivar Toropi em resposta ao Al por 1h e descrição de possíveis funções (Boff, 2006).

Nome	Iniciador <i>forward</i>	Iniciador <i>reverse</i>	C°
<i>Metabolismo</i>			
AluTr04	Succinil-CoA ligase cadeia β CCATCAAGCCCGATGTAGTT	TCTTGCCGAGACAGCTGA	60
AluTr06	ATP sintase vacuolar subunidade E TGCATCAAAGCAGATGTCC	CAATCTTCCATCCCGAGAA	60
AluTr10	Aconitase hidratase 1 GGTGCTGAGTATGGCAGTGG	GCTCGTATGTTGGGGGAATG	60
AluTr11	Succinato desidrogenase flavoproteína subunidade α GCCTGTCTCGGTTGTTGAT	TCCTACCAACCAAAGGGTGA	60
AluTr16	Corismato sintase GGAGCCGATTGGTTCTTGTA	TAGCTTCAAGCCAACAGCA	60
AluTr26	Piruvato descarboxilase LTA2 CATTGAGGGTGGCCTTCTTA	CTGTCCACCCCAACATACC	60
AluTr43	Proteína contendo domínio tipo ATP-ase CCGAGGTACACATAGCACG	AATGACAAATTGCGTGACG	60
AluTr48	Ubiquinol-citochrome-c redutase CAATCACTTTGCTGGGGAAC	TGAGGGACCAAGTTTTCCAC	60
AluTr64	NADP-específica isocitrato desidrogenase GTGCTGGTTTCACCACCTTT	GACGGAGATGTGCAGAGTGA	60
<i>Estrutura e Desenvolvimento</i>			
AluTr05	Proteína expressa de membrana GCCTTCTGAGTTCTGGCTTG	AGAAGCTTGGATCGTTCAT	60
AluTr08	Enoil-ACP redutase CAATGGACTCAACACGATGG	TAGTCCGGAGTAGCCAAAGC	60
AluTr12	Proteína quinesina cadeia pesada AAAGAAAACCGACCCAAACC	TGGCAAACATGTGGGTTCTA	61
AluTr15	β -acetoacil-ACP sintase AGAAGCCGCCTAGCTACTCC	GAAGTAAAGGTGGCGCTGTC	60
AluTr95	Actina GGCAGGTACGAAGAGTCTGG	ACACCCATAGACAGGCCATC	60

Continuação TABELA 7. Relação de iniciadores para seqüências de cDNA diferencialmente expressas em ápices radiculares de trigo cultivar Toropi em resposta ao Al por 1h e descrição de possíveis funções (Boff, 2006).

<i>Processamento de informações</i>			
AluTr02	Fator de ribosilação ADP		
	GTTCACTGTGTGGGATGTGG	CATTGCTCCCCTCATGTCTT	61
AluTr07	Proteína tipo calreticulina		
	ACCGCTATGACCAAGTTTCG	CGGGGATGTTGTTCTTCTAC	60
AluTr13	Proteína fator de transcrição (bHLH)		
	GGTGCTGAGTATGGCAGTGG	GCTCGTATGTTGGGGAATG	60
AluTr14	Proteína quinase OSK		
	CAGGCCAGCATAACAGTTTT	CGCCGTTTCTTTCAACAGAT	60
AluTr17	Caseína quinase II α		
	TGAATGCTGATCCCTGACAA	GGAGGGGCAAATACAGTGAA	61
AluTr42	Proteína quinase serine/treonine		
	TCCATCGACATATGCACCAG	AACGGACCCTATGCTTCAGA	60
AluTr45	Proteína quinase BKIN12		
	TCAGCGGGTATTGTGTCAA	GCGGGGCCATATTATAAACA	60
AluTr59	DNA polimerase subunidade catalítica α		
	TCAGGCGTGATTGGAGTATG	CATCCACTTGTTAGGGTCTCG	61
AluTr67	γ -glutamilcisteina sintetase		
	GTAGAATTGGGGACGGGATT	CAAGGAGGTTGGTTTCCTGA	60
<i>Outros</i>			
AluTr09	Sem homologia		
	TGCAATCTGCTTTAACAACACC	TTTTGATCATGCATACCGTG	61
AluTr30	Sem homologia		
	TGAGAAAATTTGGCGATTCC	CCAATGAAGTGCAAATGGTG	60
AluTr68	Sem homologia		
	GTCAGATGTCGGATCCTCGT	CGGACTGTTCTTTTGCTTCC	60

Além dos iniciadores desenvolvidos diferencialmente para Toropi ao estresse de Al, foram sintetizados iniciadores a partir de referências de Sasaki *et al.* (2004) para o gene que codifica o transportador de membrana de malato para trigo *TaALMT1* (5'AAGAGCGTCCTTAATTCG3' e 5' CCTTACATGATAGCTCCAGGG3') e de Yi

et al. (2005) para o fator de transcrição identificado em arroz sob deficiência de P, *OsPTF1*, (5'GAGCAAGAAAAGCGGCAACTAAAG3' e 5'TACGAAATACCCTCTGACGATGAA3').

Todas as reações foram realizadas em volume final de 10 μ l / poço: 5 μ l da reação composta de 1 μ L tampão 10X, 0,06 μ L dNTPs (10 μ M cada nucleotídeo), 0,6 μ L de solução de MgCl₂ (50 mM), 1 μ L de “SYBR Green” diluído 1:100 (preparado na hora da utilização a partir de solução diluída 100X), 0,1 μ L de “ROX Reference Dye” diluído 1:500, 0,025 μ L Taq Platinum® Invitrogen e 0,2 μ L da combinação de iniciadores *forward* e *reverse* e 5 μ l da amostra de cDNA (diluída 1:100) e água destilada q.s.p. O padrão de fluorescência de SYBR e ROX pode ser observado na FIGURA 11.

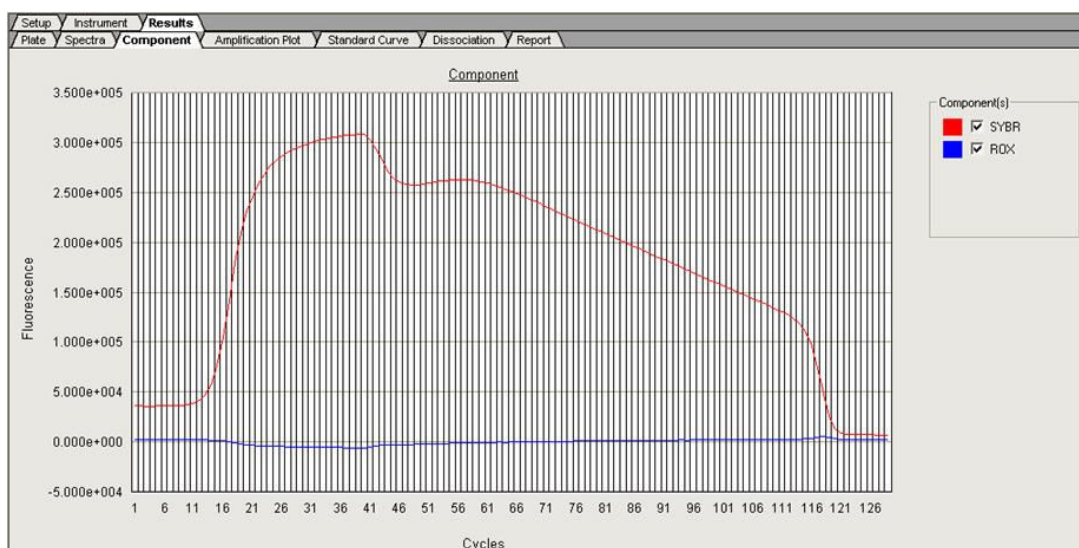


FIGURA 11. Padrão de fluorescência para o corante SYBR Green (em vermelho) e a referência padrão ROX (em azul).

As etapas de amplificação incluíram um ciclo inicial de aquecimento de 50°C por 2 minutos, seguido por um ciclo inicial de 95°C de 2 minutos após seqüência de 40 ciclos: iniciado com 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos, 72°C por 30 minutos e 60°C por 1 minuto, nesta etapa foi capturada a fluorescência, para finalizar foi adicionado um ciclo final de dissociação (FIGURA 12). Terminada a reação, analisou-

se a curva de dissociação para verificar a pureza do produto formado e confirmar a ausência de dímeros de iniciadores ou produtos inespecíficos. Placas que apresentaram comportamento anormal foram descartadas.

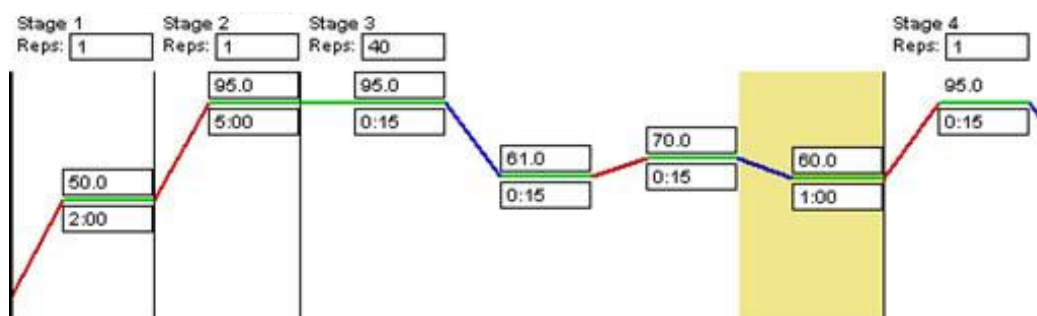


FIGURA 12. Etapas de amplificação em PCR em tempo real. Ciclos (stage), repetições (reps), temperatura em C° (caixa superior) e tempo min (caixa inferior).

A amplificação realizada pela PCR em tempo real foi analisada pela quantificação relativa, a qual determina o número de cópias de um gene alvo em relação a um controle endógeno, no caso 28S rRNA. O cálculo baseia-se, indiretamente, na separação dos Cts (*cycle threshold*), que correspondem aos ciclos de PCR nos quais o sinal de amplificação atinge um valor exponencial. Quanto maior for a quantidade inicial de cDNA, mais cedo o produto acumulado é detectado na PCR e menor será o valor de Ct. Posteriormente, calculou-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação para cada dado.

Para a quantificação relativa procedeu-se o ajuste das curvas pela análise da eficiência da PCR, através do software livre LinReg (Ramakers *et al.*, 2003), que analisa a curva exponencial de amplificação, valores de $R > 0,99$, eficiência entre 1,8 e 2 e números de pontos maiores que 4 foram aceitos, os demais foram descartados não entrando na análise.

Para as placas o *threshold* foi ajustado manualmente, procurando-se uma posição satisfatória para todas as amostras, sempre na fase logarítmica, foram utilizados valores

de 50.000 e 30.000. Para análise estatística foram utilizados valores das triplicatas de Ct não superiores a 0,5 de desvio padrão.

Para análise dos dados foram colhidos valores de Ct (*cycle threshold*) e realizadas médias das amostras em triplicatas com desvio padrão inferior a 0,5 de indivíduos calibradores e indivíduos alvo para cada gene. Utilizou-se a fórmula de Dussault & Pouliot (2006), onde o $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{alvo}} - Ct_{28S})_{-P} - (Ct_{\text{calibrador}} - Ct_{28S})_{+P}$ é a expressão relativa do gene, e a aplicação do resultado em $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ fornece a dimensão de variação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A hipótese inicial deste trabalho considera que processos similares são induzidos quando as plantas são submetidas a estresse por deficiência de P e por presença de Al. A cultura escolhida para testar a hipótese foi o trigo, tendo sido selecionados os cultivares Toropi e Anahuac por serem considerado tolerante e sensível respectivamente, a ambos os estresses (Rosa & Camargo, 1990).

A tolerância ao Al nestes genótipos e na população de linhagens recombinantes originada do cruzamento destes foi anteriormente avaliada por Boff (2006) encontrando-se bem caracterizada. No entanto, informações sobre a tolerância à deficiência de P ainda são limitadas, havendo, portanto necessidade de melhor caracterizá-la. É sabido que em solos, Toropi mantém seus rendimentos mesmo em baixa disponibilidade de P, enquanto que Anahuac os reduz de forma significativa (Miranda, 1985). Recentemente, Silva (2007) avaliou estes genótipos sob condições crescentes de P aos dez dias em hidroponia, identificando características que diferenciaram os genótipos e tiveram associação com a tolerância à deficiência de P observada em solo com plantas adultas. Utilizando o sistema proposto por Silva et al. (2008), neste trabalho analisou-se o comportamento temporal destes genótipos. Esta análise avaliou temporalmente os níveis de fósforo nos tecidos buscando entender como se dá o estabelecimento da tolerância.

4.1 Comparação dos teores de fósforo em Toropi e Anahuac no tempo sob diferentes disponibilidades de fósforo

A remoção do endosperma é essencial na avaliação do efeito da deficiência de P. A não remoção do endosperma da semente faz com que o efeito de deficiência de P não seja observado nos estádios iniciais de desenvolvimento em hidroponia (Silva *et al.*, 2008). Isso ocorre porque a semente possui grande quantidade de P armazenada nas células do endosperma, para utilização da plântula nos seus estádios iniciais. Na FIGURA 13, observa-se que o teor de P livre e total presente no endosperma não diferiram para ambos os genótipos, porém houve diferenças significativas entre o Pi livre e P total. Cerca de 15% do P encontrava-se na forma livre (FIGURA 13), o que é esperado uma vez que a maior parte do P nas sementes está na forma de fítina, como reserva (Guttieri *et al.*, 2004). A concentração de P fítico em grãos de cereais é geralmente alta, representando cerca de 50% a 80% do P total (Common, 1940). A quantidade de P total no endosperma alcançou 0,7% da massa seca do grão (FIGURA 13), o que justifica a necessidade de remoção do endosperma em experimentos com plântulas.

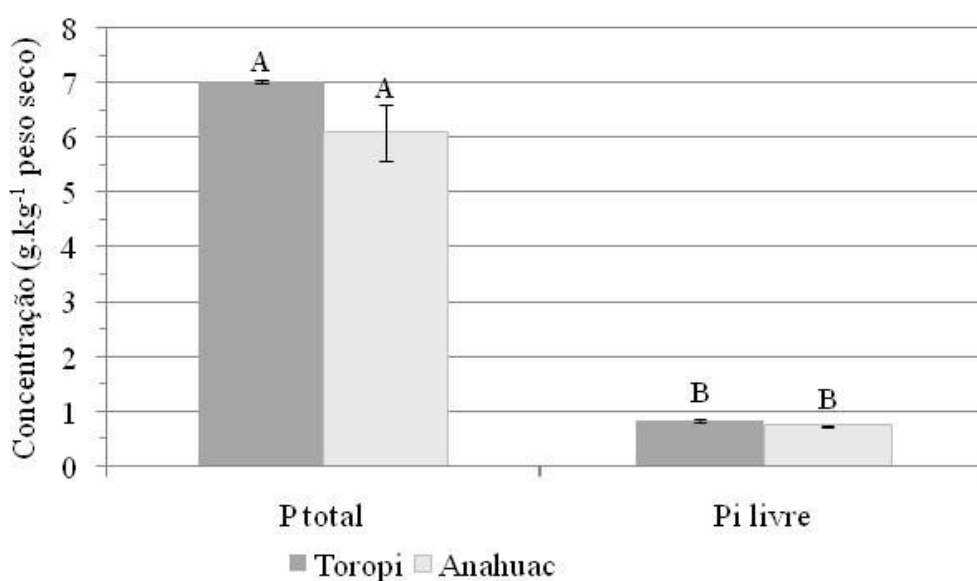


FIGURA 13. Teor de fósforo (g P.kg MS⁻¹) livre e total de endosperma retirado de plântulas de trigo germinadas. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey 5%.

As sementes utilizadas neste trabalho foram produzidas em condições de suficiência de P, portanto apesar dos genótipos Toropi e Anahuac serem contrastantes para a resposta a deficiência de P, era esperado não ocorrer diferenças significativas na concentração de P no endosperma da semente. Em condições de limitação de P, o conteúdo de P no endosperma dependeria não apenas da habilidade de extrair P do solo, mas também da remobilização e da redistribuição de P para pontos de crescimento durante o ciclo da cultura (Nanamori *et al.*, 2004).

Os genótipos Anahuac e Toropi apresentam comportamento diferente quanto à tolerância à deficiência de P e a toxidez de Al em condições de solo (Rosa & Camargo, 1990). Sendo Anahuac sensível e Toropi tolerante, tanto quando considerada a massa seca produzida como o rendimento de grãos.

Segundo Wiethölter (2004) a maior tolerância do genótipo Toropi decorre do crescimento radicular mais amplo em solo, ocasionando maior volume de solo explorado. Ben & Dechen (1996) em estudo de resposta diferencial de genótipos mostraram que Toropi cultivado em vasos apresentava maior produção de matéria seca em comparação com diversos genótipos, entre eles BH1146 classificado como tolerante ao Al. Porém em hidroponia, em estádios iniciais, não há diferenças significativas entre a produção de matéria seca tanto da parte aérea como do sistema radicular em relação ao genótipo sensível Anahuac (Silva *et al.*, 2008). Característica essa observada também durante a análise fenotípica da população ToropiXAnahuac neste estudo no item 4.1. Essa discrepância pode ser devida à influência do ciclo da cultura, onde Anahuac é classificada como precoce e Toropi, tardia (Cunha *et al.*, 2000, Mota & Goedert, 1969), assim diferenças nos estádios iniciais podem não ser evidentes. Entretanto, foi possível visualizar diferenças na tolerância a deficiência de P entre os genótipos, através da coloração da parte aérea. Similar observação foi descrita por Silva *et al.* (2008).

Considera-se que a tolerância à deficiência de P observada em Toropi neste estudo não foi devida a variações morfológicas ou modificações na arquitetura das raízes, ou qualquer outra característica de pouca importância na hidroponia como a associação micorrízica. A capacidade de secreção de enzimas também não deve ter tido importância, pois o P na solução está na forma inorgânica e prontamente disponível.

No trigo submetido à limitação de P a concentração de Pi livre é reduzida com o passar do tempo (FIGURA 14 e 15). O declínio provavelmente ocorre porque o Pi precisa ser redistribuído na planta, que está crescendo. Interessantemente, apesar da proporção entre a concentração de Pi livre na condição de suficiência e a de deficiência de P ter sido similar em cada tempo entre genótipos nas raízes (1,06, 2,73 e 1,82 para Toropi e 1,34, 2,06 e 1,84 para Anahuac nas 24, 120 e 240 horas, respectivamente), na parte aérea esta diferença foi grande entre os genótipos nos tempos 120 e 240 horas (1,40, 1,18 e 1,32 para Toropi e 1,29, 2,46 e 3,44 para Anahuac nas 24, 120 e 240 horas, respectivamente). Os genótipos apresentaram comportamento oposto entre si quando a proporção de Pi livre na parte aérea e raiz foram calculadas (FIGURA 16). Toropi tendeu a translocar mais P para a parte aérea sob condições de deficiência do que Anahuac.

Em estudos anteriores, foi observado que Anahuac aumenta seu conteúdo de Pi livre na parte aérea com elevação da disponibilidade de P na solução de zero a 1000 μ M, enquanto Toropi aumenta o Pi livre na parte aérea até 10 μ M na solução, não havendo diferença quando a disponibilidade de P na solução aumentava para 30 μ M ou mesmo para 1000 μ M (Silva *et al.*, 2008).

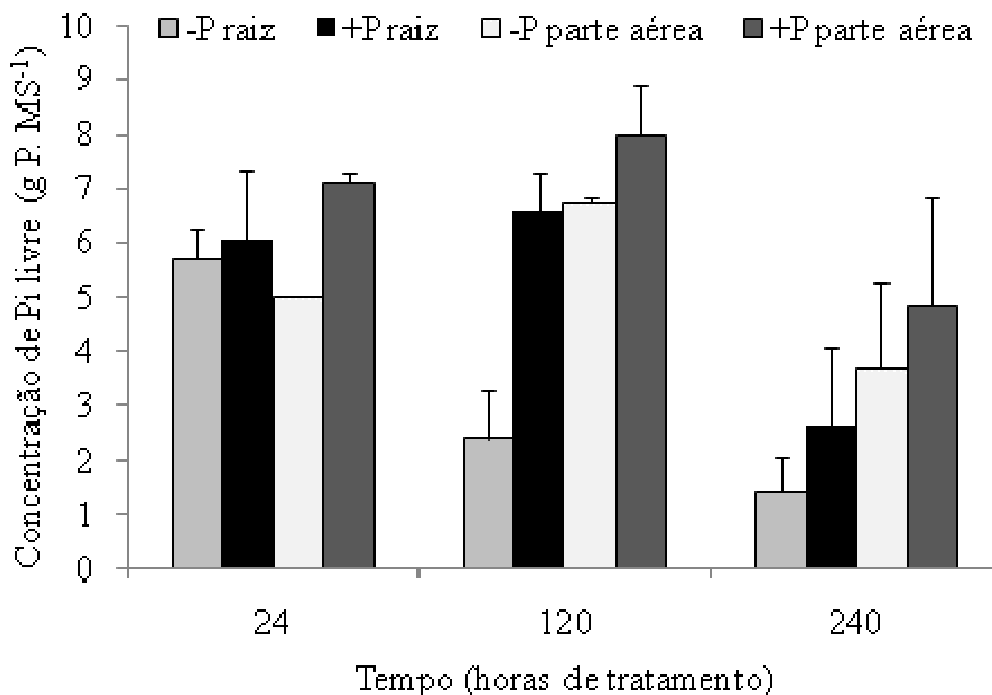


FIGURA 14. Concentração (g P.kg MS⁻¹) de fósforo livre na parte aérea e no sistema radicular do cultivar de trigo Toropi, em três tempos de exposição, 24 horas, 120 horas e 240 horas, na presença (+P, 1000 μ mol.L⁻¹) e ausência (-P) de fósforo.

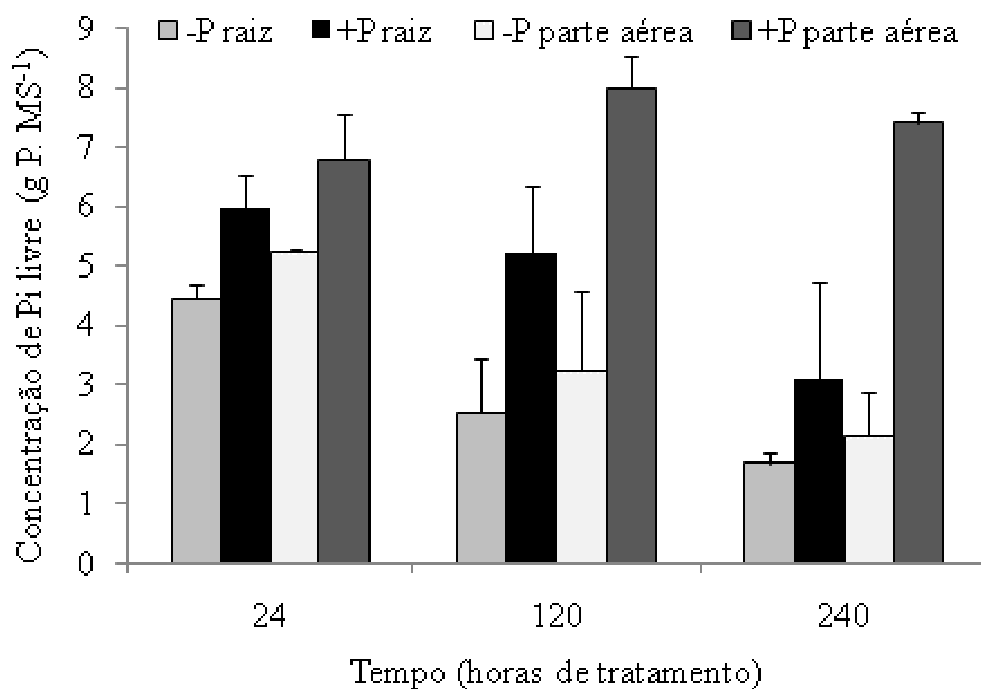


FIGURA 15. Concentração (g P.kg MS⁻¹) de fósforo livre na entre parte aérea e sistema radicular do cultivar de trigo Anahuac, em três tempos de exposição, 24 horas, 120 horas e 240 horas, na presença (+P, 1000 μ mol.L⁻¹) e ausência (-P) de fósforo.

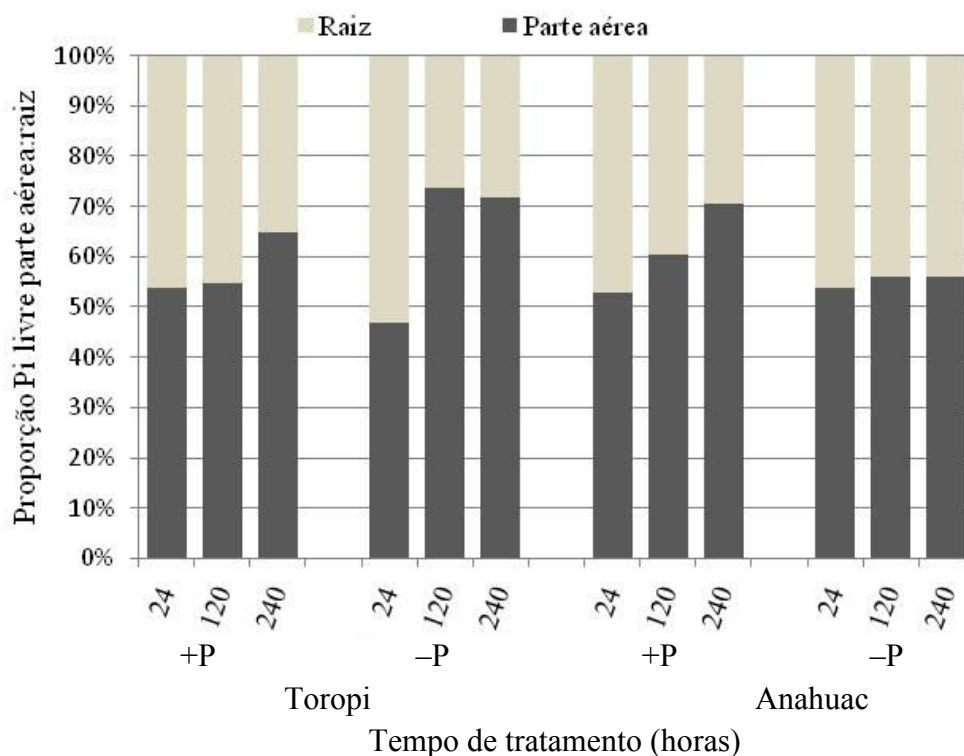


FIGURA 16. Proporção de Pi livre entre parte aérea e sistema radicular, em três tempos de exposição, 24 horas, 120 horas e 240 horas, na presença (+P, $1000\mu\text{mol.L}^{-1}$) e ausência (-P) de fósforo, para os genótipos de trigo Toropi e Anahuac.

Estes dados sugerem que Toropi tem um forte controle sobre o conteúdo de Pi livre na parte aérea, que é parcialmente independente da disponibilidade de Pi na solução. Anahuac é mais responsiva, aumentando a concentração interna com o aumento da disponibilidade de P (Silva *et al.*, 2008), no entanto torna-se inábil em baixas disponibilidades (Miranda, 1985). Enquanto Toropi tolera redução na disponibilidade de P mantendo a concentração de Pi livre na parte aérea mais estável (Silva *et al.*, 2008). Essa hipótese de comportamento dos genótipos quanto à concentração de Pi livre em diferentes disponibilidades de P na solução é suportada pelos resultados de Silva (2007).

Houve redução temporal da concentração de P total na condição de ausência de P para ambos os genótipos (FIGURA 17 e 18). Na parte aérea, para Toropi a redução foi estatisticamente significativa às 240 horas e, para Anahuac às 120 e 240 horas. Apesar

da alta concentração de P total na parte aérea em condições de alta disponibilidade de P, Toropi manteve as concentrações de Pi livre similares àquelas em condições de deficiência de P (compare a FIGURA 14 e 17) sugerindo um maior controle de Toropi na partição do P na planta. Provavelmente, na presença de $1000\mu\text{M}$ de P na solução, grande parte do P é estocado no vacúolo. No vacúolo as plantas podem estocar P na forma orgânica, como fitato (Tinker, 1981). Sob condições de deficiência, os estoques são remobilizados do vacúolo, bem como há redução no conteúdo de P estrutural, como fosfolipídeos, para manter a homeostase do P livre na célula (Vance *et al.*, 2003). Entretanto, sob deficiência, são principalmente os níveis de P das reservas que decrescem (Mengel & Kirkby, 1987).

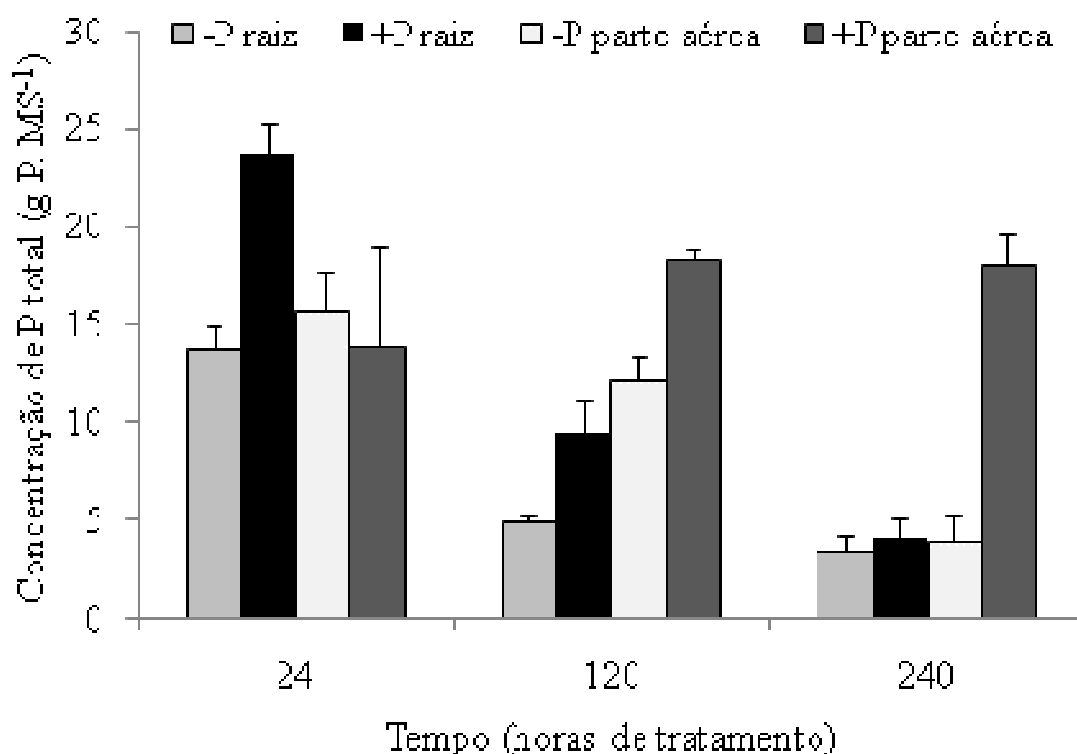


FIGURA 17. Concentração (g P.kg MS^{-1}) de fósforo total na parte aérea e no sistema radicular no cultivar de trigo Toropi, em três tempos de exposição, 24 horas, 120 horas e 240 horas, na presença (+P, 1mmol.L^{-1}) e ausência (-P) de fósforo.

