

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

ESTRESSE OXIDATIVO EM TRIGO CAUSADO POR DIFERENTES  
DISPONIBILIDADES DE FÓSFORO EM SOLUÇÃO HIDROPÔNICA

Letícia Simionato Tonello  
Bióloga/UPF

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

Porto Alegre (RS), Brasil  
Agosto de 2011

LETÍCIA SIMIONATO TONELLO  
Bióloga - UPF


## DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

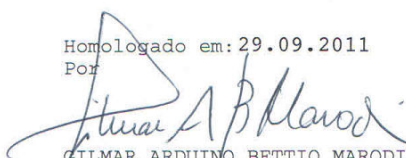
### **MESTRE EM FITOTECNIA**


Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

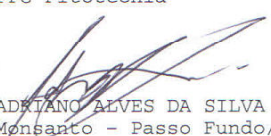
Aprovado em: 03.08.2011  
Pela Banca Examinadora


  
ALDO MEROTTO JUNIOR  
Responsável - PPG Fitotecnia  
CARLA ANDRÉA DELATORRE  
Orientadora - PPG Fitotecnia


Homologado em: 29.09.2011  
Por

  
GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia

  
CHRISTIAN BREDEMEIER  
PPG Fitotecnia

  
ADRIANO ALVES DA SILVA  
Monsanto - Passo Fundo/RS

  
SANDRA PATUSSI BRAMMER  
EMBRAPA Trigo - Passo Fundo/RS

  
PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

DEDICO

*Aos meus pais, Jaime e Tania e  
aos meus irmãos Lucas e  
Virgínia, por estarem SEMPRE  
do meu lado.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e me ajudar a superar os momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Jaime e Tania, agradeço por tudo o que tenho e a pessoa que sou hoje, eles são os melhores!

Aos meus irmãos, Lucas e Virgínia, por eles serem ótimos amigos, companheiros e conselheiros!

À minha família “inteira”, a nossa união é motivo de orgulho!

À Hermínia, minha amiga especial, pelas nossas conversas sempre me fazendo ver o lado positivo dos acontecimentos!

À Maira, Aline e Renata, pelos momentos de conversa e descontração!

À Carla Delatorre, pelo seu amor por ensinar e orientar, não vou esquecer as prévias dos seminários e ajuda com a dissertação!

Aos componentes da banca Dra. Sandra Patussi Brammer, Dr. Adriano Alves da Silva e Dr. Christian Bredemeier pelas sugestões que enriqueceram este trabalho!

Ao Professor Aldo pela disponibilidade em representar a Carla e pelas suas sugestões!

Às gurias, Carolina Cover, Adriana, Kelly, Noryam, Ana Paula, Thanise, Carolina Tessele e Liliana pelas conversas, companheirismo e boas risadas!

À Graciela, pelas experiências divididas, já que usamos os mesmos protocolos!

Ao Fábio, sempre solícito e muito atencioso.

Ao Professor Marcelo Pacheco pela ajuda na análise estatística.

Aos colegas e amigos que passaram pelo Mestrado durante esse período, pela companhia nos diferentes momentos.

À Alice e Karina, por estarem sempre solícitas e prontas para ajudar.

À Cibele, por ter sido uma pessoa especial em um momento de muitas mudanças!

À Renata e Noryam, colegas de apartamento!

À Laize Espíndula, pela ajuda via e-mail!

A todas as pessoas que, de alguma forma, participaram dessa etapa da minha vida.

Por fim, a CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro.

# ESTRESSE OXIDATIVO EM TRIGO CAUSADO POR DIFERENTES DISPONIBILIDADES DE FÓSFORO EM SOLUÇÃO HIDROPÔNICA<sup>1</sup>

Autora: Letícia Simionato Tonello

Orientadora: Carla Andrea Delatorre

## RESUMO

O fósforo (P) é um dos elementos mais importantes para o desenvolvimento das plantas. Entretanto, sabe-se que a sua disponibilidade é prejudicada muitas vezes pela presença de substâncias quelantes no solo que o indisponibilizam para o uso. O objetivo do trabalho foi estudar o estresse oxidativo causado por diferentes concentrações de P em duas cultivares de trigo, Toropi, tolerante à deficiência, e Anahuac, sensível à deficiências de P. As plântulas foram crescidas sob condição hidropônica com 0  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , após 10 dias de tratamento, raízes e parte aérea foram coletadas. Foram analisadas as enzimas catalase (CAT), glutathione redutase (GR) e ascorbato peroxidase (APX); quantificado o conteúdo de ácido ascórbico (AsA) e tióis não protéicos (NPSH) e os níveis de clorofila A, B e carotenóides. O estresse oxidativo foi verificado através do teor de malonaldeído (MDA), que avalia os níveis de peroxidação lipídica, e do teor de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e superóxido. Toropi e Anahuac apresentaram diferenças quanto à produção de espécies reativas de oxigênio quando expostas às situações de deficiência de fósforo. Houve incremento na produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na parte aérea de Anahuac, e de superóxido apenas para Toropi com o aumento da disponibilidade de P. A peroxidação lipídica mostrou-se muito superior nas folhas de Toropi, especialmente nas condições extremas de P. Por outro lado nas raízes somente Anahuac mostrou aumento da peroxidação com o aumento da disponibilidade de P. É possível que níveis muito baixos de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas raízes, em decorrência da ausência de P, afetem negativamente o crescimento da raiz de Anahuac. Quanto aos pigmentos cloroplastídicos, o conteúdo de clorofila B e carotenóides foram similares e o conteúdo de clorofila A foi constante. O conteúdo de AsA foi amplamente superior nas raízes em comparação com as folhas para Toropi e Anahuac e o mesmo padrão de produção de NPSH foi observado para as duas cultivares. Os resultados obtidos sugerem que aumento na disponibilidade de P, causa aumento na produção de EROs, o qual é contra-atacado por incremento na atividade de enzimas antioxidantes, GR e APX, e pelo aumento na produção de carotenóides e clorofila B em Toropi. Anahuac responde ao estresse oxidativo causado pela maior disponibilidade de P via aumento da atividade de catalase, porém não eficientemente, uma vez que os níveis de peroxidação de lipídeos se elevam.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (54p.) Agosto, 2011.

# OXIDATIVE STRESS IN WHEAT CAUSED BY DIFFERENT AVAILABILITIES OF PHOSPHORUS IN HIDROPONICS<sup>1</sup>

Author: Letícia Simionato Tonello  
Adviser: Carla Andrea Delatorre

## ABSTRACT

Phosphorus (P) is one of the most important nutrients for plant growth. However, it is known that its availability is often hampered by the presence of chelating substances in the soil, which turns it unavailable. In order to study the oxidative stress caused by different concentrations of P in two cultivars of wheat, Toropi (tolerant) and Anahuac (sensitive to P deficiency), seedlings were grown under hydroponic conditions with 0  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , after 10 days of treatment, roots and shoots were collected. The activity of antioxidative enzymes, catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and ascorbate peroxidase (APX) were analyzed, the content of ascorbic acid (AsA) and non-protein thiols (NPSH) chlorophyll A, B and carotenoids were quantified. Oxidative stress was verified by the content of malonaldehyde (MDA), which assesses the levels of lipid peroxidation, also hydrogen peroxide and superoxide were quantified. Toropi and Anahuac showed differences in the production of reactive oxygen species when exposed to phosphorus deficiency. There was an increase in the production of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the shoot of Anahuac, and of superoxide for Toropi when P availability was increased. Lipid peroxidation was found to be much higher in the leaves of Toropi, especially in the extreme conditions of P, on the other hand, in the roots only Anahuac showed increase in lipid peroxidation with increase in P availability. It is possible that very low levels of reactive oxygen species (ROS) in the roots, due to the P starvation, negatively affect root growth of Anahuac. The content of chlorophyll B and carotenoids were similar and the chlorophyll A content was constant. The AsA content was far greater in the roots than in the leaves for both cultivars and a similar pattern of NPSH production was observed. The results suggest that increase in P availability, induces ROS production, which is counteracted by increased activity of antioxidant enzymes, GR and APX, and higher content of carotenoids and chlorophyll B in Toropi. Anahuac responded to the oxidative stress caused by higher P availability by increasing catalase activity, but not efficiently, since the levels of lipid peroxidation also increased.

---

<sup>1</sup> Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (54p.) August, 2011.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Objetivo principal .....	2
1.2 Objetivos específicos .....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1 A cultura do trigo no Brasil .....	4
2.2 O fósforo no solo .....	6
2.3 O fósforo no solo e sua importância para as plantas .....	8
2.4 Estresse em plantas e a geração de espécies reativas de oxigênio .....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.1 Material genético e local de condução dos experimentos .....	18
3.2 Cultivo do material .....	18
3.3 Análises enzimáticas .....	21
3.3.1 Extração enzimática .....	21
3.3.2 Determinação da concentração da proteína .....	21
3.3.3 Determinação da atividade da catalase (CAT) .....	21
3.3.4 Determinação da atividade da glutathione redutase (GR) .....	22
3.3.5 Determinação da atividade da ascorbato peroxidase (APX).....	22
3.4 Análises de estresse oxidativo .....	22
3.4.1 Estimativa da peroxidação de lipídeos (TBARS) .....	22
3.4.2 Quantificação de peróxido de hidrogênio .....	23
3.4.3 Avaliação do teor de superóxido .....	23
3.4.4 Extração de clorofila e carotenóides .....	24
3.4.5 Determinação de ácido ascórbico e tióis não protéicos .....	24
3.5 Análise estatística .....	25
4. RESULTADOS .....	26
4.1 Metabolismo antioxidativo .....	26
4.1.1 Análises enzimáticas .....	28
4.1.1.1 Atividade da enzima catalase (CAT) .....	28
4.1.1.2 Atividade da enzima glutathione redutase (GR) .....	28
4.1.1.3 Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) .....	30
4.1.2 Análises de estresse oxidativo .....	31
4.1.2.1 Peróxidação de lipídeos (TBARS) .....	31



	Página
4.1.2.2 Teor de peróxido de hidrogênio .....	31
4.1.2.3 Avaliação do teor de superóxido .....	32
4.1.2.4 Atividade não enzimática: pigmentos cloroplastídicos .....	32
4.1.2.5 Conteúdo de ácido ascórbico (AsA) e tióis não protéicos .....	35
5. DISCUSSÃO .....	37
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45
8. VITA .....	54

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Composição da solução nutritiva: fontes minerais usadas e concentração final .....	20
2. Análise de variância, com valores de probabilidade determinados para o efeito dose de fósforo, órgão e genótipo .....	27
3. Coeficientes de correlação entre as diferentes análises relacionadas ao metabolismo antioxidativo e pigmentos cloroplastídicos nos genótipos Toropi e Anahuac .....	28

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Produtividade de trigo no mundo nas últimas décadas (Adaptado de Canziani &Guimarães, 2009) .....	6
2. Esquema com alguns iniciadores da geração de EROS e algumas conseqüências biológicas do estresse oxidativo que podem resultar em morte celular (Adaptado de Scandalios, 2005).....	12
3. Retirada do endosperma de plântulas de trigo após 72 horas de germinação. A) Plântula com o endosperma não retirado; B) Plântula com o endosperma retirado ao lado; C) Plântula de trigo pronto para ser colocada em tratamento.....	19
4. Aspecto ilustrativo das plântulas distribuídas nos recipientes plásticos.....	20
5. Atividade da enzima catalase nas raízes e na parte aérea de plântulas de trigo dos genótipos Toropi e Anahuac submetidas a diferentes concentrações de fósforo (P) durante dez dias. Letras maiúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão e, letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo órgão e dose, pelo teste Tukey ao nível de 5%. NS: diferença não significativa .....	29
6. Atividade da enzima glutaciona redutase nas raízes e na parte aérea de plântulas de trigo dos genótipos Toropi e Anahuac submetidas a diferentes concentrações de fósforo (P) durante dez dias. Letras maiúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão e, letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo órgão e dose, pelo teste Tukey ao nível de 5%. NS: diferença não significativa .....	30
7. Atividade da enzima ascorbato peroxidase nas raízes e na parte aérea de plântulas de trigo dos genótipos Toropi e Anahuac submetidas a diferentes concentrações de fósforo (P) durante dez	

	Página
dias. Letras maiúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão e, letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo órgão e dose, pelo teste Tukey ao nível de 5%. NS: diferença não significativa.....	30
8. Efeito de diferentes concentrações de fósforo (P) nos níveis de malonaldeído (MDA) nas raízes e na parte aérea de plântulas dos genótipos Toropi e Anahuac. Letras maiúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão e, letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo órgão e dose, pelo teste Tukey ao nível de 5%. NS: diferença não significativa .....	31
9. Efeito de diferentes concentrações de fósforo (P) na produção de peróxido de hidrogênio nas raízes e folhas de plântulas dos genótipos Toropi e Anahuac. NS: diferença não significativa .....	32
10. Efeito de diferentes concentrações de fósforo (P) no teor de superóxido na parte aérea de plântulas dos genótipos Toropi e Anahuac submetidas ao estresse por diferentes concentrações de fósforo (P) durante 10 dias. Letras maiúsculas comparam doses dentro de genótipos, pelo teste Tukey ao nível de 5%. NS: diferença não significativa .....	33
11. Conteúdo de carotenóides na parte aérea de plântulas de trigo dos genótipos Toropi e Anahuac submetidas ao estresse por diferentes concentrações de fósforo (P) durante dez dias. NS: diferença não significativa.....	33
12. Conteúdo de clorofila B na parte aérea de plântulas de trigo dos genótipos Toropi e Anahuac submetidas a diferentes concentrações de fósforo (P) durante dez dias. Letras maiúsculas comparam doses dentro de genótipos, pelo teste Tukey ao nível de 5%. NS: diferença não significativa .....	34
13. Conteúdo de clorofila A na parte aérea de plântulas de trigo dos genótipos Toropi e Anahuac submetidas a diferentes concentrações de tratamentos de fósforo (P) durante dez dias. NS: diferença não significativa .....	34
14. Efeito de diferentes tratamentos de fósforo (P) na concentração de ácido ascórbico nas raízes e na parte aérea de plântulas de trigo dos genótipos Toropi e Anahuac. Letras maiúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão e, letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo órgão e dose, pelo teste Tukey ao nível de 5%. NS: diferença não significativa .....	35
15. Efeito de diferentes concentrações de fósforo (P) no conteúdo de tióis não protéicos (NPSH) nas raízes e na parte aérea dos genótipos Toropi e Anahuac. NS: diferença não significativa.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

APX: ascorbato peroxidase

AsA: ácido ascórbico

CAT: catalase

Clor A: clorofila A

Clor B: clorofila B

DMSO: dimetilsulfóxido

DNPH: dinitro fenil hidrazina

DNTB: 5,5'' – ditiobis (2-ácido nitobenzóico)

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etileno diamino tetracético

EROs: espécies reativas de oxigênio

GR: glutathione redutase

GSH: glutathione reduzida

GSSG: glutathione oxidada

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: fosfato de potássio

KI: iodeto de potássio

MDA: malonaldeído

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NaNO<sub>3</sub>: nitrato de sódio

NBT: nitro blue tetrazolium

NPSH: tióis não protéicos

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: superóxido

PVPP: polivinilpolipirrolidona

TBA: ácido tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas cultivadas precisam de condições ideais de ambiente para que desenvolvam o seu potencial. Entretanto, normalmente são submetidas a situações adversas durante o seu crescimento e desenvolvimento. Entre estas condições, encontra-se a limitação de fósforo. Os solos brasileiros, de uma forma geral, apresentam baixa disponibilidade de fósforo (P). Práticas de manejo que amenizam este problema, como a adubação fosfatada, são normalmente realizadas, apesar de apresentarem alto custo (Ben & Dechen, 1996). Sabe-se, no entanto, que as fontes de P são esgotáveis e que a presença de alumínio no solo reduz a disponibilidade de P por formar com este um precipitado. Atualmente, a prática da calagem superficial, permite que alumínio tóxico permaneça acessível após os primeiros 20 cm de solo.

