UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ELCIO FERREIRA DOS SANTOS

Mecanismos de interação fósforo-zinco no sistema solo-planta: disponibilidade no solo, avaliações fisiológicas e expressão de transportadores de fosfato

> Piracicaba 2018

ELCIO FERREIRA DOS SANTOS

Mecanismos de interação fósforo-zinco no sistema solo-planta: disponibilidade no solo, avaliações fisiológicas e expressão de transportadores de fosfato

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia Nuclear na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. José Lavres Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira

Piracicaba 2018 AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

> Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Santos, Elcio Ferreira dos

Mecanismos de interação fósforo-zinco no sistema solo-planta: disponibilidade no solo, avaliações fisiológicas e expressão de transportadores de fosfato / Elcio Ferreira dos Santos; orientador José Lavres Junior; co-orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - Piracicaba, 2018.

124 p.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

 Algodoeiro 2. Estresse oxidativo 3. Fertilidade do solo 4. Fotossíntese
Metabolismo vegetal 6. Nutrição vegetal 7. Relação solo-planta 8. Transporte de fosfato

CDU 581.13

Elaborada por: Marilia Ribeiro Garcia Henyei CRB-8/3631 Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017 Aos meus pais amados Elson e Marilene, que tanto trabalharam para me garantir educação de qualidade.

Ao meu irmão Elton Pelo carinho e amizade

DEDICO

A Deus, por ter me agraciado com a vida, pelas oportunidades, saúde e por sempre estar iluminando e guiando todas as etapas da minha vida

A toda minha família pelo apoio e carinho.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP e ao Programa de Pós-Graduação do respectivo centro pela realização do curso. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão das bolsas de estudos.

Ao Professor Dr. José Lavres Junior pela orientação, ensinamentos, oportunidades e, principalmente, pela confiança depositada em mim.

Ao Professor Dr. Antonio Figueira pela co-orientação e pela oportunidade de trabalhar com biologia molecular. Ao Prof. Dr. Joni Esrom Lima pelo apoio orientação nas análises moleculares e ao Luís Henrique Damasceno Serezino pela amizade e auxilio na bancada.

Ao Professor Dr. Francisco Krug pela orientação nas análises deste projeto no Laboratório Química Analítica do CENA e a Aparecida de Fátima Patreze e a Dra. Liz Mary Bueno de Moraes pelos ensinamentos, orientações e bons momentos partilhados.

Ao Professor Dr. Ricardo Antunes de Azevedo pela colaboração na condução das análises deste projeto no Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas e a Dra. Salete Aparecida Gaziola e a Dra. Lucélia Borgo pelo auxílio e ensinamento partilhados.

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Pavinato pela oportunidade de realização de parte das minhas análises no Departamento de Ciência do Solo e ao Marcos Rodrigues pelas facilidades disponibilizadas para análises de solo.

À Professora Elisabete Aparecida De Nadai Fernandes e ao Professor Doutor Fábio Rodrigo Piovezani Rocha pelo exemplo de amor pela pesquisa. Aos funcionários do CENA pelo exemplo de profissionalismo e sempre dispostos ao auxílio: Suzineide de Fátima Manesco de Almeida, Marília Ribeiro Garcia Henyei, Cláudia Márcia de Freitas Corrêa, Benedita Inês Franco Possignolo Rodrigues e Joaquim Everaldo Martins dos Santos.

Ao Professor Dr. André Rodrigues dos Reis e o Professor Dr. Marcos Antonio Camacho, pelos os auxílios pessoais, paciência e sincera amizade.

Ao professor Dr Martin Broadley, pela oportunidade de realização do doutoradosanduíche na University of Nottingham, pelas facilidades disponibilizadas para a pesquisa, pelos ensinamentos, além do excelente exemplo profissional. Aos colegas do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do CENA, por toda ajuda e companheirismo: Aline Grella de Campos, André Francisco de Oliveira, Bruno José Zanchim, Dra. Cristiane Prezotto Silveira, Felipe Furlan, Dr. Fernando Giovannetti de Macedo, Flávio Henrique Silveira Rabêlo, Dr. Joaquim Frazão, Nicolas Casarin, Nikolas de Souza Mateus, Raphael Florêncio Garrone. Em especial à Cleusa Pereira Cabral, grande amiga e conselheira.

A Renata Beatriz Cruz pelos valiosos conselhos em todo o período experimental e na vida pessoal.

Aos amigos do MS Ana Carolina Lucena, Camila Carmona, Eder Fanaya, Elisângela Casanova, Franciele Françoso, Helder Lima, Helder de Oliveira, Priscilla Nátaly e Rodrigo Ferreira, Thays Benites, Thaynara Lara, que, mesmo longe, foram incansáveis no estimulo e confiança depositada.

Aos colegas de pós-graduação pelo convívio e momentos de descontração: Alice Cassetari, Bárbara Laura, Bruno Lena, Carol Rossi, Dani Scotton, Fabio Paulino, Fábio Pértille, Fernando Setti, Gianni Haddad, Ioná Rech, Ismael Meurer, Janine Mesquita, Jéssica Drum, José Mateus, Juliana Deganello, Juliana Eschholz, Juliana Leles, Layane Souza, Luiz Sobenko, Marcelo Bida, Matheus Donegá, Mayra Camargo, Michele Silva, Nericlenes Marcante, Otavio Neto, Paulo Bitola, Ricardo Feliciano, Sandra Santa Rosa, Slyvia Segredo, Taninha Batista, Tatiane Beloni e Thiago Wendling.