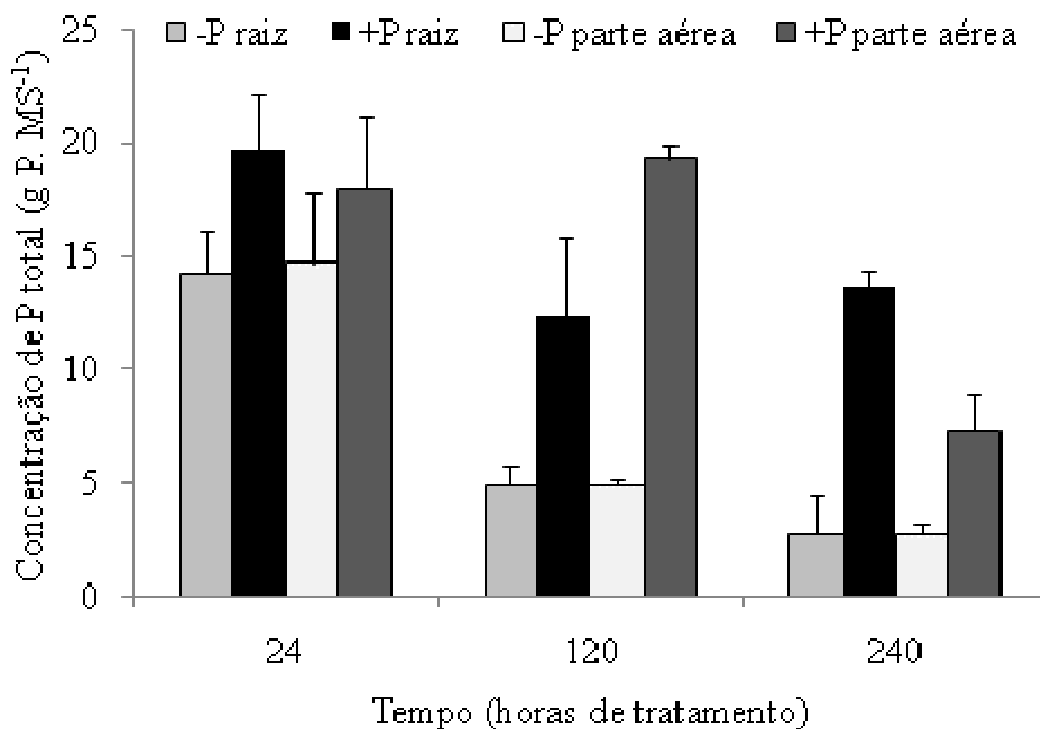


FIGURA 18. Concentração (g P.kg MS⁻¹) de fósforo total na parte aérea e no sistema radicular do cultivar de trigo Anahuac, em três tempos de exposição, 24 horas, 120 horas e 240 horas, na presença (+P, 1mmol.L⁻¹) e ausência (-P) de fósforo.

Toropi, de modo geral, transloca maior quantidade de P das raízes para a parte aérea nas condições de deficiência de P do que Anahuac, observado na proporção de Pi livre (2,80, 2,55 para Toropi e 1,27, 1,28 para Anahuac nas 120 e 240 horas, respectivamente) e de P total (2,47 para Toropi e 1,37 para Anahuac nas 120 horas). A maior eficiência de transporte de P das raízes para a parte aérea pode estar relacionada com a quantidade e tipo de transportadores de fosfato presentes em cada genótipo nos tecidos que dão acesso ao transporte de longa distância, como o gene *PHO1*, identificado em *A. thaliana*, que codifica uma proteína de carregamento de P para o xilema (Stefanovic *et al.*, 2007; Hamburger *et al.*, 2002). É possível que diferenças cinéticas em uma proteína similar a *PHO1* em Toropi permita melhor controle do carregamento de P para o xilema conduzindo a maior estabilidade. A identificação de homólogos de *PHO1* em trigo seria de grande utilidade na dissecação desta resposta. No

entanto, é uma difícil tarefa, pois em *arabidopsis* existem 11 membros desta família, destes, apenas dois estão envolvidos no carregamento do xilema e são regulados por rotas de transdução independentes (Stefanovic *et al.*, 2007).

Recentemente foi proposto um modelo sistêmico para regulação da alocação de P em *arabidopsis*. Esse modelo consiste na interação de *AtPHO2*, uma enzima E2 de conjugação a ubiquitina (da raiz) com o *microRNA399* e com membros da família *AtIPSI/AT4*. Quando há disponibilidade de P, baixa atividade de *PHO2* conduz a aumento na expressão de genes transportadores de Pi na raiz (*Pht1,8* e *Pht1,9*) e de membros da família gênica *IPS/At4* (Doerner, 2008). *miRNA399* teria por alvo *AtPHO2*, silenciando-o e assim regulando processos envolvidos no transporte de Pi, tais como carregamento, redistribuição e reciclagem (Fang *et al.*, 2009). *AtIPSI/AT4* parecia com *miRNA399*, seqüestrando-o e portanto impedindo o silenciamento de *AtPHO2* (Franco-Zorilla *et al.*, 2007). Sugere-se que durante condições normais de disponibilidade de Pi, *PHO2* limite o carregamento de Pi na raiz mantendo a reciclagem e redistribuição nas folhas. No início da deficiência, são induzidos *miRNA399* e *AtIPSI*, *PHO2* é protegido e não reprimido, porém conforme aumenta o estresse a quantidade de *miRNA399* aumentaria a ponto de superar *AtIPSI* e *PHO2* seria reprimido aumentando o carregamento de Pi para a parte aérea (Fang *et al.*, 2009). Já Doerner (2008) sugere que este modelo serviria para equilibrar as oscilações na distribuição de Pi causadas pelo antagonismo entre *miRNA399* e *PHO2*, ou desensibilizando a resposta à limitação de Pi durante a aclimação. Alterações neste sistema têm significativa influência no acúmulo de P na parte aérea. Sendo este outro ponto que poderia diferenciar Toropi e Anahuac.

Recentemente, Silva (2007) comparando dados fornecidos por Minella, referentes à produção de massa seca em vasos na antese e na colheita, com seus dados de concentração de Pi obtidos em hidroponia aos 10 dias, encontrou um padrão similar

de comportamento. Havendo, portanto, associação entre as características avaliadas em hidroponia com a tolerância observada em planta adulta.

4.2 Avaliação fenotípica da progênie em diferentes disponibilidades de fósforo

Uma das hipóteses secundárias deste trabalho é que QTLs para tolerância à deficiência de P e para tolerância ao Al colocalizam-se. O teste desta hipótese requereu a fenotipagem das linhagens segregantes para construção do mapa de ligação e identificação de QTLs. Em um primeiro momento houve a necessidade de determinar que características seriam eficientes na caracterização da tolerância ao P nos genitores para posterior análise da progênie.

A habilidade de absorção e uso de P para produção de biomassa é muito importante para o crescimento da planta sob deficiência de P, e a produção de biomassa afetará o rendimento final de grãos. Isto é frequentemente chamado de requerimento interno de P e é a concentração de P na planta que reflete na produção e rendimento (Pratapbhanu *et al.*, 2002).

Sob deficiência de P, as plantas tendem a aumentar sua habilidade de absorção e aquisição de P regulando suas atividades fisiológicas e bioquímicas e alterando sua morfologia com aumento da densidade de raízes (Raghothama, 1999). Assim, as características fenotípicas avaliadas apresentam relação com a genética da deficiência de P e são relatadas por estudos de mapeamento em várias espécies (Ming *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2006).

As avaliações fenotípicas contaram com 18 variáveis relacionadas à deficiência de P na população recombinante de Toropi X Anahuac. A análise estatística inicial contou com análise de variância (ANOVA) para três parâmetros: massa seca (mg), quantidade de Pi (mol) e concentração de Pi livre (g Pi. Kg MS^{-1}). A análise foi

realizada em conjunto com as três repetições de Toropi e Anahuac em condições de baixo e alto P para a raiz e para a parte aérea, para que se pudesse evidenciar alguma diferença estatística.

A análise de massa seca representa o crescimento da planta, o quanto a planta pode ser afetada nas condições de P disponíveis na solução. As diferenças entre os genótipos não foram significativas (TABELA 8) para baixo e alto P em ambas as partes da planta. As diferenças para massa seca podem não ter sido observadas pela diferença do ciclo dos genótipos como descrito neste estudo no item 4.1. Silva *et al.* (2008) também observaram que em condição de hidroponia, em estádios iniciais, não há diferenças significativas na produção de massa seca tanto da parte aérea como do sistema radicular.

TABELA 8. Análise de variância para massa seca (mg) medido após 240 horas em solução com 10 μ M e 1000 μ M de P, para os genótipos de trigo Toropi e Anahuac, para raízes e parte aérea.

Causas da variação	GL	QM	F teste	Probabilidade
Genótipo (G)	1	18.36	3.23	0.0798
Repetição (R)	2	13.50	0.63	0.5385
Tratamento (T)	3	307.63	54.15	<.0001
G x T	3	47.07	8.29	0.0002
Erro	50	5.68		
Total	59			

Houve efeito da interação genótipo x tratamento, analisando as médias para massa seca (FIGURA 19) entre os genótipos, em Toropi é observada maior massa seca na parte aérea na condição de baixo P. Já em Anahuac a massa seca aumenta com o incremento de P tanto nas raízes quanto na parte aérea.

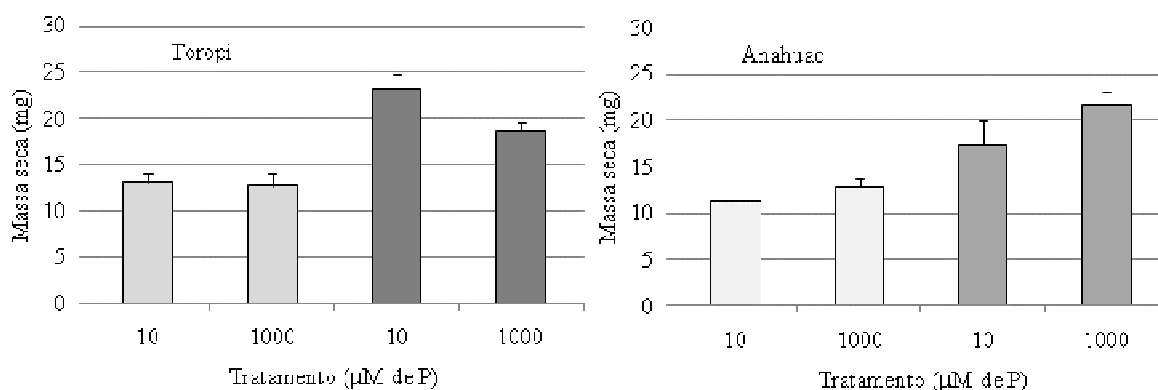


FIGURA 19. Massa seca (mg) dos cultivares de trigo Toropi e Anahuac, em condições de baixo P (10 μ M) e alto P (1000 μ M) nas raízes (barras claras) e na parte aérea (barras escuras) após 240 horas.

Quanto a concentração de Pi livre, estas foram diferentes para os genótipos, tratamentos e interação (TABELA 9). A análise de médias (FIGURA 20) evidenciou maior concentração de Pi na planta com o incremento de P na solução.

TABELA 9. Análise de variância para concentração de Pi livre (g Pi. Kg MS⁻¹) medido após 240 horas em solução com 10 μ M e 1000 μ M de P, para os cultivares Toropi e Anahuac, para raízes e parte aérea.

Causas da variação	GL	QM	F teste	Probabilidade
Genótipo (G)	1	1.83	6.13	0.0176
Repetição (R)	2	0.29	0.98	0.3845
Tratamento (T)	3	65.74	220.65	<.0001
G x T	3	15.27	51.24	<.0001
Erro	50	0.45		
Total	59			

Em baixo P, Toropi obteve maior concentração de Pi livre na parte aérea sendo 57% superior a Anahuac, nas raízes não houve diferenças significativas. Em alto P, Toropi não mostrou diferenças na concentração de Pi livre entre as partes da planta, enquanto Anahuac apresentou maior concentração na parte aérea e, cerca de 40% a mais que Toropi, nesta condição.

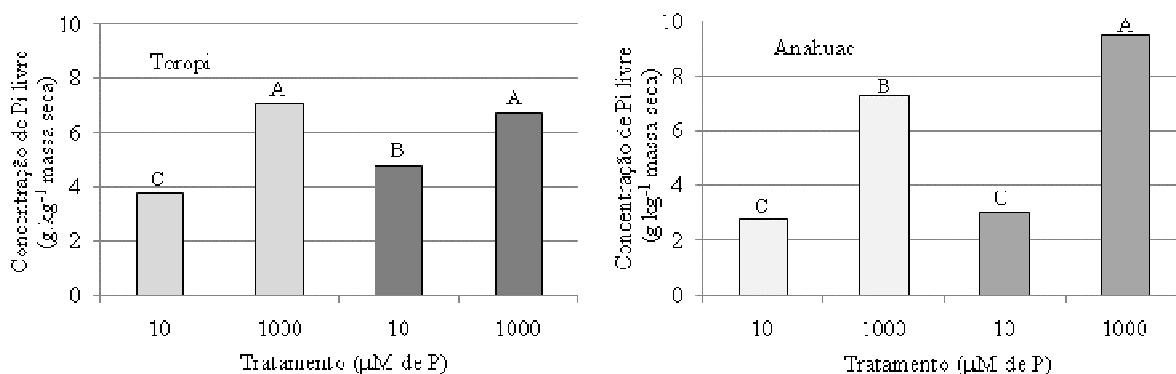


FIGURA 20. Concentração de Pi livre (g.kg⁻¹ MS) nos cultivares de trigo Toropi e Anahuac, em condições de baixo P (10μM) e alto P (1000μM) nas raízes (barras claras) e parte aérea (barras escuras) após 240 horas. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05) dentro dos genótipos.

As determinações da quantidade de Pi, além da concentração de Pi livre, são necessárias para excluir interferências na distribuição do Pi livre na planta em função do crescimento, pois maiores aquisições de Pi pela planta poderiam ser mascaradas pela diferença na massa seca, como descrito por Batten (1992).

A análise de variância para quantidade de Pi (TABELA 10) não mostrou diferenças significativas entre os genótipos, mas sim para tratamento e interação. Analisando as médias (FIGURA 21) há alterações entre os genótipos, Toropi em baixo P apresenta 92% a mais de quantidade de Pi na planta do que Anahuac (5,09 mols para Toropi e 2,65 mols para Anahuac). Na condição de alto P, a situação se inverte, Anahuac apresenta 42% a mais na quantidade de Pi na planta do que Toropi (9,34 mols para Anahuac e 6,58 para Toropi).

Estes dados evidenciam a maior capacidade de aquisição e translocação de Pi para parte aérea por Toropi em baixo P na solução, comparado com Anahuac, pois maior quantidade de Pi em Toropi encontra-se na parte aérea (3,5 mols para Toropi e 1,67 para Anahuac) e nas raízes não há muita diferença.

TABELA 10. Análise de variância para quantidade de Pi livre (mol) medido após 240 horas em solução com 10 μ M e 1000 μ M de P, para os genótipos de trigo Toropi e Anahuac, para raízes e parte aérea.

Causas da variação	GL	QM	F teste	Probabilidade
Genótipo (G)	1	0.094	0.39	0.5374
Repetição (R)	2	3.66	3.96	0.0987
Tratamento (T)	3	35.04	143.6	<.0001
G x T	3	10.58	43.36	<.0001
Erro	50	0.24		
Total	59			

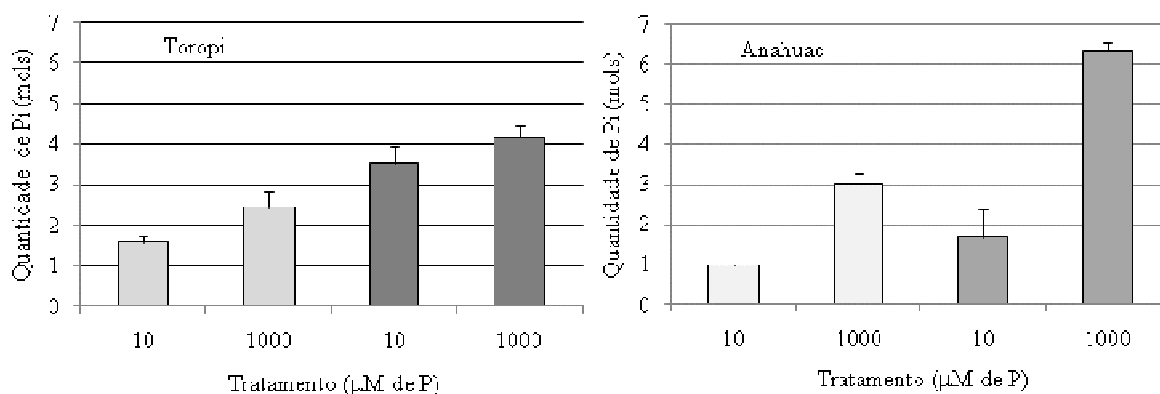


FIGURA 21. Quantidade total (mol) de Pi livre nos cultivares de trigo Toropi e Anahuac, em condições de baixo P (10 μ M) e alto P (1000 μ M) nas raízes (barras claras) e parte aérea (barras escuras) após 240 horas.

As diferenças significativas entre os genótipos para o parâmetro concentração de Pi livre na parte aérea, a 10 μ M, e na raiz, em 1000 μ M de P na solução (FIGURA 20), permitiu a discriminação dos genótipos e contribuiu para o mapeamento das características. A distribuição contínua da frequência com tendência normal foi observada nas características concentração de Pi livre (FIGURA 22 a 24) o que sugere que a característica é controlada por mais de um gene e/ou é fortemente afetada pelo ambiente. Todas as características apresentam transgressividade negativas e positivas (FIGURAS 22 a 26), a observação da segregação de transgressivos positivos indica que alelos favoráveis podem ser combinados para melhorar a característica. A deficiência de P é considerada uma característica quantitativa em muitas espécies. Há ampla evidência

que a tolerância para deficiência de P em trigo seja controlada por poligenes (Su *et al.*, 2006).

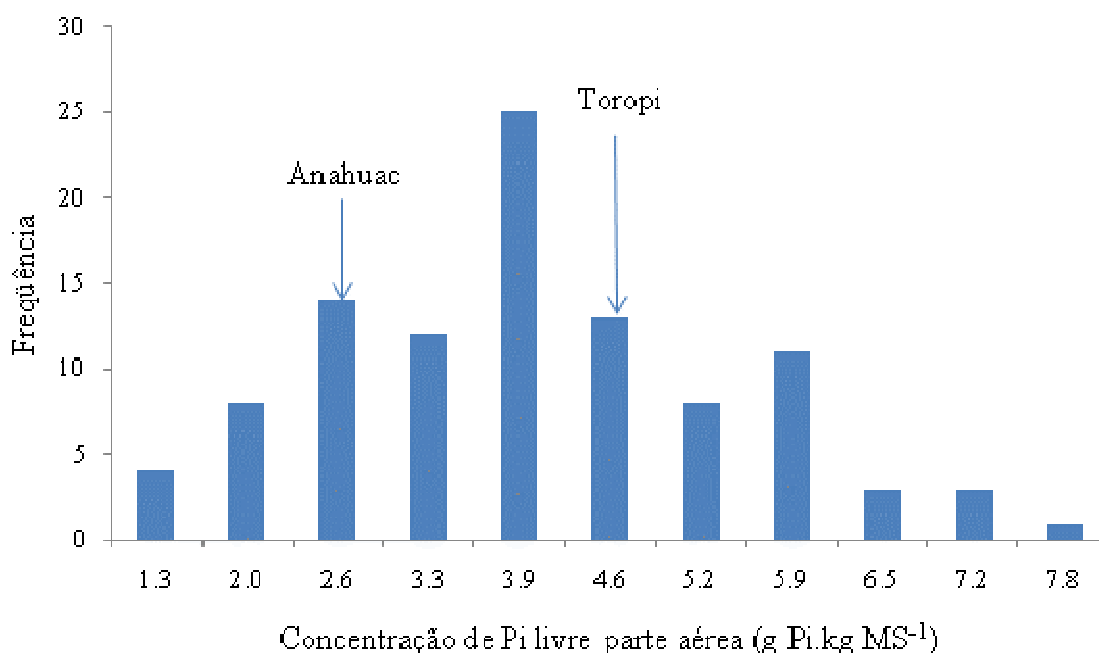


FIGURA 22. Distribuição de frequências da concentração de Pi livre (g.kg⁻¹ MS) na parte aérea da população F6 Toropi X Anahuac após 240 horas de tratamento de baixo P (10μM) em solução hidropônica.

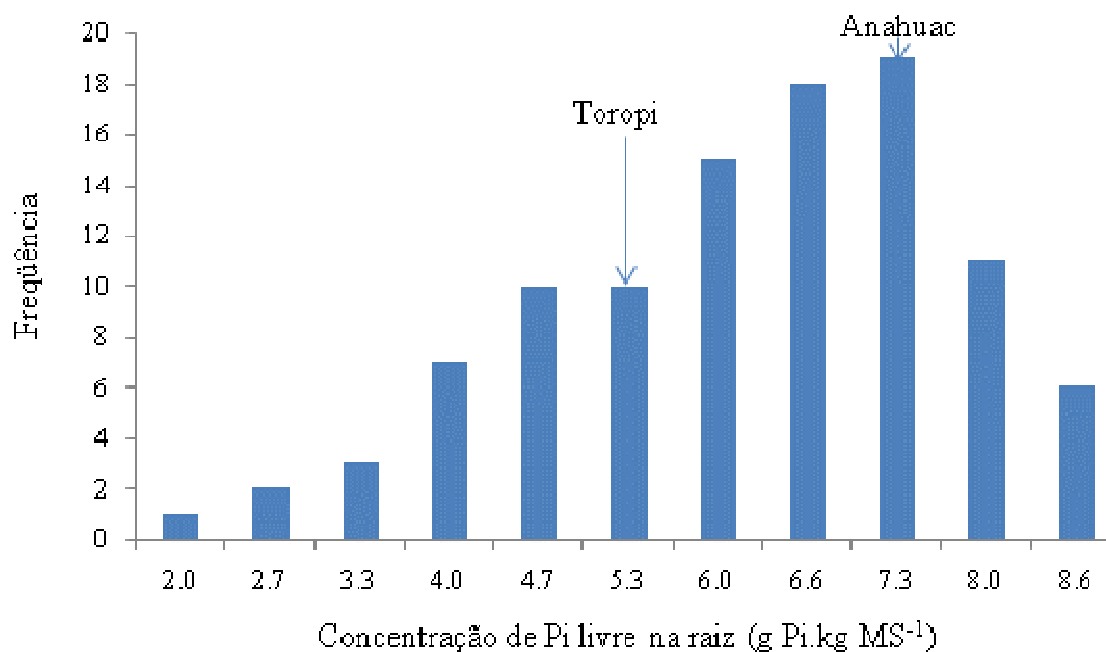


FIGURA 23. Distribuição de frequências da concentração de Pi livre (g.kg⁻¹ MS) na raiz da população F6 Toropi X Anahuac após 240 h de tratamento de alto P (1000μM) em solução hidropônica.

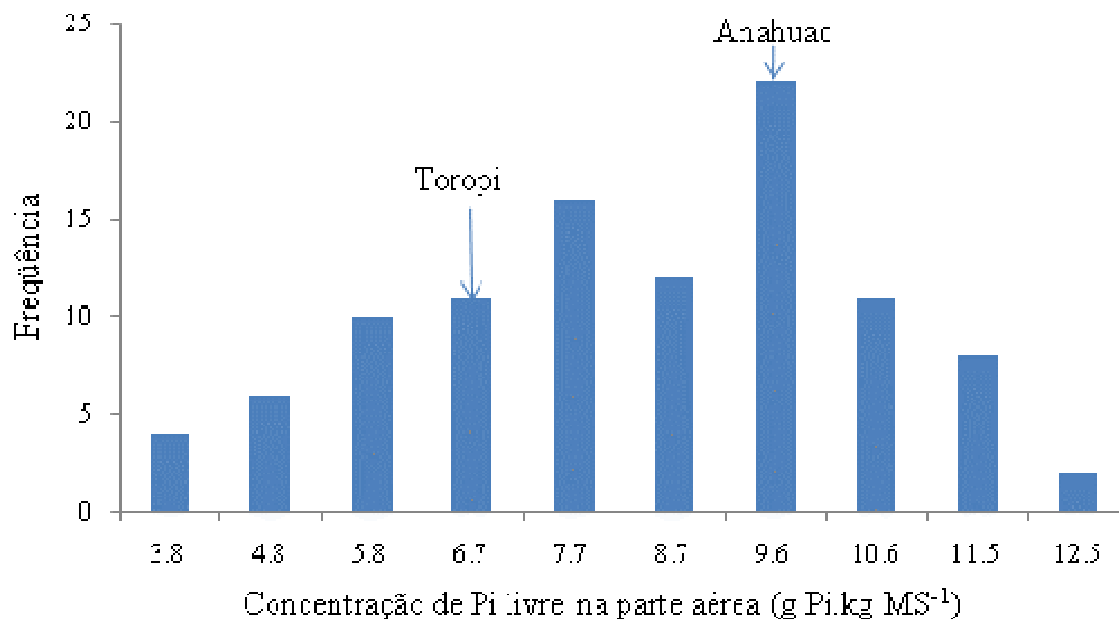


FIGURA 24. Distribuição de frequências da concentração de Pi livre (g.kg⁻¹ MS) na parte aérea da população F6 Toropi X Anahuac após 240 h de tratamento de alto P (1000µM) em solução hidropônica.

Segundo Silva (2007) a diferenciação dos genótipos Toropi e anahuac em solução nutritiva é possível de ser realizada pelo cálculo da razão entre os valores de concentração de Pi livre na parte aérea nas doses de 10 e 1000µM de P. A razão da quantidade de Pi livre na plântula nas doses de 10 e 1000µM de P, ou mesmo a quantidade de Pi livre na parte aérea também podem ser usados (Silva, 2007). Assim os cálculos destas razões foram realizados para as características concentração e quantidade de Pi livre tanto para raízes quanto para parte aérea (TABELA 11 a 14). Foram significativamente diferentes entre os genótipos apenas as características de razão de concentração de Pi livre na raiz e na parte aérea (probabilidade 0.0002 e <0.001, respectivamente). A razão de quantidade de Pi livre nas raízes e na parte aérea foi significativamente diferente para os genótipos e para as repetições, logo a relação de quantidade de Pi não foi utilizada no mapeamento.

TABELA 11. Análise de variância para razão da concentração de Pi livre na raiz entre plantas submetidas a 10 μ M e 1000 μ M de P, por 240 horas para os cultivares de trigo Toropi e Anahuac.

Causas da variação	GL	QM	F teste	Probabilidade
Genótipo (G)	1	0.22	31.62	0.0002
Repetição (R)	2	0.0041	0.60	0.5664
Erro	11	0.0069		
Total	14			

TABELA 12. Análise de variância para razão da concentração de Pi livre na parte aérea entre plantas submetidas a 10 μ M e 1000 μ M de P por 240 horas, para os cultivares de trigo Toropi e Anahuac.

Causas da variação	GL	QM	F teste	Probabilidade
Genótipo (G)	1	0.552	43.65	<.0001
Repetição (R)	2	0.0118	0.93	0.4228
Erro	11	0.0126		
Total	14			

TABELA 13. Análise de variância para razão da quantidade de P (mol) na raiz entre plantas submetidas a 10 μ M e 1000 μ M de P por 240 horas, para os cultivares de trigo Toropi e Anahuac.

Causas da variação	GL	QM	F teste	Probabilidade
Genótipo (G)	1	0.421	36.12	<.0001
Repetição (R)	2	0.192	16.53	0.0005
Erro	11	0.012		
Total	14			

TABELA 14. Análise de variância para razão da quantidade de P (mol) na parte aérea entre plantas submetidas a 10 μ M e 1000 μ M de P por 240 horas, para os cultivares de trigo Toropi e Anahuac.

Causas da variação	GL	QM	F teste	Probabilidade
Genótipo (G)	1	1.73	37.48	<.0001
Repetição (R)	2	0.55	12.01	0.0017
Erro	11	0.046		
Total	14			

A distribuição contínua da frequência com tendência normal foi observada na razão da concentração de Pi livre (FIGURA 22 e 26) tanto na raiz quanto na parte aérea. Nota-se nos gráficos uma maior tendência de transgressividade positiva. Analisando as linhagens que apresentam maior razão que Toropi encontram-se seis linhagens com superioridade tanto nas raízes quanto na parte aérea, NYW 865-04, NYW 865-14, NYW 865-15, NYW 865-35, NYW 865-82 e NYW 865-114, sugerindo maior

capacidade de obtenção de Pi em baixo P quando comparadas com Toropi. Quando Boff (2006) avaliou esta mesma população em relação à tolerância ao Al, também observou transgressividade.