O P é um dos nutrientes mais importantes para o desenvolvimento das plantas, compõe moléculas como ácidos nucleicos, fosfolipídeos e ATP. A deficiência de P influencia o metabolismo do carbono e seus produtos, como a secreção de ácidos orgânicos das raízes e a acúmulo de amido na parte aérea (Fukuda *et al.*, 2007).

Dentro de um cenário propício para o desenvolvimento das plantas, sabe-se que estas estão adaptadas a viverem sob certos níveis de espécies reativas de oxigênio. Entretanto, um acúmulo destas nos tecidos pode levar à morte celular (Forman *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2011). Em casos de toxicidade causada pelas espécies reativas de oxigênio, as plantas possuem um sistema complexo com objetivo de minimizar estes

efeitos deletérios. Para isso dispõem de mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. As clorofilas B e os carotenóides também exercem função de proteção às plantas em situações de estresse oxidativo (El-Shabrawi *et al.*, 2010; Mittler *et al.*, 2008).

As cultivares de trigo, Toropi e Anahuac são consideradas tolerante e sensível à deficiência de P, respectivamente (Da Silva, 2007). A deficiência nutricional ao afetar o metabolismo primário, gera incremento na produção de espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, foi observado que em alta disponibilidade de P, há o surgimento de nova isoforma de superóxido dismutase (Espíndula, 2009) sugerindo que o excesso de P também possa induzir a formação de espécies reativas de oxigênio. Assim, a caracterização de cultivares contrastantes quanto à tolerância à deficiência de P em relação à indução de estresse oxidativo representa um importante passo para o estudo dos mecanismos de tolerância aos estresses nutricionais.

Buscando verificar o efeito da disponibilidade de P sobre a geração de espécies reativas de oxigênio em cultivares de trigo contrastantes quanto a tolerância de P (Toropi e Anahuac) este trabalho foi proposto..

### **1.1 Objetivo principal**

Analisar o estresse oxidativo sob diferentes concentrações de fósforo (P) nas cultivares de trigo, Anahuac e Toropi, em cultivo hidropônico.

### **1.2 Objetivos específicos**

1. Avaliar o dano causado por espécies reativas de oxigênio via peroxidação de lipídeos em plântulas cultivadas sob diferentes disponibilidades de fósforo (P) em cultivo hidropônico;

2. Quantificar carotenóides e clorofilas em plântulas cultivadas sob diferentes disponibilidades de fósforo (P) em cultivo hidropônico;



3. Quantificar as espécies reativas de oxigênio, superóxido e peróxido de hidrogênio, em diferentes condições de fornecimento de P em plântulas cultivadas em cultivo hidropônico;

4. Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase, glutathione redutase e catalase em diferentes condições de fornecimento de P em plântulas cultivadas em cultivo hidropônico.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica irá ilustrar de uma forma geral este trabalho atendendo aos seguintes assuntos: cultura do trigo no Brasil, fósforo no solo, importância do fósforo para as plantas e por fim, a ocorrência de estresse e a sua relação com a geração de espécies reativas de oxigênio nas plantas.

### 2.1 A cultura do trigo no Brasil

O trigo surgiu há mais de 10 mil anos, na região da Mesopotâmia, chamada “Crescente Fértil”. Suas espécies ancestrais ainda podem ser encontradas na sua região de origem. Os achados arqueológicos indicam ter sido o segundo grão cultivado, após a cevada. Este cereal foi a cultura chave para o desenvolvimento da civilização ocidental, assim como o milho, na América. Seu cultivo permitiu que a espécie humana finalmente abandonasse milhares de anos de caça e de coleta, fixando-se em povoados e construindo cidades, desenvolvendo as profissões, as artes e as ciências, graças à reserva das sementes armazenadas (Moraes-Fernandes, 2000).

O trigo cultivado *Triticum aestivum* é uma espécie hexaplóide ( $2n=6x=42$ ), compreendendo três genomas (AABBDD). Estudos comprovaram que o genoma A é oriundo da espécie *Triticum turgidum* (AABB); o genoma B tem origem no *Aegilops speltoides* e o D, no *Aegilops tauschii* (Wang *et al.*, 1997; Dvorak *et al.*, 1998). Segundo classificação botânica, o trigo pertence à família Poaceae. É uma planta autógama, com

flores completas que, em condições normais de cultivo, apresenta aproximadamente 5% de taxa de fecundação cruzada. No Brasil, as espécies cultivadas apresentam hábito primaveril e a grande maioria dos genótipos é insensível ao fotoperíodo (Embrapa/CNPT, 2009).

Nos últimos 30 anos, com melhorias genéticas e de manejo, o rendimento mundial médio da cultura aumentou, passando de 1,9 toneladas para 2,9 toneladas por hectare (Embrapa/CNPT, 2009). Na União Européia, o rendimento de trigo é superior a 4 toneladas por hectare (Figura 1). Mesmo assim, a quantidade produzida atualmente no mundo, 647 milhões de toneladas (USDA, 2011), representa apenas 57% do que será necessário em 2025. Sendo assim, é clara a necessidade de estudos que envolvam a interação entre a cultura do trigo e estresses bióticos e abióticos para que a produtividade acompanhe o ritmo da demanda e consumo.

A partir de 1940, a cultura do trigo começou a se expandir comercialmente no Brasil, especialmente nos estados do Rio Grande do Sul e do Paraná, mas continuou não sendo uma planta de fácil adaptação. Desde aquela época, o rendimento e área plantada têm passado por oscilações significativas, diferentemente da Argentina, onde as condições de solo e clima permitem aos produtores obter boas colheitas com custos mais baixos. Mesmo assim, por meio do avanço do melhoramento genético e das técnicas de cultivo, conseguiu-se aumentar o rendimento. No Brasil o rendimento dobrou em 45 anos (Embrapa/CNPT, 2009). Porém, a produção ainda não é suficiente para atender o consumo da população brasileira. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) (2011), a safra 2010/2011 está estimada em 5,8 milhões de toneladas de grãos, enquanto o consumo é de pouco mais de 10 milhões de toneladas. Com as novas cultivares, têm-se condições técnicas para produzir a maior parte do trigo necessário para suprir o consumo interno (Federizzi *et al.*, 2005; Fanan *et al.*, 2006).

Entretanto, questões relacionadas à agricultura de precisão e melhores práticas de manejo ainda precisam ser mais adequadamente utilizadas. Somadas a isso, questões de alto custo de adubação ainda representam um ponto negativo na busca de atingir essa produção necessária.

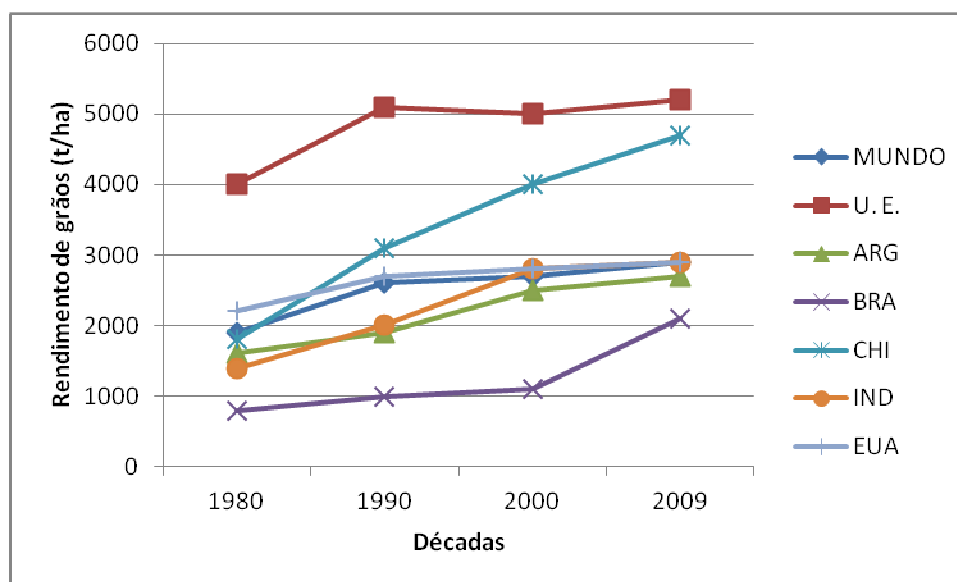


FIGURA 1. Produtividade de trigo no mundo nas últimas décadas (Adaptado de Canziani & Guimarães, 2009).

## 2.2 O fósforo no solo

O fósforo (P) presente no solo, de interesse agrônômico ou ambiental, é constituído por compostos derivados de ácido ortofosfórico e, menos comumente, de pirofosfatos. A dinâmica do P no solo está associada a fatores ambientais que controlam a atividade dos microorganismos, os quais imobilizam ou liberam os íons ortofosfato, e às propriedades físico-químicas e mineralógicas do solo. Assim, com o passar do tempo, os processos geoquímicos e biológicos transformam os fosfatos naturais em formas orgânicas e inorgânicas estáveis e transferem o P para os compartimentos do ambiente, como, por exemplo, solo, água, ar, sedimentos, biota, aquíferos e substâncias de resíduos orgânicos e inorgânicos (Santos *et al.*, 2008). O P do solo pode ser classificado em dois grandes grupos: fósforo inorgânico (Pi) e fósforo orgânico, dependendo do

composto a que está ligado. O Pi possui papel importante no metabolismo das células vegetais. Porém, é o mais inacessível macronutriente em muitos ecossistemas, limitando o crescimento das plantas (Abel *et al.*, 2002).

Devido a estas questões, busca-se criar novas cultivares que visem um melhor aproveitamento do P no solo em alguns programas de melhoramento de trigo no Brasil. Pesquisas têm demonstrado diferenças entre genótipos quanto à tolerância a baixos níveis de P, quanto à eficiência na absorção e na sua utilização e quanto à resposta à adubação fosfatada (Fohse *et al.*, 1988). Grande parte da triticultura brasileira é produzida em solos ácidos, com elevado teor de alumínio (Al) trocável ou solúvel e baixa disponibilidade de P, acarretando níveis insatisfatórios de produtividade. Experimentos em hidroponia com cultivares de trigo, centeio e triticales concluíram que houve significativa diferença no crescimento das plantas em soluções com maiores níveis de P, na presença de Al. Nestes, as cultivares de trigo apresentaram um crescimento superior às outras poáceas (Camargo & Felício, 1987).

Nos sistemas agrícolas onde a aplicação de P no solo é necessária para garantir maior produtividade, a recuperação pelas plantas do P aplicado é baixa inicialmente, porque, no solo, mais de 80% do P se torna imóvel e indisponível em razão da reabsorção, precipitação ou conversão para a forma orgânica (Holford, 1997). É importante enfatizar que entre 20% e 80% do P no solo é encontrado na forma orgânica, onde o ácido fítico é o principal componente (Richardson, 1994). Abichequer *et al* (2003) destacam que há uma interação tríplice na eficiência de translocação de P para a parte aérea de plantas de trigo. Essa interação ocorre entre a absorção, as características da cultivar e a qualidade do solo quanto aos níveis de P e de Al. A capacidade diferencial de translocação da cultivar Toropi, por exemplo, ocorre porque há uma

retenção de P nas raízes em condições de deficiência, priorizando o crescimento das raízes em relação à parte aérea (Abichequer & Bohnen, 1998).

Sabe-se que a baixa fertilidade de solos ácidos, caracterizados pela deficiência de nutrientes como P, cálcio (Ca) e magnésio (Mg) e presença de substâncias como Al e manganês (Mn) em quantidades fitotóxicas, é o principal limitante para a produção de grãos nas regiões tropical e temperada do mundo (Von Ueskull & Mutert, 1995). Somado a isso, houve aumento nos últimos anos de atividades realizadas pelo homem que contribuem para a poluição ambiental o que leva a um aumento nas chuvas ácidas (resultado da poluição industrial) e a nitrificação, após a aplicação de fertilizantes nitrogenados (Mokolobate & Haynes, 2001). Sabe-se que as chuvas ácidas afetam as plantas negativamente pela diminuição dos nutrientes no solo, deixam as plantas mais vulneráveis a ataques de doenças quando danificam suas camadas de proteção, e influenciam também, sua reprodução e germinação.

Os problemas relacionados ao aproveitamento de P nos solos ácidos ocorrem porque nesses solos há a presença de hidróxidos de ferro (Fe) e Al que possuem a habilidade de adsorver o P e deixá-lo indisponível para o uso das plantas. O mecanismo de interação Al/P é chamado de reação de adsorção-precipitação (Naidoo *et al.*, 1978). Essa interação resulta em sintomas de deficiência de P em plantas que sofrem toxidez de Al (Foy, 1988).

### **2.3 O fósforo e sua importância para as plantas**

O fósforo (P) é um importante macronutriente, responsável por cerca de 0.2% do peso seco da planta. É componente de moléculas-chave, como ácidos nucleicos, fosfolipídeos e ATP. Conseqüentemente, as plantas não podem se desenvolver sem um fornecimento adequado deste nutriente. O fósforo inorgânico (Pi) está envolvido também em reações enzimáticas e na regulação de rotas metabólicas (Theodorou &

Plaxton, 1993). Depois do nitrogênio (N), o P é o segundo mais frequente macronutriente limitante para o crescimento vegetal. Entretanto, as culturas enfrentam problemas para utilizar esse componente, principalmente pela baixa disponibilidade de P nos solos brasileiros aptos ao cultivo, o elevado custo da adubação fosfatada e a sua condição de recurso natural não renovável e escasso (Ben & Dechen, 1996). Se o consumo de P continuar similar ao atual, prevê-se a utilização completa das fontes com alta qualidade de rochas fosfatadas em 60 a 90 anos (Yuan & Liu, 2008).