A Luana Rossato que deixou aquilo que era difícil parecer fácil.

E a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

" Deleita-te também no Senhor, e ele te concederá o que deseja o teu coração. "Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e ele tudo fará.". Salmos 37:4,5

RESUMO

SANTOS, E. F. Mecanismos de interação fósforo-zinco no sistema solo-planta: disponibilidade no solo, avaliações fisiológicas e expressão de transportadores de fosfato. 2018. 124 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

Considerando que existem informações controversas sobre os efeitos da interação P (fósforo) Zn (zinco), tem-se a hipótese que a interação P-Zn é uma resposta ao somatório de relações nutricionais que ocorrem na planta e no solo, implicando na modificação do desenvolvimento vegetal e em respostas adaptativas do algodoeiro (Gossypium hirsutum L.). Objetivou-se com o presente estudo avaliar os mecanismos de interação P-Zn no sistema solo-planta para o algodoeiro, realizando-se uma abordagem de química do solo (fracionamento de P e extração sequencial de Zn no solo), de dinâmica de absorção destes elementos (genômica - quanto à expressão de genes relacionados à absorção de P) e de fisiologia e nutrição de plantas (quanto à determinação das atividades da fosfatase ácida e da anidrase carbônica, metabolismo oxidativo, bem como as trocas gasosas e as avaliações fotoquímicas). Para alcançar os objetivos desta proposta foram realizados quatro experimentos, três em solução nutritiva e um em solo. No experimento I foi descrita a disponibilidade de P e Zn em solo de rizosfera em resposta a doses de P e Zn em duas classes de solo cultivados com algodoeiro. Já no experimento II, descreveu-se o efeito da interação P-Zn no acúmulo de nutrientes no tecido vegetal; nas alterações no processo fotossintético - determinadas pelas trocas gasosas - e consequentes alterações no crescimento das plantas, em resposta à nutrição de P e Zn. No experimento III foi verificada a disponibilidade fisiológica de P e Zn por meio da atividade enzimática da fosfatase ácida e da anidrase carbônica, bem como descrevito o efeito da interação nas respostas de trocas gasosas, fotoquímicas e do sistema antioxidante do algodoeiro. Por fim, no experimento IV caracterizou-se a família de genes PHOl (transportador de fosfato das raízes para o xilema) em Gossypium hirsutum (L.) e foi descrito o efeito da interação P-Zn na expressão de *PHOl* nestas plantas.

Palavras-chave: *Gossypium hirsutum* L. Disponibilidade de P e Zn. Metabolismo antioxidativo. Trocas gasosas. Genômica nutricional.

ABSTRACT

SANTOS, E. F. **Mechanisms of phosphorus-zinc interaction in the soil-plant system**: soil availability, physiological evaluations and expression of P transporters. 2018. 124 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

Considering that there is controversial information about the effects of P (phosphorus) Zn (zinc) interaction, it is hypothesized that the interaction P-Zn is a response to the sum of nutritional relations that occur in the level of plant and in the soil together, as a consequence of plant development and adaptive responses of cotton. The aim of the present study was to evaluate the mechanisms of P-Zn interaction in the soil-plant system for the cotton plant (Gossypium hirsutum L.), using a soil chemistry approach (P fractionation and sequential extraction of Zn in the soil), absorption dynamics of these elements (genomics - regarding the expression of genes related to P uptake) and plant physiology and nutrition (as regards the determination of acid phosphatase activities, oxidative stress, as well as gas exange and photochemical changes). To achieve the objectives of this proposal, four experiments were carried out, three in nutrient solution and one in soil. In the experiment I, we aimed to describe the availability of P and Zn in rhizosphere soil in response to P and Zn doses in two classes of soil cultivated with cotton (Gossypium hirsutum L.). In the experiment II, the objective was to investigate the effect of the interaction P-Zn on the accumulation of nutrients in the plant tissue; on changes in the photosynthetic process - determined by gas exchange; and consequent changes in cotton growth in response to P and Zn nutrition. In the experiment III, the objective was to verify the physiological availability of P and Zn by the enzymatic activity of acid phosphatase and carbonic anhydrase, as well as to describe the effect of the interaction in the gas exchanges, photochemical and antioxidant system responses of cotton plant. Finally, in the experiment IV it was characterized the PHO1 gene (phosphate transporters in roots to xylem) in cotton and evaluated the effect of the P-Zn interaction on *PHO1* expression in *Gossypium hirsutum*.

Keywords: *Gossypium hirsutum* L. Physiological responses. Availability of P and Zn. Nutritional genomic.