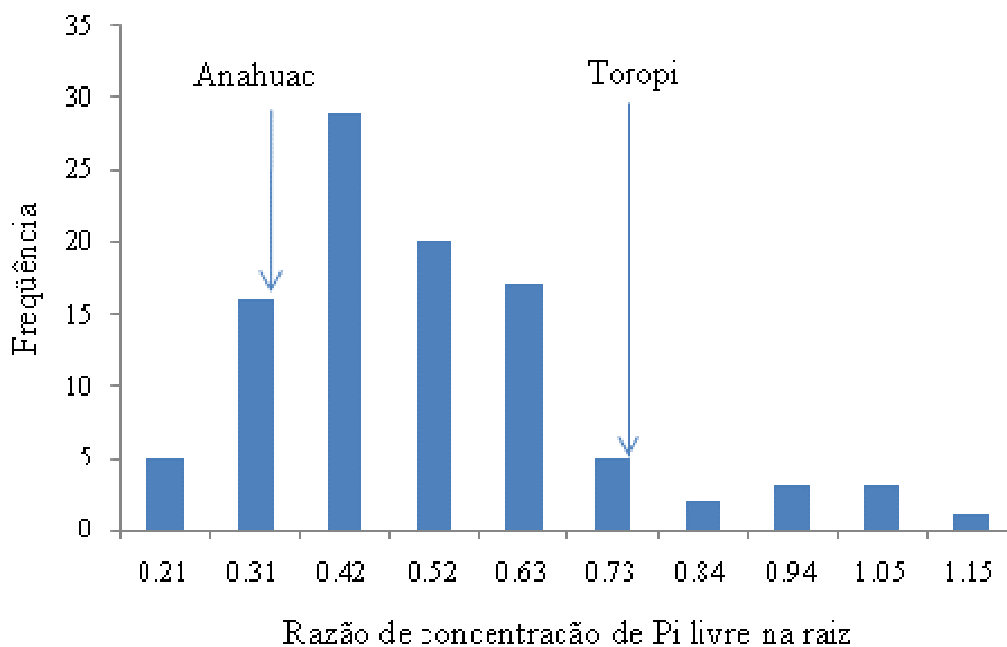


FIGURA 25. Distribuição de freqüências da razão da concentração de Pi livre em baixo P ($10\mu\text{M}$)/alto P ($1000\mu\text{M}$) na raiz da população F6 ToropiXAnahuac após 240 h de tratamento em solução hidropônica.

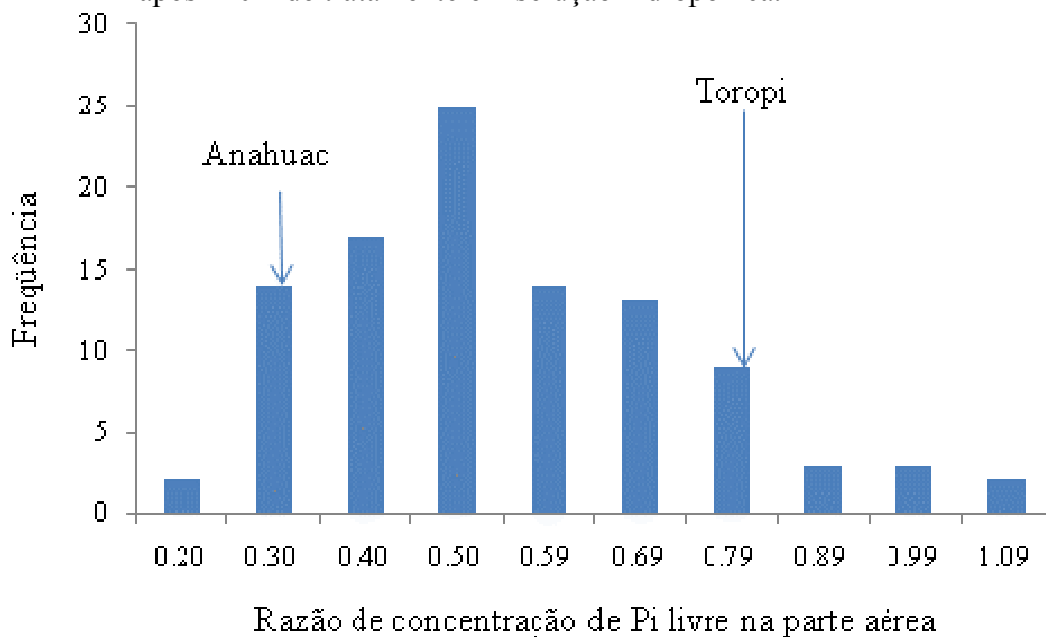


FIGURA 26. Distribuição de freqüências da razão da concentração de Pi livre em baixo P ($10\mu\text{M}$)/alto P ($1000\mu\text{M}$) na parte aérea da população F6 ToropiXAnahuac após 240 h de tratamento em solução hidropônica.

A herança da tolerância ao Al em trigo, durante muito tempo foi considerada monogênica, com efeito de dominância (Ma *et al.*, 2000 e Raman *et al.*, 2005), mas há controvérsias. Segundo Ryan *et al.* (2009) muitos trabalhos apresentam resultados conflituosos devido, em parte, ao material vegetal utilizado, como linhagens isogênicas ou genótipos que apresentam lóco simples. Está claro que o entendimento do controle genético para a tolerância ao Al em trigo está incompleto (Rengel, 2003).

Segundo Boff (2006) seus resultados foram consistentes com a teoria de um gene de efeito maior controlando a tolerância ao Al na população Toropi X Anahuac, nas três doses testadas (74, 148 e 222 μM de Al), podendo outros genes de efeito menor contribuir para a tolerância. Analisando as linhagens transgressivas positivas para a tolerância ao Al, obtidas por Boff (2006) observou-se que NYW 865-18, NYW 865-86 e NYW 865-95 apresentaram crescimento maior que Toropi em pelo menos duas doses de Al. Não houve nenhuma linhagem transgressiva para os dois caracteres, tolerância à deficiência de P e à toxidez de Al. Estes dados permitem inferir que as linhagens transgressivas apresentam diferentes genes contribuindo para as duas tolerâncias, ao Al e à deficiência de P. Entretanto isso não significa que não haja coincidência parcial entre as rotas utilizadas na conferência das tolerâncias.

Os resultados da análise de correlação das oito características analisadas na população recombinante estão mostrados na TABELA 15. As oito características analisadas apresentaram correlação significativa para alguma das características. As características de tolerância ao Al não foram significativamente correlacionadas com as características concentração de Pi livre na raiz (CPLR) 1000 μM P e razão da concentração de Pi livre (RCPL) na parte aérea entre baixa e alta disponibilidade de P. Nota-se que as características de concentração de Pi livre na parte aérea (CPLS) em 10 μM de P, concentração de Pi livre na parte aérea (CPLS) em 1000 μM de P e razão da

concentração de Pi livre (RCPL) na raiz entre baixa e alta disponibilidade de P foram positivamente correlacionadas com as características de Al nas maiores doses. É esperado que o maior crescimento das raízes em contato com Al esteja positivamente correlacionado com maior concentração de P livre na parte aérea, já que maior área superficial de raiz pode ser utilizada para acessar P na solução para utilização na planta (Kochian *et al.*, 2004, Raghothama, 1999). Salienta-se a elevada correlação entre o crescimento relativo da raiz em 148 e 222 μ M de Al com a razão da concentração de Pi livre na raiz entre baixa e alta disponibilidade de P (0,987 e 0,975). Talvez a capacidade de manter mais constante os níveis de Pi livre possa favorecer o crescimento da raiz na presença de Al.

TABELA 15. Análise de correlação para oito características fenotípicas analisadas. CRRP (crescimento relativo da raiz), CPLR (concentração Pi livre na raiz), CPLS (concentração de Pi livre na parte aérea), RCPL (razão da concentração de Pi livre).

	CRRP 74 μ M Al	CRRP 148 μ M Al	CRRP 222 μ M Al	CPLR 1000 μ M P	CPLS 10 μ M P	CPLS 1000 μ M P	RCPL na raiz
CRRP 74 μ M Al	1.000						
CRRP 148 μ M Al	0.193	1.000					
CRRP 222 μ M Al	0.235*	0.992**	1.000				
CPLR 1000 μ M P	0.049	0.117	0.129	1.000			
CPLS 10 μ M P	0.003	0.249*	0.250*	0.299*	1.000		
CPLS 1000 μ M P	0.021	0.394**	0.387**	0.483**	0.529**	1.000	
RCPL na raiz	0.043	0.987**	0.975**	0.101	0.250*	-0.389**	1.000
RCPL na parte aérea	0.014	0.115	0.117	0.144	0.672**	0.220	-0.108

A existência destas correlações suporta a hipótese deste trabalho, na qual se sugere que a tolerância à deficiência de P e ao Al estão relacionadas.

4.3 Mapa de ligação molecular

A partir das características fenotípicas par Al e P buscou-se verificar se os genes responsáveis por estas colocalizavam-se. Com este intuito foi desenvolvido o mapa de ligação molecular. Dos 267 marcadores, 112 não foram ligados ao mapa, que compreendeu 37 grupos de ligação (lg).

O grupo de ligação 37 foi formado somente por marcadores do tipo SSR, mapeados no cromossomo 4DS de trigo (FIGURA 27) (*Xgdm129*, *Xbarc105*, *Xbarc334* e *Xbarc1118*), que apresentaram polimorfismo consistente entre os genótipos para a tolerância ao Al, assim foi possível identificar sua posição física no genoma e localizar os genes que conferem tolerância ao Al e P nessa região.

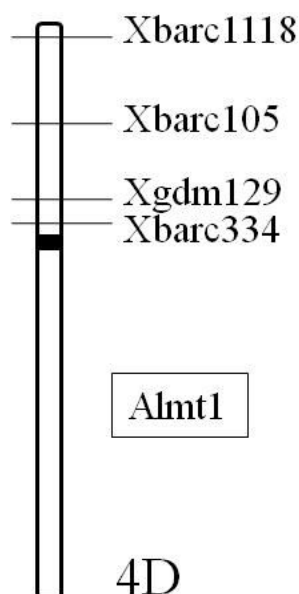


FIGURA 27. Mapa molecular para cromossomo 4D de trigo. Modificado de Pestsova *et al.*, 2000; Raman *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2005.

4.3.1 Detecção de QTLs pela análise de regressão linear

A análise por regressão linear ou análise de ponto, detectou 16 QTLs (TABELA 16) para sete variáveis fenotípicas, distribuídos em 10 grupos de ligação, num total de oito variáveis analisadas. As variáveis relacionadas à tolerância ao Al associaram-se a 11 QTLs em cinco grupos de ligação, enquanto as variáveis relacionadas à deficiência

de P associaram-se a cinco QTLs distribuídos em quatro grupos de ligação. Apenas o grupo de ligação 37 apresentou-se associado às variáveis de tolerância ao Al e à deficiência de P. A característica de tolerância ao Al foi altamente significativa com probabilidade de 0,001, já a característica concentração de Pi livre na raiz na presença de P apresentou probabilidade de 0,01.

O mapeamento por meio da análise de ponto ou regressão linear (Lander & Botstein, 1989) é uma das estratégias para detectar QTLs em cruzamentos controlados com linhagens endogâmicas, porém QTLs previamente detectados e ligados no intervalo em questão interferem no processo de estimação, podendo, portanto detectar QTLs não-existentes. Zeng (1993) propôs o uso do modelo de regressão múltipla para eliminar esses efeitos, criando assim o método de mapeamento por intervalo composto.

TABELA 16. QTLs significativos pela análise de regressão linear na população de linhagens recombinantes (F7) Toropi X Anahuac. CRRP (crescimento relativo da raiz), CPLR (concentração Pi livre na raiz), CPLS (concentração de Pi livre na parte aérea), RCPL (razão da concentração de Pi livre).

Variável	Grupo ligação	Probabilidade (F)
CRRP a 74 μ M Al	1	0.012*
CRRP a 148 μ M Al	1	0.032*
CPLS em 1000 μ M de P	3	0.033*
CRRP a 74 μ M Al	5	0.024*
CPLS em 10 μ M de P	6	0.028*
CRRP a 74 μ M Al	14	0.011*
CRRP a 148 μ M Al	14	0.005**
CRRP a 74 μ M Al	19	0.022*
CRRP a 222 μ M Al	23	0.006**
CRRP a 74 μ M Al	27	0.014*
CRRP a 148 μ M Al	27	0.049*
CPLS em 1000 μ M de P	31	0.016*
RCPL na raiz	31	0.028*
CRRP a 74 μ M Al	37	0.000***
CRRP a 222 μ M Al	37	0.000***
CPLR em 1000 μ M de P	37	0.001**

*Significância a 5%, ** a 1% e *** a 0,1%.

4.3.2 Detecção de QTLs pela análise de intervalo composto

A análise por intervalo composto detectou 17 QTLs (TABELA 17) para seis variáveis fenotípicas distribuídos em 12 grupos de ligação. As variáveis relacionadas à tolerância ao Al associaram-se a seis QTLs em cinco grupos de ligação e as variáveis relacionadas à deficiência de P associaram-se a 11 QTLs distribuídos em nove grupos de ligação. Os grupos de ligação 19 e 37 se apresentaram associados às variáveis de tolerância ao Al e à deficiência de P.

A colocalização de QTLs, no grupo de ligação 37, de características de tolerância ao Al e à deficiência a P foram confirmadas pela análise de intervalo composto (FIGURA 28). Porém, a variável para deficiência de P foi alterada, agora com ligação da relação da concentração de Pi livre na raiz, contribuindo com 9,8% da variação fenotípica no cromossomo 4D. As variáveis para a característica de tolerância ao Al, comprimento relativo da raiz principal nas duas menores doses, contribuíram com cerca de 20% cada uma. Houve uma distância de apenas 4 cM entre os QTLs para as características de Al e P, próximos ao marcador *Xbarc334*.

TABELA 17. QTLs significativos pela análise por intervalo composto da população de linhagens recombinantes (F7) Toropi X Anahuac. CRRP (crescimento relativa da raiz), CPLR (concentração Pi livre na raiz), CPLS (concentração de Pi livre na parte aérea), RCPL (razão da concentração de Pi livre).

Variável	Grupo ligação	Posição cM	%QTL
RCPL na parte aérea	1	0.01	16.4
CRRP a 74 μ M Al	3	226.01	36.2
CPLR em 1mM de P	4	14.01	38.0
RCPL na parte aérea	4	0.01	26.5
RCPL na parte aérea	5	143.61	13.6
CPLS em 10 μ M de P	15	688.61	10.2
CRRP a 74 μ M Al	19	0.01	10.8
CPLS em 1mM de P	19	0.01	11.9
RCPL na parte aérea	21	1354.71	12.1
CPLS em 1mM de P	23	21.61	12.7
CRRP a 148 μ M Al	27	0.01	12.5
CPLR em 1mM de P	29	16.51	10.9

Continuação TABELA 17. QTLs significativos pela análise por intervalo composto da população de linhagens recombinantes (F7) Toropi X Anahuac.

RCPL na raiz	29	110.31	18.8
CRRP a 74 μ M Al	31	135.31	13.9
CRRP a 74 μ M Al	37	68.91	22.3
CRRP a 148 μ M Al	37	0.01	18.7
RCPL na raiz	37	64.91	9.8

O grupo de ligação 19, também apresentou colocalização de QTLs para as características de tolerância ao Al e à deficiência de P, mapeados pelo marcador do tipo AFLP - *gatg523*. É possível que o QTL seja o mesmo para ambas as características. O QTLs do grupo de ligação 19 explicou cerca de 10% da variação fenotípica encontrada para as variáveis comprimento relativo da raiz principal em 74 μ M de Al e concentração de Pi livre na parte aérea na presença de P.

O QTL com maior contribuição para a característica tolerância ao Al foi localizado no grupo de ligação 3, explicando 36% da variação fenotípica e mapeado próximo ao marcador *gaag975*. Para a característica tolerância à deficiência de P, QTLs com maiores contribuições ocorreram no grupo de ligação 4, para CPLR na presença de P e RCPL na parte aérea, explicando 38% e 26% destas, respectivamente (TABELA 17).

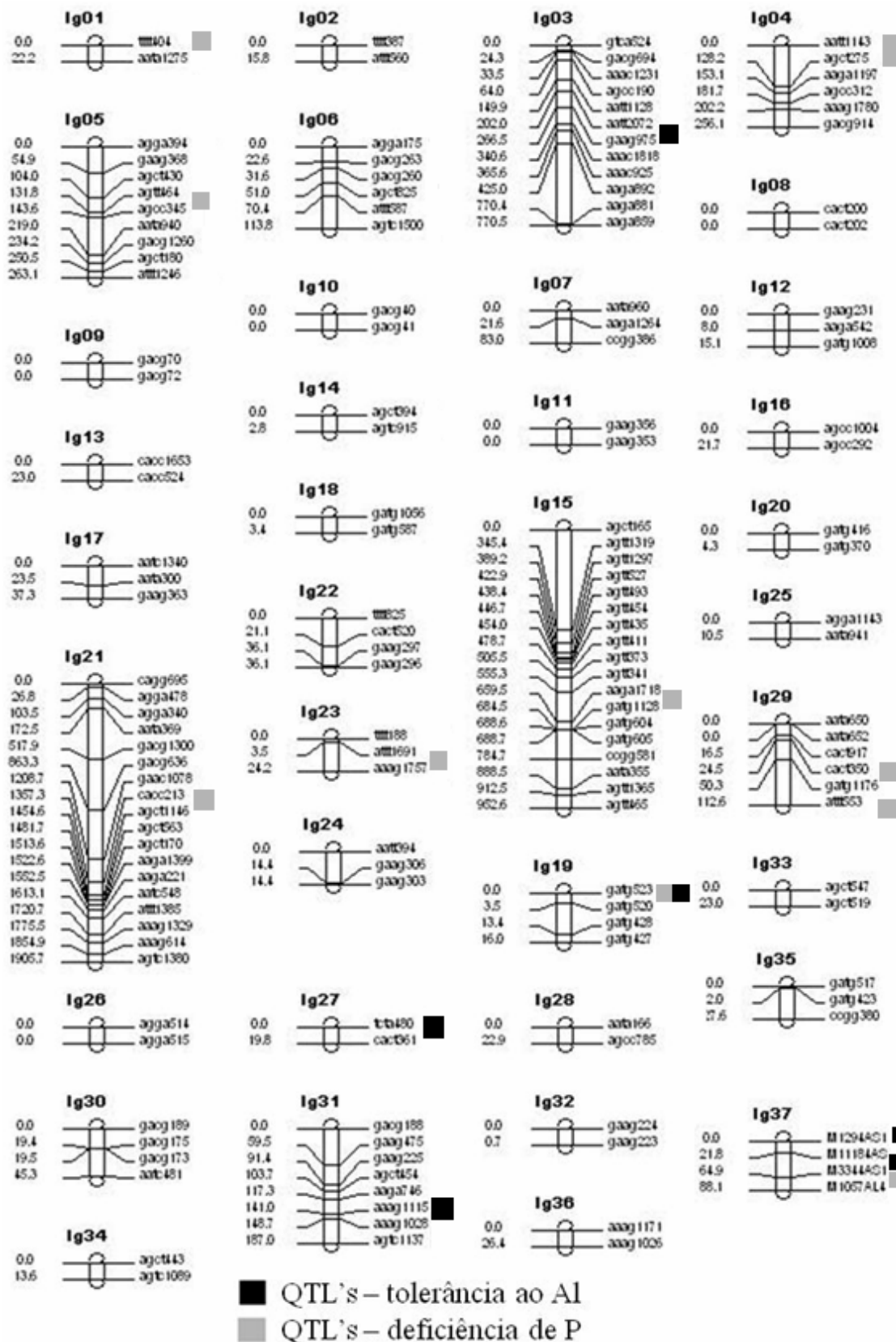


FIGURA 28. Mapa de ligação de trigo com identificação de QTLs para tolerância ao alumínio e à deficiência de fósforo (quadrados cinzas localizam QTLs para tolerância à deficiência de P, quadrados pretos para tolerância ao Al) por análise de intervalo composto.

Em relação à tolerância à deficiência de P, observou-se que os genes que controlam a característica na raiz podem ser diferentes dos que controlam na parte aérea, mostrado pela distribuição diferenciada dos QTLs nos grupos de ligação, o que também confirma a ação poligênica da característica. Isto pode ser devido à reação dinâmica da planta, onde alguns genes são ativados em tempos de exposição diferentes, dependendo da percepção da disponibilidade de P e do seu requerimento para o crescimento da planta sob estresse. Em muitos casos, interações genéticas, como epistasia, podem mascarar diferentes QTLs no efeito de outros. Em milho, interações epistáticas tiveram uma contribuição substancial na eficiência de utilização do P, tendo que ser considerado na seleção em programas de melhoramento (Chen *et al.*, 2009).

Três QTLs associados à eficiência de utilização de P foram detectados em arroz, localizados nos cromossomos 2, 4 e 12 (Wissura *et al.*, 1998). Também em arroz, dois QTLs foram responsáveis por 20,7% do total da variação fenotípica no conteúdo de P absorvido. Entre vários índices fisiológicos secundários, a eficiência em absorver P e a massa seca de raiz mostraram-se os mais importantes (Ming *et al.*, 2000). Em trigo, três QTLs para eficiência de utilização de P na parte aérea foram detectados e localizados no mapa de ligação nos cromossomos 2D, 3B e 6D, enquanto QTLs para a eficiência de utilização de P na planta inteira foram localizados em 2D e 7A (Cao *et al.*, 2001). Um QTL para uso relativo da eficiência de P foi detectado em arroz, com localização no cromossomo 10 (Ming *et al.*, 2000). No entanto, este é o primeiro estudo revelando em trigo QTLs para eficiência na utilização de P localizados no cromossomo 4D, o qual é considerado importante para a tolerância ao Al.

O número de locos que controlam a tolerância ao Al em trigo ainda não está esclarecido. Riede & Anderson (1996) relataram um único gene no 4DL (*Alt_{BH}*) segregando para a tolerância ao Al na população BH1146 X Anahuac. Luo & Dvorak (1996) ao mesmo tempo identificaram em trigo na variedade *Chinese Spring*, outro gene

(*Alt2*) para a tolerância ao Al descoberto no mesmo braço do cromossomo 4. Uma série de outros relatos sugere o controle oligogênico para a tolerância ao Al, indicando que a tolerância ao Al é determinada por um complexo mecanismo envolvendo mais de um gene (Zhou *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2009). QTLs para tolerância ao Al localizados no cromossomo 4D em diferentes populações tem o validado como maior lóco identificado para esta característica (Zhou *et al.*, 2007).

A co-localização da tolerância ao Al e à deficiência de P nos grupos de ligação 19 e 37 (cromossomo 4DL) reforçam a hipótese de que estas tolerâncias compartilham parte de suas rotas.

4.4 Metabolismo anti-oxidativo em resposta a fósforo

A atividade de enzimas envolvidas na detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em estresses em plantas é amplamente conhecida. Para a forma de vida aeróbia é consequência a contínua formação de ERO, sendo um processo aumentado pelos estresses abióticos, principalmente por estresses a metais (Cakmak & Horst, 1991; Gunes *et al.*, 2009; Vanhoudt *et al.*, 2008). ERO produzidos como resultados de estresses abióticos precisam ser anulados para manutenção do crescimento normal, seja por mecanismos de proteção celulares e subcelulares, utilizando enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) ou por mecanismos não enzimáticos antioxidantes como glutathione (Gunes *et al.*, 2007).

Na tolerância ao Al foi observado aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, na presença do alumínio (Yamamoto *et al.*, 2002). Yamamoto *et al.* (2002) observaram que o alumínio causa disfunção mitocondrial e produção de EROS, como ânions superóxidos, reduzindo a atividade mitocondrial, inibindo a respiração e reduzindo a produção de ATP, acarretando perda da capacidade de crescimento das células. Na deficiência de P não há na literatura informações sobre o efeito da

deficiência de P sobre o estresse oxidativo. Supõem-se que ao afetar processos metabólicos, como a fotossíntese, deficiência de P cause aumento na produção de EROs.

A catalase é uma enzima envolvida na detoxificação e proteção direta contra acumulação de H_2O_2 . Analisando a atividade de CAT (FIGURA 29) observa-se que o genótipo sensível, Anahuac, apresenta maior atividade após 24 horas de deficiência de P quando comparado com a presença de P, enquanto Toropi possui mesma atividade nas duas condições. Nas 120 horas, a situação se altera e a atividade de catalase em Anahuac na ausência de P reduz para níveis similares aos obtidos na presença de P. Por outro lado, Toropi eleva a atividade para os níveis obtidos por Anahuac nas 24 horas. Em 240 horas, a atividade de catalase em Toropi estabilizou-se em valores similares aos obtidos na presença de P e, Anahuac reduz ainda mais a atividade, alcançando cerca de 1/3 da atividade obtida na presença de P. Ambos os genótipos mantiveram a atividade de CAT estável e similares entre si, na presença de P. Estes dados sugerem que Toropi responde mais tardiamente ao estresse que Anahuac (120 e 24 horas respectivamente), talvez porque Toropi consiga manter os níveis de P_i estáveis por um período mais prolongado retardando a ocorrência do estresse oxidativo. A redução significativa da atividade da catalase após 240 horas em Anahuac pode representar a incapacidade de sustentar adequadamente o metabolismo.

Estudos avaliando CAT mostraram redução na atividade enzimática em condições de baixa temperatura, mas não necessariamente implicaram na acumulação de H_2O_2 em níveis danosos, esta relação de baixa atividade da catalase e de baixa concentração de H_2O_2 sugere que há interferência de outras reações na remoção de H_2O_2 ou, na inabilidade das membranas peroxissomais para transporte de precursores da catalase para o peroxissomo (MacRae & Ferguson, 2008). Estes resultados podem ser relacionados com a deficiência de P, uma vez que é bastante comum baixas

temperaturas causarem redução dos níveis de Pi nos tecidos, similar ao que ocorreria se houvesse deficiência de P no solo. A análise dos níveis de peróxido poderia auxiliar a esclarecer o que acontece em Anahuac nas 240 horas.

Convém ressaltar que, Fialová & Dobremyslová (1962) observaram redução de atividade de CAT com o aumento da idade das plantas nas raízes e o contrário ocorria na parte aérea. Certamente a redução da atividade com a idade da planta associa-se a ação da catalase na proteção das folhas, na atividade fotossintética ou na formação da clorofila. Poderia se especular que a redução da atividade de catalase no tempo é esperada nas raízes, no entanto, em condições de alta disponibilidade de P a redução na atividade de catalase foi marginal (FIGURA 29).

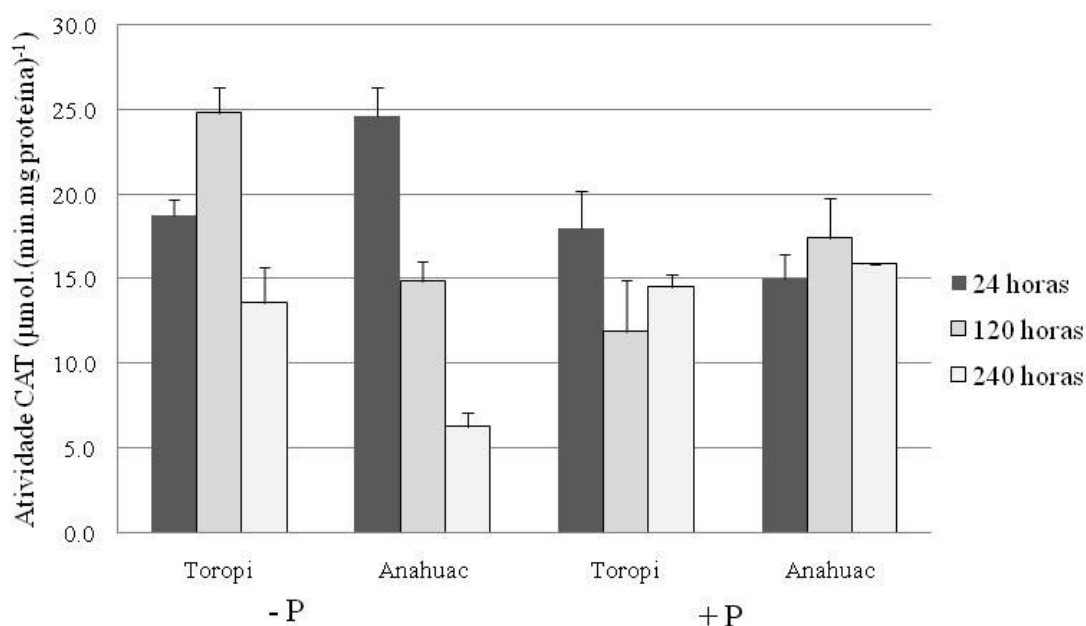


FIGURA 29. Atividade enzimática da catalase (CAT) ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) em raízes nos genótipos de trigo Toropi e Anahuac na presença e ausência de P em três tempos de exposição 24, 120 e 240 horas.

Alta proporção de glutathiona em sua forma oxidada ocorre também em condições ótimas de crescimento e a forma reduzida precisa ser restaurada por meio de maior atividade da enzima glutathiona redutase (GR). GR é uma flavoproteína que catalisa a redução dependente de NADPH da forma oxidada de glutathiona (Mullineaux

& Creissen, 1997). Análises de expressão da sequência diferencialmente expressa AluTr64, sugerem alterações nos níveis de NADP. A maioria da atividade de GR tem sido localizada nos cloroplastos e plastídeos (Noctor *et al.*, 2002).

A atividade de GR observada nos genótipos Toropi e Anahuac, nas condições de presença e ausência de P, revelou maior atividade enzimática na presença de P para ambos os genótipos ao passar do tempo (FIGURA 30). A elevação da atividade foi mais significativa em Toropi que dobrou sua atividade de GR entre 24 e 240 horas. Na condição de ausência de P, os genótipos permaneceram estáveis na atividade de GR, e não diferiram entre si. A similaridade na atividade de GR em baixo P em ambos os genótipos indica que esta não está envolvida na tolerância à deficiência de P em Toropi.

Os resultados sugerem que o maior crescimento (maior atividade metabólica) em condições de alta disponibilidade de P poderia induzir a produção de radicais livres gerando maior necessidade de aumento na atividade da GR. Mullineaux & Creissen (1997) propuseram uma explicação para o aumento da atividade de GR com a aplicação de N, sendo este devido ao aumento na proporção de crescimento, fotossíntese e atividade metabólica, que requer uma intensificação na remoção de ERO.

A atividade de SOD pode ser observada pela comparação da intensidade das bandas dos géis não desnaturantes (FIGURA 31 e 32) para Anahuac e Toropi. Não se observou diferenças na atividade de SOD entre os genótipos. A partir das 120 horas ocorreu o surgimento, em ambos os genótipos, de uma nova banda na presença de P (FIGURA 31 e 32) indicando a atividade de uma nova isoforma de SOD.