Então, quando o fornecimento de  $P_i$  é limitado, as plantas desenvolvem maior número de raízes, na tentativa de aumentar a chance de capturar P do solo, há uma mobilização de P das folhas mais velhas, e uma diminuição nos estoques de P dos vacúolos. Além disso, as micorrizas colonizam mais intensamente as raízes. Quando as plantas têm um adequado fornecimento de P que é absorvido em quantidades que excedem a demanda, vários processos atuam na prevenção do acúmulo de concentrações tóxicas de P. Esses processos incluem a conversão do P em componentes orgânicos (como o ácido fítico) e a redução da captura de P de soluções externas (Lee *et al.*, 1990). Qualquer um desses processos representa estratégias importantes para a manutenção da homeostase intracelular.

Sabe-se que variedades de trigo tolerantes ao Al podem ser mais eficientes no aproveitamento de P na presença desse elemento. Diferenças entre variedades de trigo quanto à eficiência no aproveitamento ou uso de P podem estar relacionadas com o diferente grau de tolerância dessas variedades à toxidez de Al, comum nos solos onde o cereal é cultivado no Brasil. A eficiência no aproveitamento de P resulta da eficiência de absorção, de translocação e de utilização deste nutriente (Baligar & Fageria, 1999).

As reações de adsorção e precipitação são caracterizadas pela perda de um ortofosfato da solução do solo para a fase sólida. O fosfato chega até as raízes por

difusão e a sua captura é dependente das características das raízes, que podem ser capazes de explorar um maior volume de solo ou maximizar a absorção de íons de P oriundos das partículas do solo. Para uma melhor captura do nutriente a vantagem principal é ter uma maior quantidade de raízes por unidade de solo. (Manske *et al.*, 2000). Além disso, a geometria do sistema radicular e o nível de excreção de fosfatases pelas raízes são características importantes para melhorar a captura de P. Então, uma estratégia para melhorar o aproveitamento de P é elevar a atividade das fosfatases para obter ou remobilizar fosfato inorgânico de fontes orgânicas. Wang *et al.* (2009), superexpressando um gene de arabis, *AtPAP15*, em raízes de plantas de soja obtiveram uma atividade 1,5 vezes maior de fosfatases nas raízes das plantas transgênicas. Esse aumento na atividade das fosfatases acarretou significativa melhora no aproveitamento do P e rendimentos maiores de soja em solos ácidos.

Através de técnicas de proteômica, Fukuda *et al.* (2007) demonstraram, que a deficiência de P geralmente influencia o metabolismo de carbono e seus produtos finais, como a secreção de ácidos orgânicos das raízes, a acumulação de amido e as rotas para a reciclagem interna de Pi.

Projeções para 2020 apontam para um aumento de 20% na demanda por fertilizantes fosfatados em virtude do aumento na produção mundial de alimentos. Neste cenário, cultivares mais eficientes e responsivas ao fósforo são necessárias (Manske *et al.*, 2000). Entretanto, há dificuldades na seleção e melhoramento para eficiência e aproveitamento de nutrientes em razão de se definir o que é eficiência. Diversos autores descrevem a eficiência no uso de fósforo baseados em medidas de rendimento de grãos/unidade de P aplicado, rendimento de grãos por unidade de P translocado para o grão e concentração de P no grão, entre outras (Batten *et al.*, 1984; Blair, 1993).



A cultivar de trigo Toropi é caracterizada por sua tolerância à deficiência de P, sendo utilizada como genótipo doador em programas de melhoramento (Ben & Dechen, 1996; Camargo & Felício, 1987; Abichequer *et al.*, 2003; Da Silva *et al.*, 2008). Resultados de experimentos obtidos por Ben & Dechen (1996), mostraram que em solos com deficiência de P, a cultivar Toropi obteve produção equivalente a 34% da massa seca obtida na condição de suprimento desse nutriente (massa seca=100%), enquanto outros genótipos alcançaram apenas 10% da produção. Já a cultivar Anahuac é conhecida como sensível à deficiência de P (Da Silva, 2007).

#### **2.4 Estresses em plantas e a geração de espécies reativas de oxigênio**

O termo estresse em plantas normalmente gera muitas dúvidas, mas, de uma forma ampla pode ser definida como: “Uma grande variedade de fatores biológicos e ambientais que culturas agrícolas e outras plantas estão sujeitas diariamente, como frio, seca, calor, competição, exposição a substâncias em quantidades fitotóxicas ou deficiências nutricionais, insetos e doenças causadas por fungos, bactérias e vírus” (Lichtenthaler, 1996). Essa exposição a fatores biológicos impõe uma condição desfavorável aos organismos afetados, podendo levá-los a uma condição de crescimento e desenvolvimento insuficiente.

As plantas produzem as espécies reativas de oxigênio (EROs) como produtos do seu metabolismo aeróbico. Essa produção aumenta em situações de estresse aeróbico ou anaeróbico, causando danos em compartimentos celulares (Moller & Sweetlove, 2010) (Figura 2). As espécies reativas de oxigênio podem ser produzidas em reações ocorridas nas mitocôndrias, nos cloroplastos e nos peroxissomos, são extremamente reativas e citotóxicas a todos os organismos (Scandalios, 1993) e são produtos intermediários de muitas reações metabólicas.

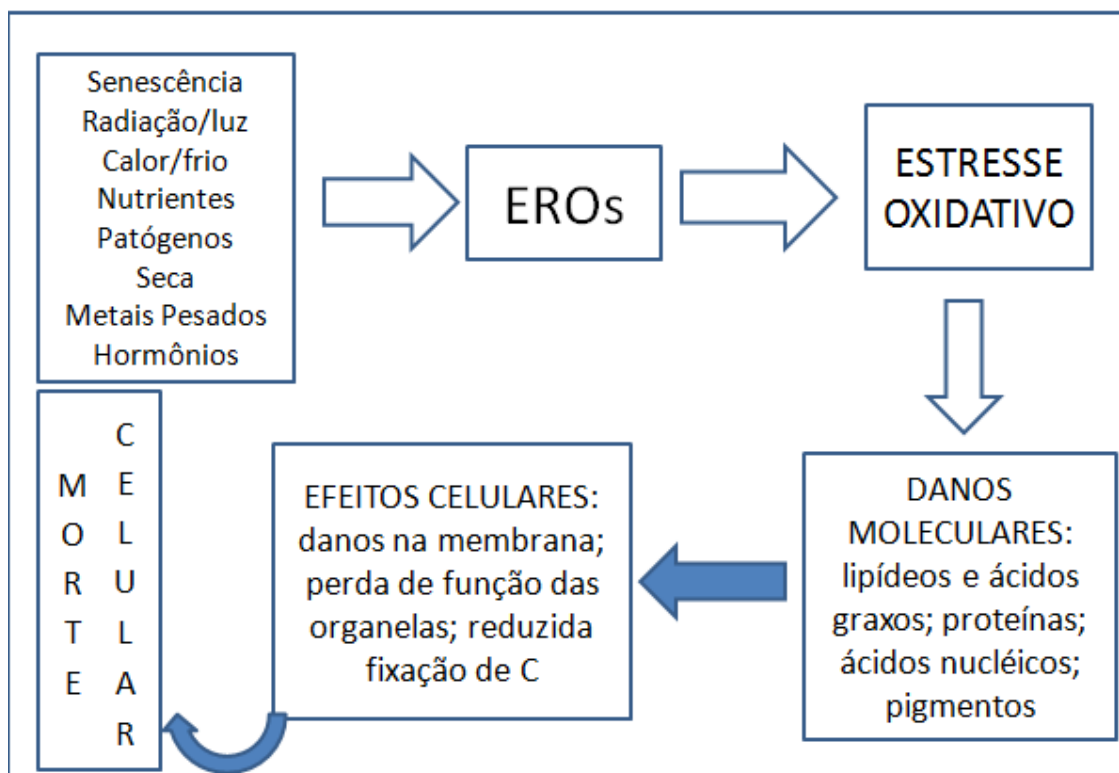


FIGURA 2. Esquema com alguns iniciadores da geração de EROs (Espécies Reativas de Oxigênio) e algumas conseqüências biológicas do estresse oxidativo que podem resultar em morte celular. Adaptado de Scandalios (2005).

O oxigênio, em seu estado natural, não é reativo, porém no metabolismo aeróbico ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio, como os superóxidos ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxil (OH) e oxigênio “singlet” ( $O_2$ ). estimando-se que 1% do consumo total de  $O_2$  de um tecido vegetal participe da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Moller, 2001). As EROs são necessárias para o desenvolvimento das plantas, mas, em elevadas concentrações, reagem com lipídeos, proteínas, pigmentos e ácidos nucleicos, causando danos às membranas e inativação de enzimas, prejudicando a viabilidade celular (Gratão *et al.*, 2005).

Um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio leva à peroxidação lipídica (Panda & Parta, 1997). As espécies reativas de oxigênio são produzidas nas células como um produto intermediário durante a redução de  $O_2$  para

H<sub>2</sub>O e degradam importantes componentes celulares por indução do estresse oxidativo (Dietz *et al.*, 1999).

Em relação à fotossíntese, há três tipos de processos que consomem O<sub>2</sub> nos cloroplastos: a redução direta do oxigênio molecular pelo transporte de elétrons do fotossistema I (PSI); a reação oxigenase da ribulose-1,5 bifosfato carboxilase-oxigenase (RUBISCO) e a clororrespiração. A ocorrência de estresses que afetam estes processos pode incrementar a formação de radicais livres. A presença de oxidases alternativas (AOX) nas mitocôndrias não permite que ocorra elevada produção de EROs durante o processo respiratório. Essas oxidases catalisam a redução tetravalente do O<sub>2</sub> por uma ubiquinona. A AOX compete com o citocromo bc<sub>1</sub> por elétrons e, assim, ajuda a reduzir EROs. A expressão de AOX é induzida pelo aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wagner, 1995; Apel & Hirt, 2004).

As plantas desenvolveram um complexo antioxidante para eliminar as espécies reativas de oxigênio, como um mecanismo de auto-proteção do ataque oxidativo. Estes complexos incluem enzimas e antioxidantes de baixo peso molecular, como glutathione, e carotenóides e outros componentes que tem um papel importante na sua sinalização nas plantas (Vranova *et al.* 2002, Koca *et al.*, 2006). Esta resposta é variável e depende do tipo de planta e do estresse envolvido (Panda & Choudhury, 2005).

As enzimas antioxidantes como, catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR), ascorbato peroxidase (APx) e superóxido dismutase (SOD) têm sido objeto de estudo em muitas espécies. A CAT tem papel importante na conversão do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigênio e está localizada nos peroxissomos, sendo também requerida para a detoxificação nas plantas (Panda & Choudhury, 2005). A detoxificação via glutathione S transferase se dá através da reação  $RX + \text{glutathione reduzida} \rightleftharpoons HX + R\text{-S-glutathione}$ , onde em RX o R pode ser grupos alifáticos,

aromáticos ou heterocíclicos e o X radicais sulfato, nitrila, halido, todos eles em qualquer combinação (Atkins *et al.*, 2003).

A alta inespecificidade permite a ação contra vários elementos tóxicos, os quais são complexados pela glutathione S-transferase. Ezaki *et al.* (2004) comprovaram o aumento da expressão de dois genes de glutathione S transferase (*AtGSTI* e *AtGSTII*) de *Arabidopsis*, induzidos por Al. Aumento da quantidade de enzimas antioxidantes, como lipoxigenase (LOX, EC 1.13.11.12) e na atividade de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD) e redução no conteúdo de ascorbato (ASC) no ápice de raízes de *Cassia tora*, foram observados em resposta ao Al (Wang & Yang, 2005). Genótipos de milho tolerantes ao Al, após 72 h de exposição ao íon, apresentaram um aumento da atividade da SOD nas raízes destas plantas. A presença do Al induziu a produção do radical superóxido o qual foi removido pela ação da SOD (Giannakoula *et al.*, 2010). Em soja e arroz, esse mesmo efeito foi observado (Cakmak & Horst, 1991; Meriga *et al.*, 2004). Estas enzimas atuam na cascata de oxidação e anulam o poder destrutivo das espécies ativas de oxigênio, preservando a integridade da célula (Noctor & Foyer, 1998).

Nem sempre a produção de EROs é negativa. As plantas podem produzir EROs como moléculas sinalizadoras, para controle de processos como mecanismo de defesa após ataque de patógenos, morte celular programada e comportamento estomatal (Apel & Hirt, 2004). De acordo com suas concentrações, poderá ocorrer um efeito sinalizador ou destrutivo de EROS (Gechev, 2006). Se ocorrer um efeito destrutivo, a severidade do estresse oxidativo depende da capacidade das plantas produzirem mecanismos de defesa (Noctor & Foyer, 1998).

Sabe-se que há uma forte relação entre a exposição a elementos tóxicos e a resposta oxidativa nas plantas. Isso se reflete na aclimatação das plantas em situações de

exposição a esses elementos. É observado um aumento na atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase ou peroxidase, e isso pode indicar que o primeiro “efeito” da exposição de plantas a metais tóxicos seja a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS). A principal função desses antioxidantes é reduzi-las ou eliminá-las (Kochian *et al.*, 2005; Naik *et al.*, 2009).

A produção de EROS nas plantas pode ser considerada um fenômeno natural. Entretanto, o estresse oxidativo representa um desbalanço na homeostase levando a uma super produção de EROS. Essa correlação entre estresses causados por quantidade de substâncias que se tornam tóxicas para as plantas já foi observada em inúmeras espécies (Naik *et al.*, 2009).

Em linhagens contrastantes de milho quanto à tolerância ao alumínio, foi observado um aumento na peroxidação da membrana lipídica acompanhada de uma diminuição da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POD) na linhagem suscetível quando exposta ao estresse causado por Al. Já nas linhagens tolerantes, as atividades de SOD e POD aumentaram e não foi observado mudanças quanto à peroxidação lipídica (Giannakoula *et al.*, 2010). Em plantas de cevada submetidas a um tratamento similar, a atividade da peroxidase também aumentou (Támas *et al.*, 2003). Esses experimentos permitem concluir que a toxicidade ao metal, no caso o alumínio, é mediada pelo estresse oxidativo e que a melhor proteção contra os danos causados provêm do aumento da atividade do sistema antioxidativo da planta.

Plantas de milho, tomate e ervilha quando submetidas a estresse salino, também tiveram aumento na atividade da SOD (Shalata *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2008; Tuna *et al.*, 2008). Em plantas de pepino, trigo e alfafa expostas a estresses por alta temperatura,

o aumento na atividade da glutathione redutase, levou à acumulação de glutathione, conferindo-as tolerância (Lee & Lee, 2000; Keles & Oncel, 2002; Vital *et al.*, 2008).