Sumário

1. INTRODUÇÃO: Por que avaliar a interação fósforo-zinco no algodoeiro?17	
2. Interação fósforo-zinco no solo: Baixa disponibilidade de zinco limita a resposta a	
adubação fosfatada do algodoeiro	
Resumo	
Abstract	
2.1 Introdução	
2.2 Material e Métodos	
2.2.1 Condições experimentais	
2.2.2 Propriedades físicas e químicas do solo	
2.2.3 Cultivo do algodoeiro	
2.2.4 Análise química do tecido vegetal	
2.2.5 Análise de P no solo de rizosfera	
2.2.6 Análise de Zn no solo de rizosfera	
2.2.7 Análise Estatística	
2.3 Resultados	
2.3.1 Interação P-Zn na planta	
2.3.2 Fracionamento de P no solo	
2.3.3 Fracionamento de Zn no solo	
2.3.4 Extratores	
2.4 Discussão	
2.5 Conclusões	
3. Interação fósforo-zinco na dinâmica nutricional do algodoeiro: absorção de Zn aumenta	0
uso eficiente de P na fotossíntese	
Resumo	
Abstract	
3.1 Introdução	
3.2 Material e Métodos	
3.2.1 Condições experimentais	
3.2.2 Parâmetros de trocas gasosas	
3.2.3 Produção de massa seca das plantas	
3.2.4 Avaliação do sistema radicular	
3.2.5 Análise química do tecido vegetal	
3.2.6 Eficiência de uso de P e Zn na fotossíntese	
3.2.7 Análise Estatística	
3.3 Resultados	
3.3.1 Crescimento das plantas	
3.3.2 Concentração e acúmulo de P e Zn	
3.3.3 Trocas gasosas	
3.3.4 Eficiência de uso de P e Zn na fotossíntese	

3.4 Discussão	59
3.5 Conclusões	63
4. Interação P-Zn nas respostas fisiológicas em algodoeiro: disponibilidade fisi	ológica, trocas
gasosas, relações fotoquímicas e metabolismo antioxidante	65
Resumo	65
Abstract	66
4.1 Introdução	67
4.2 Material e Métodos	68
4.2.1 Condições experimentais	68
4.2.2 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila	70
4.2.3 Atividade da Fosfatase Ácida (FA, EC. 3.1.3.2)	70
4.2.4 Atividade da Anidrase Carbônica (AC, EC.4.2.1.1)	71
4.2.5 Determinação do peróxido de hidrogênio e da peroxidação de lipídeos	71
4.2.6 Extração de e proteínas	72
4.2.7 Atividade da Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)	72
4.2.8 Atividade da Catalase (CAT, 1.11.1.6)	73
4.2.9 Atividade da Ascorbato Peroxidase (APX, EC. 1.11.1.11)	73
4.2.10 Atividade da Guaiacol Peroxidase (GPX, EC.1.11.1.7)	73
4.2.11 Área foliar e produção de massa seca das plantas	73
4.2.12 Análise química do tecido vegetal	74
4.2.13 Análise Estatística	74
4.3 Resultados	74
4.3.1 Crescimento das plantas	74
4.3.2 Concentração e acúmulo de P e Zn	77
4.3.3 Atividade da fosfatase ácida e anidrase carbônica	78
4.3.4 Trocas gasosas e atividade fotoquímica	
4.3.5 Avaliação dos sistemas antioxidantes	
4.4 Discussão	
4.5 Conclusões	

5. Interação P-Zn na expressão de transportadores de P em algodoeiro: um enfoque	
molecular	.93
Resumo	.93
Abstract	.94
5.1 Introdução	.95
5.2 Material E Métodos	.97
5.2.1 Condições experimentais	.97
5.2.2 Experimento I - expressão dos transportadores de P em função do tempo	.97
5.2.3 Experimento II- expressão dos transportadores de P em função da interação	.98
5.2.4 Trocas gasosas	.98
5.2.5 Análise química do tecido vegetal	. 99
5.2.6 Eficiências nutricionais	. 99

5.2.7 Extração do RNA e síntese de cDNA
5.2.8 Identificação do gene PHO1 em algodoeiro e desenho de iniciadores 100
5.2.9 Análise de amplificação quantititiva de transcritos reversos (RT-qPCR) 101
5.2.10 Análise Estatística 101
5.3 Resultados
5.3.1 Análise filogenética dos homólogos PHOl em algodão (Gossypium hirsutum) 101
5.3.2 Regulação da expressão de PHO1a e PHO1b em resposta a deficiência de fósforo e
zinco102
5.3.3 Regulação da expressão de PHO1a e PHO1b em a interação P-Zn 103
5.3.4 Concentrações de P e Zn 103
5.3.5 Crescimento e trocas gasosas
5.3.6 Eficiências nutricionais 107
5.4 Discussão 108
5.5 Conclusões
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 111
REFERÊNCIAS 113

1. INTRODUÇÃO: Por que avaliar a interação fósforo-zinco no algodoeiro?

O fósforo (P) e o zinco (Zn) são elementos químicos essenciais para o desenvolvimento vegetal, crescimento, reprodução e diversos processos fisiológicos. O P possui papel importante na transferência de energia, nas relações de respiração e fotossíntese. Além disso, constitui em componente estrutural de ácidos nucléicos, coenzimas, fosfoproteínas e fosfolipídeos. Contudo, é comum a limitação de produtividade de culturas agrícolas pela deficiência por P. Isso porque a maioria dos solos agrícolas do mundo possui alto potencial de adsorção de P, notadamente os solos intemperizados de regiões tropicais, reduzindo a disponibilidade de P (Figura 1.1).