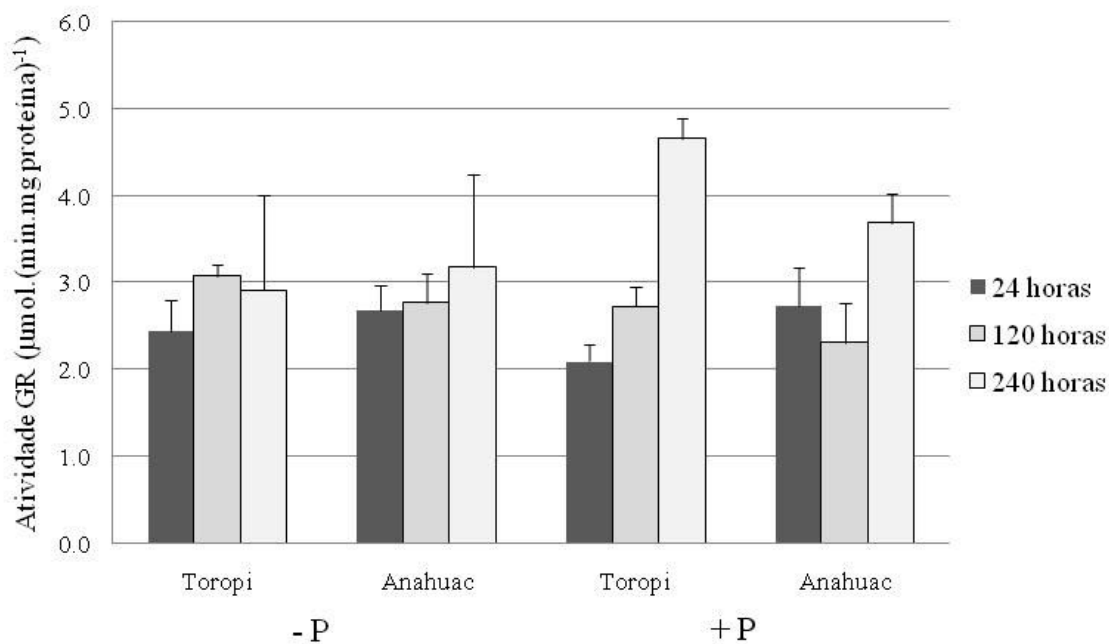


FIGURA 30. Atividade enzimática da glutathione redutase (GR) ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) em raízes dos genótipos de trigo Toropi e Anahuac na presença e ausência de P em três tempos de exposição 24, 120 e 240 horas.

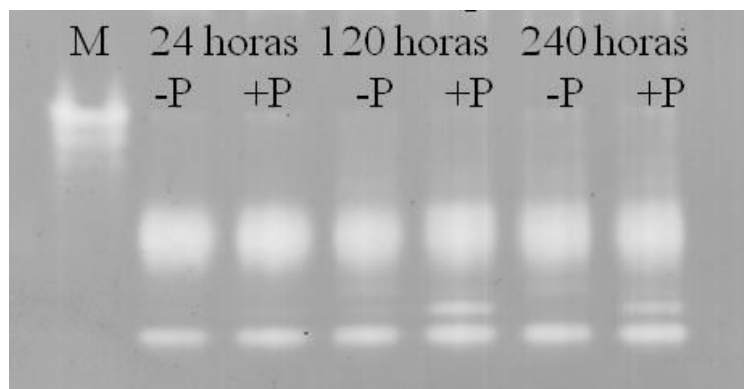


FIGURA 31. Gel não desnaturante para atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) em raízes no genótipo de trigo Toropi na presença (+P) e ausência de P (-P) em três tempos de exposição 24, 120 e 240 horas.

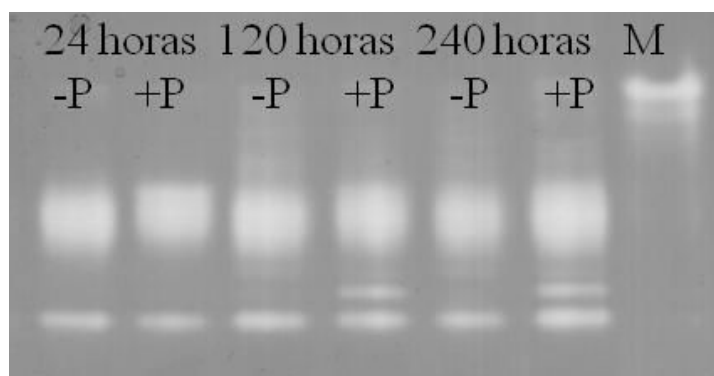


FIGURA 32. Gel não desnaturante para atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) em raízes do genótipo de trigo Anahuac na presença (+P) e ausência de P (-P) em três tempos de exposição 24, 120 e 240 horas.

A SOD constitui a primeira linha de defesa em plantas contra ERO, catalisando a dismutação de superóxidos. Esta espécie reativa é produzida em qualquer localização intracelular onde exista um transporte de elétrons, podendo ocorrer em diferentes compartimentos celulares, como mitocôndria, cloroplastos, glioxissomos, peroxissomos e citosol (Alscher *et al.*, 2002). As SOD são classificadas conforme o metal cofator, Fe, Cu/Zn ou Mn. O número e o tipo de isoformas de SOD são variáveis entre espécies vegetais e condições de crescimento (Asada, 1999). A existência de isoenzimas de SOD, suas localizações dentro da célula, tecido ou organelas, e mudanças que elas devam sofrer durante o desenvolvimento, ou em resposta a vários sinais, implicam em rotas metabólicas separadas para cada isoenzima de SOD (Scandalios, 1993). O número de isoenzimas de cada tipo de SOD varia muito de planta para planta, assim como a abundância relativa de cada uma. Todas as isoenzimas aparentam ser codificadas pelo núcleo, e quando necessário, são transportadas aos seus locais nas organelas por meio de sequências alvo amino terminais (Bowler *et al.*, 1992). Mullineaux & Creissen (1997) têm discutido que mudanças na quantidade particular de isoenzimas podem ser mais importantes que alterações na atividade total. Essa modificação izoenzimática reflete as mudanças ocorridas nos locais subcelulares de formação de oxiradicais (Bowler *et al.*, 1994).

O significado do surgimento de outra isoforma de SOD apenas na presença de P não é claro. Novamente pode ser especulado que incremento no metabolismo gerou aumento na produção de superóxido em algum compartimento específico requerendo a expressão desta nova isoforma. Há a possibilidade do teor de P na solução ser muito elevado, no entanto, a concentração usada, apesar de muito superior aquelas encontradas nos solos naturais, é similar ou mesmo inferior as utilizadas para estudos com P em diversas espécies sem terem sido observados efeitos negativos no crescimento (Ticconi *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2008). Na condição de deficiência de P, neste trabalho, não foi observada diferença entre os genótipos em nenhum dos tempos. A SOD não deve portanto, estar envolvida na tolerância à deficiência de P.

Os dados aqui apresentados mostraram diferenças significativas entre os genótipos, em condições de deficiência de P, apenas para atividade de catalase. É possível que o gerenciamento diferenciado do estresse oxidativo contribua para a tolerância de Toropi. Entretanto, para confirmar a habilidade destes genótipos de lidar com o estresse oxidativo, seria necessário verificar os níveis dos radicais livres, ou o nível de peroxidação de lipídeos e proteínas, sintomas da não detoxificação.

4.5 Sequências diferencialmente expressas na deficiência de P

Para comparar os processos de resposta em trigo ao Al e à deficiência de P optou-se por identificar sequências gênicas diferencialmente expressas nestas condições. Em 2007, Boff desenvolveu biblioteca subtrativa pelo método de SSH utilizando a subtração do RNAm obtido de ápices radiculares do cultivar Toropi do RNAm de ápices radiculares submetidos a uma hora de exposição ao Al em hidroponia. Para a deficiência de P, em arroz foi desenvolvida biblioteca subtrativa, contrastando a suficiência com a deficiência de P em solução nutritiva por dez dias (Yu *et al.*, 2005). Em decorrência de haverem estoques de P nas células e as respostas variarem com o

tempo de exposição à deficiência, a utilização de um período de dez dias tem como objetivo certificar-se que a planta encontra-se em estresse de P. Este período foi também o que permitiu Silva et al (2008) diferenciarem os genótipos Toropi e Anahuac quanto à tolerância a P. No entanto, como as respostas iniciais muitas vezes são as mais importantes para a aclimação, optou-se por utilizar “bulk” de três tempos de exposição à deficiência de P: 24, 120 e 240 horas. A biblioteca desenvolvida, portanto, possuiu sequências gênicas que foram induzidas em pelo menos um destes tempos.

Os clones desenvolvidos pelo método de SSH são obtidos pelo processo de hibridização com o uso de excesso de cDNA controle (*driver*) (Sagerström *et al.*, 1997). A técnica de SSH, combinou normalização, equalização da abundância de cDNA da população alvo, e subtração, que exclui as sequências comuns entre a população alvo, ou *tester* (-P), contra a *driver* (+P) (Diatchenko *et al.*, 1996).

A biblioteca de seqüências subtraídas, resultado da passagem única do sequenciamento dos clones da biblioteca, forneceu seqüências curtas de transcritos (ESTs – *Expressed Sequence Tags*) que são uma parte pequena das extremidades próximas a cauda de poliA do cDNA obtido de um gene. Do ponto de vista funcional, o resultado fornece o padrão de expressão da característica analisada, no caso a resposta à deficiência de P pela cultivar Toropi por 24, 120 e 240 horas.

Uma vez determinada a qualidade das seqüências, estas informações podem ser utilizadas para determinar padrões de expressão, localizar a posição de genes nos cromossomos, identificar lócos de características quantitativas, contribuir para a genética comparativa entre as espécies, mas principalmente ajudar a decifrar genes candidatos que contribuam para a superioridade da característica em estudo (Hatey *et al.*, 1998).

As seqüências obtidas pelo método diferencial foram um total de 96 clones, dos quais se obteve 64 seqüências adequadas para análise. Devido a problemas no

sequenciamento ou nas amostras, a eficiência do sequenciamento foi de apenas 66%. Após a identificação das sequências únicas e limpeza de vetores e contaminantes restaram 33 sequências únicas ou seja, ocorreu 51% de redundância. As sequências foram renomeadas como PiTr (*Phosphate inorganic Toropi*), seguido pelo número de identificação da sequência. Através do alinhamento das sequências, realizado pelo BioEdit, foram identificadas as redundâncias, a sequência PiTr04 apresentou maior número de sequências similares, 7, seguido por PiTr13 e PiTr32 com 5 sequências, PiTr11 e PiTr31 com quatro, PiTr16, PiTr20 e PiTr26 com três e o restante com sequências duplas e únicas.

A validação da expressão diferencial de seqüências obtidas por SSH pode ser realizada via técnicas clássicas como o PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) semi-quantitativo, *Northern blot* e PCR em tempo real, sendo este último utilizado neste estudo. No processo de validação obtém-se RNAm de material cultivado nas mesmas condições utilizadas para desenvolvimento do SSH e avalia-se direta ou indiretamente a quantidade de RNAm das sequências obtidas para verificar se realmente ocorre maior indução destas na condição *tester*, neste caso deficiência de P por 24, 120 e 240 horas, em relação a situação controle, suficiência de P nos mesmos tempos em raízes do cultivar de trigo Toropi.

Para a validação é necessário utilizar um gene com expressão não alterada pela condição em estudo, o qual servirá como controle endógeno para normalização da expressão, uma vez que as quantidades iniciais de RNAm podem ter variado entre as amostras. Dos quatro genes comumente utilizados como controle endógeno, apenas 28S rRNA foi adequado neste estudo, amplificando de forma adequada (FIGURA 33). No caso do gene que codifica gliceraldeído 3fosfato desidrogenase, apesar deste ser considerado constitutivo e amplamente utilizado, os resultados obtidos por Duff et al. (1989) indicam claramente alteração na sua atividade em condições de limitação de P.

Reduções em NAD-gliceraldeído 3fosfato desidrogenase, que utiliza P, e aumentos em NADP-gliceraldeído 3fosfato desidrogenase, que não utiliza P, fariam parte das estratégias para manter o metabolismo em condições prolongadas de limitação de P. No caso da actina e ubiquitina, também considerados constitutivos pela literatura em geral, observa-se variação em genes destas famílias na presença de Al (Limberger, 2006).

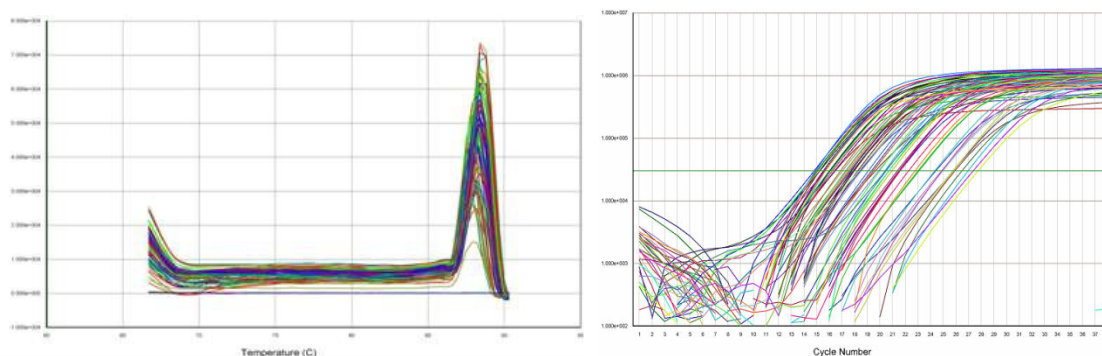


FIGURA 33. Curva de dissociação e amplificação em PCR em tempo real para controle endógeno 28S rRNA.

Para validar as sequências obtidas na biblioteca de SSH, iniciadores para estas foram desenhados e analisados em PCR em tempo real. Dos 33 pares de iniciadores desenhados, 20 pares de iniciadores amplificaram adequadamente. Os demais, PiTr01, PiTr05, PiTr07, PiTr12, PiTr17, PiTr18, PiTr19, PiTr28, PiTr29, PiTr30, PiTr31, PiTr32 e PiTr33 não geraram fragmento, ou não amplificaram fragmentos únicos, o que foi verificado nas curvas de dissociação pela presença de múltiplos picos. A não amplificação de fragmentos únicos, em geral, se deve aos genes pertencerem a famílias multigênicas com grande similaridade e os iniciadores desenvolvidos não serem capazes de discriminar entre estes.

As vinte sequências avaliadas apresentaram maior quantidade de RNAm nas raízes submetidas a deficiência de P do que nas cultivadas em suficiência deste nutriente em pelo menos um dos tempos de duração do estresse. No entanto, as sequências PiTr20, PiTr25, PiTr26 e PiTr27 apresentaram desvios entre amostras que não permitem

considerá-las validadas. Desta forma 16 sequências foram consideradas validadas como diferencialmente expressas na deficiência de P em Toropi (TABELA 18).

Três sequências mostraram aumento na expressão relativa apenas nas 24 horas de deficiência de P em Toropi, PiTr21, PiTr22 e PiTr23. A expressão destas foi aproximadamente 2,5, 2,5 e 4 vezes superior a ocorrida na suficiência de P. Outras duas apresentaram indução apenas nas 120 horas, PiTr09 e PiTr24, com aumento de expressão em torno de 6 e 2 vezes, respectivamente. A sequência PiTr02 apresentou aumento de expressão significativo em 24 e 120 horas com aumento em torno de 5 vezes da sua expressão e a sequência PiTr16 em 120 e 240 horas com aumento de cerca de 3 vezes. Todas as demais sequências foram validadas para os três tempos de exposição à deficiência de P (TABELA 18). Houve diferenças na magnitude do incremento da expressão relativa nos diferentes tempos. PiTr03, PiTr06, PiTr08, PiTr10 e PiTr13 mostraram maior expressão relativa nas 120 horas, sendo esta bastante elevada (TABELA 18). Enquanto, PiTr11 e PiTr14 apresentaram maior expressão relativa nas 240 horas de deficiência, também com aumentos superiores a 10 vezes. Já, a expressão relativa da sequência PiTr15 foi similar nos tempos de 24 e 120 horas, reduzindo-se nas 240 horas. Por final, PiTr04 apresentou incremento de cerca de duas vezes as 24 horas e nos demais tempos a expressão relativa elevou-se acima de 15 vezes.

TABELA 18. Expressão relativa das sequências gênicas da biblioteca subtrativa de ápices radiculares do cultivar de trigo Toropi em resposta a deficiência de P por 24, 120 e 240 horas.

Sequência	Tempo (horas)		
	24	120	240
Expressão relativa*			
PiTr02	5 ±0,9	4,5 ±0,7	1,7 ±1,0
PiTr03	2,5 ±0,5	12,6 ±0,9	7,2 ±0,9
PiTr04	2,4 ±0,8	22,9 ±1,0	16,6 ±0,8
PiTr06	5,9 ±1,0	27,7 ±1,2	4,8 ±1,1
PiTr08	3,9 ±0,9	16,8 ±1,6	4,5 ±1,6
PiTr09	2,4 ±1,2	14,5 ±1,1	1,3 ±1,0

Continuação TABELA 18. Expressão relativa das sequências gênicas da biblioteca subtrativa de ápices radiculares do cultivar de trigo Toropi em resposta a deficiência de P por 24, 120 e 240 horas.

PiTr10	5,8 ±0,8	16,3 ±1,2	6,4 ±0,1
PiTr11	6,0 ±0,9	5,2 ±0,8	10,1 ±1,0
PiTr13	5,8 ±0,9	8,9 ±1,0	5,8 ±1,0
PiTr14	7,5 ±0,9	9,1 ±1,4	18,0 ±2,2
PiTr15	8,0 ±1,0	10,7 ±0,8	3,0 ±1,4
PiTr16	1,5 ±0,9	3,2 ±1,0	2,5 ±0,7
PiTr20	1,7 ±1,0	1,5 ±0,9	0,7 ±0,7
PiTr21	2,5 ±1,0	1,1 ±0,7	1,0 ±0,6
PiTr22	2,7 ±0,9	1,2 ±0,9	1,0 ±0,8
PiTr23	3,9 ±1,1	0,8 ±1,1	1,2 ±0,9
PiTr24	1,2 ±1,0	2,6 ±0,7	1,1 ±1,0
PiTr25	1,4 ±1,0	1,2 ±0,8	0,8 ±0,8
PiTr26	0,6 ±0,9	1,3 ±0,8	0,2 ±0,8
PiTr27	1,6 ±0,9	1,0 ±1,1	1,9 ±0,9
PiTr30	3,6 ±0,9	0,6 ±0,8	0,1 ±0,7

*O gene 28S foi utilizado como controle endógeno para normalização. A expressão relativa compara condição de suficiência contra deficiência de P em 24, 120 e 240 horas em ápices radiculares.

4.6 Comparação da expressão relativa das sequências diferencialmente expressas na deficiência de P em Toropi e Anahuac

O objetivo principal do desenvolvimento da biblioteca de sequências gênicas diferencialmente expressas na deficiência de P foi identificar possíveis genes envolvidos na tolerância a este estresse. Assim, com a intenção de identificar possíveis candidatos foi realizada a comparação da expressão relativa entre genótipo tolerante (Toropi) e sensível (Anahuac). Sequências com maior expressão apenas em Toropi podem ser consideradas candidatas ao envolvimento na tolerância, enquanto as com expressão similar entre os genótipos possivelmente representam respostas comuns ao estresse que não conduzem a tolerância.

As sequências PiTr16, PiTr20, PiTr21, PiTr22, PiTr24, PiTr25, PiTr26 e PiTr27 em Anahuac mostraram em todos tempos expressão relativa igual ou superior a obtida em Toropi, desta forma estão possivelmente relacionadas a resposta a P mas não

ao estabelecimento da tolerância (FIGURA 34). Salienta-se que em Anahuac em 240 horas de deficiência de P a expressão das sequências PiTr20, PiTr25 e PiTr26 tiveram aumento significativo em relação a suficiência de P (3, 2,6 e 8 vezes superior, respectivamente), confirmando então o envolvimento destas na resposta a P.

Toropi teve maior expressão relativa na deficiência de P em relação ao Anahuac, em todos os tempos testados, em duas sequências, PiTr11 e PiTr14, sendo estas fortes candidatas a conduzirem a tolerância (FIGURA 35). Outras candidatas seriam PiTr02, PiTr10, PiTr13e PiTr15 que tiveram maior expressão em Toropi nos tempos 24 e 120 horas (FIGURA 35), PiTr23 com maior expressão apenas nas primeiras 24 horas, PiTr06, PiTr08 e PiTr09 com maior expressão em Toropi nas 120 horas de deficiência de P (FIGURA 36). PiTr03 e PiTr04 foram mais expressas nos tempos 24 e 240 horas em Anahuac, entretanto apresentaram em 120 horas maior expressão em Toropi. Desta forma, a possibilidade destas serem mediadoras da tolerância é pequena, a menos que o momento específico da expressão seja importante no resultado final da resposta (FIGURA 36).

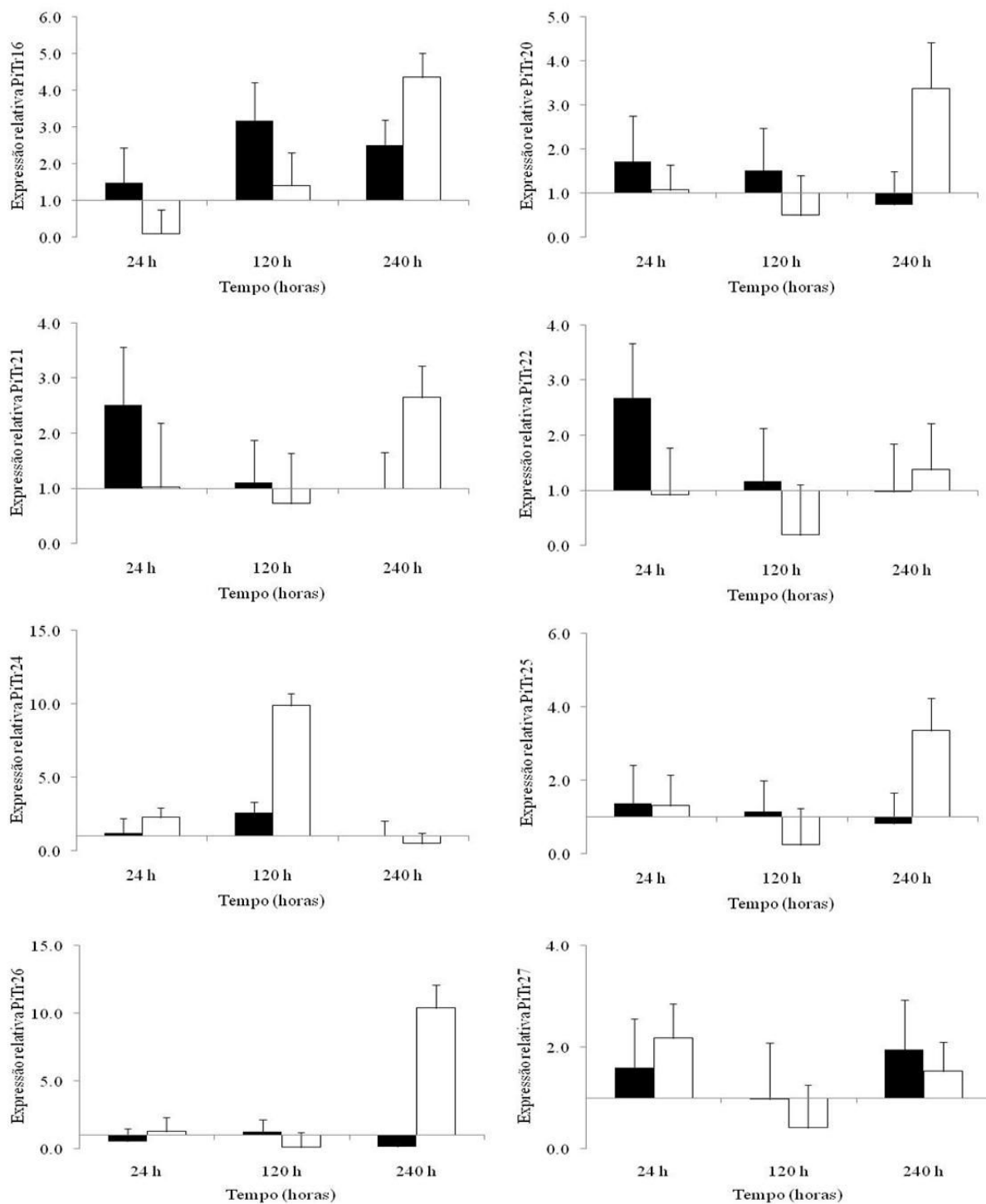


FIGURA 34. Expressão relativa temporal de genes com expressão em Anahuac superior a Toropi, diferencialmente expressos sob deficiência de P, em raízes de trigo genótipos Toropi (barras pretas) e Anahuac (barras brancas) depois de 24, 120 e 240 horas da deficiência de P, em relação à suficiência.

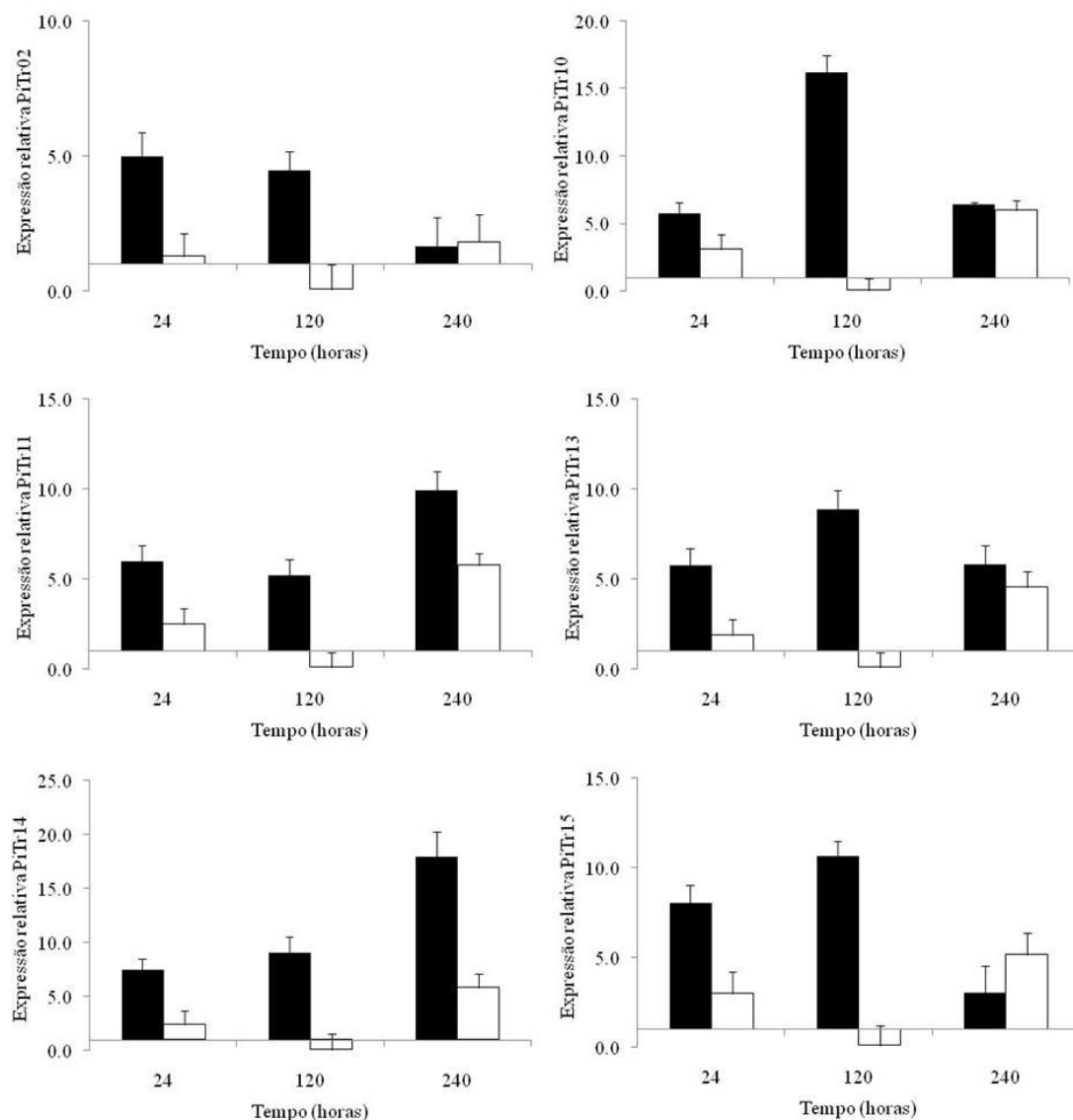


FIGURA 35. Expressão relativa temporal de genes com expressão em Toropi superior a Anahuac, diferencialmente expressos sob deficiência de P, em raízes de trigo genótipos Toropi (barras pretas) e Anahuac (barras brancas) depois de 24, 120 e 240 horas da deficiência de P, em relação à suficiência.

PiTr23 pode ser necessária para processos iniciais de indução da aclimação, enquanto as que foram maiores em Toropi apenas nas 120 h podem estar envolvidas nas respostas aclimatativas. Salienta-se que nenhuma sequência foi superior em Toropi apenas nas 240 horas, supõem-se que neste tempo, já considerado longo de exposição ao estresse os processos aclimatatórios já devem estar em funcionamento, o que explicaria a não ocorrência de diferenças exclusivas a este tempo entre genótipos tolerantes e sensíveis.

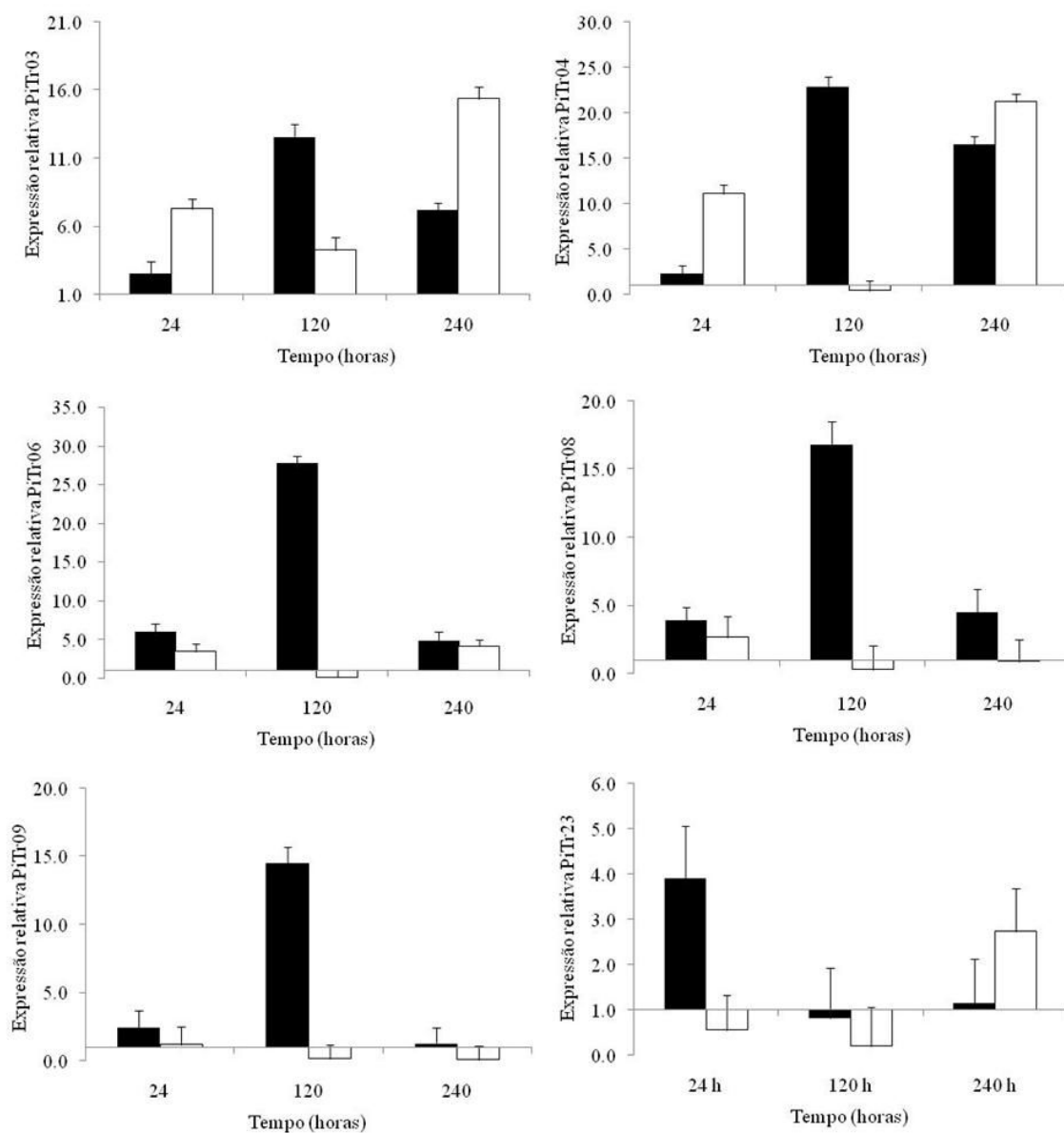


FIGURA 36. Expressão relativa temporal de genes com expressão em Toropi superior a Anahuac às 120 horas, diferencialmente expressos sob deficiência de P, em raízes de trigo genótipos Toropi (barras pretas) e Anahuac (barras brancas) depois de 24, 120 e 240 horas da deficiência de P, em relação à suficiência.