Plantas de *Arabidopsis* cultivadas em condições de baixa concentração de P acumularam baixos níveis de ascorbato quando comparadas às plantas cultivadas na suficiência de P. Sabe-se que o ácido ascórbico detoxifica as espécies reativas de oxigênio e estas, juntamente com o ácido ascórbico, estão envolvidas na regulação de processos afetados pela deficiência de P (Tyburski *et al.*, 2010).

Genótipos de canola suscetíveis e tolerantes à deficiência de P quando submetidos à essa situação apresentaram diferenças quanto à expressão de proteínas, produção de biomassa e crescimento radicular. Quanto à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), o genótipo tolerante com maior capacidade de captura de fósforo inorgânico (Pi) e maior concentração de Pi nos tecidos sentiu uma menor pressão de EROs. Por outro lado, o genótipo suscetível sentiu uma maior pressão de EROs e uma indução de lipoxigenases com função na oxidação lipídica (Yao *et al.*, 2011).

A ocorrência de severos estresses abióticos acarreta um aumento na concentração de EROs nas células vegetais, o que, em geral é prejudicial, visto que provoca o início da peroxidação e destruição de lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas (Yamaguchi & Shinozaki, 2006; Tabaldi *et al.*, 2009). Sabe-se que há diferenças quanto à função das EROs após a ocorrência de um estresse biótico, durante o mecanismo de defesa após o ataque de um patógeno, por exemplo; e um estresse abiótico. Durante o ataque de um patógeno, a indução de um receptor ativa oxidases localizadas na membrana celular ou no apoplasto que irão produzir radicais superóxidos (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), que são altamente tóxicos e podem ajudar a eliminar o patógeno invasor. Por outro lado, o superóxido é rapidamente transformado em peróxido de hidrogênio, que, em contraste com o superóxido, pode rapidamente atravessar a membrana plasmática. Então, há um

aumento nos níveis intracelulares de EROs devido não somente a sua produção extracelular, mas também pelos mecanismos intracelulares de expulsão das EROs.

Durante o estresse abiótico, as enzimas eliminam as EROs e induzem a diminuição da concentração dos níveis tóxicos de EROs intracelulares. Essa diferença nos estresses biótico e abiótico quanto ao funcionamento das EROS pode surgir pela ação de hormônios nos locais onde as EROS são produzidas ou acumuladas durante a ocorrência do estresse (Mittler *et al.*, 1999; Apel & Hirt, 2004).

O estresse oxidativo acarretado por diferentes disponibilidades de fósforo nas plantas não é objeto de muitos trabalhos. Buscou-se com este trabalho a obtenção de dados referentes a essa hipótese ainda pouco difundida.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram desenvolvidos buscando em um primeiro momento verificar se diferentes disponibilidades de P afetavam a ocorrência de estresse oxidativo em cultivares de trigo contrastantes quanto a tolerância a deficiência de fósforo, para tanto foram avaliados os danos causados as membranas via peroxidação de lipídeos. Em seguida buscou-se determinar se havia diferença na concentração de algumas espécies reativas de oxigênio. E por fim, avaliou-se a atividade de enzimas antioxidantes, bem como de outros integrantes não-enzimáticos do sistema antioxidativo.

#### **3.1 Material genético e local de condução dos experimentos**

Os genótipos de trigo utilizados foram Toropi (Frontana/Quaderna A//Petiblanco 8) e Anahuac (II 12300/Lerma Rojo), obtidos junto ao Banco de Germoplasma de Trigo, mantido pela Embrapa Trigo/CNPT – Passo Fundo, (RS). Os experimentos foram realizados nos laboratórios do Departamento de Plantas de Lavoura, da Faculdade de Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### **3.2 Cultivo do material**

As sementes dos genótipos Toropi, tolerante à deficiência de fósforo (P) e Anahuac, sensível à deficiência de P, foram desinfectadas em uma solução 4% de hipoclorito de sódio durante 3 minutos sob agitação contínua, e após, foram submetidas



a sucessivas lavagens em água destilada. Após a desinfecção, estas foram distribuídas em papel germinador e colocadas para germinar em câmaras de crescimento, na temperatura de 23°C ( $\pm$  1°C) durante 72 horas. Após esse período, por meio de corte com lâmina de bisturi, o endosperma foi removido das sementes (Figura 3). O endosperma foi removido porque contém reserva de fósforo (P) que pode influenciar as análises posteriores (Da Silva, 2007).



FIGURA 3. Retirada do endosperma de plântulas de trigo após 72 horas de germinação. A) Plântula com endosperma não retirado; B) Plântula com endosperma retirado ao lado; C) Plântula de trigo pronto para ser colocada em tratamento.

As plântulas que apresentaram tamanho semelhante de radícula (aproximadamente 3 cm) foram selecionadas e distribuídas uniformemente em telas plásticas adaptadas a recipientes plásticos com capacidade de 3L de volume (Figura 4) de solução nutritiva (Tabela 1) com pH 5,8. A solução nutritiva dos recipientes foi renovada a cada 48 horas, sendo o pH verificado em cada troca de solução, mantida sob aeração contínua e com temperatura de 21°C( $\pm$ 1°C). As plântulas foram mantidas sob luz constante. Essas plântulas foram submetidas à solução nutritiva com 4 concentrações de fósforo (0, 100, 500, 1000  $\mu$ M), sendo o fósforo adicionado na forma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , a cada 48 horas, durante 10 dias. Essas concentrações foram definidas com

base nos dados obtidos por Espíndula (2009), que observou em 1000  $\mu\text{M}$  de P, o aparecimento de uma isoforma de superóxido dismutase (SOD) não presente na ausência de P, o que poderia indicar excesso do nutriente, bem como nos dados de Da Silva (2007), que utilizou 0  $\mu\text{M}$  como concentração de deficiência, e identificou 100  $\mu\text{M}$  como condição adequada de fornecimento de P. A concentração de 500  $\mu\text{M}$  foi utilizada por ser uma concentração intermediária entre 100  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$ .

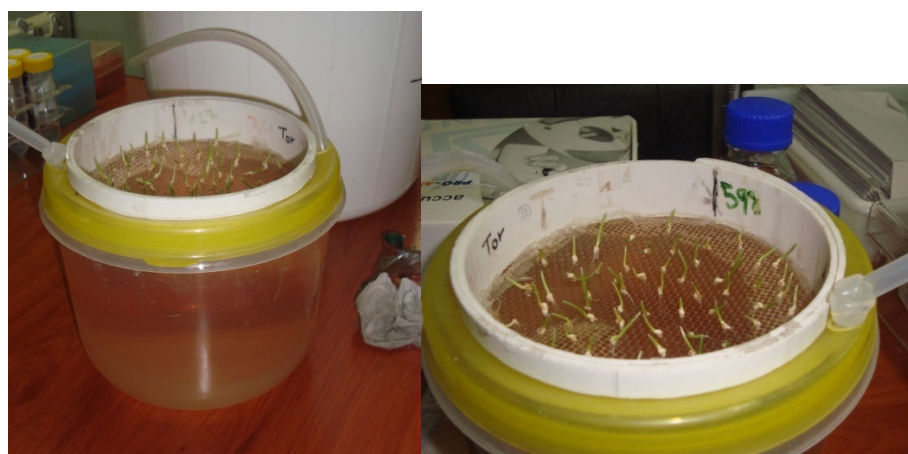


FIGURA 4. Plântulas retiradas do papel germinador e distribuídas uniformemente nos recipientes plásticos com solução nutritiva.

TABELA 1. Composição da solução nutritiva: fontes minerais usadas e concentração final.

Componente químico	Concentração final do sal (mM)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2
$\text{KNO}_3$	4
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,4
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,002
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0003
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0008
$\text{NaCl}$	0,003
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0001
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,01
GeoFe-6	0,009

Os experimentos seguiram o delineamento experimental de blocos inteiramente casualizados, com três repetições para cada tratamento.

### **3.3 Análises enzimáticas**

#### **3.3.1 Extração enzimática**

O tecido de raiz e parte aérea foi separado e pesado. A extração enzimática foi conduzida sobre o gelo. As células de trigo foram homogeneizadas (2:1 volume de tampão/ massa fresca) em mortar e pistilo, em 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) contendo 1mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 3mM de DL-ditionitroretol e 5% (m/v) de PVPP insolúvel. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 30 min e o sobrenadante estocado em alíquotas separadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para as análises enzimáticas.

#### **3.3.2 Determinação da concentração de proteína**

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

#### **3.3.3 Determinação da atividade de catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi determinada conforme proposto por Azevedo *et al.* (1998), com pequenas modificações. A atividade da CAT foi avaliada em espectrofotômetro a  $25^{\circ}\text{C}$  em uma reação composta de 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 2,5  $\mu\text{L}$  de solução a 30% (v/v) de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , preparado imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição de 25  $\mu\text{L}$  de extrato vegetal e a atividade determinada pelo monitoramento de degradação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm com amostragem de 10 em 10 segundos durante 1 minuto, contra um branco livre de

extrato vegetal. Os resultados foram corrigidos considerando o conteúdo protéico das amostras, a fim de normalizá-las.

### **3.3.4 Determinação da atividade de glutathiona redutase (GR)**

A atividade da GR foi determinada conforme Azevedo *et al.* (1998). A atividade da GR foi avaliada em espectrofotômetro a 30°C em reação composta de 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1mM de 5,5"- ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), 1mM de glutathiona oxidada (GSSG) e 0,1 mM de NADPH. A reação iniciou pela adição de 50 µL de extrato enzimático. A taxa de redução da GSSG foi acompanhada pelo monitoramento do aumento na absorvância a 412 nm durante 1 min. Os resultados foram corrigidos considerando o conteúdo protéico das amostras, a fim de normalizá-las.

### **3.3.5 Determinação da atividade de ascorbato peroxidase (APX)**

A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano e Asana (1981), pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato via leitura da absorção a 290 nm, na temperatura de 30°C. O meio de reação foi composto de tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 7,0), 5 mM de ascorbato, 1 mM de EDTA, 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 50 µL de extrato enzimático, em um volume total de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição da solução contendo ascorbato, previamente preparada. O decréscimo na absorvância foi monitorado a partir de 10 até 60 s do início da reação. Os resultados foram corrigidos considerando o conteúdo protéico das amostras, a fim de normalizá-las.

## **3.4 Análises de estresse oxidativo**

### **3.4.1 Estimativa da peroxidação de lipídeos (Técnica TBARS)**

Para a estimativa da peroxidação lipídica, utilizou-se a técnica descrita por El-Mosahaty *et al.* (1993). Amostras de 0,8 g de raízes e de parte aérea foram trituradas separadamente, em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 8 ml de tampão fosfato de

citrato 0,2 mM (pH 6,5) com adição de Triton 0,5%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20.000 g durante 15 minutos a 4°C. Alíquotas de 1 ml dos sobrenadantes foram adicionadas a 1 ml de uma solução de ácido tiobartúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v). Os tubos de ensaio foram cobertos com bolitas de vidro a fim de evitar evaporação e as amostras foram incubadas em banho-maria a 95°C durante 40 min. Após o período de incubação, a reação foi paralisada, transferindo-se os tubos de ensaio para banho de gelo durante 15 min. Posteriormente, foram centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos e a absorbância dos sobrenadantes determinada a 532 nm. A absorbância inespecífica a 600 nm foi medida e subtraída das amostras. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi calculada usando o fator de correção estimado a partir da curva de MDA.

#### **3.4.2 Quantificação de peróxido de hidrogênio**

Para quantificação do peróxido de hidrogênio utilizou-se o método descrito por Loreto & Velikova (2001). Amostras de 0,25 g de raízes e de parte aérea, separadamente, foram trituradas em nitrogênio líquido e, então, homogeneizadas em 5 ml de TCA 0,1%. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g, por 15 min, a 4°C, coletando-se o sobrenadante. Alíquotas de 500 µL do sobrenadante foram adicionadas a um meio de reação constituído de 0,5 ml de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e 1 ml de KI 1M. A leitura de absorbância foi determinada a 390 nm. O branco foi preparado em paralelo e subtraído da amostra. As concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas amostras foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizando um fator fixo de 0,54.

#### **3.4.3 Avaliação do teor de superóxido**

Para a detecção do teor de superóxido utilizou-se o método baseado na redução do “nitro blue tetrazolium” (NBT) (Doke, 1983). Aproximadamente 100 mg de parte

aérea de plântulas de trigo foram cortadas em fragmentos de 1mm x 1mm e imersos em tampão K-fosfato 10 mM ( pH 7.8) contendo 0.05% (w/v) NBT e 10mM de nitrato de sódio (NaN<sub>3</sub>), mantidos por 1 hora em temperatura ambiente. Após esse período, 2 mL da solução foram aquecidos a 85°C por 15 minutos e resfriados rapidamente (gelo). A densidade ótica foi medida no comprimento de onda de 580 nm e o conteúdo de superóxido expresso como A<sub>580</sub>g<sup>-1</sup> PF (aumento da absorbância a cada grama de peso fresco (Kubis, 2008).

#### **3.4.4 Extração de clorofila e carotenóides**

Para extração de clorofila e carotenóides, utilizou-se o método de extração de clorofila sem maceração proposto por Hiscox & Israelstam (1979). Amostras de 0,07 g de parte aérea foram transferidas para tubos de vidros graduados, incubados com 5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) em banho-maria a 65°C por 30 min até o branqueamento das folhas. Os tubos foram cobertos com bolitas de vidro para evitar evaporação. Em seguida, os tubos foram retirados do banho-maria e o volume completado para 7 ml de DMSO. O sobrenadante transferido para espectrofotômetro e a leitura procedeu-se nos comprimentos de ondas a 645, 663 e 471 nm. Os teores de clorofilas e carotenóides (mg/g de peso fresco) foram mensurados a partir das seguintes fórmulas:

$$\text{Clorofila a (mg/g PF)} = \{[(11,75 \times A_{663}) - (2,35 \times A_{645})] \times 50\} / 500$$

$$\text{Clorofila b (mg/g PF)} = \{[(18,61 \times A_{645}) - (3,96 \times A_{663})] \times 50\} / 500$$

$$\text{Carotenóides (mg/g PF)} = \{[(1000 \times A_{470}) - (2,27 \times \text{Conc.Clor.a}) - (81,4 \times \text{Conc.Clor.b})] / 227 \times 50\} / 500$$

#### **3.4.5 Determinação de Ácido Ascórbico (AsA) e de tióis não-protéicos (NPSH)**

Foi homogeneizado 1g de tecido em uma solução contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) (1:5). As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min e, em seguida

foi adicionado ao sobrenadante ácido tricloroacético (TCA) 10% na proporção 1:1 (v:v), seguindo para uma nova centrifugação a 3000rpm durante 10 minutos para remoção de proteínas.