O Zn é o único metal representado em todas as classes de enzimas no metabolismo vegetal e desempenha papel estrutural nas proteínas reguladoras. Destaca-se que a maioria da população mundial possui deficiência severa de Zn em função do consumo de alimentos com baixo conteúdo de Zn (Figura 1.2), que por sua vez são produzidos em condições de baixo teor disponível de Zn no substrato de cultivo. Desta maneira, a agricultura mundial cada vez mais se torna dependente de adubos fontes de P e Zn, destacando-se culturas exigentes nesses nutrientes, como o algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.).



Figura 1.1 Potencial de adsorção de P nos solos do mundo

Fonte: USDA, 2017

O algodão é dos principais produtos agrícolas do Brasil. No cenário internacional, o Brasil faz parte dos cinco maiores produtores, ao lado de China, Índia, Estados Unidos e Paquistão. A limitação do cultivo do algodoeiro pelo baixo suprimento de fósforo (P) é comum em diversos solos do Brasil, especialmente depois da intensificação e aumento de produtividade da cotonicultura. Os solos brasileiros, em sua maioria, possuem altos teores de óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio, os quais podem adsorver o ânion fosfato na superfície de suas partículas. Assim, em virtude da baixa recuperação do P pelas plantas, fornecido via adubos fosfatados, altas doses de P são anualmente aplicadas a fim de garantir uma produção ótima. Contudo, a deficiência de zinco (Zn) pode ser observada em função do alto suprimento de P no substrato de cultivo, particularmente em solos com baixa disponibilidade neste micronutriente. Por outro lado, o Zn também controla a absorção e utilização de P, servindo de sinalizador em condições de estresse a deficiência por P. O Zn constitui sinalizador induzindo em agente na parte aérea uma série de sinais moleculares em resposta a menor disponibilidade de P para absorção na raiz.

Figura 1.2 Ocorrências de deficiências de Zn na população mundial



Fonte: http://www.zinc.org/crops

A interação P-Zn é amplamente discutida na literatura, sendo que o alto teor de P disponível para planta induz a menor absorção de Zn. Porém, a interação P-Zn mesmo sendo estudada em vários modelos e culturas ainda não é totalmente elucidada, sendo que existem muitos resultados controversos. Sabe-se que existe a interação P-Zn, contudo, todos os mecanismos que condicionam essa interação ainda não são bem elucidados.

Na literatura, a maioria dos trabalhos com interação P-Zn apresentam maior enfoque na dinâmica de absorção e utilização de nutrientes, tanto macro como micronutrientes, sendo escassos os estudos que se aprofundam em conhecer e descrever os mecanismos fisiológicos envolvidos nesta interação e na homeostase. Somado a isso, é importante elucidar a interação P-Zn sob uma abordagem que englobe a relação solo/planta, bem como a expressão de genes influenciados pela interação. A correlação entre a disponibilidade de P e Zn no solo, a dinâmica de absorção – por meio da expressão de transportadores de raiz - e a utilização fisiológica destes nutrientes, corroboram para o melhor entendimento da lacuna de conhecimento da interação P-Zn, numa perspectiva fisiológica, bioquímica e de genômica nutricional.

A análise conjunta do sistema solo-planta é essencial para identificar e melhor evidenciar as respostas das plantas em função da disponibilidade de P e de Zn no solo e em função das quantidades absorvidas pelo vegetal. Embora largamente discutida na literatura há algumas décadas, a relação P-Zn ainda apresenta lacunas à serem preenchidas, outrossim, a regionalização e especificidade dos estudos permitem maior segurança da aplicação prática dos resultados. Por isso estudos com espécies cultivadas em condições de produtividade limitantes de P e Zn – *e.g.*, algodoeiro no Brasil – são de extrema importância para o adequado manejo nutricional, bem como são excelentes modelos para a descrição e avaliação de respostas fisiológicas da interação P-Zn. A avaliação das respostas fisiológicas do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) em resposta ao suprimento de P e Zn é prioridade para orientação do manejo da adubação e da fertilidade do solo, visto que os estudos analisando o sistema solo-planta no algodoeiro são escassos.

Desta maneira, a hipótese dessa tese é que a interação P-Zn é uma resposta ao somatório de relações nutricionais que ocorrem na planta e no solo, implicando na modificação do desenvolvimento vegetal e em respostas adaptativas do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). Objetivou-se com o presente estudo avaliar os mecanismos de interação P-Zn no sistema solo-planta para o algodoeiro, fazendo-se uma abordagem de química do solo (fracionamento de P e Zn no solo), de dinâmica de absorção destes elementos (genômica - quanto à expressão de genes relacionados à absorção de P) e de fisiologia e nutrição vegetal, quanto às determinações das atividades da fosfatase ácida, da anidrase carbônica, das enzimas da proteção anti-oxidativa, bem como as trocas gasosas e as relações fotoquímicas.