4.6.1 Efeito da deficiência de P sobre a expressão de sequências responsivas ao Al

Se condições de deficiência de P induzisse sequências responsivas ao Al, a hipótese deste trabalho que P e Al induzem processos similares seria confirmada pelo menos parcialmente. A hipótese não é confirmada completamente porque se

considerada a não aclimatação todos os estresses causam processos similares, como a redução do crescimento e redução de sobrevivência das plantas, assim a expressão foi avaliada em genótipo tolerante e em genótipo sensível para tentar diferenciar efeitos de resposta ao estresse daqueles da tolerância.

As sequências testadas faziam parte da biblioteca de SSH à exposição de ápices radiculares do cultivar de trigo Toropi ao Al por uma hora, desenvolvida por Boff (2006) (TABELA 7). De um total de 26 pares de iniciadores utilizados apenas AluTr07, AluTr09, AluTr48 e AluTr68 não amplificaram, ou não geraram fragmentos únicos, o que foi observado através das curvas de dissociação.

Todas as 22 sequências para Al que amplificaram fragmento único em alguma das condições de P apresentaram aumento da expressão relativa em resposta a deficiência de P em um ou mais tempos nas raízes de trigo (FIGURAS 37 a 40). Confirmando a hipótese da indução de processos similares entre deficiência de P e presença de Al.

As sequências AluTr11 e AluTr14 tiveram nos diferentes tempos expressão relativa similar entre os genótipos ou maior expressão em Anahuac, genótipo sensível ao Al e à deficiência de P (FIGURA 37). Sugerindo que sua ação esteja mais relacionada ao estresse e não ao estabelecimento da tolerância, pelo menos em relação a deficiência de P. O mesmo ocorreu com as sequências AluTr04, AluTr08, AluTr12, AluTr26, AluTr64 e AluTr67, as quais tiveram incremento em sua expressão ao longo do tempo (FIGURA 37).

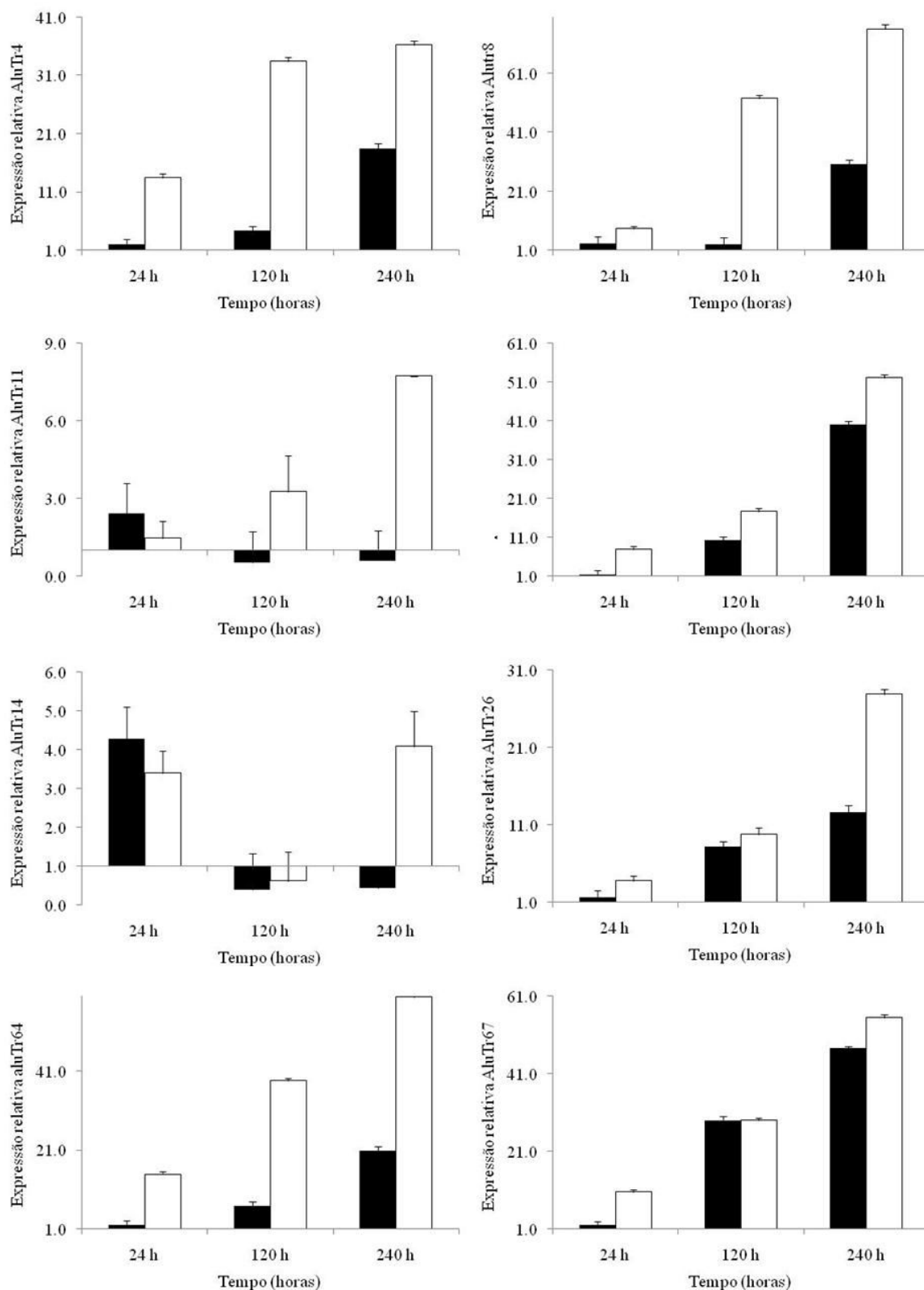


FIGURA 37. Expressão relativa temporal de genes com expressão em Anahuac superior a Toropi até as 240 horas, diferencialmente expressos na presença de Al tóxico, em raízes de trigo genótipos Toropi (barras pretas) e Anahuac (barras brancas) depois de 24, 120 e 240 horas da deficiência de P, em relação à suficiência.

Apenas três sequências, AluTr13, AluTr15 e AluTr95 apresentaram em pelo menos um tempo maior expressão em Toropi e não diferiram de Anahuac nos demais tempos (FIGURA 38). No caso de AluTr13, a maior expressão em Toropi ocorreu as 240 horas, enquanto para AluTr15, essa se deu as 24 horas quando Toropi apresentou o dobro da expressão que Anahuac. Em relação a AluTr95, houve um incremento na expressão com o tempo e Toropi foi superior a Anahuac nos tempos 120 e 240 horas com diferenças de expressão relativa de 3 para 37 vezes e de 32 para 54 vezes, respectivamente. Estas sequências podem estar relacionadas ao estabelecimento da tolerância em Toropi em ambos os estresses.

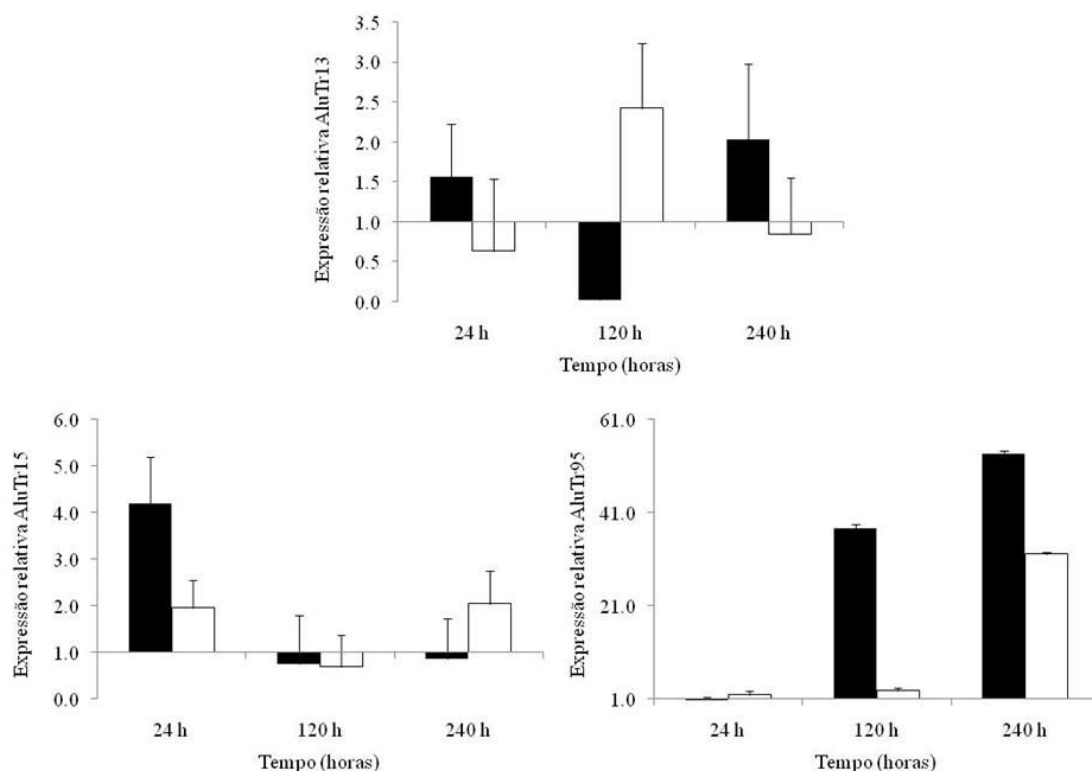


FIGURA 38. Expressão relativa temporal de genes com expressão em Toropi superior a Anahuac em pelo menos um tempo, diferencialmente expressos na presença de Al tóxico, em raízes de trigo genótipos Toropi (barras pretas) e Anahuac (barras brancas) depois de 24, 120 e 240 horas da deficiência de P, em relação à suficiência.

As sequências AluTr17, AluTr42 e AluTr43 expressaram-se mais em Toropi em dois tempos de exposição à deficiência de P, as primeiras duas sequências nos tempos

120 e 240 horas e, a terceira as 24 e 240 horas (FIGURA 39). É possível que não apenas a expressão da sequência per se, ou mesmo a sua magnitude sejam importantes para a aclimação, mas o momento em que esta ocorre. Portanto, não se pode descartar a possibilidade destas sequências com comportamento misto ao longo do tempo estarem envolvidas na tolerância aos estresses de deficiência de P e presença de Al.

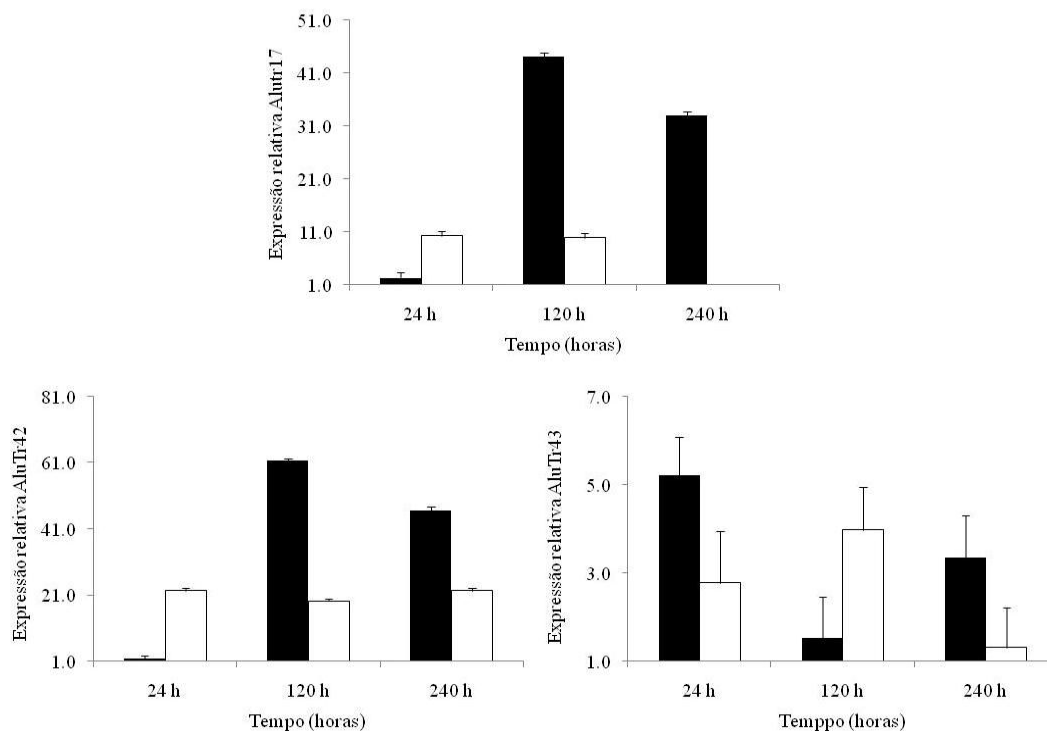


FIGURA 39. Expressão relativa temporal de genes com expressão em Toropi superior a Anahuac pelo menos dois tempos, diferencialmente expressos na presença de Al tóxico, em raízes de trigo genótipos Toropi (barras pretas) e Anahuac (barras brancas) depois de 24, 120 e 240 horas da deficiência de P, em relação à suficiência.

As demais sequências apresentaram resultados opostos em termos de maior expressão nos genótipos entre os tempos. Observou-se maior expressão em Toropi em relação ao Anahuac nas 24 horas para as sequências AluTr05 (aumento de 5 vezes) AluTr06 (aumento de 2 vezes contra 5 vezes), AluTr16 (aumento de 4 vezes contra 1,5 vezes), AluTr30 (aumento de 2 vezes) e AluTr45 (aumento de 7 vezes contra 2 vezes). No entanto, estas sequências tiveram maior expressão em Anahuac especialmente as 240 horas (FIGURA 40).

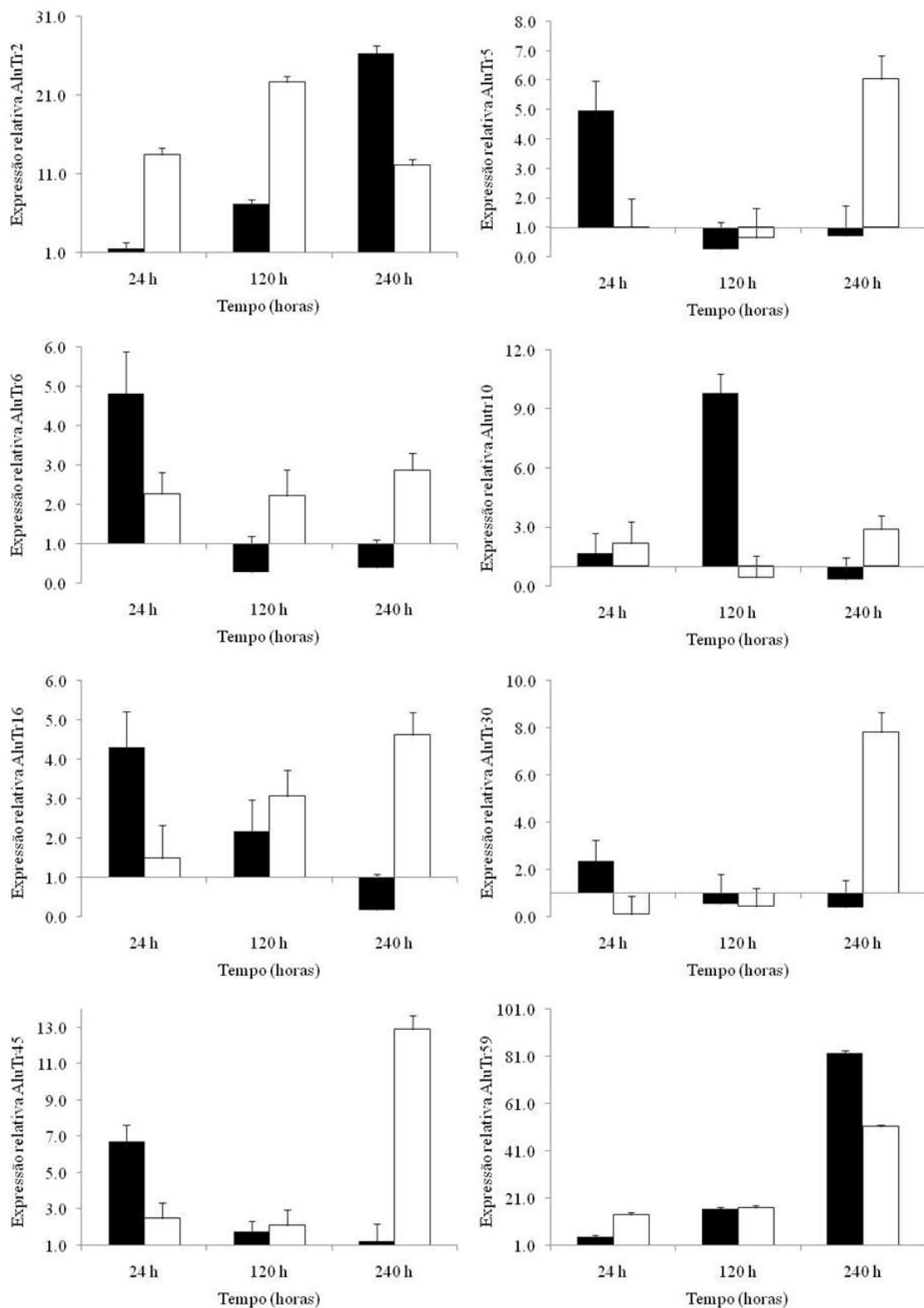


FIGURA 40. Expressão relativa temporal de genes diferencialmente expressos na presença de Al tóxico, com expressão em raízes de trigo genótipos Toropi (barras pretas) e Anahuac (barras brancas) depois de 24, 120 e 240 horas da deficiência de P, em relação à suficiência.

A sequência AluTr10 por sua vez mostrou maior expressão em Toropi as 120 horas (aumento de 9 vezes) e maior em Anahuac as 240 horas (aumento de 3 vezes) (Figura B). Por outro lado, AluTr02 e AluTr59 tiveram maior expressão em Toropi nas 240 horas de deficiência de P, com aumentos de 25 vezes contra 10 vezes e, de 80 vezes contra 50, respectivamente (FIGURA 40).

4.6.2 Comparação das sequências diferencialmente expressas em deficiência de P com sequências depositadas em bancos de dados

Na busca inicial de informações sobre a função das sequências diferencialmente expressas, estas foram comparadas em banco de dados do NCBI (GenBank, EMBL-Bank e CIB-DDBJ) pelo alinhamento BLAST para ESTs em todo o banco, BLASTn, para proteína apenas para trigo comum.

Atualmente, entre as sequências ESTs de plantas depositadas no banco de dados, as de trigo comum estão em primeiro lugar, com número de 1.064.087 sequências. Porém apesar do grande número de sequências depositadas, a grande maioria não disponibiliza informações de possível função, apenas informam a situação na qual foi obtida ou encontrada. Mesmo assim estas informações são válidas para confirmação da espécie, do tecido e tipo de estresse onde se encontram as sequências de estudo.

Os resultados do BLASTn para ESTs revelaram apenas um caso sem similaridade significativa, PiTr30. Na classificação, apenas seis sequências mostraram-se similares a outras famílias que não a Triticeae, PiTr03, PiTr07, PiTr16, PiTr22, PiTr27, PiTr33 (TABELA 19). O restante das sequências, 79%, possui similaridade significativa para a família Triticeae, e 45% são similares para o trigo comum (*T. aestivum*). Cerca de 67% das sequências apresentaram similaridade com sequências obtidas sob algum tipo de estresse, permitindo inferir que a maioria das sequências

isoladas é responsiva a mais de um estresse. Quando se considera a origem (tecido ou órgão) das ESTs, a maioria das sequências obteve similaridade com plântulas e folhas, e apenas 9% com raízes, de onde se extraiu o mRNA do estudo.

O NCBI conta com apenas 6.586 proteínas em seu banco de dados para trigo comum (*T. aestivum*), um número muito baixo considerando que devem existir cerca de 30.000 genes. Na busca de informações sobre as proteínas codificadas pelas sequências obtidas ou predição de funções foi realizado o BLASTx para trigo comum, obtendo-se resultados de proteínas hipotéticas (TABELA 20). Todas as sequências diferencialmente expressas apresentaram alguma similaridade, no entanto apresentaram altos valores para *e-Value* e baixa identidade, resultado provavelmente de serem fragmentos curtos, não superiores a 300 pb, e o BLASTx considerar o tamanho completo da proteína. Assim, a discussão é meramente especulatória.

As sequências foram divididas em categorias funcionais segundo a homologia e predição a partir dos dados do BLASTx: metabolismo, compreendendo metabolismo primário e secundário; estrutura e desenvolvimento, responsáveis pela manutenção da estrutura celular e tecidual e sua diferenciação temporal e espacial; processamento de informações, toda a parte de sinalização a estresses ou de manutenção celular e outros: outros, aquelas que não se encaixaram nas categorias acima.

Existem no mínimo duas respostas para a deficiência de Pi em raízes, uma controlada pela condição da planta inteira (sistêmica) e outra sendo controlada pelo sinal de Pi local. Os genes podem também ser divididos em função de sua resposta temporal, cedo ou tarde, durante a deficiência de P (Schachtman & Shin, 2007). Assim, neste estudo a indução temporal dos genes em resposta a deficiência de P foi analisada desde 24 horas até 240 horas após a remoção do Pi e a indução espacial apenas nas raízes, por acreditar-se ser este o órgão com maior resposta à situação de P na planta.

TABELA 19. Classificação do BLASTn dos cDNAs diferencialmente expressos do genótipo Toropi quanto à deficiência de P.

Clone	Descrição	Espécie	Acesso	e-Value	Identidade	Base de Dados
PiTr01	Biblioteca cDNA de semente 15 dias depois da antese	<i>T. aestivum</i>	BQ244419.1	0.65	92%	GenBank
PiTr02	Biblioteca cDNA de plântulas de 20 dias estioladas	<i>T. turgidum</i> subsp. <i>durum</i>	AJ615305.1	4e-46	93%	EMBL
PiTr03	Biblioteca cDNA de SSH de folhas inoculadas com antracnose	<i>Vitis quinquangularis</i>	FL595078.1	8e-151	93%	GenBank
PiTr04	Biblioteca cDNA de SSH de raízes de 5 semanas após germinação em reposta à seca	<i>T. turgidum</i> subsp. <i>dicoccoides</i>	FK827940.1	5e-76	84%	GenBank
PiTr05	Biblioteca cDNA	<i>T. aestivum</i>	CA621022.1	2e-80	83%	GenBank
PiTr06	Biblioteca cDNA de semente, estudo de família gênica de proteína de armazenamento	<i>T. aestivum</i>	BJ237034.1	1e-66	90%	DBJ
PiTr07	Biblioteca cDNA de folhas maduras, estudo de filogenia	<i>Brachypodium distachyon</i>	DV484620.1	1.3	90%	GenBank
PiTr08	Biblioteca cDNA de embrião 14 dias após a antese	<i>T. aestivum</i>	AL816613.1	4e-21	90%	EMBL
PiTr09	Biblioteca cDNA de semente 5 dias depois da antese	<i>T. aestivum</i>	BQ237240.1	3e-63	95%	GenBank
PiTr10	Biblioteca cDNA de plântulas de 20 dias estioladas	<i>T. turgidum</i> subsp. <i>durum</i>	AJ611629.1	1e-99	90%	EMBL
PiTr11	Biblioteca cDNA de embrião 14 dias após a antese	<i>T. aestivum</i>	AL815832.1	2e-62	90%	EMBL
PiTr12	Biblioteca cDNA folhas de plântulas após inoculação de <i>E. graminis</i> f. sp. <i>Tritici</i>	<i>T. aestivum</i>	CA655025.1	1e-69	78%	GenBank

Continuação TABELA 19. Classificação do BLASTn dos cDNAs diferencialmente expressos do genótipo Toropi quanto à deficiência de P.

PiTr	Biblioteca cDNA de SSH de raízes de 5 semanas após germinação em reposta à seca	<i>T. turgidum</i> subsp. <i>dicoccoides</i>	FL586143.1	0.0	93%	GenBank
PiTr13	Biblioteca cDNA de SSH de raízes de 5 semanas após germinação em reposta à seca	<i>T. turgidum</i> subsp. <i>dicoccoides</i>	FL586143.1	0.0	93%	GenBank
PiTr14	Biblioteca cDNA de callus	<i>T. aestivum</i>	CJ521557.1	7e-156	89%	DBJ
PiTr15	Retrotransposon em folhas de 5 semanas após germinação em reposta à seca	<i>T. turgidum</i> subsp. <i>dicoccoides</i>	FK828527.1	5e-106	93%	GenBank
PiTr16	Biblioteca cDNA de SSH de folhas de planta adulta em reposta ao estresse salino	<i>Lolium temulentum</i>	EB709883.1	9e-12	84%	GenBank
PiTr17	Biblioteca cDNA folhas de plântulas após 24 h inoculação de <i>E. graminis</i> f. sp. <i>Tritici</i>	<i>T. aestivum</i>	CA680675.1	5e-04	82%	GenBank
PiTr18	Biblioteca cDNA de plântulas de 20 dias estioladas	<i>T. turgidum</i> subsp. <i>durum</i>	AJ612946.1	4e-38	86%	EMBL
PiTr19	Biblioteca cDNA de embrião 14 dias após a antese	<i>T. aestivum</i>	AL816313.1	7e-72	87%	EMBL
PiTr20	Biblioteca cDNA de folhas de 5 semanas após germinação em reposta à seca	<i>T. turgidum</i> subsp. <i>dicoccoides</i>	FL586143.1	6e-104	90%	GenBank
PiTr21	Biblioteca cDNA de plântulas de 20 dias estioladas	<i>T. turgidum</i> subsp. <i>durum</i>	AJ614961.1	0.0	97%	EMBL
PiTr22	Biblioteca cDNA de folhas adultas do ápice	<i>Hordeum vulgare</i>	AV836205.1	1e-33	90%	DBJ
PiTr23	Biblioteca cDNA de raízes em reposta ao estresse a seca	<i>T. aestivum</i>	BU099370.1	4e-133	91%	GenBank
PiTr24	Biblioteca cDNA de folhas de 5 semanas após germinação em reposta à seca	<i>T. turgidum</i> subsp. <i>dicoccoides</i>	FL583375.1	4e-106	95%	GenBank

Continuação TABELA 19. Classificação do BLASTn dos cDNAs diferencialmente expressos do genótipo Toropi quanto à deficiência de P.

PiTr25	Biblioteca cDNA de folhas de 5 semanas após germinação em resposta à seca	<i>T. turgidum</i> subsp. <i>dicoccoides</i>	FL586145.1	1e-92	95%	GenBank
PiTr26	Biblioteca cDNA de plântulas de 20 dias estioladas	<i>T. turgidum</i> subsp. <i>durum</i>	AJ716596.1	2e-72	86%	EMBL
PiTr27	Biblioteca cDNA de SSH de folhas em florescimento em resposta à seca	<i>Zea mays</i>	FK933958.1	4e-104	100%	GenBank
PiTr28	Biblioteca cDNA de folhas de plântulas após 4 h inoculação de <i>E. graminis</i> f. sp. <i>Tritici</i>	<i>T. aestivum</i>	CA694173.1	1e-32	75%	GenBank
PiTr29	Biblioteca cDNA de SSH em resposta a frio	<i>T. aestivum</i>	DR732200.1	1e-06	86%	GenBank
PiTr30	Sem similaridade significativa					
PiTr31	Biblioteca cDNA	<i>T. aestivum</i>	BJ237034.1	1e-67	90%	DBJ
PiTr32	Biblioteca cDNA	<i>T. aestivum</i>	CA680675.1	5e-04	82%	GenBank
PiTr33	Biblioteca cDNA de parte aérea em resposta ao estresse de calor	<i>Festuca arundinacea</i>	DT691240.1	0.11	77%	GenBank

TABELA 20. Classificação do BLASTx no banco de proteína de trigo dos cDNAs diferencialmente expressos do genótipo Toropi.