A determinação do ácido ascórbico foi realizada conforme descrito por Jacques-Silva *et al.*(2001). Alíquotas de 300 $\mu$ L foram incubadas à 37°C em um meio contendo 100 $\mu$ L de TCA 13,3%, 100 $\mu$ L de água deionizada e 75 $\mu$ L de IL 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). A solução de DNPH foi composta por: 0,23% tiuréia, 0,27% CuSO<sub>4</sub> diluída em 49% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Após 3h, adicionou-se 500 $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 65% às amostras e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro à 520 nm.

A concentração de tióis não-protéicos foi mensurada a partir de alíquotas contendo 400 $\mu$ L de amostra, 550 $\mu$ L de tampão fosfato de potássio 1 $\mu$  (pH 7,4) e 50 $\mu$ L de DTNB. A absorbância foi quantificada à 412 nm. Para o cálculo da concentração do grupo de tióis não protéicos, foi utilizado o valor de uma curva de cisteína (Tabaldi *et al.*, 2009).

### **3.5 Análise estatística**

Os experimentos foram elaborados segundo o delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a análise da variância e a comparação entre as médias foi realizada pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todos os testes estatísticos foram realizados com o programa SAS (*Statistical Analysis System*).

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Metabolismo antioxidativo**

O metabolismo antioxidativo foi avaliado na parte aérea e nas raízes dos genótipos Toropi (tolerante) e Anahuac (sensível à deficiência de P) em diferentes disponibilidades de P. A disponibilidade de P e o genótipo interferiram significativamente nos níveis de peroxidação lipídica (TBARS), atividade de catalase (CAT) e teores de clorofila B. A interação tríplice (tecido, dose de P e genótipo) não foi significativa para as características avaliadas (Tabela 2). A dose de P mostrou interferência significativa nos teores de peroxidação lipídica, conteúdo de ácido ascórbico, atividade de glutathione redutase e teor de clorofila B. O tecido vegetal (raiz ou parte aérea) mostrou interferência significativa para as mesmas características, enquanto o genótipo (Toropi ou Anahuac) afetou a peroxidação lipídica, o conteúdo de tióis não protéicos e de ácido ascórbico e a atividade da glutathione redutase B (Tabela 2).



TABELA 2. Análise de variância, com valores de probabilidade determinados para o efeito dos fatores: dose de fósforo, órgão e genótipo.

Causas da Variação	Pr>F											
	GL	TBARS	TIÓIS	AsA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	CAT	APX	GR	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	CAROT.	CLOR.B	CLOR.A
Dose de P	3	*	NS	*	NS	NS	NS	*	NS	NS	*	NS
Tecido Vegetal	1	**	NS	**	NS	NS	NS	**	-	-	-	-
Genótipo	1	**	*	*	NS	NS	NS	**	*	NS	NS	NS
Dose P x Tecido	3	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	-	-	-	-
Tecido x Genótipo	1	**	NS	NS	NS	NS	NS	**	-	-	-	-
Genótipo x Dose P	3	**	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	*	NS
Tecido x Dose P x Genótipo	3	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-	-	-	-
C. V. (%)		21,5	20,9	17,5	36,6	22,8	28,0	4,3	56,9	16,7	10,6	37,48

AsA: Ácido ascórbico; CAT: Catalase; APX: Ascorbato peroxidase; GR: Glutaciona redutase; O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Superóxido; ClorA: Clorofila A; ClorB: Clorofila B; Carot.: Carotenóides.

CV: Coeficiente de variação. Foi aplicado o teste Tukey.

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade.

- : Não determinado

NS: Não significativo

Houve correlação negativa (Tabela 3) entre a peroxidação de lipídeos (TBARS) e os níveis de ácido ascórbico e positiva com os teores de superóxido. Já os níveis de ácido ascórbico correlacionaram-se negativamente com a atividade da enzima glutaciona redutase. O teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> correlacionou-se positivamente com os teores de clorofila A. Houve correlação positiva entre as enzimas GR e CAT. Os níveis de carotenóides correlacionaram-se com os níveis de peroxidação de lipídeos e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A clorofila A correlacionou-se positivamente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O teor de carotenóides correlacionou-se positivamente com os teores de ambas as clorofilas, mas mais intensamente com a clorofila B.

TABELA 3. Coeficientes de correlação entre as diferentes análises relacionadas ao metabolismo antioxidativo e pigmentos cloroplastídicos nos genótipos de trigo Toropi e Anahuac.

				Pr>F					
	TBARS	AsA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	CAT	ClorA	ClorB	GR	CAROT
TBARS	-	-0,34* <sub>48</sub>	0,16 <sup>NS</sup> <sub>48</sub>	0,44* <sub>24</sub>	0,19 <sup>NS</sup> <sub>48</sub>	0,02 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,31 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,12 <sup>NS</sup> <sub>48</sub>	0,29 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>
AsA	-0,33* <sub>48</sub>	-	0,15 <sup>NS</sup> <sub>48</sub>	0,23 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,08 <sup>NS</sup> <sub>48</sub>	0,05 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,27 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,42** <sub>48</sub>	-0,12 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,16 <sup>NS</sup> <sub>48</sub>	0,15 <sup>NS</sup> <sub>48</sub>	-	0,12 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,17 <sup>NS</sup> <sub>48</sub>	0,46* <sub>24</sub>	0,16 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,19 <sup>NS</sup> <sub>48</sub>	0,15 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0,44* <sub>24</sub>	0,23 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,12 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	-	0,10 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,06 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,08 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,33 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	-0,04 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>
CAT	0,19 <sup>NS</sup> <sub>48</sub>	0,08 <sup>NS</sup> <sub>48</sub>	0,17 <sup>NS</sup> <sub>48</sub>	0,10 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	-	0,21 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,11 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,12 <sup>NS</sup> <sub>48</sub>	0,06 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>
ClorA	0,02 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,05 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,46* <sub>24</sub>	0,06 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,21 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	-	0,38 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,17 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,48* <sub>24</sub>
ClorB	0,30 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,26 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,16 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,08 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,11 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,38 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	-	0,03 <sup>NS</sup> <sub>24</sub>	0,84** <sub>24</sub>

AsA: Ácido ascórbico; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio; O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Superóxido; CAT: Catalase; ClorA: Clorofila A; ClorB: Clorofila B; GR: Glutathione redutase; Carot: Carotenóides.

\*: significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* : significativo ao nível de 1% de probabilidade.

NS: Não significativo

Obs: Números subscritos representam a quantidade de valores utilizados na análise de correlação.

#### 4.1.1 Análises enzimáticas

##### 4.1.1.1 Atividade da enzima catalase (CAT)

O genótipo Anahuac apresentou diferença significativa na atividade da CAT entre doses de P na parte aérea; sendo a maior atividade obtida na dose 100 µM e a menor em 1000 µM de P. Já para Toropi, não houve efeito significativo das doses de fósforo na atividade desta enzima nas raízes e parte aérea das plântulas. Comparando dentro das doses, apenas a dose 100 µM foi diferente entre as cultivares na parte aérea, sendo a atividade do genótipo Anahuac superior à Toropi.

##### 4.1.1.2 Atividade da enzima glutathione redutase (GR)

Quanto à enzima GR, entre as cultivares, foram observadas diferenças significativas na parte aérea das plântulas submetidas aos tratamentos de 100 µM e 1000 µM de P e nas raízes para todas as doses. Comparando dentro da cultivar, observou-se diferença na parte aérea e nas raízes de Toropi entre as 4 doses de P, havendo um aumento da atividade com o aumento dos níveis de P na folha e na raiz. Este aumento

ocorreu até 500  $\mu\text{M}$  de P (Figura 6). Não foi observada diferença significativa entre as doses de P no genótipo Anahuac. No entanto, quando comparados os genótipos dentro das doses, observou-se que Anahuac na parte aérea apresentou atividade de GR mais elevada que Toropi, em 100  $\mu\text{M}$  P.

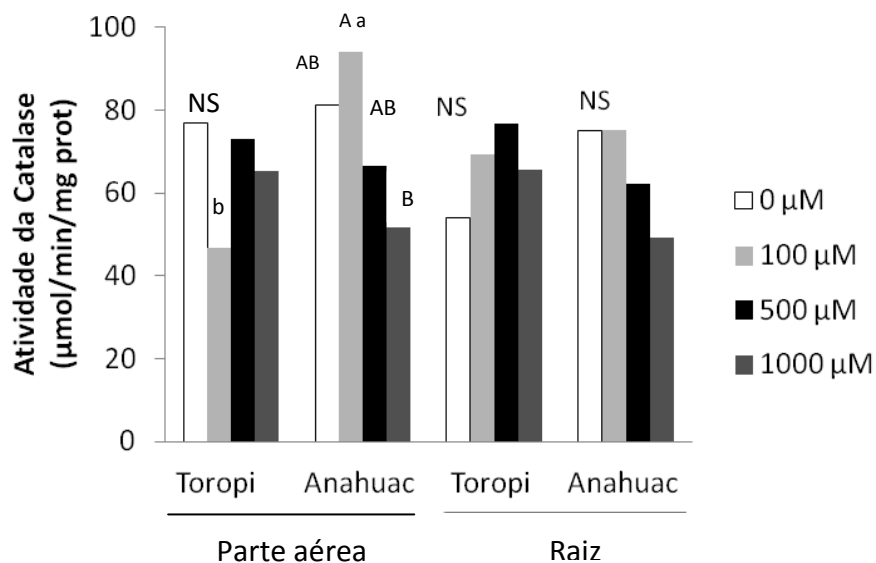


FIGURA 5. Atividade da enzima catalase nas raízes e na parte aérea de plântulas de trigo dos genótipos Toropi e Anahuac submetidas a diferentes concentrações de fósforo (P) durante dez dias. Letras maiúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão e letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo órgão e dose, pelo teste de Tukey ao nível de 5%. NS: diferença não significativa.

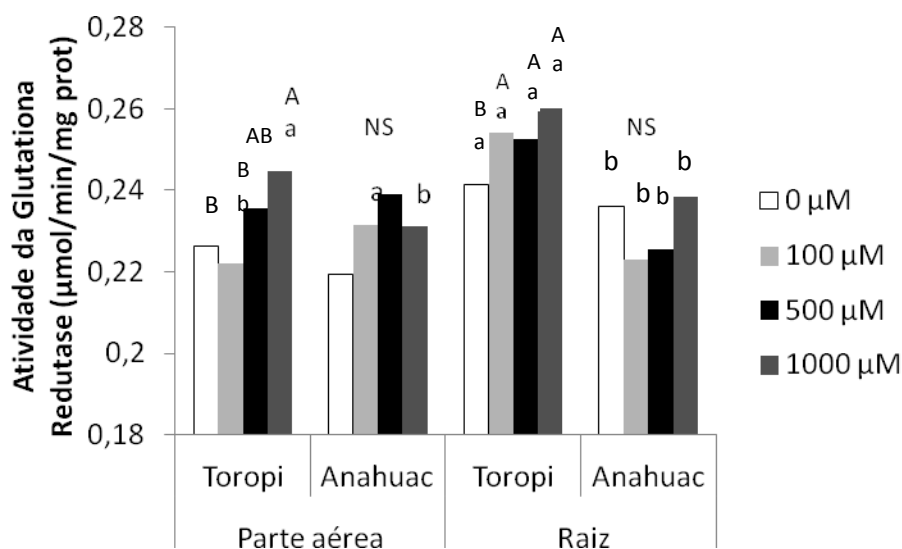


FIGURA 6. Atividade da enzima glutationa redutase nas raízes e na parte aérea de plântulas de trigo dos genótipos Toropi e Anahuac submetidas a diferentes concentrações de fósforo (P) durante dez dias. Letras maiúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão e letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo órgão e dose, pelo teste de Tukey ao nível de 5%. NS: diferença não significativa.

#### 4.1.1.3 Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX)

Não foi observado efeito significativo das doses de P sobre a atividade desta enzima na parte aérea, nem nas raízes de ambos os genótipos (Figura 7).

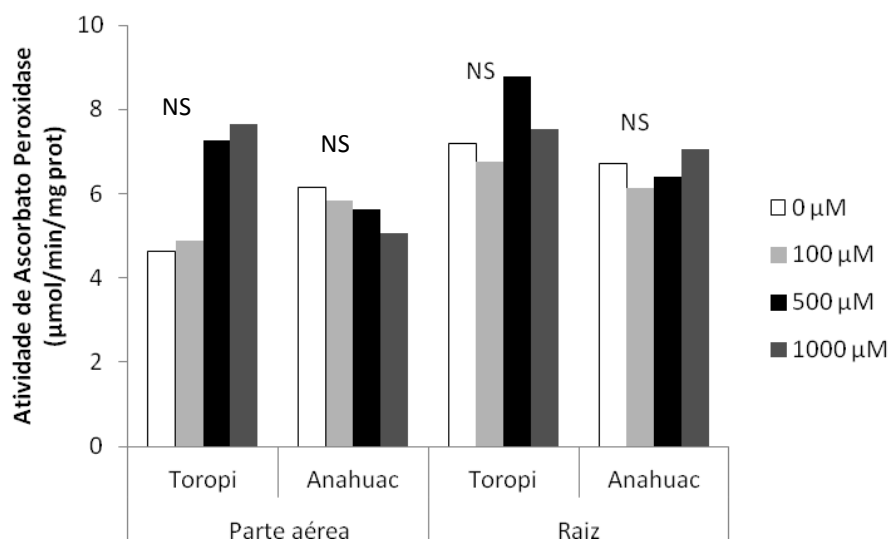


FIGURA 7. Atividade da enzima ascorbato peroxidase nas raízes e na parte aérea de plântulas de trigo dos genótipos Toropi e Anahuac submetidas a diferentes concentrações de fósforo (P) durante dez dias. NS: diferença não significativa.

#### 4.1.2 Análises de estresse oxidativo

##### 4.1.2.1 Peroxidação de lipídeos (TBARS)

A peroxidação de lipídeos foi acessada avaliando-se os níveis de malonaldeído (MDA). Nas raízes do genótipo Toropi, o nível de peroxidação de lipídeos permaneceu similar, independente da disponibilidade de P. Na parte aérea da cultivar Toropi, por outro lado, observou-se redução da peroxidação de lipídeos nas concentrações intermediárias e não foi observada diferença entre os extremos (Figura 8). O genótipo Anahuac apresentou redução dos níveis de MDA com a diminuição dos níveis de P na raiz e parte aérea. Os níveis de MDA foram superiores na parte aérea de Toropi.