2. Interação fósforo-zinco no solo: Baixa disponibilidade de zinco limita a resposta a adubação fosfatada do algodoeiro

Resumo

A limitação na produtividade do algodoeiro pela interação fósforo (P) zinco (Zn) é comum em condições de cultivo no Brasil. Contudo pouco se sabe sobre o a interação P-Zn a nível de rizosfera, bem como a disponibilidade e distribuição destes nutrientes nos diversos sítios de adsorção das partículas reativas do solo. Desta maneira, objetivou-se com esse trabalho descrever a disponibilidade de P e Zn em solo de rizosfera, em resposta às doses de P e Zn, em duas classes de solos cultivados com algodoeiro (Gossypium hirsutum L.). O experimento foi desenvolvido em vasos preenchidos com Neossolo Quartzarênico e Latossolo Vermelho-Amarelo - ambos com baixos teores disponíveis de P e Zn. Plantas de algodão foram cultivadas até o florescimento com cinco doses de P (0, 30, 60, 90, 180 mg dm⁻³) e três doses de Zn (baixo = 0; médio = 1,5; alto = 6 mg dm⁻³), totalizando 15 tratamentos, com quatro repetições. O solo da rizosfera dessas plantas foi coletado e avaliado por meio do fracionamento de P e extração sequencial de Zn. As doses de P e Zn modificaram a disponibilidade desses nutrientes nas frações avaliadas. O efeito das doses de P e Zn foi mais evidente no Latossolo em função da maior interação entre os coloides deste solo e os nutrientes aplicados. Sob altas concentrações de Zn disponível no solo rizosférico, o teor de P disponível em solução aumenta, beneficiando o crescimento do algodoeiro. Por outro lado, com o aumento da disponibilidade de P incrementou-se o teor de Zn ligado a óxidos de Fe e Al, reduzindo o teor de Zn disponível para absorção. Desta maneira, para o adequado manejo nutricional do algodoeiro, na necessidade da adubação com altas doses de P, deve-se levar em consideração os teores de Zn disponíveis para garantir eficiente adubação fosfatada.

Palavras-chave: Deficiência de Zn induzida por P; fracionamento de P; extração sequencial de Zn; P-Zn homeostase; Interface solo-raiz.

Phosphorus-zinc interaction in soil: Low zinc availability limits the response to phosphorus fertilization in cotton

Abstract

Cotton productivity limitation by the interaction of phosphorus (P) zinc (Zn) is common under cultivation conditions in Brazil. However, little is known about the P-Zn interaction at the rhizosphere level, as well as the availability and distribution of these nutrients at the various adsorption sites of soil reactive particles. Thus, the objective of this work was to describe the availability of P and Zn in rhizosphere soil, in response to P and Zn rates, in two classes of soils cultivated with cotton (Gossypium hirsutum L.). The experiment was carried out in pots filled with Neosol and Oxissol - both with low levels of P and Zn available. Cotton plants were cultivated until flowering with five doses of P (0, 30, 60, 90, 180 mg dm⁻³) and three doses of Zn (low = 0, medium = 1.5, high = 6 mg dm⁻³), totaling 15 treatments, with four replications. The rhizosphere soils of these plants were collected and evaluated by means of P fractionation and Zn sequential extraction. The doses of P and Zn modified the availability of these nutrients in the fractions evaluated. The effect of the P and Zn doses was more evident in the Latosol due to the greater interaction between the colloids of this soil and the applied nutrients. Under high concentrations of Zn available in rhizospheric soil, the available P content in solution increases, benefiting growth in cotton. On the other hand, with increasing P availability, the Zn content of Fe and Al oxides increased and Zn solved was readily available for uptake. Thus, for the adequate nutritional management of the cotton, in situations of high P supply, one must take into account the Zn levels available to guarantee efficient phosphate fertilization.

Keywords: Zn deficiency induced by P; Phosphorus fractionation; Zinc sequential extraction; P-Zn homeostasis; Interface soil roots.

2.1 Introdução

A produção de culturas agrícolas no Cerrado brasileiro é limitada pela disponibilidade de fósforo (P). Os solos dessa região, em sua maioria, apresentam altos teores de óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio, os quais podem adsorver o ânion fosfato na superfície das partículas. Em virtude da baixa recuperação do P pelas plantas, altas doses deste nutriente são anualmente aplicadas via fertilizante a fim de garantir uma produção adequada (RODRIGUES et al., 2016). No entanto, altas doses de fosfato podem induzir a deficiência de zinco (Zn), particularmente em solos com baixa disponibilidade deste micronutriente (MOORE et al., 2014).

A limitação do cultivo do algodoeiro pelo baixo suprimento de P e Zn é comum em condições de cultivo no Brasil, especialmente depois da intensificação e aumento de produtividade da cotonicultura (SANTOS et al., 2015). Destaca-se que a interação desses nutrientes é amplamente discutida na literatura, sendo que o alto teor de P disponível para planta reduz a absorção de Zn (NICHOLS et al., 2012; ZHANG et al., 2012; WATTS-WILLIAMS et al., 2014). Mesmo assim, as relações edáficas induzidas pela interação P-Zn e consequentes reduções de produção em função dessa interação nutricional ainda não são totalmente elucidadas. As respostas vegetais em função da interação P-Zn são frequentemente baseadas em três mecanismos: (1) o P insolubiliza o Zn nas raízes diminuindo sua absorção; (2) a absorção de Zn é reduzida pelo P por meio de inibição não competitiva; (3) o P reduz o transporte de Zn no xilema (MARSCHNER, 2012). Contudo pouco se sabe das reações químicas envolvendo esses nutrientes no ambiente de rizosfera antes da absorção pela planta. Além disso, o teor de P e Zn nas diferentes frações no solo são discutidas de forma isolada, não levando em consideração o efeito da interação P-Zn.