Clone	Descrição	Acesso	e-Value	Identidade	Base de Dados
<i>Metabolismo</i>					
PiTr03	Succinato desidrogenase subunidade 3	AAP80640.1	2.6	47%	GenBank
PiTr07	Glicosiltransferase	CAI93192.1	0.77	52%	EMBL
PiTr08	Sacarose-fosfato sintase	AAQ15126.1	0.39	31%	GenBank
PiTr11	Chalcona sintase	ACJ22498.1	5.3	53%	GenBank
PiTr15	Peroxisomal ascorbato peroxidase	ABQ53157	0.15	31%	GenBank
PiTr16	Protoclorofilida redutase	CAA54042.1	2.5	50%	EMBL
PiTr23	N-miristoil transferase	AAS67031.1	0.92	47%	GenBank
PiTr25	Glicosiltransferase	CAI30070.1	3.4	38%	EMBL
PiTr33	Alpha-gliadina Gli-Ts5	ABQ45319.1	0.11	57%	GenBank
<i>Estrutura e desenvolvimento</i>					
PiTr01	Fasciclina-like proteína	ABI95413.1	0.23	47%	GenBank
PiTr02	Putative puroindoline b proteína	CAQ43070.2	0.082	58%	EMBL
PiTr04	ACC sintase	AAB18416.1	0.91	61%	GenBank
PiTr14	Dof proteína de ligação a DNA	AAS19857.1	0.57	47%	GenBank
PiTr20	Transportador de amônio Amt1	AAS19466.2	1.00	64%	GenBank
PiTr21	Transportador de nitrato alta afinidade	AAL11016.1	0.5	52%	GenBank
PiTr26	Proteína associada à resistência a multidrogas MRP1 ATP-binding cassette	AAL47686.1	0.69	53%	GenBank

Continuação TABELA 20. Classificação do BLASTx no banco de proteína de trigo dos cDNAs diferencialmente expressos do genótipo Toropi.

Clone	Descrição	Acesso	e-Value	Identidade	Base de Dados
<i>Processamento de informações</i>					
PITr06	Alpha-2-purotiana	P32032.1	2.6	50%	EMBL
PITr09	Fator de transcrição WRKY1B	ABC65847.1	0.22	44%	GenBank
PITr10	Fator de transcrição MIKC-type MADS-box WM29B	CAM59077.1	4.5	42%	EMBL
PITr12	LTR proteína similar a retrotransposon	ABO69734.1	7e-06	86%	GenBank
PITr13	Serina/treonina-proteína fosfatase PP2A-1 sub-unidade catalítica	ABO16371.1	0.071	78%	GenBank
PITr17	BR1-associado a receptor quinase 1 proteína	ACD49737.1	5.1	44%	GenBank
PITr18	Serina/treonina proteína quinase	AAX19515	1.1	51%	GenBank
PITr19	Quinase proteína	ABK63977.1	8.4	45%	GenBank
PITr22	Quinase 1 associada a parede celular WAK	AA Y34780.1	0.87	41%	GenBank
PITr24	Similar a Quinase R	AAL51066.1	0.90	40%	GenBank
PITr29	Proteína quinase	ABG68032.1	3.1	39%	GenBank
PITr30	Regulador pseudo-respose	ABL09478.1	0.2	64%	GenBank
PITr31	Alfa-1 purotionina	BAA12336.1	2.1	50%	DBJ
PITr32	Receptor quinase 1 associado a BR11	ACD49737.1	0.52	55%	GenBank
<i>Outros</i>					
PITr05	Pst19	AAK20739.1	2.9	40%	GenBank
PITr27	Matr	BAE47664.1	1.2	44%	DBJ
PITr28	Tacbf9	ABK55385.1	0.23	50%	GenBank

4.7 Possível envolvimento das funções preditas das sequências das bibliotecas SSH na resposta à deficiência de P

4.7.1 Alterações no metabolismo

P é elemento essencial para processos de obtenção de energia em plantas, tendo um importante papel no metabolismo, incluindo fotossíntese e respiração. Uma série de enzimas “*by pass*” são ativadas pela deficiência de Pi, principalmente enzimas relacionadas ao fluxo de carbono (Duff *et al.*, 1989). As rotas metabólicas modificadas pela deficiência de P incluem o fluxo de ácidos orgânicos, glicólise, respiração e metabolismo secundário (Vance *et al.*, 2003).

Neste estudo foram encontrados nove sequências com similaridades a genes associados com metabolismo (TABELA 20). Para dois destes genes, PiTr07 e PiTr33 não foi possível confirmar a expressão diferencial. Outras nove sequências com similaridade a genes associados a metabolismo, porém encontrados sob presença de Al, foram avaliados sob deficiência de P (TABELA 7), apenas AluTr48 não amplificou.

Entre as sequências associadas a metabolismo foram identificadas cinco relacionadas ao ciclo dos ácidos orgânicos, duas similares a succinato desidrogenase (PiTr03 e AluTr11). PiTr03 mostrou-se induzida em todos os tempos avaliados nos dois genótipos, no entanto Anahuac apresentou maior expressão nas 24 e 240 horas e Toropi as 120 horas após o início da deficiência de P (FIGURA 36). Enquanto AluTr11 só foi induzida em Toropi nas primeiras 24 horas de estresse, e em Anahuac houve aumento da indução com o prolongamento da deficiência de P, chegando a expressão 8 vezes maior que sob disponibilidade de P as 240 horas de estresse. Interessante ressaltar que maior expressão em Anahuac do que em Toropi também foi observada na sequência similar a succinil-CoA ligase (AluTr04) e na similar a piruvato descarboxilase (AluTr 26) em 240 horas (FIGURA 37). Por outro lado, a sequência similar a aconitase

hidratase (AluTr10) mostrou-se 9 vezes mais induzida em Toropi do que em Anahuac nas 120 horas de deficiência de P (FIGURA 39). Esses resultados sugerem que há aumento da expressão desses genes sob limitação de P, podendo resultar em maior secreção de ácidos orgânicos, no entanto este aumento não está associado à maior tolerância observada em Toropi, já que o aumento da expressão foi mais significativo para Anahuac, o genótipo sensível. No entanto, ao se considerar a maior capacidade de Toropi em manter os níveis de Pi livre na parte aérea em comparação ao Anahuac (FIGURA 14 a 18), é esperado que Anahuac secrete maior quantidade de ácidos orgânicos por necessitar de maior quantidade de P.

A identificação de apenas uma enzima do ciclo de ácidos orgânicos na biblioteca de deficiência de P poderia sugerir que a liberação e atuação dos ácidos orgânicos para a tolerância à deficiência de P em Toropi podem não ser cruciais. O fato dessas sequências obtidas na biblioteca de Al não terem sido obtidas na biblioteca sob limitação de P possivelmente se deve ao pequeno número de clones avaliados, em especial no caso de AluTr04 e AluTr26, onde o aumento de expressão foi bastante significativo também em Toropi. Além disso, a liberação de ácidos orgânicos em gramíneas é menos eficiente que em raízes de leguminosas, como um mecanismo de adaptação à deficiência de P (Dong *et al.*, 2004, Shen *et al.*, 2002), apesar de ser um dos principais mecanismos de tolerância ao Al. É interessante ressaltar que apesar do aumento da secreção de ácidos orgânicos ocorrer na tolerância ao Al em trigo (Ma *et al.*, 2000; Kochian *et al.*, 2004) aumento na expressão destes genes é pouco documentada. Há relatos de aumento na secreção de ácidos orgânicos sem alteração perceptível da expressão das enzimas do ciclo dos ácidos orgânicos (Xiao *et al.*, 2005), o que sugere a ocorrência também de regulação pós-transcricional.

A sequência similar a protoclorofilida redutase (PiTr16), apresentou maior quantidade de transcritos em Anahuac às 240 horas, não diferindo de Toropi nos demais

tempos (FIGURA 34). Protoclorofilida redutase é a enzima responsável por catalisar a redução de protoclorofilida para clorofilida, sendo a penúltima reação para biossíntese de clorofila, é dependente da luz e de NADPH (Oliver & Griffiths, 1980). Apesar de utilizar a luz como ‘substrato’ durante a catálise, a formação e acumulação da enzima em plantas é marcada pela ausência de luz ou redução de radiação; na condição de luz, há a redução dramática na quantidade da enzima (Teakle & Griffiths, 1993; Schoefs & Franck, 2003). Hipotetisa-se que o aumento da enzima protoclorofilida redutase seja devido à diminuição da atividade fotossintética pelo estresse à deficiência de P, pois há presença de NADPH que pode ser evidenciada a partir da análise de expressão do gene, *AluTr64* (NADP-isocitrato desidrogenase), que aparece em maior quantidade em todos os tempos analisados e com aumento contínuo, alcançando incrementos de 60 vezes (FIGURA 37).

N-miristoil transferase (*PiTr23*), em plantas, atua na modificação de proteínas pela adição de lipídios. É uma forma de modificação pós e cotranscricional em proteínas, ligando o ácido mirístico ao N-terminal de um resíduo de glicina da proteína, esta reação é chamada de N-miristoilação (Ishitani *et al.*, 2000). Em muitos casos essa modificação é essencial para a função da proteína mediando interações entre membranas ou mesmo entre proteínas (Jonhson *et al.*, 1994). N-miristoilação é conhecida por afetar uma série de famílias de proteínas, como as proteínas quinases cálcio dependente e fatores de ADP-ribosilação (ARFs), afetando rotas de transdução. Maior expressão de ARFs foi observada em aveia, sorgo e trigo submetidos ao estresse de Al (Boff, 2006; Limberger, 2005). Os níveis de ARFs afetam o crescimento radicular via auxinas (Zhuang, 2005), característica também alterada em resposta à deficiência de Pi. Entre os principais alvos da N-miristoil transferase encontram-se as quinases relacionadas a SNF1 (*SnRK1*), importantes na resposta a estresses (Pierre *et al.*, 2007). SNF1 foi identificada como atuante na aclimatação a deficiência de P, onde

ao atuar sobre o metabolismo de glicose gera acúmulo de amido e inibição do alongamento de raiz (Hernandez *et al.*, 2007). Em Toropi, a expressão desta sequência foi superior apenas nas 24 horas, sugerindo importância na resposta inicial a deficiência de P e talvez necessária à tolerância (FIGURA 36), sendo este um gene candidato a maiores estudos.

A enzima glicosiltransferase (PiTr25) faz parte de uma família multigênica que atua na glicosilação de moléculas e componentes celulares, em *arabidopsis* mais de 100 sequências gênicas de glicosiltransferases podem modificar metabólitos secundários (Li *et al.*, 2001). Reações de glicosilação estão envolvidas na biossíntese, modificação, transporte, e estocagem de metabólitos secundários, têm importante papel no transporte de monômeros de lignina do citosol até a parede celular, na inativação de hormônios e no metabolismo da biossíntese dos flavonóides (Wang & Hou, 2009). Esta sequência teve expressão similar em ambos os genótipos até as 120 horas, sendo um efeito do estresse. Possivelmente, seu aumento em Anahuac após este período está envolvido com o aumento do estresse (FIGURA 34).

A sequência similar a corismato sintase (AluTr16) apresentou aumento significativo de expressão em Toropi apenas nas primeiras 24 horas, enquanto em Anahuac houve acréscimo dos transcritos com o passar do tempo (FIGURA 39). Já a sequência similar a chalcona sintase (PiTr11) teve maior expressão em Toropi em todos os tempos (FIGURA 35). Essas duas enzimas fazem parte de importantes rotas do metabolismo secundário, a do chiquimato e dos flavonóides. Estas são rotas interligadas que atuam na formação de aminoácidos, lignina e em resposta a estresses de nutrientes como o P e o N (Scheible *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2004, Misson *et al.*, 2005, Morcuende *et al.*, 2007). A primeira enzima da rota do chiquimato (FIGURA 41), DAHPS, catalisa a reação de fosfoenolpiruvato (PEP), e eritrose-4-P, rendendo 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato e liberando Pi, sob deficiência de P esta é a primeira

fase de reciclagem do Pi. O gene que codifica DAHPS, respondeu a deficiência de P com um aumento de três vezes o nível dos transcritos em análises de microarranjo (Misson *et al.*, 2005; Morcuende *et al.*, 2007).

A enzima chiquimato quinase (SK) apresenta complexa regulação e expressão, possuindo quatro genes em arabis. Herrmann & Weaver (1999) afirmam que nesta etapa da rota estão envolvidas a regulação transcricional e pós-transcricional, o que explicaria a diminuição no número de transcritos para a corismato sintase (CS) ao passar do tempo para Toropi. Adicionalmente, a partir do corismato se inicia a rota dos aminoácidos aromáticos. O aumento da presença de aminoácidos como o triptofano, fenilalanina e tirosina inibe a expressão das enzimas da rota dos aminoácidos aromáticos refletindo na diminuição da presença da corismato sintase (Voll *et al.*, 2004).

Na tolerância ao Al, a corismato sintase pode estar envolvida na biossíntese de lignina, relatada em resposta ao estresse (Boff, 2006). Sasaki *et al.* (1996) sugere que a inibição do crescimento radicular em contato com Al tóxico está correlacionada com a deposição de lignina nas raízes, no entanto a peroxidação da lignina poderia ser um dreno de radicais livres (peróxidos) reduzindo parcialmente o estresse causado pelo Al. Na deficiência de P, aumento da lignina não tem sido observado (Lillo *et al.*, 2008), porém a síntese de corismato antecede a formação de outros metabólitos secundários que podem ser importantes na aclimatação, sugerido pela maior expressão da chalcona sintase (PiTr11) em Toropi. Chalcona sintase utiliza para formação de fenilpropanóides a mesma molécula utilizada para a síntese de lignina, a 4-coumaroil-CoA. Maiores quantidades de chalcona sintase conduziriam a um aumento nos flavonóides, moléculas protetoras contra a radiação UV, como antocianinas. Estudos de deficiência de P mostraram aumento de duas a três vezes na sua expressão (Misson *et al.*, 2005; Morcuende *et al.*, 2007).

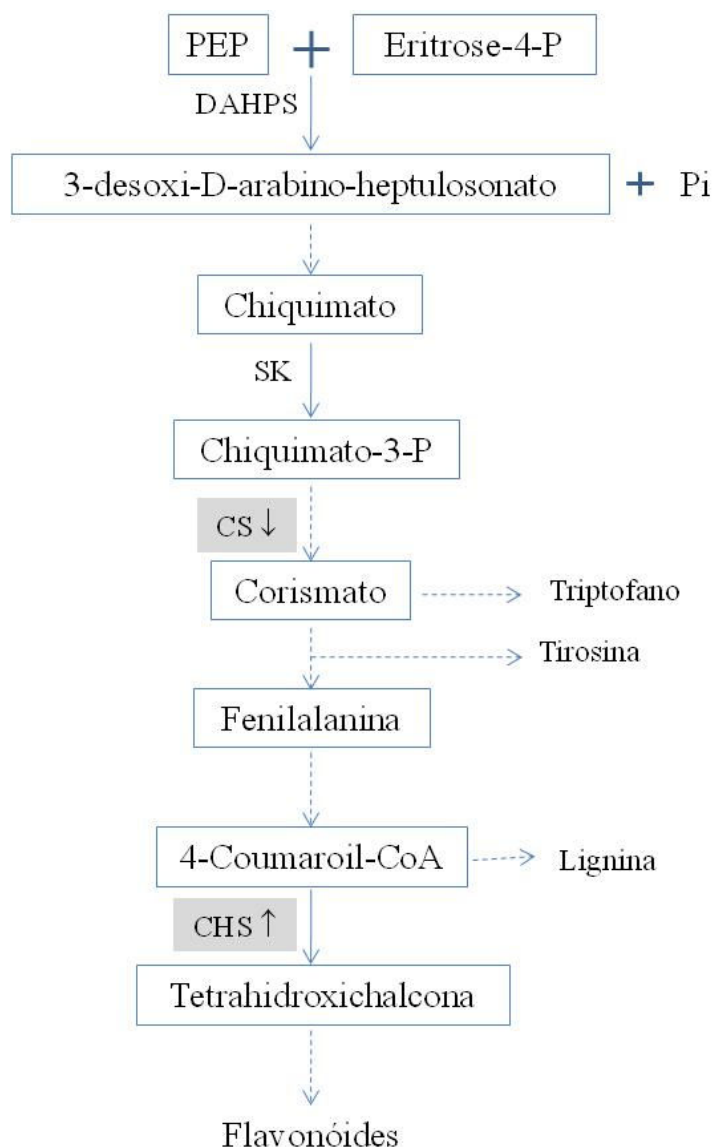


FIGURA 41. Esquema simplificado da rota do chiquimato e dos flavonóides em plantas (Adaptado de Lillo *et al.*, 2008). Caixas cinzas indicam as enzimas diferencialmente expressas para SSH, as setas pretas indicam a expressão do gene em Toropi com o prolongamento do estresse de P.

O aumento na acumulação de flavonóides em resposta a deficiência mineral pode ser causado por mudanças na estabilidade e degradação dos flavonóides como resultado do aumento da atividade de glicosilases (Scheible *et al.*, 2004, Morcuende *et al.*, 2007, Lillo *et al.*, 2008), como observado a presença de genes de glicosiltransferases (PiTr25) diferencialmente expressos para deficiência de P.

Em tecidos não fotossintetizantes como as raízes, a sacarose fosfato sintase atua na ressíntese da sacarose para exportação ou mesmo a partir de sacarose e/ou amido

degradados, onde é resintetizada para formar outros produtos (Geigenberger *et al.*, 1997). Atualmente é aceito que açúcares não são somente nutrientes essenciais, mas também atuam como sinal crítico regulando muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas (Yuan & Liu, 2008). Na deficiência de P, como revisado por Hammond & White (2008), o papel da sacarose nas raízes é bastante complexo, ela parece ser requerida na regulação da arquitetura das raízes, no aumento da indução da densidade das raízes laterais e na densidade e comprimento dos pelos radiculares, mas não está envolvida na inibição da raiz primária e na perda da atividade meristemática da raiz segundo demonstrado por Jain *et al.* (2007). Contrariamente, experimentos realizados por Mishra & Dubey (2008) em arroz com diferentes doses de Al, mostram que a atividade de sacarose fosfato sintase declinou significativamente com o aumento das doses de Al em todas as cultivares, sugerindo que a planta tende a acumular hexoses devido ao baixo *status* de fosforilação da glicose e/ou frutose e pelo aumento de enzimas degradadoras da sacarose. A sequência similar a sacarose-fosfato sintase (PiTr08) apresentou maior expressão em Toropi do que Anahuac nas 120 horas e foi similar nos demais tempos (FIGURA 36). Sacarose fosfato sintase é uma enzima da família das glicosiltransferases e atua na síntese da sacarose-6-P (UDP-glicose + D-frutose-6-P), a qual representa um ponto chave no controle da síntese da sacarose em plantas.

O vacúolo tem um grande papel na deficiência de P atuando como reserva prontamente disponível de Pi e auxiliando nas rotas de atalho do piruvato e fosfoenolpiruvato. Assim, maior atividade de ATPase indica maior utilização do vacúolo atuando na manutenção do pH do lúmen vacuolar ou no mecanismo tampão citoplasmático (Mimura *et al.*, 1990). O processo de mobilização de Pi vacuolar na deficiência de P provavelmente requer um transporte dependente de energia através do tonoplasto, apesar do transporte simporte $H^+/H_2PO_4^-$ ser termodinamicamente possível

(Schachtman *et al.*, 1998). A expressão da sequência similar a ATPase vacuolar subunidade E (AluTr06) foi superior em Toropi apenas nas 24 horas de estresse, após este período a expressão foi superior em Anahuac (FIGURA 39). Esses dados sugerem que Toropi responde mais rapidamente à deficiência de P que Anahuac, sendo a remobilização necessária apenas no início da deficiência. Em Anahuac a remobilização continua sendo requerida até as 240 horas.

A regulação e os sinais que atuam nas cascatas de transdução de sinais em respostas a deficiências nas plantas ainda estão em debate, mas é sabido que as plantas podem detectar o *status* de P no tecido e as variações locais de disponibilidade de P. López-Bucio *et al.* (2003) sugerem que Pi é percebido localmente e atua como sinal para controlar a formação de pelos e raízes laterais em resposta a deficiência de P. Em adição, estudos utilizando fosfito, uma forma reduzida de P não metabolizável, sugerem que Pi pode atuar diretamente como sinal e regular aspectos da resposta de deficiência de P, incluindo atividade do meristema radicular, acumulação de antocianina e desenvolvimento de pelos radiculares (McDonald *et al.*, 2001; Ticconi *et al.*, 2001, 2004). O fino balanço entre auxina, etileno, e citocinina, e mudanças na sensibilidade do tecido alvo podem estar envolvidos no controle sistêmico das respostas de deficiência de P (Abel *et al.*, 2002; López-Bucio *et al.*, 2002; Vance *et al.*, 2003; Hammond *et al.*, 2004; Franco-Zorrilla *et al.*, 2005). Além disso, carboidratos derivados da parte aérea, em particular a sacarose, podem estar envolvidos no controle sistêmico de respostas à deficiência de P, onde a sacarose não somente teria a função primária na composição de esqueletos de C, mas também como um sinal que altera a expressão gênica (Müller *et al.*, 2007; Yuan & Liu, 2008). Em outras palavras, genes inicialmente tidos unicamente como envolvidos no metabolismo primário estão cada vez mais sendo relacionados a processos regulatórios.

4.7.2 Estrutura e Desenvolvimento

Sabe-se que a deficiência de P altera o crescimento e desenvolvimento das plantas (Hammond *et al.*, 2004; Raghothama, 1999). Na categoria de estrutura e desenvolvimento, foram identificadas seis sequências.

Muitas das respostas à deficiência de P observada na morfologia das raízes são similares a aquelas causadas por auxina e etileno. Etileno tem sido implicado na estimulação do alongamento dos pelos radiculares e crescimento das raízes laterais sob deficiência de P. No entanto, análises do desenvolvimento das raízes em mutantes insensíveis ou resistentes a etileno têm revelado respostas para deficiência de P (López-Bucio *et al.*, 2002). ACC sintase é a enzima chave na síntese do etileno, atuando na formação de 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC), o qual é oxidado a etileno. A sequência similar a ACC sintase (PiTr04), apresentou elevado aumento na expressão durante os tempos analisados em Toropi, chegando a aumentos superiores a 20 vezes em resposta a deficiência de P, em Anahuac o incremento também foi significativo a exceção das 120 horas, onde não houve aumento da expressão (FIGURA 36). Esse aumento sugere importante papel do etileno na aclimatação à deficiência de P. Em diversos trabalhos o etileno tem sido relatado como envolvido na resposta ao P. O tratamento com inibidores de etileno nas raízes resultaram em raízes com falta de pelos radiculares e, o tratamento com ACC, promove a formação de pelos radiculares (Zhang *et al.*, 2003). Uma vez sentida a deficiência de P na rizosfera há o aumento da produção de etileno e a iniciação e alongamento dos pelos radiculares (Dolan, 2001). O aumento da proliferação de finos pelos radiculares aumenta em mais de 70% a área superficial das raízes favorecendo maior volume de solo a ser explorado (Zhang *et al.*, 2003). Entretanto, neste trabalho não foram verificadas alterações morfológicas em resposta à deficiência de P.

Interação entre nutrientes são comumente observadas e sugere a possibilidade de compartilhamento parcial ou *crossstalk* entre rotas de transdução de sinal nas respostas a deficiência de nutrientes (Schachtman & Schin, 2007). Mutantes de *arabidopsis* têm sido identificados com alterações tanto na resposta à deficiência de P como aos níveis de nitrogênio (Delatorre & Strieder, comunicação pessoal), indicando interação entre esses nutrientes. Neste sentido, foram identificadas, na biblioteca diferencial a deficiência de P, duas sequências similares a genes envolvidos no transporte de nitrogênio: uma similar ao transportador de amônio Amt1 (PiTr20) e outra ao transportador de nitrato de alta afinidade (PiTr21). Estas sequências apresentaram similar expressão entre os genótipos, a exceção das 240 horas quando em Anahuac houve superior expressão (FIGURA 34), portanto estes podem ser considerados efeitos do estresse e não envolvidos na tolerância.

Ainda considerando transportadores, os ABC fazem parte de uma superfamília com mais de 120 membros em *arabidopsis* e arroz, a maioria media o transporte através de membranas utilizando a hidrólise do Mg-ATP para energizar o processo (Rea, 2007). Uma das subfamílias de transportadores ABC localizados no vacúolo são os MPR, proteína associada à resistência a multidrogas, envolvida no processo de detoxificação (Martinoia *et al.*, 2007). Estudos com *arabidopsis* para os genes heterólogos para *MPR* indicaram contribuição na detoxificação celular, envolvimento no transporte vacuolar de catabólitos de clorofila e transporte vacuolar de ânions orgânicos, mudando o perfil fitoquímico do citosol e o perfil de exsudação da raiz na planta (Frelet-Barrand *et al.*, 2008). Uma sequência similar a um transportador ABC (PiTr26) apresentou significativo incremento no perfil de expressão apenas em Anahuac nas 240 horas (FIGURA 34). No caso específico da *AtMDR1*, esta está implicada no transporte de auxinas (Rea, 2007). Há indicações que para gerar as modificações arquitetônicas da raiz, durante a limitação de P, ocorram alterações no transporte de auxinas (López-

Bucio *et al.*, 2002), o que poderia justificar alterações na expressão do transportador, entretanto não justifica a grande diferença entre os genótipos, uma vez que não foram visualizadas diferenças morfológicas até as 120 horas. É possível, que o maior estresse causado, nas 240 horas, no genótipo sensível gere maior degradação ou produção de compostos secundários que requerem transferência para o vacúolo, induzindo a expressão deste. Já a maior capacidade de Toropi de manter os níveis de Pi talvez estabeleça menor nível de estresse.

As sequências (AlTr05), (AlTr08), (Alutr12) e (AlTr15) são similares a genes que codificam proteínas de membrana, enoil-ACP redutase, proteína quinesina de cadeia pesada e β -acetoacil-ACP sintase respectivamente. Estas proteínas estão envolvidas na síntese de lipídios. AlTr08 e AlTr12 apresentaram um aumento contínuo ao passar do tempo para ambos os genótipos com elevado incremento na comparação com a suficiência de P (FIGURA 37). AlTr08 aumentou quase 80 vezes o número de transcritos nas 240 horas de deficiência de P em relação a suficiência em Anahuac. Já AlTr05 e AlTr15 apresentaram maior expressão em Toropi nas primeiras 24 horas (FIGURAS 38 e 39). A deficiência de Pi induz drásticas mudanças na composição dos lipídios das membranas, incluindo a diminuição dos fosfolipídios e o aumento de sulfolipídios e galactolipídios em diversas espécies (Dörmann & Benning, 2002; Fang *et al.*, 2009). Assim alterações na expressão de genes envolvidos na síntese lipídica são justificáveis e seu aumento no início da deficiência, como foi observado em Toropi, pode liberar P para utilização em outros processos. Além disso, barreiras hidrofóbicas têm um papel central em muitos aspectos na biologia da planta incluindo a sensibilidade aos estresses bióticos e abióticos, camadas hidrofóbicas presentes na parede celular das plantas contêm polímeros de lipídios como cutina e suberina, que atuam como barreira controladora de movimentos dos gases, água e solutos, e em parte geram resistência a

patógenos (Pollard *et al.*, 2008). A diminuição das alterações lipídicas provocadas nas membranas sugere uma maior tolerância de Toropi em relação à Anahuac para a deficiência de P, não apenas pela atuação das fosfolipases, mas também a atuação de ROS na peroxidação de lipídios comum em estresses abióticos (Kochian *et al.*, 2005).

A sequência similar a actina (AlTr95) teve maior expressão em Toropi nas 120 e 240 horas de deficiência de P (FIGURA 38), ultrapassando 30 vezes a quantidade em Anahuac. A toxidez de Al causa perturbação na dinâmica do citoesqueleto, o que poderia afetar a expressão de actina. Essa perturbação é resultante do deslocamento de Ca^{2+} ligado as pectinas, ou mesmo da interferência direta do Al nos elementos do citoesqueleto via conexões estabelecidas pelas WAKs e outras proteínas com funções similares (Sivaguru *et al.*, 2000). Apenas recentemente foi observado efeito de P sobre genes de actina. Almeida (2007) estudando a expressão em tempo real de transportadores de Pi em cana-de-açúcar, observou que o gene de actina utilizado como controle endógeno apresentava variação em 2 vezes no seu perfil de expressão entre cultivares. Incrementos na expressão de genes de actina foram observados em genótipos tolerantes ao Al após 1 hora de exposição tanto em trigo (Boff, 2006) como em aveia (Limberger, 2006). A maior e mais rápida indução de genes de actina em genótipos tolerantes talvez permita entre outras coisas a manutenção da organização do transporte de vesículas e o crescimento da raiz. É possível que na deficiência de P, actina também desempenhe um papel na manutenção do crescimento da raiz.

4.7.3 Processamento de Informações

P não é somente constituinte de moléculas celulares chaves como ATP, ácidos nucléicos e fosfolipídios, mas também é o principal regulador em muitos processos. A limitação de P em plantas pode causar mudanças no processamento genético, como a indução de fatores de transcrição, alteração da tradução, ativação de proteínas

específicas modificando a replicação e o sistema de reparo (Rhagothama, 1999; Morcuende *et al.*, 2007). Usualmente, as funções dos genes envolvidos no processamento de informações referem-se a ativar ou reprimir a transcrição, tendo um importante papel na aclimação a condição de estresse. Na categoria de processamento de informações, foram classificadas 14 sequências da biblioteca de deficiência de P, mais de 42%.

Wu *et al.* (2003), utilizando a tecnologia de microarranjo para analisar os padrões de expressão de deficiência de P, encontraram mudanças na expressão de 1800 genes, dos quais mais de 100 eram fatores de transcrição ou proteínas sinalizadoras. Da mesma forma, Mission *et al.* (2005) identificaram 80 genes relacionados à regulação transcricional. De fato, genes envolvidos no processamento de informações são bastante abundantes para P.

Dentro desta categoria, as sequências similares a α -2-purotionina (PiTr06) e serina/treonina-fosfatase PP2A-1 subunidade catalítica (PiTr13) apresentaram maior quantidade de transcritos em Toropi comparados com Anahuac nos tempos 120 horas e, 24 e 120 horas respectivamente (FIGURAS 35 e 36). PiTr06 incrementou em mais de 25 vezes o número de transcritos em resposta a deficiência de P em Toropi, enquanto neste mesmo tempo Anahuac não apresentou indução. Tioninas são pequenos peptídeos ricos em cisteína envolvidos na defesa da planta tanto ao ataques de patógenos quanto a elementos tóxicos, algumas classes estão envolvidas com fosfolipídios de membrana e modificações redox em proteínas (Stec, 2006). Estas modificações redox, em diversos casos, ativam proteínas, tendo portanto, função regulatória. Numerosos estudos sugerem que a interação primária das tioninas está na mudança eletrostática dos fosfolipídios da membrana, a qual seria inibida por cátions divalentes como o Ca^{2+} e fosfatos (Florack & Stiekema, 1994; Hughes *et al.*, 2000). Assim, a ação de tioninas em resposta a

deficiência de P pode estar relacionada a modificações em fosfolipídios, na reciclagem de P da membrana ou ainda ser um importante componente de transdução de sinal. Serine/treonine fosfatases fazem parte da grande família de fosfatases responsáveis pela fosforilação reversível de proteínas, essenciais no mecanismo regulatório em vários processos celulares. Em geral, as células utilizam esta modificação pós-transcricional para alterar propriedades (atividade, localização) de proteínas chaves em rotas específicas (Farkas *et al.*, 2007).