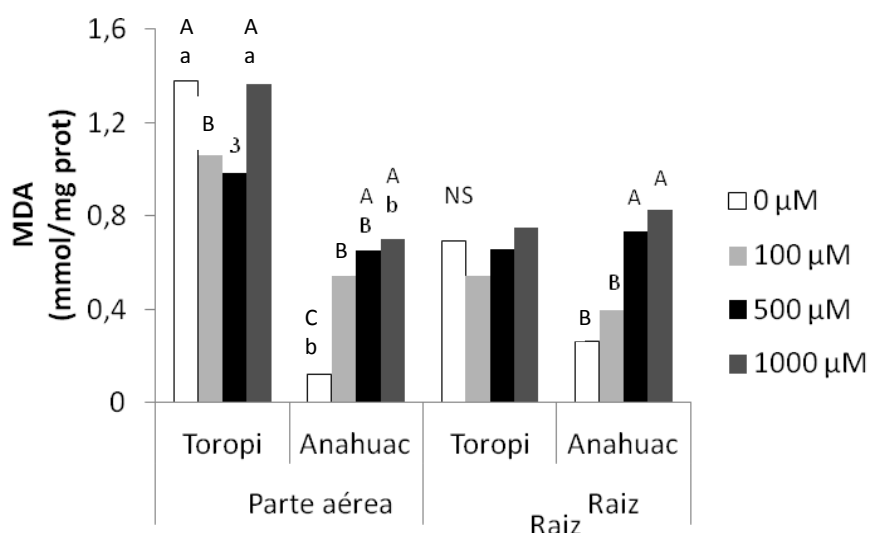


FIGURA 8. Efeito de diferentes concentrações de fósforo (P) nos níveis de malonaldeído (MDA) nas raízes e parte aérea de plântulas dos genótipos Toropi e Anahuac. Letras maiúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão e letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo órgão e dose, pelo teste de Tukey ao nível de 5%. NS: diferença não significativa.

##### 4.1.2.2 Teor de Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Não se observou incremento significativo do teor de peróxido de hidrogênio nas duas cultivares em resposta a disponibilidade de P tanto na raiz quanto na parte aérea (Figura 9).

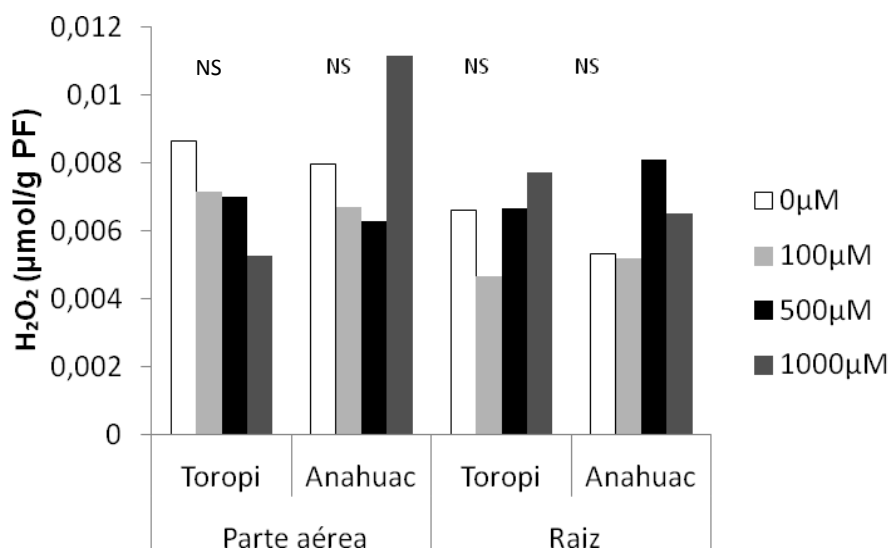


FIGURA 9. Efeito de concentrações de fósforo (P) na produção de peróxido de hidrogênio nas raízes e parte aérea de plântulas dos genótipos Toropi e Anahuac. NS: diferença não significativa.

#### 4.1.2.3 Avaliação do teor de superóxido

Quanto ao teor de superóxido (Figura 10), houve efeito apenas de cultivar. O genótipo Toropi apresentou, de forma geral, maior teor do que Anahuac, mostrando diferença significativa entre as duas cultivares. Na concentração 100 µM de P, pode-se observar uma maior diferença entre os dois genótipos.

#### 4.1.2.4 Atividade não enzimática: Pigmentos Cloroplastídicos

O conteúdo de carotenóides não apresentou diferenças significativas entre as cultivares nem entre as doses de P (Figura 11).

Os teores de clorofila B foram maiores na alta disponibilidade de P em Anahuac, enquanto que em Toropi, o maior conteúdo foi observado com 500 µM de P (Figura 12). Os teores de clorofila B foram similares aos teores de carotenóides. Houve diferença significativa entre cultivares apenas na dose de 500 µM de P, quando Toropi apresentou maior teor de clorofila B que Anahuac.

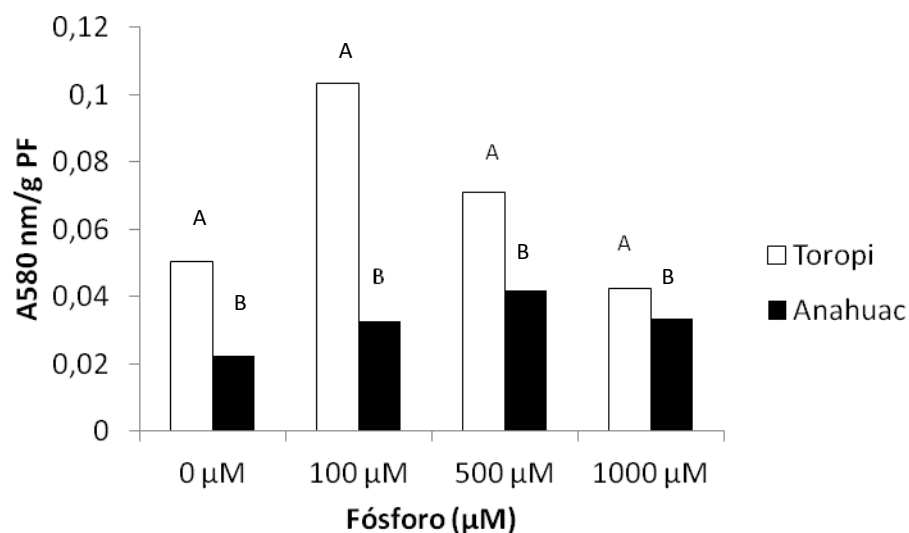


FIGURA 10. Efeito de diferentes concentrações de fósforo (P) no teor de superóxido na parte aérea de plântulas dos genótipos Toropi e Anahuac, submetidas ao estresse por diferentes concentrações de fósforo (P) durante dez dias. Letras maiúsculas comparam doses dentro de genótipos, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

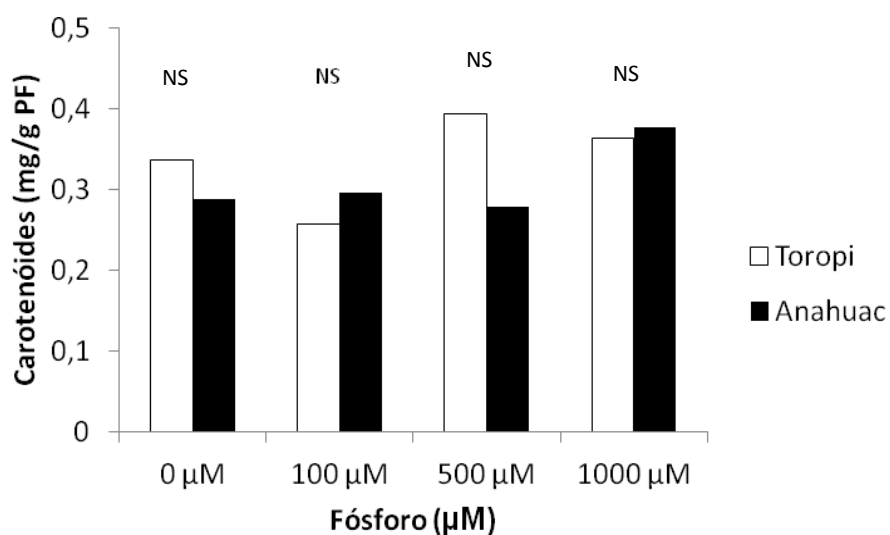


FIGURA 11. Conteúdo de carotenóides na parte aérea de plântulas de trigo dos genótipos Toropi e Anahuac submetidas ao estresse por diferentes concentrações de fósforo (P) durante dez dias. NS: não significativo.

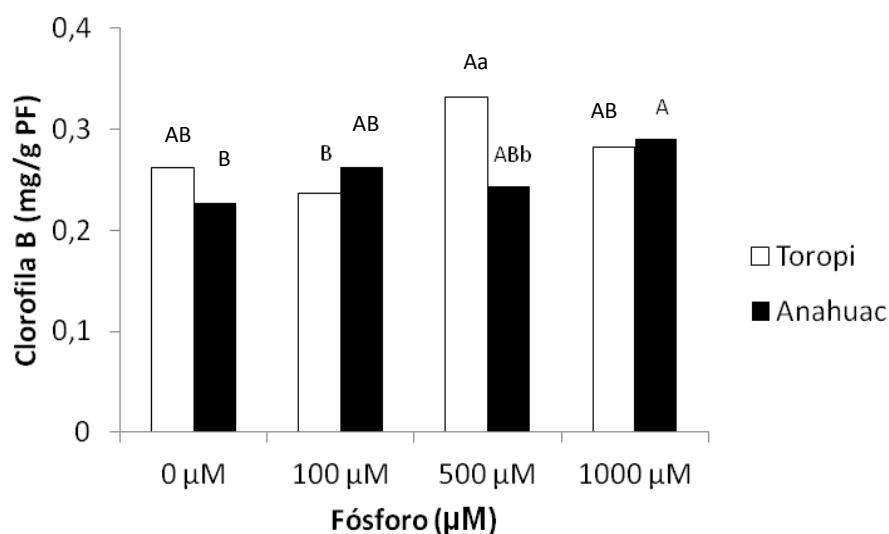


FIGURA 12. Conteúdo de clorofila B na parte aérea de plântulas de trigo dos genótipos Toropi e Anahuac submetidas a diferentes tratamentos de fósforo (P) durante dez dias. Letras maiúsculas comparam doses dentro de genótipos e letras minúsculas comparam entre genótipos dentro da dose, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

O conteúdo de clorofila A foi cerca de três vezes superior que o conteúdo de clorofila B. O conteúdo de clorofila A não apresentou diferenças significativas, sendo constante para as duas cultivares nas diferentes doses.

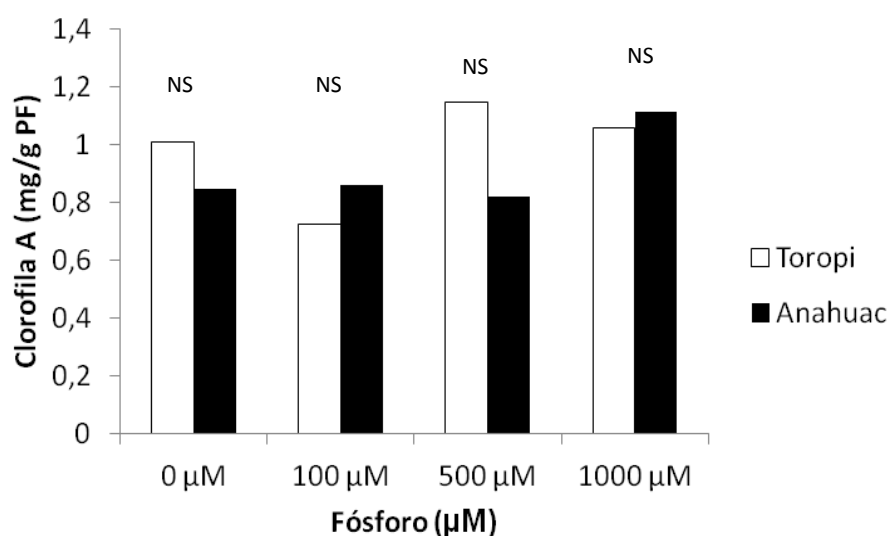


FIGURA 13. Conteúdo de clorofila A nas folhas de plântulas de trigo dos genótipos Toropi e Anahuac submetidas a diferentes tratamentos de fósforo (P) durante dez dias. NS: não significativo.



#### 4.1.2.5 Conteúdo de ácido ascórbico (AsA) e tióis não protéicos (NPSH)

O conteúdo de ácido ascórbico (Asa) foi superior nas raízes em comparação à parte aérea (Figura 14). Isso foi observado para ambos os genótipos. Independentemente da parte da plântula analisada, para a cultivar Anahuac não foi observado efeito significativo das doses de P na produção de AsA. Já Toropi apresentou diferença na produção de AsA nas raízes e parte aérea entre as diferentes concentrações de P. Nas raízes de Toropi, a maior quantidade de AsA foi observada na ausência de P e a menor em 1000  $\mu\text{M}$  de P.

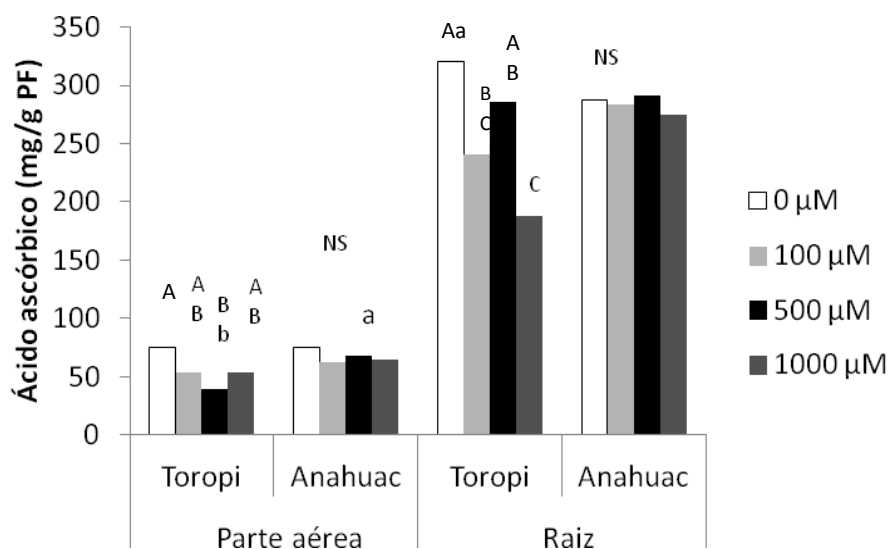


FIGURA 14. Efeito de diferentes tratamentos de fósforo (P) na concentração de ácido ascórbico nas raízes e na parte aérea de plântulas de trigo dos genótipos Toropi e Anahuac. Letras maiúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão e letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo órgão e dose, pelo teste de Tukey ao nível de 5%. NS: diferença não significativa.

Com o aumento das concentrações de fósforo não foram observadas diferenças em relação ao conteúdo de tióis não protéicos nos dois genótipos. Toropi e Anahuac mantêm o mesmo padrão de quantidade de produção de tióis não protéicos quando as concentrações são comparadas (Figura 15).