Em condições tropicais, cerca de 80% do P aplicado via fertilizante é adsorvido por óxidos de Fe e Al (MOORE et al., 2014), que por consequência, aumenta as cargas negativas sobre estes coloides e pode aumentar a adsorção de Zn pelos óxidos do solo (PÉREZ-NOVO et al., 2011). Loneragan et al. (1979) relataram que interação P e Zn é dependente da mineralogia e pH no solo. Esses fatores interferem na disponibilidade de cargas do solo e, por consequência, na adsorção e fitodisponibilidade destes elementos. Quando se trata do P, esses fatores são ainda mais instigantes. Sob condições tropicais, solos sem interferência antrópica e que possuem baixos valores de pH (3 a 4), apresentam a disponibilidade de P reduzida (MOORE et al., 2014). Já a adsorção de Zn em solos sob condições tropicais são governadas principalmente pelo pH, pelo incremento de matéria orgânica e pela presença de óxidos de Fe

e Al (Perez-Novo et al., 2011). Desta maneira, fica claro o efeito da interação na disponibilidade desses nutrientes nas diferentes frações do solo. Contudo, os mecanismos de deslocamento de cátions e ânions nas frações do solo são pouco conhecidos.

A disponibilidade de P no solo também é modificada por alterações promovidas pelas plantas na interface solo-raiz. Em resposta a baixa disponibilidade de P, as plantas desenvolveram mecanismos que aumentam a solubilidade desse nutriente, incluindo modificações da produção de biomassa de raiz, exsudação de ácidos orgânicos, complexação de elementos tóxicos, e associação simbiótica com micro-organismos (HAMMOND; WHITE, 2008; LYNCH; BROWN, 2008; SMITH; SMITH, 2011). Essas adaptações aumentam os teores de P na fração orgânica no solo, de tal forma que a absorção de P pelas raízes é aumentada (ARRUDA et al., 2016). O mesmo ocorre com o Zn. As modificações da comunidade microbiana associada as raízes constitui em principal aspecto no aumento da eficiência de absorção de Zn pelas raízes (NAVARRETE et al., 2017). Desta maneira, o fornecimento de P e/ou Zn promove alterações na interface solo-raiz, que por sua vez, modificam os teores disponíveis desses nutrientes, de forma direta ou indireta.

A influência do fosfato na adsorção de Zn tem sido pouco estudada, apesar da sua importância. Contudo, a presença do fosfato pode aumentar (McBRIDE, 1985; THAKUR; TOMAR; PANDEYA, 2006) ou reduzir (CLARK; McBRIDE, 1984; PÉREZ-NOVO et al., 2011) a mobilidade de íons metálicos. Estes resultados confirmam a utilidade da avaliação do efeito da interação P-Zn na mobilidade desses nutrientes, já que a interação pode modificar o teor desses nutrientes no solo. Com base no exposto, o fracionamento de P e a análise sequencial de Zn no solo constituem em excelentes ferramentas para o entendimento da disponibilidade e solubilidade de P e Zn no solo, descrevendo o efeito da interação P-Zn nas frações do solo. Desta maneira, objetivou-se com esse trabalho avaliar a disponibilidade de P e Zn em solo de rizosfera em resposta a doses de P e Zn em duas classes de solo cultivados com algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Condições experimentais

O experimento foi realizado em condições de casa de vegetação no período de janeiro a abril de 2015. A temperatura máxima, mínima e média, durante o período experimental foi: 40; 20 e 30°C, respectivamente. A umidade relativa do ar média de 65 % e radiação fotossinteticamente ativa máxima de aproximadamente 700 μ mol m⁻² s⁻¹. O estudo foi

realizado em vasos com capacidade de 10 dm³ preenchidos com amostras coletadas da camada de 0 – 20 cm de um Neossolo Quartzarênico (arenoso) e um Latossolo Vermelho Amarelo (argiloso) (EMBRAPA, 2013), todos com teores baixos de P (6-12 mg dm⁻³) e Zn (0-0,5 mg dm⁻³) (RAIJ et al., 1997). O experimento foi realizado com solos contrastantes ao teor de argila (arenoso *x* argiloso), a fim de averiguar as diferenças da interação P-Zn nessas classes texturais. Foram utilizados 60 vasos para cada tipo de solo, distribuídos em delineamento de blocos completos ao acaso, em esquema fatorial 5 x 3, com quatro repetições para cada tratamento. Foram estudadas as combinações de cinco doses de P (0, 30, 60, 90, 180 mg dm⁻³) e três doses de Zn (baixo = 0; médio = 1,5; alto = 6 mg dm⁻³), resultando em 15 combinações. As doses escolhidas foram baseadas a partir da compilação de dados de experimentos em vaso em casa de vegetação, estipulando doses maiores e menores do que o recomendado para P (60 mg dm⁻³) e Zn (1,5 mg dm⁻³) para as condições inicias de cultivo.