Duas sequências interessantes são as que apresentaram similaridade aos fatores de transcrição WM29B MIKC-tipo MADS-box (PiTr10) e WRKY (PiTr09), ambas apresentaram elevado aumento na quantidade de transcritos em Toropi em 120 horas de deficiência de P (FIGURAS 35 e 36). No caso de PiTr09, em Anahuac a expressão não foi alterada pelas condições de P. Poucos fatores de transcrição são bem estudados na resposta e sinalização de deficiência de P, como o PHR1 em arabidopsis e arroz (Rubio *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2008). Este fator MYB foi até o momento o único identificado em arabidopsis, porém responde parcialmente pelas alterações que ocorrem sob deficiência de P. Em arroz foram identificados também OsPTF1, fator de transcrição bHLH (Yi *et al.*, 2005) e WRKY75 (Devaiah *et al.*, 2007). O fator de transcrição WRKY, foi fortemente induzido na deficiência de P e parece estar envolvido em muitos processos de regulação de estresses, tanto bióticos quanto abióticos (Devaiah *et al.*, 2007). A supressão da expressão de WRKY por RNAi em arabidopsis, causou aumento no acúmulo de P total e de antocianinas, no número de raízes laterais e pelos radiculares e inibiu o crescimento da raiz principal. Ele se apresenta como um regulador negativo no desenvolvimento da raiz, atuando como regulador positivo em resposta de estresse de P. No entanto, é estranho que em trigo o aumento de WRKY ocorra tão tardiamente, seria esperada uma resposta nas primeiras 24 horas. O fator de transcrição MIKC-tipo MADS-box, pertence a uma grande família de fatores de transcrição em plantas,

envolvidos no controle do florescimento, na identidade do meristema e órgão floral, no desenvolvimento embrionário e vegetativo de órgãos como raízes e parte aérea (Parenicová *et al.*, 2003). Estudo com trigo mostrou grande número de fatores do tipo MADS-box envolvidos no desenvolvimento floral e associados com estresses abióticos (Tardif *et al.*, 2007). Estas sequências, PiTr09 e PiTr10, especialmente devido à diferença de expressão entre os genótipos sensível e tolerante e a suposta função de fatores de transcrição, devem ser investigadas. Seria interessante avaliar suas expressões após exposição ao Al e em tempos intermediários entre 24 e 120 horas. A clonagem dos genes inteiros e sua superexpressão em arábido, por exemplo, poderia auxiliar na identificação do envolvimento destes na tolerância à deficiência de P.

Uma sequência similar a fator de transcrição com domínio básico *helix-loop-helix* identificada após exposição ao Al (AluTr13) apresentou pequena indução sob deficiência de P, no entanto Anahuac apresentou expressão superior a Toropi em 120 horas (FIGURA 38). Este fator de transcrição é semelhante ao *OsPTF1* de arroz, o qual tem sua expressão aumentada nas raízes na deficiência de P, mas é constitutivamente expresso na parte aérea (Yi *et al.*, 2005). Sua superexpressão em arroz afeta mais de 180 genes. Para maiores esclarecimentos sobre a expressão deste fator de transcrição, *PTF1*, esta foi analisada com iniciadores específicos em trigo (ver item 4.4).

Várias sequências similares a diversos tipos de quinases foram identificadas tanto na biblioteca obtida sob deficiência de P quanto sob exposição ao Al. As expressões destas sob deficiência de P mostraram-se bastante variáveis. As sequências oriundas da biblioteca de Al, proteína quinase OSK (AluTr14) e proteína quinase BKIN12 (AluTr45) apresentaram expressão significativamente induzida pela deficiência de P em 24 horas seguida de uma diminuição dos transcritos em Toropi ao passar do tempo praticamente não diferindo da suficiência de P em 240 horas

(FIGURAS 37 e 39). Em Anahuac houve incremento na expressão nas 240 horas de deficiência. AluTr45 também seria uma candidata a envolvimento com a tolerância.

Já as sequências similares a proteína quinase serina/treonina (AluTr42) e caseína quinase II α (AluTr17), mostraram, em Toropi, aumento considerável nos tempos 120 e 240 horas (mais de 40 vezes em relação a suficiência de P) (FIGURA 40). Enquanto a sequência similar a quinase R (PiTr24), apresentou maior número de transcritos em Anahuac, especialmente 120 horas após o início da deficiência (FIGURA 34).

A percepção de sinais através de receptores da superfície celular é um mecanismo comum entre os organismos vivos. Proteínas quinases possuem um papel fundamental em uma grande variedade de processos celulares resultando em crescimento e desenvolvimento em plantas e animais. Todas as proteínas quinases catalisam a mesma reação química: a fosforilação de um ou mais substratos através da transferência do grupamento γ -fosfato do ATP para um grupamento hidroxila na proteína substrato. Em muitos casos esta função é realizada por receptores quinases, os quais são divididos em duas grandes classes apresentando diferentes especificidades em seus domínios quinases: receptor tirosina-quinases que fosforila proteínas em específicos resíduos de tirosina e, receptores serina/treonina-quinases que fosforilam serina ou treonina, encontradas mais comumente em plantas, ou em alguns casos podem fosforilar ambos resíduos de aminoácidos. Estas duas grandes famílias apresentam uma origem comum anterior à diversificação dos organismos vivos em animais e plantas (Shiu & Bleeker, 2001).

Considerando as sequências similares a quinase identificados na biblioteca sob deficiência de P (FIGURA 20), aquela similar a quinase 1 associada a parede (PiTr22) apresentou pouco incremento no número de transcritos. Entre as várias famílias de proteínas quinases, as denominadas WAK (quinases associadas a parede), abundantes

em plantas, atuam na conexão entre a parede celular e a membrana plasmática, ligando-se ao ácido poligalacturônico por meio de formação de pontes de Ca^{2+} . O gene WAK1 se expressa em resposta a ferimentos ou infecção de patógenos, o que sugere que WAK, localizada na zona de alongamento celular, atua na percepção e transferência de estímulos externos ao citoplasma, como modificações na pectina, por meio de receptor do tipo serina/treonina quinase (Decreux & Messiaen, 2005). Sivaguru *et al.* (2003) observaram que a exposição de plântulas de *Arabidopsis* ao Al em pH 4, durante 12h, resultou numa rápida inibição do crescimento radicular, e houve uma rápida indução de WAKs, cuja função não está esclarecida. Segundo Baluska *et al.* (2003), a expressão em plantas transgênicas revelou a essencialidade das WAKs no alongamento celular. A expressão diferencial de genes WAK em resposta a deficiência de P, sugere que, como encontrado em Al por Limberger (2006) em aveia, esses genes estariam envolvidos em ambos os estresses, interferindo no desenvolvimento das raízes como resposta da planta as condições da presença do Al tóxico e a deficiência de P. No entanto, salienta-se que a indução foi marcante apenas nas 24 horas iniciais de exposição (FIGURA 35).

Como já citado anteriormente observou-se aumento na expressão de PiTr23, suposta N-miristoil transferase, a qual atua sobre fator de ribosilação ADP, pois uma sequência (AluTr02) similar a este fator também teve sua expressão aumentada significativamente sob limitação de P (FIGURA 39). A deficiência tende a aumentar os transcritos desta sequência em Toropi ao passar do tempo, alcançando incrementos superiores a 20 vezes, mas inicialmente, nas 24 e 120 horas, Anahuac tem maior número de transcritos. Fatores de ribosilação ADP são conhecidos também como ARFs, são pequenas GTPases e estão envolvidos na regulação do tráfego endocítico de membranas em plantas, auxiliando na proliferação celular, citoesqueleto e organização, tráfego intracelular de membranas, estão presentes no retículo endoplasmático para o transporte de vesículas peroxissomais e degradação de peroxissomos (Ma, 2007).

Recentemente, Amenós *et al.* (2009) sugeriram que ARFs estariam envolvidas na reciclagem de proteínas PIN relacionadas a sinalização de auxinas, tendo um papel central no transporte polar da auxina, induzindo a inibição do alongamento radicular. Xu & Scheres (2005) trabalhando com mutantes de ARFs em *arabidopsis* evidenciaram mudanças na polaridade apical-basal afetando a posição de crescimento dos pelos radiculares, sugerindo que proteínas PIN são sítios de ação de ARFs durante o crescimento e localização dos pelos radiculares. Limberger (2006), em estudo de expressão diferencial em resposta a Al em aveia, identificou ARFs em resposta ao estresse. Isso sugere forte interação de ARFs no direcionamento e interferências no crescimento radicular para os estresses tanto de Al como na deficiência de P, como na regulação de fosfolipídios, reconstituindo a membrana plasmática, alvos importantes do Al e das fosfolipases. A maior expressão inicial no genótipo sensível, Anahuac, gera dúvidas quanto ao papel das ARFs na tolerância a estes estresses.

O aumento extremamente alto (superior a 80 vezes) da expressão de sequência similar a DNA polimerase subunidade catalítica α (AlTr59) é intrigante considerando que não foi observado aumento no crescimento da raiz (FIGURA 39). No entanto, a exposição ao Al causa redução do crescimento do ápice da raiz, e essa sequência foi identificada como induzida nestas condições em Toropi.

Aumento da expressão da sequência similar a γ -glutamilcisteina sintetase (AluTr67), em ambos os genótipos foi observada de forma marcante e com significativo aumento dos transcritos ao passar do tempo (FIGURA 37). Em decorrência do aumento muito em ambos os genótipos e superior em Anahuac, pode-se concluir que esta sequência, apesar da elevada indução, não tem efeito sobre a tolerância à deficiência de P, possivelmente sendo mais um efeito do estresse do que uma resposta.

Juntando o que foi observado, pode-se sugerir que os mecanismos de resposta à deficiência de P envolvem parcialmente a atuação dos ácidos orgânicos, pois ocorre aumento significativo dos genes envolvidos na rota dos ácidos orgânicos, o aumento da expressão é mais significativo para Anahuac, o genótipo sensível, possivelmente por este requerer mais P que Toropi para manter os níveis de Pi livre na parte aérea. A deficiência de P induziu maior proteção contra a radiação e Toropi apresentou menor magnitude nas alterações lipídicas provocadas nas membranas, sugerindo menor ação de fosfolipases, e melhor controle de EROs, causadores de peroxidação de lipídios em estresses como o Al. Houve indução de genes relacionados a fitohormônios e transportadores indicando alterações de alocação. Toropi apresentou maior capacidade de manter os níveis de Pi livre na parte aérea, e por consequência manteve por menor período necessidade de aumentar a indução de transportadores vacuolares. A maior e mais rápida indução de genes de actina em Toropi talvez permita entre outras coisas a manutenção da organização do transporte e secreção e o crescimento da raiz, sendo possível que na deficiência de P e na tolerância ao Al, actina desempenhe um papel na manutenção do crescimento da raiz. As sequências relacionadas ao processamento de informações formaram a maior categoria obtida pelo método diferencial, mais de 42%, do total de sequências obtidas, isto sugere a ativação de uma rede de transdução de sinais, de ativações pós-transcricionais e de genes muito complexa para a deficiência de P, bem como para a tolerância ao Al. Fatores de transcrição, como do tipo bHLH, WRKY e MADSbox, foram induzidos. ARFs, também já identificadas no estresse ao Al, sugerem forte interação no direcionamento e no crescimento radicular para os estresses tanto de Al como de deficiência de P.

Convém lembrar que as esperanças encontradas para as sequências da biblioteca de deficiência de P, por ter sido comparado apenas o banco de proteínas de trigo, foram bastante elevadas, o que torna a discussão muito mais exploratória do que

coclusiva. A comparação das sequências com bancos de proteínas de outras espécies pode auxiliar a estabelecer as funções, no entanto a manipulação destas sequências, via silenciamento, por exemplo, seria a forma de confirmar as funções. Entretanto transformação em cereais é um processo ainda considerado pouco eficiente, o que dificulta a avaliação de um número significativo de sequências.

4.8 Expressão de genes relacionados à P e ao Al

Em geral, respostas a estresses, como a deficiência de P, são controladas por uma ou mais rotas de transdução de sinais, dependendo da extensão e magnitude do estresse. Os fatores de transcrição são os principais participantes nessas rotas, e podem afetar a expressão de uma série de genes. Além disso, quando se busca identificar genes para transferência e melhoria da característica em outras espécies, os fatores de transcrição são os mais propensos a gerar efeitos significativos. Assim, o fator de transcrição *PTF1*, que afeta vários genes em arroz, teve sua expressão analisada em raízes de trigo (FIGURA 42).

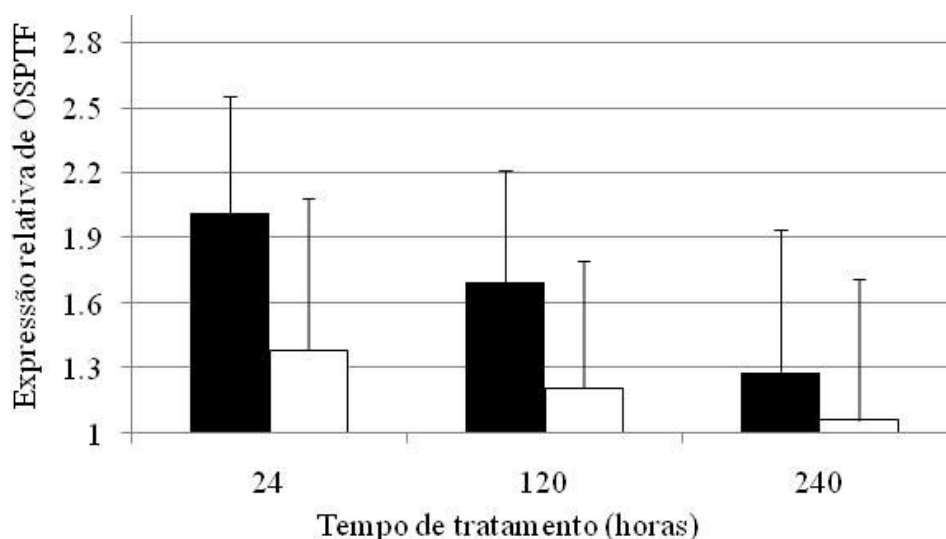


FIGURA 42. Expressão relativa temporal do gene *PTF1* em raízes de trigo genótipos Toropi (barras pretas) e Anahuac (barras brancas) depois de 24, 120 e 240 horas da deficiência de P, em relação à suficiência.

Os iniciadores desenhados a partir de *OsPTF1* foram capazes de amplificar em trigo. A expressão relativa foi sempre maior em deficiência de P, porém pouco expressiva. Ambos os genótipos reduziram a expressão ao passar do tempo. Às 240 horas Toropi mostrou uma expressão 40% menor que nas 24 horas, enquanto Anahuac mostrou somente 25% da resposta inicial (FIGURA 42). Em arroz, este gene foi identificado via SSH após dez dias (240 horas) de limitação de P.

A secreção de ácidos orgânicos tem sido referida como o principal mecanismo para a tolerância ao Al e também para a tolerância a baixo P em várias espécies (Kochian *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009). *TaALMT1* foi o primeiro gene identificado para a tolerância ao Al em plantas e codifica um transportador de malato ativado por Al (Sasaki *et al.*, 2004). Ele é expresso constitutivamente na raiz em linhagens de trigo tolerantes ao Al; porém não existe nenhuma informação sobre seu papel na deficiência de P na ausência de Al. Quando Toropi e Anahuac são comparados em relação à expressão de *TaALMT1* comportamentos diferentes são observados (FIGURA 43). Às 24 horas de deficiência de P, ambos os genótipos aumentaram a expressão do gene *TaALMT1* em comparação com a presença de P, sendo que em Anahuac foi quase 6 vezes em relação a suficiência de P. Às 120 horas, Toropi mostrou pequena variação e Anahuac não diferiu das 24 horas. Passadas 240 horas, Toropi mostrou uma expressão mais de 8 vezes superior a Anahuac, e 30 vezes superior a observada na suficiência de P. Isto sugere que apesar de expresso constitutivamente *TaALMT1* pode ter sua expressão alterada após um tempo maior de exposição ao estresse em genótipos tolerantes. Seria interessante avaliar a atividade deste transportador em resposta a deficiência de P, sugere-se que sua atividade seja regulada pela presença de Al, mas nenhum estudo foi conduzido avaliando a ativação sob diferentes doses de P na ausência de Al.

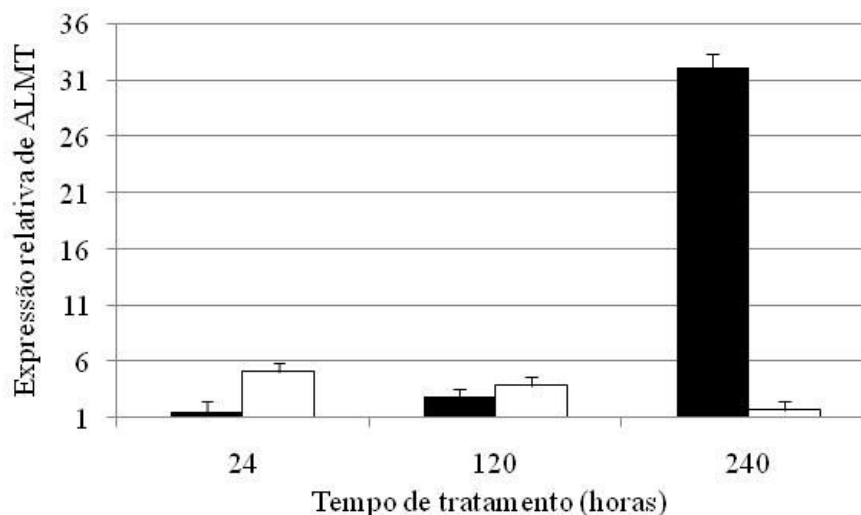


FIGURA 43. Expressão relativa temporal do gene *TaALMT1* em raízes de trigo genótipos Toropi (barras pretas) e Anahuac (barras brancas) depois de 24, 120 and 240 horas da deficiência de P (P não adicionado), em relação a suficiência (1000 μ M).

A importância da secreção de malato para a tolerância ao baixo P em Toropi e, como ALMT1 é ativado na ausência de Al são aspectos que devem ser mais explorados. Como discutido anteriormente, em hidroponia onde o P é adicionado na forma inorgânica e o pH é mantido próximo de 6, a secreção de ácidos orgânicos não tem muita importância na tolerância, porém no solo pode ser fator decisivo para aumento da capacidade de extração e absorção de P.

Recentemente, outro fator de transcrição, STOP1, foi identificado, estando envolvido na tolerância ao Al e a baixo pH em *Arabidopsis thaliana*, STOP é requerido para a expressão de *AtALMT1* (Iuchi *et al.*, 2007). A identificação de fatores similares em trigo pode ajudar a entender as interações entre tolerância ao baixo P e Al.

A comparação de mecanismos de aclimação da cv. Toropi, quanto à deficiência de P e Al tóxico, sugere que Toropi utilize mais de um mecanismo para escapar da limitação de P e da toxidez de Al. Por possuir um sistema radicular extenso e ramificado que permite maior exploração do solo e acesso ao Pi, na condição de deficiência, Toropi aumenta a expressão de transportador de malato que uma vez

ativado permite a liberação do P quelado, tornando-o disponível e atuando na detoxificação do Al. Além disso, Toropi é capaz de controlar e sustentar o conteúdo de Pi livre na parte aérea sob condições variáveis de disponibilidade de P, diminuindo o estresse causado pelo Al em solos ácidos. Esta habilidade pode ser crucial para manter o metabolismo estável sob diversas situações conduzindo para a tolerância e estabilidade na produção.

O elevado número de sequências, 84%, da biblioteca subtrativa sob exposição ao Al, que apresentou indução de expressão em condições de deficiência de P, corrobora a hipótese inicial deste trabalho. Há um considerado número de genes induzidos pela presença do Al que também são induzidos pela limitação de P. A avaliação da situação oposta, apesar de mais complicada tecnicamente, uma vez que permitir suficiência de P na presença de Al tóxico é paradoxal, seria bastante elucidativa. Supomos que parte da tolerância de Toropi ao Al se deva a maior tolerância à deficiência de P.

Há, portanto, rotas bioquímicas compartilhadas no desenvolvimento das respostas aos dois estresses. Um passo futuro será a identificação da importância das sequências aqui avaliadas para o estabelecimento da tolerância. Supõe-se que as sequências com elevada indução e com comportamento marcadamente diferente entre os genótipos sejam as mais promissoras, em especial os fatores de transcrição.

5 CONCLUSÕES

A tolerância à deficiência de P em Toropi se deve também a capacidade de manter as concentrações de Pi na parte aérea estáveis. Sugere-se um forte controle sobre o conteúdo de Pi livre na parte aérea, que é parcialmente independente da disponibilidade de Pi na solução. A cultivar Anahuac é mais responsiva, no entanto torna-se menos eficiente em baixas disponibilidades de P, enquanto Toropi tolera redução na disponibilidade mantendo a concentração de Pi livre na parte aérea mais estável.

O caráter tolerância a deficiência de P é poligênico na população de linhagens F6 do cruzamento Toropi X Anahuac, enquanto o caráter tolerância ao Al é controlado por um gene maior e modificado por genes de menor efeito. Existem QTLs relacionados à tolerância à deficiência de P, identificados pelas diferenças entre os genótipos para os parâmetros de concentração de Pi livre para parte aérea a 10 e 1000 μ M, e para raiz, em 1000 μ M de P na solução e pela razão da concentração de Pi livre entre baixa e alta disponibilidade de P para raiz e parte aérea. QTLs para tolerância ao Al localizados no cromossomo 4D reforçam-no como o maior lóco identificado para esta característica. QTLs para os dois caracteres, tolerância a Al e P, colocalizam sugerindo a possibilidade de genes comuns, aumentando a importância da região identificada no cromossomo 4D.

Toropi apresenta comportamento diferenciado em relação à atividade de catalase sob condições de deficiência de P, no entanto não é possível afirmar que essa diferença

também compoem o mecanismo da tolerância, podendo representar apenas uma consequência da tolerância.

O método SSH é adequado para obtenção de sequências gênicas induzidas em resposta à deficiência de P. Cerca de 70% das sequências obtidas foram validadas em PCR em tempo real, confirmando a maior expressão nas condições de ausência de P para Toropi.

A resposta a deficiência de P e a resposta ao Al tóxico em trigo decorrem, pelo menos parcialmente, da indução de mesmas rotas. Este compartilhamento é evidenciado pela indução por deficiência de P de 85% das sequências AlTr, obtidas a partir da exposição ao Al. Se os mecanismos de tolerância também são compartilhados, é uma questão que permanece. Um passo futuro será a identificação da importância das sequências aqui avaliadas para o estabelecimento da tolerância. Supõe-se que as sequências com elevada indução e com comportamento marcadamente diferente entre os genótipos sejam as mais promissoras, em especial os fatores de transcrição.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, S. *et al.* Phosphate sensing in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 115, n. 1, p. 1-8, 2002.

ABICHEQUER, A. D. *et al.* Phosphorus uptake, translocation and utilization in wheat varieties under aluminum toxicity. **Revista Brasileira De Ciência Do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 2, p. 373-378, 2003.

ALMEIDA, R.S. **Perfil fisiológico e da expressão de transportadores de fosfato da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) durante a simbiose com micorriza arbuscular.** 2007. 187 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ALTSCHUL, S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 215, 403-410, 1990.

AMENÓS, M. *et al.* Different effects of aluminium on the actin cytoskeleton and brefeldin A- sensitive vesicle recycling in root apex cells of two maize varieties differing on root elongation rate and aluminium tolerance. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 50, n. 3, p. 528-540, 2009.

AMES, B. N. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 8, p. 115-118, 1966.

AONO, T. *et al.* The response of the phosphate uptake system and the organic acid exudation system to phosphate starvation in *Sesbania rostrata*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 42, n. 11, p. 1253-1264, 2001.

AZEVEDO, R. A. *et al.* Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 280-292, 1998.

BALIGAR, V.C.; FAGERIA, N.K. Plant nutrient efficiency: towards the second paradigm. In: SIQUEIRA, J.O. *et al.* **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas.** Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, 1999. 819 p.

BALUSKA, F. *et al.* Polar transport of auxin: carrier-mediated flux across the plasma membrane or neurotransmitter-like secretion? **Trends in Cell Biology**, London, v. 13, n. 6, p. 282-285, 2003.

BATTEN, G. D. A review of phosphorus efficiency in wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 146, n. 1-2, p. 163-168, 1992.

BEAUCHAM, C; FRIDOVIC, I. Superoxide dismutase - improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 44, n. 1, p. 276-279, 1971.

BEN, J. R.; DECHEN, A.R. Comportamento de genótipos de trigo em relação a P no solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.20, edição especial, p.77-82, 1996.

BENNET, R.J. et al. The primary site of aluminium injury in the root of *Zea mays* L. **South African Journal of Plant and Soil**, Boordfontein, v. 2, p. 8-17, 1984.

BIOEDIT. Software livre de alinhamento e análises de sequências. Disponível em: <www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>. Acesso em: nov de 2007.

BLAMEY, F. P. C. et al. Effects of aluminum, OH-AL and P-AL molar ratios, and ionic-strength on soybean root elongation in solution culture. **Soil Science**, Baltimore, v. 136, n. 4, p. 197-207, 1983.

BOFF, T. **Tolerância ao alumínio em trigo: identificação e caracterização molecular de genes**. 2006. 184 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

BOWLER, C. *et al.* Superoxide-dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 83-116, 1992.

BOWLER, C. *et al.* Superoxide-dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 13, n.3, p. 199-218, 1994.

BRACALE, G. **O trigo nacional**. In: FÓRUM NACIONAL DO TRIGO. Carazinho, 2006. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/transferecia/forum_trigo2006/CONAB_mai2006.pdf> Acesso em: 25 nov 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminium on net efflux of nitrate and potassium from root tips of soybean (*Glycine max* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 138, p. 400-403, 1991.

CAMARGO C.E.O.; OLIVEIRA, O.F. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva e no solo. **Bragantia**, Campinas, v.40, n. 3, p. 21-31, 1981.

CAMARGO, C.E.de O.; FELÍCIO, J.C. Trigo, triticale e centeio: avaliação da eficiência ao fósforo e tolerância à toxicidade ao alumínio. **Bragantia**, Campinas, v.46, n.2, p. 203-215, 1987.

CAO, W.D. *et al.* Identification and interaction analysis of QTL for phosphorus use efficiency in wheat. **Plant Nutrition and Fertilizer Science**, Beijing, v.7, n.3, p. 285-292, 2001.

CHEN, J. *et al.* Identification of QTLs for phosphorus utilization efficiency in maize (*Zea mays* L.) across P levels. **Euphytica**, Dordrecht, v. 167, p. 245-252, 2009.

CHEN, Y. F. *et al.* Membrane transporters for nitrogen, phosphate and potassium uptake in plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, Oxon, v. 50, n. 7, p. 835-848, 2008.

CLARKSON, D. T. Effect of aluminum on the uptake and metabolism of phosphorus by barley seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, n. 41, p. 167-172, 1966.

CLARKSON, D. T. Interactions between aluminium and phosphorus on root surfaces and cell wall material. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 27, n. 3, p. 347-356, 1967.

COMMON, R.H. The phytic acid content of some poultry feeding stuffs. **The Analyst**, Cambridge, v. 65, n.767, p. 79-83, 1940.

COSTA, C.T. *et al.* **A hidroponia na avaliação de cereais de inverno quanto à tolerância ao alumínio tóxico**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. (Documentos on line, 95). Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do95_5.htm. Acesso em: 13 de fev 2009.

CUNHA, G.R. *et al.* Bioclimatologia de trigos sul-brasileiros. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v.5, n.2, p.195-198, 1997.

CURTIN, D.; SMILLIE, G. W. Soil solution composition as affected by liming and incubation. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 47, n. 4, p. 701-707, 1983.

DA SILVA, A. A. *et al.* Differentiation in hydroponic solution of wheat genotypes in relation to tolerance to phosphorus starvation. **Revista Brasileira De Ciência Do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 5, p. 1949-1958, 2008.

DAT, J. *et al.* Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 57, n. 5, p. 779-795, 2000.

DAT, J. F. *et al.* Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 4, p. 1351-1357, 1998.

DAVID, M. B.; DRISCOLL, C. T. Aluminum speciation and equilibria in soil solutions of a haplorthod in the Adirondack Mountains (New-York, USA). **Geoderma**, Amsterdam, v. 33, n. 4, p. 297-318, 1984.

DECREUX, A; MESSIAEN, J. Wall-associated kinase WAK1 interacts cell wall pectins in a calcium-induced conformation. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 46, n.2, p. 268-278, 2005.

DELATORRE, C. A. *et al.* *Arabidopsis pdr2* reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, n. 6, p. 801-814, 2004.

DELHAIZE, E. *et al.* Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) .1. Uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, n. 3, p. 685-693, 1993.

DEVAIAH, B.N. *et al.* WRKY75 Transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, n.4, p. 1789-1801, 2007.

DEVINE, T. E. *et al.* Development of alfalfa strains with differential tolerance to aluminum toxicity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 44, n. 1, p. 73-79, 1976.

DIATCHENKO, L, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 12, p. 6025-6030, 1996.

DOLAN, L. The role of ethylene in root hair growth in *Arabidopsis*. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science - Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung und Bodenkunde**, Berlin, v. 164, n. 2, p. 141-145, 2001.

DONG, D.F. *et al.* Organic acid exudation induced by phosphorus deficiency and/or aluminium toxicity in two contrasting soybean genotypes. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 122, p. 190-199, 2004.

DÖRMANN, P.; BENNING, C. Galactolipids rule in seed plants. **Trends in Plant Science**, London, v.7, p. 112-118, 2002.

DORNELLES, C.A.L. **O uso da cultura de tecidos na geração de variabilidade para a tolerância à toxicidade do alumínio e sensibilidade ao ácido giberélico em trigo (*Triticum aestivum* L.)**. 1994. 102 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.

DÜFF, S. M. G. *et al.* Phosphate starvation inducible bypasses of adenylate and phosphate dependent glycolytic-enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 90, n. 4, p. 1275-1278, 1989.

DUSSAULT, A. A.; POULIOT, M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. **Biological Procedures Online**, New York, v. 8, n.1, p. 1-10, 2006.

DVORAK, J. *et al.* The structure of the *Aegilops tauschii* gene pool and the evolution of hexaploid wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, n. 4, p. 657-670, 1998a.

DVORAK, J. Genome analysis in the *Triticum-Aegilops* alliance. In: SLINKARD, A.E. **Wheat Genetics Symposium, University of Saskatchewan**. Canada: University Extension Press, vol. 1, p. 8-11, 1998b.