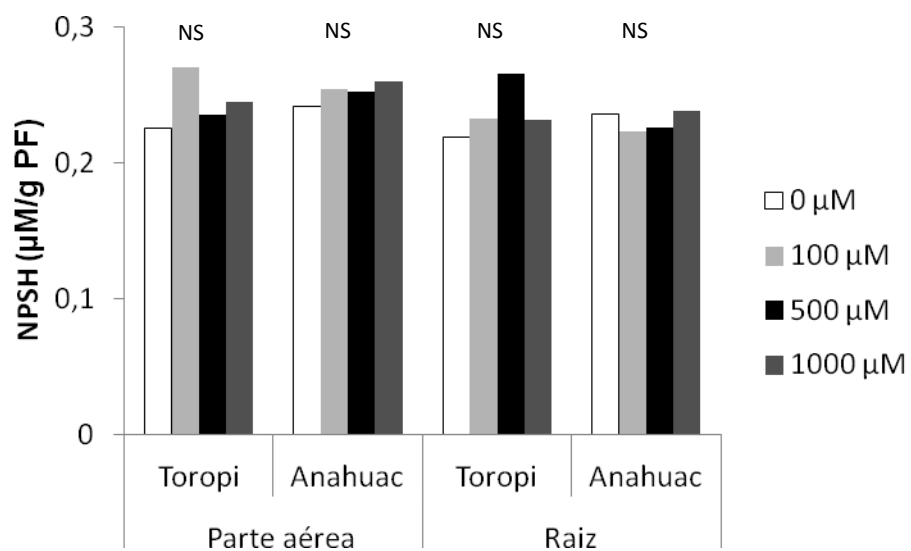


FIGURA15. Efeito de diferentes concentrações de fósforo (P) no conteúdo de tióis não protéicos (NPSH) nas raízes e parte aérea dos genótipos Toropi e Anahuac. NS: diferença não significativa.

## 5 DISCUSSÃO

Estresses abióticos, tais como seca, salinidade, temperaturas extremas, toxicidade química, limitação nutricional e estresse oxidativo acarretam uma série de mudanças morfológicas, fisiológicas e moleculares nas plantas. Essas mudanças afetam o crescimento e a produtividade das culturas (Javadian *et al.*, 2010). Entre as limitações nutricionais, a de fósforo (P) torna-se principalmente importante ao se considerar as interações deste nutriente com outros elementos do solo, como o alumínio, o que resulta em redução da capacidade de aproveitamento do P presente no solo pelas plantas (Baligar & Fageria, 1999).

Estratégias para um melhor aproveitamento de fósforo do solo têm sido utilizadas em alguns programas de melhoramento de trigo. A cultivar de trigo Toropi é considerada tolerante à deficiência de P, com maior habilidade de absorção e utilização de P, sendo utilizada como fonte melhoradora (Ben & Rosa, 1983; Camargo & Felício, 1987; Abichequer & Bohnen, 1998; Abichequer *et al.*, 2003; Camargo *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*, 2008; Espíndula, 2009), enquanto que a cultivar Anahuac é considerada sensível à deficiência de fósforo.

Apesar de consequência comum à vida aeróbia, uma resposta comum a ocorrência de estresses é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Cakman & Horst, 1991). Em trigo, alterações na ocorrência destes, bem como nos níveis de

atividade de enzimas antioxidantes, têm sido observadas em resposta a estresses, tais como níquel (Yusuf *et al.*, 2011), cádmio (Moussa & Gamal, 2010), salinidade (Sairam *et al.*, 2002) e frio (Javadian *et al.*, 2010).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são responsáveis por induzir danos às macromoléculas e às estruturas celulares. Com isso, o papel das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutathione redutase (GR) e catalase (CAT) e metabólitos como ácido ascórbico (AsA), carotenóides e flavonóides, que são responsáveis por extinguir as EROs, se tornou importante (Sairam *et al.*, 2002). O papel dos antioxidantes que atuam no mecanismo enzimático de defesa nas plantas é minimizar os possíveis danos causados por agentes bióticos e abióticos.

As plantas desenvolveram diversos mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos para lidar com o estresse oxidativo. Estes incluem peroxidases, superóxido dismutases, catalases, glutathione redutases e outros antioxidantes com baixo peso molecular como o ácido ascórbico, glutathione e carotenóides (Miller *et al.*, 2008; Mittler *et al.*, 2004; Noctor *et al.*, 2002). Portanto, a atividade de algumas destas enzimas foram avaliadas buscando verificar o efeito da disponibilidade de P (limitação ou excesso) sobre estas.

Foi observada correlação positiva entre a peroxidação de lipídeos e os níveis de peróxido de hidrogênio, clorofila B e carotenóides (Tabela 3). O aumento da peroxidação de lipídeos é esperado quando há incremento nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma vez que as ligações duplas presentes nos ácidos graxos insaturados dos lipídeos são excelentes alvos para a ação de espécies reativas (Nordberg & Arnér, 2001). O aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode gerar a formação de aldeídos derivados da peroxidação de lipídeos, os quais iniciam uma reação em cadeia, aumentando a quantidade de lipídeos peroxidados (Yin *et al.*, 2010b). Por outro lado, houve correlação negativa com as enzimas GR e

CAT e com o antioxidante ácido ascórbico (AsA), o que sugere que a ação destes foi eficiente em reduzir o dano causado por EROs.

A peroxidação de lipídeos foi avaliada através da medição dos níveis de malonaldeído (MDA). O MDA é o produto final da peroxidação lipídica e a sua quantidade pode ser usada como uma medida da peroxidação. O MDA pode ser prejudicial para as plantas. Geralmente sua quantidade muda em resposta a estresses abióticos, principalmente em relação à temperatura (Hendry *et al.*, 1993; McDonald, 1999; Mei & Song, 2010).

Na cultivar sensível à limitação de P, Anahuac, os níveis de MDA aumentaram com a elevação da dose de P (Figura 8). Já Toropi não mostrou diferença nas raízes sob diversas doses de P. É sabido que a limitação de P causa crescimento determinado da raiz, ou seja, induz a diferenciação do meristema radicular, além de afetar o alongamento das células (Delatorre *et al.*, 2004; Sanchez-Calderon *et al.*, 2005; Sanchez-Calderon *et al.*, 2006; Silva & Delatorre, 2009). Recentemente, foi sugerido que a inibição da divisão celular e a redução do crescimento celular na zona de alongamento da raiz são acompanhadas por uma eliminação no padrão típico de distribuição de EROs (Tyburski *et al.*, 2010). O padrão típico de distribuição de EROs possui duas áreas de produção, o centro quiescente e a zona de alongamento (Jiang *et al.*, 2003; Liskay *et al.*, 2004). No centro quiescente, EROs seriam necessárias para manter a baixa taxa de divisão celular e, na zona de alongamento, para aumentar a extensibilidade da parede celular. Assim, é possível que menor ocorrência de EROs nas raízes em Anahuac sob ausência de P relacione-se ao menor crescimento da raiz. Das principais EROs, apenas peróxido de hidrogênio foi avaliado neste experimento nas raízes, não sendo observada diferença significativa entre as doses de P. Entretanto, na

ausência de P, Toropi apresentou teores mais elevados desta espécie reativa de oxigênio que Anahuac.

Por outro lado, na parte aérea, Toropi apresentou maior quantidade de MDA tanto na ausência quanto em 1000  $\mu\text{M}$  P. Ressalta-se que houve significativa variação entre amostras na parte aérea de Toropi. Os teores de superóxido foram superiores em Toropi na parte aérea.

A atividade da GR contribui para uma maior remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a partir da glutathiona reduzida (GSH) aumentando a tolerância a estresses abióticos (Szalai *et al.*, 2009). A GR tem papel essencial nas células de defesa contra as espécies reativas de oxigênio porque sustenta o *status* reduzido da glutathiona, um importante antioxidante (Seo *et al.*, 2006). A glutathiona é um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina. Suas propriedades antioxidativas são devido ao grupo thiol presente no seu resíduo de cisteína. A glutathiona também ancora metais de transição, especialmente cobre e atua como primeira linha na defesa antioxidante prevenindo a formação de espécies reativas de oxigênio (Halliwell & Gutteridge, 1999; Netto, 2001).

Neste trabalho, foi observado efeito positivo na atividade da GR, com o aumento na dose de P para a cultivar Toropi (Figura 6). Na parte aérea, Anahuac, de modo geral, apresentou menor atividade de GR que Toropi. E Toropi, incrementou a atividade de forma significativa com o aumento das doses de P. Espíndula (2009) trabalhando com os mesmos genótipos (Toropi e Anahuac) observou que em 1000  $\mu\text{M}$  de fósforo (P), a atividade da GR aumentava com o passar do tempo (entre 24 e 240 horas) sendo inferior na ausência total de P, sugerindo que a presença do P acarreta maior produção de radicais livres, o que contribui para uma maior atividade da GR. A presença, em 1000  $\mu\text{M}$  de P, em ambos os genótipos, de uma isoforma de SOD não presente na ausência de

P, também sugere aumento na produção de radicais livres em altas concentrações de P (Espíndula, 2009).

Outra enzima envolvida na redução de espécies reativas é a catalase (CAT). Sabe-se que a CAT elimina o  $H_2O_2$ , quebrando-o diretamente em  $H_2O$  e  $O_2$  e o aumento na sua atividade está relacionado com o aumento na tolerância ao estresse. Foram identificadas três classes de CAT nas plantas: 1. mais comum nos tecidos fotossintéticos e envolvida na remoção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), produzida durante a fotorrespiração; 2. Produzida nos tecidos vasculares e pode ter função na lignificação e 3. Presente nas sementes e plantas jovens e sua atividade está relacionada com a remoção do excesso de  $H_2O_2$  produzido durante a degradação dos ácidos graxos no ciclo do glioxilato nos glioxissomos (Willekens *et al.*, 1994).

As doses de P interferiram significativamente somente nas folhas das plântulas de Anahuac quanto à atividade da catalase. Nas maiores concentrações de P, o genótipo Anahuac mostrou menor produção da enzima na comparação dentro do genótipo e com Toropi. Espíndula (2009) mostrou que, na ausência ou presença de P no genótipo Toropi, a produção da catalase após 240 horas não se modificou. Isso pode sugerir a maior resistência deste genótipo à deficiência de P. Nas raízes e no genótipo Toropi, a dose de P não mostrou um efeito significativo sobre a atividade da catalase. De forma similar, diferentes genótipos de trigo expostos a tratamentos relacionados à disponibilidade hídrica apresentaram diferenças quanto à atividade enzimática da CAT. Entretanto, observou-se um aumento nessa atividade quando as plantas foram submetidas a um nível médio de irrigação (Hameed *et al.*, 2011), indicando que a resposta oxidativa a determinado recurso pode não ser linear.

A ascorbato peroxidase (APX) é a principal peroxidase que atua na remoção do peróxido de hidrogênio no interior das células. A APX atua em conjunto com outras

enzimas que participam do ciclo ascorbato-glutationa (Foyer & Noctor, 2000; Carvalho *et al.*, 2011). Ela utiliza o ácido ascórbico como doador de elétrons para a redução do  $H_2O_2$  à  $H_2O$ . Logo, o aumento da sua atividade é relacionado com o aumento na produção de ácido ascórbico (AsA) e a redução no conteúdo de  $H_2O_2$  (Dipierro *et al.*, 2005). Neste trabalho, não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos e as doses de fósforo utilizadas na raiz (Figura 7). Houve redução do teor de AsA com o aumento da dose de P em Toropi, novamente sugerindo que a maior disponibilidade de P induz acréscimo na produção de radicais livres. A atividade da APX aumentou significativamente na parte aérea de plantas de trigo submetidas ao estresse por altas temperaturas, e nas raízes foi observado um declínio na sua atividade (Goyal & Asthir, 2010).

De um modo geral, as cultivares Toropi e Anahuac se comportaram de formas diferentes em relação à atividade das enzimas antioxidantes. A atividade das enzimas antioxidantes nas raízes foi pouco alterada pela disponibilidade de fósforo. Basicamente, apenas GR teve a atividade aumentada nas raízes de Toropi conforme a dose de P aumentava. Na parte aérea, a importância de cada enzima antioxidante foi diferente entre as cultivares. Anahuac apresentou alteração na atividade da catalase, enquanto Toropi incrementou a atividade de GR. O aumento na atividade da catalase na parte aérea em Anahuac não foi eficiente na redução de  $H_2O_2$ , nem na redução da peroxidação de lipídeos. No caso de Toropi, em todas as condições houve superior peroxidação de lipídeos na parte aérea, sugerindo que seja característica do genótipo. Porém, o incremento na atividade de GR parece ter sido efetivo aos 100  $\mu M$  e 500  $\mu M$  de P, onde observou-se redução da peroxidação, mas não em 1000  $\mu M$  de P. Convém ressaltar que os níveis de carotenóides e clorofila B, com função de proteção contra



estresses abióticos, podem ter auxiliado em 500  $\mu\text{M}$  de P onde seus conteúdos foram mais elevados.

Sob condições de estresse, a fotossíntese é um dos processos do metabolismo vegetal que pode ser primeiramente afetado, tanto de forma direta através da restrição estomática, como indireta, pelo desbalanço entre a produção e remoção das espécies reativas de oxigênio durante o processo fotossintético que culminam no estresse oxidativo (Moller *et al.*, 2007; Chaves *et al.*, 2009). Sabe-se que os carotenóides e a clorofila B têm funções importantes na proteção contra estresses (Knox & Dodge, 1985; Agarwal & Shaheen, 2007). Eles agem como eliminadores do oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), uma das formas de EROs (Mittler, 2002).

O sistema antioxidativo responde diferentemente em Toropi e Anahuac há disponibilidade de P, o que era esperado uma vez que os genótipos são contrastantes quanto à tolerância à deficiência deste nutriente, embora essas diferenças não sejam suficientes para explicar a tolerância à deficiência de P. É portanto, esperado que a tolerância aconteça pela atuação de outros processos, e que o controle antioxidativo seja um fator secundário.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As cultivares contrastantes em relação à tolerância a deficiência de fósforo (P) apresentam diferentes respostas à disponibilidade de P em termos de estresse oxidativo. Toropi e Anahuac apresentaram diferenças quanto à produção de espécies reativas de oxigênio quando expostas às situações de deficiência de fósforo.

O aumento da atividade de glutathiona redutase (GR) foi eficiente em minimizar os efeitos do estresse oxidativo em Toropi, sendo importante ressaltar, a contribuição da clorofila B nesta função.

Os resultados obtidos sugerem que aumento na disponibilidade de P causa aumento na produção de EROs, o qual é minimizado por incremento na atividade de enzimas antioxidantes e pelo aumento na produção de clorofila B.