2.2.2 Propriedades físicas e químicas do solo

O solo arenoso apresentou constituição de 150, 50 e 800 g kg⁻¹ de argila, silte e areia, respectivamente e; o solo argiloso 619, 141 e 240 g kg⁻¹ de argila, silte e areia, respectivamente. As propriedades químicas (de acordo com RAIJ et al., 2001) do solo arenoso foram: pH 5,6 (_{CaCl2}); matéria orgânica 5 g dm⁻³; P (Resina) 2 mg dm⁻³; K 0,3 mmol_c dm⁻³; Ca 5 mmol_c dm⁻³; Mg 2 mmol_c dm⁻³; H + Al 22 mmol_c dm⁻³; CTC 29 mmol_c dm⁻³; soma de bases 7 mmol_c dm⁻³; saturação por bases 25%; S (SO4⁻²) 4 mg dm⁻³; Cu 0,5 mg dm⁻³ (DTPA); Fe 4 mg dm⁻³ (DTPA); Zn 0,5 mg dm⁻³ (DTPA); Mn 1,0 mg dm⁻³ (DTPA); B 0,3 mg dm⁻³ (água quente).

Os resultados das propriedades químicas do solo argiloso determinadas foram: pH 4,2; matéria orgânica 20 g dm⁻³; P (disponível) 2 mg dm⁻³; K 1,3 mmol_c dm⁻³; Ca 8 mmol_c dm⁻³; Mg 3 mmol_c dm⁻³; H + Al 64 mmol_c dm⁻³; CTC 76 mmol_c dm⁻³; soma de bases 12 mmol_c dm⁻³; saturação por bases 16%; S (SO₄) 8 mg dm⁻³; Cu 0,5 mg dm⁻³ (DTPA); Fe 4 mg dm⁻³ (DTPA); Zn 0,2 mg dm⁻³ (DTPA); Mn 1,9 mg dm⁻³ (DTPA); B 0,2 mg dm⁻³ (água quente).

Com base nos dados obtidos e, por ocasião do preenchimento dos vasos, foi realizada a calagem separadamente, para elevar a saturação por bases a 70%. Foi utilizada a mistura de carbonato de cálcio e carbonato de magnésio, ambos p.a. na proporção 3:1. Após incorporação dos carbonatos os vasos foram mantidos com 50% da capacidade de campo até a semeadura.

2.2.3 Cultivo do algodoeiro

Foram utilizadas cinco sementes por vaso da cultivar FMT 709. Dez dias após a emergência, foi realizado o desbaste, permanecendo uma planta por vaso. Os vasos foram irrigados diariamente com água deionizada em quantidade suficiente para suprir a necessidade vegetal. As adubações de manutenção (semeadura e cobertura) foram realizadas conforme método preconizado por Malavolta et al. (1980), sendo utilizados como fertilizantes matérias primas de uso laboratorial p.a. para evitar contaminação. O P foi fornecido por meio de KH₂PO₄ (com balanceamento do K nos tratamentos) a fim de isolar o efeito da competição entre o Zn e outros cátions adicionados a adubos fosfatados, na absorção. Já para fornecimento de Zn foi por meio da aplicação de ZnCl₂.

Quando as plantas atingiram o estádio de emissão do primeiro botão floral - estádio B1 (60 dias após início dos tratamentos), segundo escala fenológica do algodoeiro (MARUR; HUANO, 2001) - foi realizada a coleta das folhas utilizadas para a diagnose foliar. A folha diagnose correspondeu à quinta folha completamente expandida a partir do ápice da haste principal, considerando como folha completamente expandida aquela com tamanho mínimo de 2,5 cm (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

Ao final do experimento (aos 90 dias após a emergência), as plantas apresentavam-se em florescimento pleno. Destaca-se que nessa época surgiram os sintomas de carência por P e Zn. Os vasos foram desmontados, coletando-se amostras de solo de rizosfera em todas as unidades experimentais, conforme descrito por Macedo et al. (2016). Foi coletado o solo aderido em raízes secundárias com auxílio de um pincel. Na colheita, as plantas foram separadas em parte aérea (folhas + caule) e raízes. Posteriormente foram determinadas a massa seca da parte aérea e a massa seca das raízes.

2.2.4 Análise química do tecido vegetal

No tecido vegetal (folha diagnose, parte aérea e raízes) foram determinadas as concentrações de P e Zn. O extrato para determinação foi obtido via digestão nítricoperclórica, a partir do qual foram determinados os nutrientes usando a visualização radial do espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado (ICP-OES), equipado com câmara de nebulização. Os seguintes comprimentos de ondas foram utilizados: P I (213,618 nm) e Zn II (231,865 nm). O acúmulo de nutrientes foi calculado pelo produto entre a massa seca (parte aérea ou raiz) e a concentração do nutriente no respectivo tecido vegetal (MALAVOLTA, VITTI; OLIVEIRA, 1997).