EMBRAPA - CNPT. Centro Nacional de Pesquisa de Trigo. **Cultura do trigo**. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/index.htm>>. Acesso em: 07 dez. 2008.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Phosphorus-use efficiency in wheat genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 22, n. 2, p. 331-340, 1999.

FANG, Z. Y. *et al.* Phosphate signaling in *Arabidopsis* and *Oryza sativa*. **Plant Science**, Clare, v. 176, n. 2, p. 170-180, 2009.

FAOStat. Base de dados estatísticos da agricultura mundial. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 20 jan. 2009.

FARKAS, I. *et al.* Arabidopsis PPP family of serine/threonine phosphatases. **Trends in Plant Science**, London, v. 12, n. 4, p. 169-173, 2007.

FIALOVÁ, S.; DOBREMYSLOVÁ, M. The activity of citalase and phosphatase in wheat when controlling the growth rate. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 4, n. 3, p. 182-190, 1962.

FLORACK, D. E.; STIEKEMA, W.J. Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 26, n.1, p. 25-37, 1994.

FOY, C. D. Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 19, n. 7-12, p. 959-987, 1988.

FOYER, C. H. *et al.* Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, n. 2, p. 241-254, 1997.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 119, n. 3, p. 355-364, 2003.

FRANCO-ZORRILLA, J. M. *et al.* The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 396, p. 285-293, 2004.

FRELET-BARRAND, A. *et al.* Comparative mutant analysis of Arabidopsis ABCC-type ABC transporters: AtMRP2 contributes to detoxification, vacuolar organic anion transport and chlorophyll degradation. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v.49, n.2, p. 557-569, 2008.

FUJII, H. *et al.* A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. **Current Biology**, Cambridge, v. 15, n. 22, p. 2038-2043, 2005.

FUKUDA, T. *et al.* Metabolic alterations proposed by proteome in rice roots grown under low P and high Al concentration under low pH. **Plant Science**, Clare, v. 172, n. 6, p. 1157-1165, 2007.

FURIHATA, T. *et al.* Kinetic characterization of 2 phosphate-uptake systems with different affinities in suspension-cultured *Catharanthus roseus* protoplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 33, n. 8, p. 1151-1157, 1992.

FURUKAWA, J. *et al.* An aluminium activated citrate transporter in barley. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v.48, n. 8, p. 1081-1091, 2007.

GAHOONIA, T. S. *et al.* Phosphorus (P) acquisition of cereal cultivars in the field at three levels of P fertilization. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 211, n. 2, p. 269-281, 1999.

GAPPER, C.; DOLAN, L. Control of plant development by reactive oxygen species. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, n. 2, p. 341-345, 2006.

GEIGENBERGER, P. *et al.* Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. **Planta**, New York, v. 201, n.4, p. 502-518, 1997.

GESSA, C. E. *et al.* Effect of aluminium and pH on the mobility of phosphate through a soil-root interface model. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 272, n. 1-2, p. 301-311, 2005.

GILL, B.S.; FRIEBE, B. **Cytogenetics**, phylogeny and evolution of cultivated wheats. In: **FAO: BREAD WHEAT**. Roma: FAO, 2002 (FAO Plant Production and Protection Series, n° 30), Roma, 2002.

GONZALEZ, E. *et al.* PHOSPHATE TRANSPORTER TRAFFIC FACILITATOR1 is a plant-specific SEC12-related protein that enables the endoplasmic reticulum exit of a high-affinity phosphate transporter in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 12, p. 3500-3512, 2005.

GOURLEY, C. J. P. *et al.* Defining phosphorus efficiency in plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 156, p. 289-292, 1993.

GOURLEY, C. J. P. *et al.* Plant nutrient efficiency - a comparison of definitions and suggested improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 158, n. 1, p. 29-37, 1994.

GRAINGENES. A database for Triticeae e *Avena*. Disponível em: <<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>>. Acesso em: nov 2007.

GREGORY, P.J. Roots and the Physico-Chemical Environment. In: **PLANT ROOTS: GROWTH, ACTIVITY AND INTERACTIONS WITH THE SOIL**. Oxford: Blackwell Publishing. 2006. p. 131 -170.

GUNES, A. *et al.* Effect of arsenic-phosphorus interaction on arsenic-induced oxidative stress in chickpea plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 314, p. 211-220, 2009.

GUNES, A. *et al.* Silicon-mediated changes of some physiological and enzymatic parameters symptomatic for oxidative stress in spinach and tomato grown in sodic-B toxic soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 290, p. 103-114, 2007.

GUO, P. *et al.* Transcriptional analysis between two wheat near-isogenis lines contrasting in aluminium tolerance under aluminium stress. **Molecular Genetics and Genomics**, Heidelberg, v. 277, n.1, p. 1-12, 2007.

GUO, W. B. *et al.* Identification of temporally and spatially phosphate-starvation responsive genes in Glycine max. **Plant Science**, Clare, v. 175, n. 4, p. 574-584, 2008.

GUPTA, P.K. *et al.* Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 105, p. 413-422, 2002.

GUTTIERI, M. *et al.* Identification and characterization of a low phytic acid wheat. **Crop Science**, Madison, v. 44, n.2, p. 418-424, 2004.

HAMBURGER, D. *et al.* Identification and characterization of the Arabidopsis PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 4, p. 889-902, 2002.

HAMMOND, J. P. *et al.* Genetic responses to phosphorus deficiency. **Annals of Botany**, Oxford, v. 94, n. 3, p.323-332, 2004.

HAMMOND, J. P.; WHITE, P. J. Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.59, n. 1, p.93-109, 2008.

HERNÁNDEZ, G. *et al.* Phosphorus Stress in Common Bean: Root Transcript and Metabolic Responses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 144, p. 752-767, 2007.

HERRMANN, K.M.; WEAVER, L.M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 473-503, 1999.

HEUN, M. *et al.* Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. **Science**, New York, v. 278, n. 5341, p. 1312-1314, 1997.

HORST, W. J. *et al.* Genotypic differences in phosphorus efficiency of wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 156, p. 293-296, 1993.

HUANG, J. W. W. *et al.* Aluminum interactions with voltage-dependent calcium transport in plasma membrane vesicles isolated from roots of aluminum-sensitive and -resistant wheat cultivars. **Plant Physiology**, Rockville, v. 110, n. 2, p. 561-569, 1996.

HUGHES, P. *et al.* The cytotoxic plant protein, beta-purothionin, forms ions channels in lipid membranes. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 275, n.2, p. 823-827, 2000.

ISHIKAWA, S. *et al.* Comparison of the amount of citric and malic acids in Al media of seven plant species and two cultivars each in five plant species. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 46, n. 3, p. 751-758, 2000.

ISHITANI, M. *et al.* SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 9, p. 1667-1677, 2000.

IUCHI, S. *et al.* Zinc finger protein *STOP1* is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 23, p. 9900-9905, 2007.

JAIN, A. *et al.* Differential effects of sucrose and auxin on localized phosphate deficiency induced modulation of different traits of roots system architecture in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, n. 1, p. 1460-1470, 2007.

JOHNSON, D.R. *et al.* Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. **Annual Review Biochemistry**, Palo Alto, v. 63, p. 869-914, 1994.

JONES, D. L. *et al.* Aluminium-organic acid interactions in acid soils .2. Influence of solid phase sorption on organic acid-Al complexation and Al rhizotoxicity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 182, n. 2, p. 229-237, 1996.

JONES, D. L.; KOCHIAN, L. V. Aluminium-organic acid interactions in acid soils .1. Effect of root-derived organic acids on the kinetics of Al dissolution. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 182, n. 2, p. 221-228, 1996.

KARPINSKI, S. *et al.* Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. **Science**, New York, v. 284, n. 5414, p. 654-657, 1999.

KINRAIDE, T. B.; SWEENEY, B. K. Buffered, phosphate-containing media suitable for aluminum toxicity studies. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 235, n. 1, p. 75-83, 2001.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto v. 46, p. 237-260, 1995.

KOCHIAN, L. V. *et al.* How do crop plants tolerate acid soils? - Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 459-493, 2004.

KOCHIAN, L. V. *et al.* The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 274, n. 1-2, p. 175-195, 2005.

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distances from recombination values. **Annual Eugenetics**, [S.l.], v.12, p. 172-175, 1944.

KUMARI, M. *et al.* Transcriptomic responses to aluminium stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Genetics and Genomics**, Heidelberg, v. 279, n. 4, p. 339-357, 2008.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LANDER, E. *et al.* MAPMAKER: An Interactive Computer Package for Constructing Primary Genetic Linkage Maps of Experimental and Natural Populations. **Genomics**, San Diego, v. 1, p. 174-181, 1987.

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative trait using RFLP linkage maps. **Genetics**, Bethesda, v. 121, p. 185-199, 1989.

- LEE, D.H.; LEE, C.B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. **Plant Science**, Claire, v.159, n.1, p. 75-85, 2000.
- LI, B.; MCKEAND, S.E.; ALLEN, H.L. Genetic variation in nitrogen use efficiency of loblolly pine seedlings. **Forest Science**, Bethesda, v.37, n.2, p.613-626,1991.
- LI, X. F. *et al.* Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, n. 4, p. 1537-1543, 2000.
- LI, Y. *et al.* Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. **Journal Biological Chemistry**, Rockville, v. 276, n. 6, p. 4338-4343, 2001.
- LI, Y.D. *et al.* QTL mapping of phosphorus deficiency tolerance in soybean (*Glycine max* L. Merr.). **Euphytica**, Dordrecht, v. 142, p. 137-142, 2005.
- LI, Y.J. *et al.* Chromosomal control of the tolerance to soil phosphorus deficiency in genome of common wheat. **Chinese Journal Genetic**, Beijing, v. 26, 529-538, 1999.
- LI, Y.J., *et al.* Chromosomal location of the genes conferring the tolerance to phosphorus deficiency stress in *Lophopyrum elongatum* genome. **Acta Genetica Sinica**, Beijing, v. 26, p. 703 - 710, 1999.
- LIAO, H. *et al.* Phosphorus and aluminum interactions in soybean in relation to aluminum tolerance, exudation of specific organic acids from different regions of the intact root system. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, n. 2, p. 674-684, 2006.
- LICHTENTHALER, H. K. Vegetation stress: An introduction to the stress concept in plants. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 148, n.1-2, p.4-14, 1996.
- LILLO, C. *et al.* Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of flavonoid pathway. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 587-601, 2008.
- LIMBERGER, E. **Identificação de genes responsivos ao alumínio tóxico em aveia branca (Avena sativa)**. 2006. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- LIN, S. I. *et al.* Regulatory network of microRNA399 and *PHO2* by systemic signaling. **Plant Physiology**, Rockville, v. 147, n. 2, p. 732-746, 2008.
- LINDSAY, W.L. **Chemical equilibria in soils**. New York, John Wiley & Sons, 1979, 449 p.
- LIU, C. M. *et al.* Cloning and characterization of high affinity phosphate transporter homologs from tomato *Uthappa mukatira*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, n. 2, p. 436-436, 1996.

LIU, J. P. *et al.* Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer *Arabidopsis* aluminum tolerance. **The Plant Journal**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 389-399, 2009.

LIU, J. Z. *et al.* Chromosomal location of genes conferring the tolerance to Pi starvation stress and acid phosphatase (APase) secretion in the genome of rye (*Secale L.*). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 237, n. 2, p. 267-274, 2001.

LOPEZ-BUCIO, J. *et al.* Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, n. 1, p. 244-256, 2002.

LYNCH, J. P. Roots of the second green revolution. **Australian Journal of Botany**, Victoria, v. 55, n. 5, p. 493-512, 2007.

LYNCH, J. P.; ST CLAIR, S. B. Mineral stress: the missing link in understanding how global climate change will affect plants in real world soils. **Science**, New York, p.101-115, 2004.

MA, J. F. *et al.* Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, London, v. 6, n. 6, p. 273-278, 2001.

MA, J. F.; HIRADATE, S. Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Planta**, New York, v. 211, n. 3, p. 355-360, 2000.

MA, Q.H. Small GTP-binding proteins and their functions in plants. **Journal Plant Growth Regulation**, New York, v. 26, p. 369-388, 2007.

MACRAE, E.A.; FERGUSON, I. B. Changes in catalase activity and hydrogen peroxide concentration in plants in response to low temperature. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 65, n. 1, p. 51-56, 2006.

MAGALHÃES, J.V. *et al.* A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminium tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, London, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, 2007.

MAGALHÃES, J.V. *et al.* Comparative mapping of a major aluminium tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. **Genetics**, Bethesda, v. 167, p. 1905-1914, 2004.

MANSKE, G. G. B. *et al.* Importance of P uptake efficiency versus P utilization for wheat yield in acid and calcareous soils in Mexico. **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 261-274, 2001.

MARTINOIA, E. *et al.* Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v.58, n.1, p.83-102, 2007.

MATZ, M. *et al.* Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 1558-1560, 1999.

MEDICI, L.O. *et al.* The influence of nitrogen supply on antioxidant enzymes in plant roots. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 31, p.1-9, 2004.

MILLA, M. A. R.; GUSTAFSON, J. P. Genetic and physical characterization of chromosome 4DL in wheat. **Genome**, Ottawa, v. 44, n. 5, p. 883-892, 2001.

MIMURA, T. *et al.* Phosphate transport across biomembranes and cytosolic phosphate homeostasis in barley leaves. **Planta**, New York, v. 180, n.2, p. 139-146, 1990.

MING, F. *et al.* Identification of quantitative trait loci affecting tolerance low phosphorus in rice (*Oriza sativa* L.). **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v. 45, p. 520 - 524, 2000.

MIRANDA, L.N. **Aluminum-phosphate interactions in relation to wheat growth.** 1985, 169f. Tese (Doutorado). University of Reading, UR, Inglaterra, 1985.

MISHRA, P.; DUBEY, R.S. Effect of aluminium on metabolism of starch and sugars in growing rice seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 30, n.3, p. 265-275, 2008.

MISSON, J. *et al.* A genome-wide transcriptional analysis using Arabidopsis thaliana Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 33, p. 11934-11939, 2005.

MIURA, K. *et al.* The **Arabidopsis** SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington v. 102, n. 27, p. 7760-7765, 2005.

MIYASAKA, S. C.; HAWES, M. C. Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, n. 4, p. 1978-1987, 2001.

MORCUENDE, R. *et al.* Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of Arabidopsis in response to phosphorus. **Plant Cell and Environment**, Oxon, v. 30, n. 1, p. 85-112, 2007.

MOTA, F.S.; GOEDERT, C.O. Características bioclimáticas dos trigos sul-brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de janeiro, v. 4, n. 2, p. 79-87, 1969.

MUCHAL, U. S.; RAGHOTHAMA, K. G. Cloning and characterization of two high affinity phosphate transporter homologues in Arabidopsis thaliana. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, n. 2, p. 435-435, 1996.

MUDGE, S. R. *et al.* Expression analysis suggests novel roles for members of the PHT1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 341-353, 2002.

MÜLLER, R. *et al.* Genome-wide analysis of the Arabidopsis leaf transcriptome reveals interaction of phosphate and sugar metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, p. 156-171, 2007.

MULLINEAUX, P. M. *et al.* Spatial dependence for hydrogen peroxide-directed signaling in light-stressed plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, n. 2, p. 346-350, 2006.

MULLINEAUX, P.M.; CREISSEN, G.P. Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. In: OXIDATIVE STRESS AND MOLECULAR BIOLOGY OF ANTIOXIDANT DEFENSES. Ed. J.G. Scandalion, 1997, p. 667-713.

MUNNS, D. N. Soil acidity and growth of a legume .i. interactions of lime with nitrogen and phosphate on growth of *Medicago sativa* L. and *Trifolium subterraneum* L. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 16, n. 5, p. 733-755, 1965.

NACRY, P. *et al.* A role for auxin redistribution in the responses of the root system architecture to phosphate starvation in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 138, n. 4, p. 2061-2074, 2005.

NAKANO, Y. & ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, p. 867-880, 1981.

NANAMORI, M. *et al.* Low phosphorus tolerance mechanisms: phosphorus recycling and photosynthate partitioning in tropical forage Grass, *Brachiaria* hybrid cultivar mulato compared whit rice. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 45, p. 460 – 469, 2004.

NAVA, I.C. **Estratégias de avaliação e herança da tolerância ao alumínio em linhagens recombinantes de aveia (*Avena sativa* L.)**. 2005, 92 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

NCBI Taxonomy. Base de dados de taxonomia. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>>. Acesso em: 12 dez. 2008.

NICHOL, B. E. *et al.* The effects of aluminum on the influx of calcium, potassium, ammonium, nitrate, and phosphate in an aluminum-sensitive cultivar of barley (*Hordeum-vulgare* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 4, p. 1263-1266, 1993.

NOCTOR, G. *et al.* Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 1, p. 1283-1304, 2002.

NURUZZAMAN, M. *et al.* Distribution of carboxylates and acid phosphatase and depletion of different phosphorus fractions in the rhizosphere of a cereal and three grain legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 281, p. 109- 120, 2006.

OLIVER, R.P.; GRIFFITHS, W.T. Identification of the polypeptides of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase. **Biochemical Journal**, London, v. 191, n.1, p.277-280, 1980.

OSBORNE, L. D.; RENGEL, Z. Screening cereals for genotypic variation in efficiency of phosphorus uptake and utilisation. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 53, n. 3, p. 295-303, 2002.

OZTURK, L. *et al.* Variation in phosphorus efficiency among 73 bread and durum wheat genotypes grown in a phosphorus-deficient calcareous soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 269, n. 1-2, p. 69-80, 2005.

PAPERNIK, L. A. *et al.* Physiological basis of reduced Al tolerance in ditelosomic Lines of Chinese Spring wheat. **Planta**, New York, v. 212, n. 5-6, p. 829-834, 2001.

PARENICÓVA, L. *et al.* Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. **The Plant Cell**, v. 15, n.7, p. 1538-1551, 2003.

PASZKOWSKI, U. *et al.* Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.98, n. 20, p. 13324-13329, 2002.

PATERSON, A. H. *et al.* Resolution of quantitative traits into mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. **Nature**, London, v. 335, n. 6192, p. 721-726, 1988.

PECSVARADI, A. *et al.* Chloroplastic glutamine synthetase is activated by direct binding of aluminium. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 135, n. 1, p. 43-50, 2009.

PELLET, D. M. *et al.* Multiple aluminum-resistance mechanisms in wheat - Roles of root apical phosphate and malate exudation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, n. 2, p. 591-597, 1996.

PESTSOVA, E. *et al.* Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. **Genome**, Ottawa, v. 43, p.689-697, 2000.

PIERRE, M. *et al.* N-myristoylation regulates the SnRK1 pathway in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v.19, n.9, p. 2804-2821, 2007.

POLLARD, M. *et al.* Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. **Trends in Plant Science**, London, v. 13, n. 5, p. 236-246, 2008.

PRASAD, M. N. V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 525-545, 1995.

PRASAD, T. K. *et al.* Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen-peroxide. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, n. 1, p. 65-74, 1994.

PRATAPBHANU, S.B. *et al.* Phosphorus efficiency of wheat and sugar beet seedlings grown in soils with mainly calcium, or iron and aluminium phosphate. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 246, n. 1, p. 41-52, 2002.

PRIMER 3. Software livre de desenho e análises de iniciadores. Disponível em: <www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi>. Acesso em: dez, 2007.

RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 665-693, 1999.

RAGHOTHAMA, K.G.; KARTHIKEYAN, S.A. Phosphate acquisition. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 274, n.1-2, p. 37-49, 2005.

RAMAKERS, C. *et al.* Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.

RAMAN, H. *et al.* Molecular characterization and mapping of ALMT1, the aluminium-tolerance gene of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Genome**, Ottawa, v. 48, n. 5, p. 781-791, 2005.

REA, P. A. Plant ATP-Binding Cassette Transporters. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto v. 58, p. 347-375. 2007.

RENGEL, Z.. Handbook of Soil Acidity. In: GARVIN, D.F.; CARVER, B.F. **Role of the genotype in tolerance to acidity and aluminium toxicity**. Local: Marcel Dekker, New York, 2003, 496 p.

RENGEL, Z.; ZHANG, W. H. Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. **New Phytologist**, Oxon, v. 159, n. 2, p. 295-314, 2003.

ROSA, O.S.; CAMARGO, C.E.O. Wheat breeding for better efficiency in phosphorus use. In: SAUNDERS, D.A. WHEAT FOR THE NONTRADITIONAL WARM AREAS: a proceeding of the international conference. Foz do Iguaçu, United Nations Development Programme International Maize and Wheat Improvement Center, 1990. p.333-351.

RUBIO, V. *et al.* A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. **Genes & Development**, Washington, v.15, p. 2122-2133, 2001.

RUBIO, V. *et al.* Plant hormones and nutrient signaling. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 4, p. 361-373, 2009.

RYAN, P. R. *et al.* A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, n. 1, p. 340-351, 2009.

SAKANO, K. Proton phosphate stoichiometry in uptake of inorganic-phosphate by cultured-cells of *Catharanthus roseus* (L) G-Don. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, n. 2, p. 479-483, 1990.

SANCHEZ, P. A.; SALINAS, J. G. Low-input technology for managing oxisols and Ultisols in tropical America. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 34, p. 279-406, 1981.

SASAKI, T., *et al.* A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 645-653, 2004.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, p. 7-12, 1993.

SCHACHTMAN, D. P. *et al.* Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 2, p. 447-453, 1998.

SCHACHTMAN, D. P.; SHIN, R. Nutrient sensing and signaling: NPKS. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 47-69, 2007.

SCHEIBLE, W.R. *et al.* Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. **Plant Physiology**, Rockville, v.136, n.1, p. 2483-2499, 2004.

SCHOEFS, B, FRANCK, F. Protochlorophyllide reduction: Mechanisms and evolution. **Photochemistry and Photobiology**, Augusta, v. 78, n. 6, p. 543-557, 2003.

SCHUNMANN, P. H. D. *et al.* Promoter analysis of the barley Pht1 phosphate transporter gene identifies regions controlling root expression and responsiveness to phosphate deprivation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, n. 4, p. 4205-4214, 2004.

SCHUTZENDUBEL, A.; POLLE, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1351-1365, 2002.

SHEN, H. *et al.* Exudation of organic acids in common bean as related to mobilization of aluminium and iron bound phosphates. **Environmental Experimental Botany**, Oxford, v. 48, n.1, p. 1-9, 2002.

SHI, J. *et al.* Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. **Nature Biotechnology**, London, v. 25, n.8, p. 930-937, 2007.

SHIU, S.H.; BLEECKER, A.B. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function and signaling. **Science STKE**, New York, v.113, rev. 22, p. 2001.

SILVA, A.A. **Diferenciação em solução hidropônica de genótipos de trigo quanto à tolerância à deficiência de fósforo.** 2007, 81 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Fitotecnia. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SIVAGURU, M. *et al.* Aluminium induced gene expression and protein localization of cell wall-associated receptor kinase in Arabidopsis thaliana. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 2256-2266, 2003.

SIVAGURU, M. *et al.* Aluminum-induced 1 -> 3-beta-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, n. 3, p. 991-1005, 2000.

SIVAGURU, M.; HORST, W.J. The distal part of the transitional zone is the most aluminium-sensitive apical root zone in maize. **Plant Physiology**, Rockville, v. 163, p. 155 – 163, 1998.

SONG, Q.J. *et al.* Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 110, p. 550-560, 2005.

SOON, Y. K. Differential response of wheat genotypes to phosphorus in acid soils. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 15, n. 5, p. 513-526, 1992.

STAUFFER, M. D.; SULEWSKI, G. Fósforo – essencial para a vida. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S. (Ed.) **Fósforo na agricultura brasileira**. Piracicaba: POTAFOS, 2004. p. 457-494.

STEC, B. Plant thionins – the structural perspective. **Cellular and Molecular Life Science**, Basel, v. 63, n.12, p. 1370-1385, 2006.

STEEL, R.G.D., TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics**. 2^o ed. New York: McGraw-Hill, 1980. 633p.

STEFANOVIC, A. *et al.* Members of the PHO1 gene family show limited functional redundancy in phosphate transfer to the shoot, and are regulated by phosphate deficiency via distinct pathways. **The Plant Journal**, Oxford, v. 50, n. 6, p. 982-994, 2007.

STEVENSON, F.J., VANCE, G.F. Environmental chemistry of aluminium-organic complexes. In: SPOSITO, G. **The environmental chemistry of aluminium**. Boca raton, FL: CRC Press, 1996, p. 169-220.

SU, J. *et al.* Mapping QTLs for phosphorus-deficiency tolerance at wheat seedling stage. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 281, p. 25-36, 2006.

SUN, Q. B. *et al.* Phosphorus enhances Al resistance in Al-resistant *Lespedeza bicolor* but not in Al-sensitive *L. cuneata* under relatively high Al stress. **Annals of Botany**, Oxford, v. 102, n. 5, p. 795-804, 2008.

TADANO, T.; SAKAI, H. Secretion of acid-phosphatase by the roots of several crop species under phosphorus-deficient conditions. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 37, n. 1, p. 129-140, 1991.

TALBERT, L. E. *et al.* More than one origin of hexaploid wheat is indicated by sequence comparison of low-copy DNA. **Genome**, Ottawa, v. 41, n. 3, p. 402-407, 1998.

TARDIF, G. *et al.* Interaction network of proteins associated with abiotic stress response and development in wheat. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 63, n. 5, p. 703-718, 2007.

TEAKLE, G.R.; GRIFFITHS, W.T. Cloning, characterization and import studies on protochlorophyllide reductase from wheat (*Triticum aestivum*). **Biochemical Journal**, London, v. 296, n.1, p. 225-230, 1993.

TIAN, J. *et al.* Molecular cloning and characterization of phosphorus starvation responsive genes in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Planta**, New York, v. 227, n.1, p. 151-165, 2007.

TICCONI, C. A.; ABEL, S. Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures. **Trends in Plant Science**, London, v. 9, n. 11, p. 548-555, 2004.

TINKER, P. B. Levels, distribution and chemical forms of trace elements in food plants. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, London, v. 294, n. 1071, p. 41-55, 1981.

VANCE, C. P. *et al.* Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, Oxon, v. 157, n. 3, p. 423-447, 2003.

VANHOUDT, N. *et al.* Effects of uranium and phosphate concentrations on oxidative stress related responses induced in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S.l.], v. 46, p. 987-996, 2008.

VECSCREEN. Software on line de verificação de contaminantes em seqüências nucleotídicas. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen>. Acesso em: dez 2007.

VENKATACHALAM, P. *et al.* Identification of expression profiles of tapping panel dryness (TPD) associated genes from the latex of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Planta**, New York, v. 226, n.2, p. 499-515, 2007.

VITORELLO, V. A. *et al.* Recent advances in aluminium toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Campinas, v. 17, p. 129-143, 2005.

VON UEXKULL, H. R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic-impact of acid soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 171, n. 1, p. 1-15, 1995.

VOS, P. *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n.21, p. 4407-4414, 1995.

WANG, G. Z. *et al.* Plasmon analyses of Triticum (wheat) and Aegilops: PCR single-strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analyses of organellar DNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 26, p. 14570-14577, 1997.

WANG, J; HOU, B. Glycosyltransferases: key players involved in the modification of plant secondary metabolites. **Frontiers of Biology in China**, Beijing, v. 4, n. 1, p. 39-46, 2009.

WANG, R. *et al.* Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, n.1, p. 2512-2522, 2004.

WANG, S. *et al.* **Windows QTL Cartographer 2.5**. (Software). Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC, 2007. Disponível em: <<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>>. Acesso em: jul de 2008.

WASAKI, J. *et al.* Transcriptomic analysis of metabolic changes by phosphorus stress in rice plant roots. **Plant Cell and Environment**, Oxon, v. 26, n. 9, p. 1515-1523, 2003.

WHITE, R. E. *et al.* Existence of polymeric complexes in dilute-solutions of aluminum and orthophosphate. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 45, n. 2, p. 521-529, 1976.

WIETHÖLTER, S. **Fósforo no solo e a cultura do trigo**. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S. (Ed.) **Fósforo na agricultura brasileira**. Piracicaba: POTAFOS, 2004. p. 457-494.

WU, P. *et al.* Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and shoots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n.3, p. 1260-1271, 2003.

XU, J.; SCHERES, B. Dissection of Arabidopsis ADP-ribosylation factor 1 function in epidermal cell polarity. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 525-536, 2005.

YAMAMOTO, Y. *et al.* Aluminium toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and production of reactive oxygen species in plant cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 128, p. 63 – 72, 2002.

YI, K. K. *et al.* OsPTF1, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice. **Plant Physiology**, Rockville, v. 138, n. 4, p. 2087-2096, 2005.

YUAN, H.; LIU, D. Signaling components involved in plant responses to phosphate starvation. **Journal of Integrative Plant Biology**, Oxon, v. 50, n. 7, p. 849-859, 2008.

ZENG, Z. B. Theoretical basis of precision mapping of quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 10972-10976, 1993.

ZHANG, D. *et al.* Detection of quantitative trait loci for phosphorus deficiency tolerance t soybean seedling stage. **Euphytica**, Dordrecht, online first, 2009.

ZHANG, J. *et al.* Identification of aluminium-responsive genes in rice cultivars with different aluminium sensitivities. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 8, p. 2269-2278, 2007.

ZHANG, Y. *et al.* Differential gene expression in *Festuca* under heat stress conditions. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 413, p. 897-907, 2005.

ZHANG, Y.J. *et al.* Ethylene and phosphorus availability have interacting yet distinct effects on root hair development. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n.391, p. 2351-2361, 2003.

ZHEN, Y. *et al.* Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 131, n. 4, p. 542-554, 2007.

ZHENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **BMC Genetics**, London, v. 136, n.5, p. 1457-1468, 1994.

ZHOU, L. L. *et al.* Quantitative trait loci for aluminum resistance in wheat. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 19, n. 2, p. 153-161, 2007.

ZHUANG, X. *et al.*. OsAGAP, an ARF-GAP from rice, regulates root development mediated by auxin in Arabidopsis. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.28, p.147–156, 2005.

7 VITA

Laize Fraga Espindula é filha de José Luiz Espindula e Isabel de Fraga Espindula. Nasceu em Porto Alegre em 01 de abril de 1982.

Cursou e completou o primeiro grau na Escola Municipal de 1º Grau Getúlio Vargas em Cachoeirinha-RS. O segundo grau juntamente com o ensino técnico cursou na Escola Técnica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul formando-se no curso Técnico em Biotecnologia em 2000. Em 2001 ingressou no Curso de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre, onde se graduou Engenheiro Agrônomo em 2006. Em 2007 ingressou no curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre-RS, na ênfase Melhoramento e Biotecnologia Vegetal. Em 2009, integrou-se ao grupo de Pesquisa e Desenvolvimento em fumo da Alliance One do Brasil.