Não foram encontradas evidências de que a maior tolerância a deficiência de P em Toropi seja relacionado a controle do estresse oxidativo. Seria interessante localizar as EROs no sistema radicular para verificar sua influência sobre o alongamento e divisão celular.

## 7 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. Absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo submetidas à toxidez de alumínio. **Revista Brasileira da Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 2, p. 373-378, 2003

ABICHEQUER, A. D.; BOHNEN, H. Eficiência de absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo. **Revista Brasileira da Ciência do Solo**, Viçosa, v. 22, p. 21-26, 1998.

AGARWAL, S.; SHAHEEN, R. Stimulation of antioxidant system and lipid peroxidation by abiotic stress in leaves of *Momordica charantia*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 19, n. 2, p. 149-161, 2007.

AHMAD, P. et al. Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress. **International Journal of Plant Production**, Iran, n. 2, p. 353-366, 2008.

AHMAD, P. et al. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 30, p. 161-175, 2010.

APEL, K.; HIRTH, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.

ATKINS, O.K. et al. Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. **Trends in Plant Science**, Oxford, n. 8, p. 343-351, 2003.

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, 1999.

BATTEN, G.D. et al. Yield response by modern wheat genotypes to phosphate fertilizer and their implications for breeding. **Euphytica**, Dordrecht, n. 33, p. 81-89, 1984.

BEN, J. R.; ROSA, O.S. Comportamento de algumas cultivares de trigo em relação a fósforo no solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 9, p. 967-972, 1983.

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, p. 77-82, 1996.

BLAIR, G. Nutrient efficiency – what do we really mean. In: **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. RANDALL et al (Eds), Holanda, p. 205-213, 1993.

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 lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 83, p. 463-468, 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. 3, p. 203-215, 1987.

CANZIANI, J.R.; GUIMARÃES, V.A. O trigo no Brasil e no mundo: cadeia de produção, transformação e comercialização. In: CUNHA, G.R. **Oficina sobre o trigo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. 192 p.

CARVALHO, F.E.L. et al. Aclimação ao estresse salino em plantas de arroz induzida pelo pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 4, p. 416-423, 2011.

CASTILHOS, G. **Estresse oxidativo em resposta à toxidez de alumínio em aveia branca**. Porto Alegre: UFRGS, 2010, 95 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Fitotecnia. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CHAVES, M.M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, J. Photosynthesis and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annal of Botany**, London, v. 103, p. 551-560, 2009.

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

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.

DA SILVA, A.A.; DELATORRE, C.A. Alterações na arquitetura de raiz em resposta à disponibilidade de fósforo e nitrogênio. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 8, p. 152-163, 2009.

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

DIETZ, K. L. et al. Free radicals and reactive oxygen species as mediator of heavy metal toxicity in plants. In: PRASAD, M. N. V.; HAGEMEYER, I.(), **Heavy metal stress in plants from molecules to ecosystem**, Berlin, p. 73-79, 1999.

DIPIERRO, N. et al. Changes in ascorbate system in the response of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) roots to aluminum stress. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 162, p. 529-536, 2005.

DOKE, N. Involvement of superoxide anion generation in hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans*. **Physiological and Plant Pathology**, London, v. 23, p. 345-347, 1983.

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, 1998.

EL MOSHATY, F.I.B. et al. Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco rings pot virus or southern bean mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 43, p. 109-119, 1993.

EMBRAPA – CNPT. Centro Nacional de Pesquisa de Trigo. **Cultura do trigo**. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/index.htm>> Acesso em: 31 ago. 2009.

ESPINDULA, L. **Comparação das respostas à deficiência de fósforo e à presença de alumínio em trigo, cv. Toropi**. Porto Alegre: UFRGS, 2009, 112 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Fitotecnia. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

EZAKI, B. et al. Expression of aluminum induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. **Plant Physiology**, Minneapolis, n. 122, p. 657-665, 2004.

FANAN, S. et al. Avaliação do vigor de sementes de trigo pelos testes de envelhecimento acelerado e de frio. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 2, p. 152-158, 2006.

FEDERIZZI, L.C. et al. Melhoramento do trigo. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. UFV: Viçosa, 2005. 969 p.

FÖHSE, D.; CLAASSEN, N.; JUNGK, A. Phosphorus efficiency of plants. **Plant and Soil**, Dordebrecht, v. 110, n. 1, p. 101-109, 1988.

FORMAN, H.J.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Signaling functions of reactive oxygen species. **Biochemistry**, Washington, v. 49, p. 835-842, 2010.

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

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.

GECHEV, T.S. et al. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **BioEssays**, Cambridge, v. 28, p. 1091-1101, 2006.

GIANNAKOULA, A. et al. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, n. 67, p. 487-494, 2010.

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

GOYAL, M.; ASTHIR, B. Polyamine catabolism influences antioxidative defense mechanism in shoots and roots of five wheat genotypes under high temperature stress. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 60, p. 13-25, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. In: **Free radicals in Biology and Medicine** (Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., (Eds.), Oxford Science Publications, 3ed., 1999.

HAMEED, A. et al. Differential changes in antioxidants, proteases, and lipid peroxidation in flag leaves of wheat genotypes under different levels of water deficit conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, n. 49, p. 178-185, 2010.

HENDRY, G.A.F. et al. Stress indicators: lipid peroxidation. In: **Methods in Comparative Plant Ecology**, Hendry, G.S.F.; Grime, J.P. (Eds.). Chapman & Hall, London, p. 154-156, 1993.

HISCOX, J.D.; ISRAELSTAM, G.F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 57, p. 1132-1334, 1979.

HOLFORD, I.C.R. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. **Journal Soil Research**, Australia, n. 35, p. 227-239, 1997.

JAVADIAN, N. et al. Cold induced changes of enzymes, proline, carbohydrates and chlorophyll in wheat. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 54, n. 4, p. 540-547, 2010.

JACQUES-SILVA, M.C. et al. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharmacology Toxicology**, Copenhagen, v.88, p.119-125, 2001.

JIANG, K. et al. Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin regulated oxidizing environment. **Development**, Cambridge, v. 130, p. 1429-1438, 2003.

KELES Y., ONCE, I. Response of antioxidative defense system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings. **Plant Science**, Clare, n. 163, p. 783-790, 2002.

KNOX, J.P.; DODGE, A.D. Singlet oxygen and plants. **Phytochemistry**, New York, v. 24, p. 889-896, 1985.

KOCA, H. et al. Effect of salt stress on lipid peroxidation and superoxide dismutase and peroxidase activities of *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon pennelli*. **Biology Plantarum**, Prague, n. 50, p. 745-748, 2006.

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

KUBIS, J. Exogenous spermidine differentially alters activities of some scavenging system enzymes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide radical levels in water stressed cucumber leaves. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, n. 4, p. 397-406, 2008.

LEE, R. B. *et al.* 31P NMR measurements of the cytoplasmic and vacuolar Pi content of mature maize roots: relationships with phosphorus status and phosphate. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, n. 41, p. 1063–1078, 1990.

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**, Clare, n. 159, p. 75-85, 2000.

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.

LISZKAY, A., VAN DER YALM, E., SCHOPFER, P. Production of reactive oxygen intermediates (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. **Plant Physiology**, Washington, v. 135, p. 3114-3123, 2004.

LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protect the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 1781-1787, 2001.

MANSKE, G.G.B. et al. Traits associated with improved P-uptake efficiency in CIMMYT'S semidwarf spring bread wheat grown on an acid Andisol in Mexico. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 221, n. 2, p. 189-204, 2000.

McDONALD, M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 177-237, 1999.

MEI, Y.; SONG, S. Response to temperature stress of reactive oxygen species scavenging enzymes in the cross-tolerance of barley seed germination. **Journal of Zhejiang University**, Hangzhou, v. 11, n. 12, p. 965-972, 2010.

MERIGA, B. et al. Aluminium induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 161, p. 63-68, 2004.

MITTLER, R. et al. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, n. 96, p. 14165-14170, 1999.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, p. 405-410, 2002.

MITTLER, R. *et al.* Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, p. 490-498, 2004.

MITLLER, G., SHULAEV, V., MITTLER, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 133, p. 481-489, 2008.

MOKOLOBATE, M.S.; HAYNES, R.J. Amelioration of Al toxicity deficiency in acid soils by additions of organic residues: a critical review of the phenomenon and the mechanisms involved. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, n. 59, p. 47-63, 2001.

MOLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 561-591, 2001.

MOLLER, I.M.; JÉNSEN, P.E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 459-481, 2007.

MOLLER, I. M.; SWEETLOVE, L. J. ROS signaling – specificity is required. **Trends in Plant Science**, London, n. 15, p. 370-374, 2010.

MORAES-FERNANDES, M.I.B. de. Genética e novas biotecnologias no melhoramento de trigo. Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_do04\\_1.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do04_1.htm)> Acesso em: 20 jul. 2009.

MOUSSA, H.R.; EL-GAMAL, S.M. Effect of salicylic acid pretreatment on cadmium toxicity in wheat. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, n. 2, p. 315-320, 2010.

NAIDO, G. et al. Accumulation sites of Al in snapbean and cotton roots. **Agronomy Journal**, Madison, n. 70, p. 489-492, 1978.

NAIK, D. et al. Rhizosphere carbon deposition, oxidative stress and nutritional changes in two poplar species exposed to aluminum. **Tree Physiology**, Oxford, n. 29, p. 423-436, 2009.



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.

NETTO, L.E.S. Oxidative stress response in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 24, n. 1-4, p. 93-102, 2001.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 249-279, 1998.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling. **Proceedings of Royal Society of London**, London, n. 355, p. 1465-1475, 2000.

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

NORDBERG, J.; ARNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

PANDA, S. K.; CHOUDHURY, S. Chromium stress in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, n. 6, p. 95-102, 2005.

PANDA, S. K.; PARTA, H. K. Physiology of chromium toxicity in plants – A Review. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 24, n. 1, p. 10-17, 1997.

RICHARDSON A. E. Soil microorganisms and phosphorus availability. **Soil Biota: management in sustainable farming systems**, Oxford, p. 50–62, 1994.

SAIRAM, R.K.; RAO, K.V.; SRIVASTAVA, G.C. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. **Plant Science**, Watsonville, v. 163, p. 1037-1046, 2002.

SANCHEZ-CALDERON, L. et al. Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 46, p. 174-184, 2005.

SANCHEZ-CALDERON, L. et al. Characterization of low phosphorus insensitive mutants reveals a crosstalk between low phosphorus-induced determinate root development and the activation of genes involved in the adaptation of *Arabidopsis* to phosphorus deficiency. **Plant Physiology**, Washington, v. 140, p. 879-889, 2006

SANTOS, D. R.; GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J. Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema plantio direto. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 576-586, 2008.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, p. 995-1014, 2005.

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

SCHACHTMAN, D.P.; REID, R.J.; AYLING, S.M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. **Plant Physiology**, Washington, v. 116, p. 447-453, 1998.

SEO, B.B. et al. The single subunit NADP dehydrogenase reduces generation of reactive oxygen species from complex I. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 580, n. 26, p. 6105-6108, 2006.

SHALATA, A. et al. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennelli* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidant system. **Plant Physiology**, Rockville, n. 112, p. 487-494, 2002.

SZALAI, G. et al. Glutathione as a antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. **Journal Plant of Growth Regulation**, New York, v. 22, p. 66-80, 2009.

TABALDI, L.A. et al. Oxidative stress is an early symptom triggered by aluminum in Al-sensitive potato plantlets. **Chemosphere**, Oxford, v. 76, p. 1402-1409, 2009.

TAMÁS, L. et al. Inhibition of Al-induced roots elongation and enhancement of Al-induced peroxidase in Al sensitive and Al resistant barley cultivars are positively correlated. **Plant and Soil**, Dordrecht, n. 250, p. 193-200, 2003.

THEODOROU, M.E.; PLAXTON, W.C. Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. **Plant Physiology**, Rockville, n. 101, p. 339-344, 1993.

TUNA A. L. et al. The combined effects of giberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, n. 62, p. 1-9, 2008.

TYBURSKI, J.; DUNAJSKA, K.; TRETYN, A. A role for redox factors in shaping roots architecture under phosphorus deficiency. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 5, n. 1, p. 64-66, 2010.

USDA-FAS. **Grain World Markets and Trade**. Disponível em: <<http://fas.usda.gov/grain.pdf>> Acesso em: 11 maio 2011.

VITAL, S. A. et al. Opposing roles for superoxide and nitric oxide in the NaCl stress-induced upregulation of antioxidant enzyme activity in cotton callus tissue. **Environment and Experimental Botany**, Oxford, n. 62, p. 60-68, 2008.

VON UEXKULL, H.R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, n. 171, p. 11-15, 1995.

- VRANOVA, E. et al. Signal transduction during oxygen species. **Journal Experimental Botany**, Oxford, n. 53, p. 1227-1236, 2002.
- WAGNER, A.M. A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia* hybrid cells. **FEBS Letters**, Amsterdam, n. 368, p. 339-342, 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, X. et al. Genetic improvement for phosphorus efficiency in soybean: a radical approach. **Annals of Botany**, Oxford, n. 106, p. 215-222, 2010.
- WANG, X. et al. Overexpressing AtPAP15 enhances phosphorus efficiency in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 151, p. 233-240, 2009.
- WANG, W.X. et al. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends of Plant Science**, Oxford, v. 9, p. 244-252, 2005.
- WHITEAKER, G. et al. Intraspecific differences ingrowth of beans at stress level of phosphorus. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, n. 101, p. 472-475, 1976.
- WILLEKENS, H. et al. Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 352, p. 79-83, 1994.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, n. 57, p. 781-803, 2006.
- YAO, Y. et al. Comparative proteome analysis of metabolic changes by low phosphorus stress in two *Brassica napus* genotypes. **Planta**, New York, v. 233, p. 523-537, 2011.
- YIN, L. et al. Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminum stress in transgenic tobacco. **Planta**, New York, v. 231, p. 609-621, 2010.
- 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.
- YUSUF, M. et al. Protective response of 28-homobrassicin in cultivars of *Triticum aestivum* with different levels of nickel. **Environmental Contamination and Toxicology**, Berlin, v. 60, p. 68-76, 2011.

## 8 VITA

Letícia Simionato Tonello é filha de Tania Marta Simionato Tonello e Jaime Pedro Tonello. Nasceu em Passo Fundo – RS, em 03 de dezembro de 1983. Coursou o Ensino Fundamental e o Médio no Colégio Notre Dame. Em 2002, ingressou no curso de Ciência Biológicas da Universidade de Passo Fundo, onde se graduou Bióloga em 2006. Nos dois anos seguintes exerceu cargo de assistente de pesquisa na empresa Brasmax Genética LTDA, em atividades relacionadas ao melhoramento genético de soja. Em 2009, 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, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).