2.2.5 Análise de P no solo de rizosfera

Realizou-se a análise do P no solo conforme método preconizado por Hedley et al. (1982), adaptado por Condron et al. (1985), fracionando o fósforo total (Pt) em frações inorgânicas (Pi) e orgânicas (Po). Amostras de 0,5 g de solo foram submetidas a diferentes extratores, em ordem sequencial, que simulam o grau de disponibilidade de P no solo para a planta. Primeiro, foi determinado o Pi extraído por uma lâmina de resina de troca aniônica (RTA) de 2 cm² saturada com NaHCO₃ (0,5 mol L⁻¹). Em seguida, essa lâmina foi imersa em 10 mL de água em contato direto com o solo (PRTA). Na mesma amostra, foram adicionados 10 mL de NaHCO₃ (0,5 mol L⁻¹), extraindo-se o Pi lábil fracamente ligando a compostos inorgânicos (Pi_{Bic}) e o Po lábil (Po_{Bic}). Posteriormente, foi extraído o P sorvido por Fe e Al (Pi_{NaOH0.1}) e o Po moderadamente lábil (Po_{NaOH 0.1}), pela adição de 10 mL de NaOH (0,1 mol L⁻¹). Em seguida, foi extraído o P fortemente ligado com o fosfato de cálcio (Pi_{HCl}), mediante a adição de 10 mL de HCl (1 mol L⁻¹). Após, adicionou-se 10 mL de NaOH (0,5 mol L⁻¹) com o objetivo de extrair o fósforo inorgânico (Pi_{NaOH 0,5}) e orgânico (Po_{NaOH 0,5}) não labil. O P residual ($P_{residual}$) foi extraído do solo residual, mediante digestão com $H_2SO_4 + H_2O_2 + MgCl_2$ saturado (BROOKES; POWLSON, 1981). Logo em seguida, foi retirada uma alíquota dos extratos alcalinos – extração com NaHCO₃ (0,5 mol L⁻¹) e NaOH (0,1 mol L⁻¹) e NaOH (0,5 mol L^{-1}) - para determinação do Pt por digestão com (NH₄)₂S₂O₈ + H₂SO₄ em autoclave, com o objetivo de calcular o Po de cada fração pela diferença (Pt – Pi) de cada extrato.

O teor de P dos extratos ácidos foi determinado pelo método de Murphy e Riley (1962), enquanto o P inorgânico dos extratos alcalinos foi analisado pelo método proposto por Dick e Tabatabai (1977). Adicionalmente, as diferentes frações de P foram classificadas segundo a labilidade do P em função do extrator. O P lábil é relativo as frações P_{RTA}, Pi_{Bic} e Po_{Bic}. O P moderadamente lábil relaciona-se com os teores Pi_{NaOH 0,1}, Po_{NaOH 0,1} e Pi_{HCl}. O P não lábil é relativo Pi_{NaOH 0,5}, Po_{NaOH 0,5} e P_{residual}.

Os teores totais de P foram determinados nas amostras de solo de rizosfera antes do fracionamento, por meio de digestão ácida ($H_2SO_4 + H_2O_2 + MgCl_2$ saturado) (BROOKES; POWLSON, 1981), enquanto os teores disponíveis foram avaliados pelos extratores Resina, conforme método preconizado por Raij et al. (1986); Mehlich-1, conforme método preconizado por Nelson et al. (1953) e Mehlich-3, conforme método preconizado por Mehlich (1984). Para a determinação de P nesses extratos seguiu-se o método proposto por Murphy e Riley (1962).

2.2.6 Análise de Zn no solo de rizosfera

Realizaram-se análises de Zn nas frações do solo, por meio de extração sequencial conforme metodologia proposta por Silveira et al. (2006), sem o desdobramento das formas ligadas aos óxidos de Fe, Al e Mn. Amostras de 1 g de solo foram submetidas a diferentes extratores, em ordem sequencial, que simulam o grau de disponibilidade de Zn no solo para a planta. A primeira extração com CaCl₂ (1,0 mol L⁻¹) a pH 7,0 extraiu o Zn trocável (Zn_{Troc}). A segunda extração com NaOAC (1,0 mol L⁻¹) a pH 5,0 extraiu o Zn adsorvido a carbonatos (Zn_{Carb}). Em seguida foi determinada a terceira fração com NaOCl a pH 8,5 para extrair Zn ligado a matéria orgânica (Zn_{MO}). A quarta extração com ácido oxálico (0,2mol L⁻¹) + NH₄ oxalato (0,2 mol L⁻¹) a pH 3 determinou o Zn ligado a óxidos (Zn_{Oxi}). Adicionalmente, depois de todas as extrações, foi determinada a fração residual (Zn_{Res}), realizando digestão ácida (HNO₃ + H₂O₂ + HCl) (USEPA, 1996).

Os teores totais de Zn (Zn_{Total}) foram determinados nas amostras de solo de rizosfera antes do fracionamento de Zn por meio de digestão ácida (HNO₃ + H₂O₂ + HCl) (USEPA, 1996), enquanto os teores disponíveis foram avaliados pelos extratores DTPA, conforme método preconizado por Lindsay e Norwell (1978); Mehlich-1, conforme método preconizado por Nelson et al. (1953) e Mehlich-3 conforme método preconizado por Mehlich (1984).

2.2.7 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos às análises estatísticas utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 2000) e ao nível de significância de 5%. As pressuposições do modelo como a normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Hartley. No caso de interação, os efeitos das doses de P foram ajustados ao modelo linear ou quadrático para cada dose de Zn estudada. Além disso, foram comparadas as diferenças entre as doses de Zn dentro de cada dose de P por meio do teste t (Student). No caso de ausência de interação, foi estudado o efeito isolado das doses de P ajustados ao modelo linear ou quadrático e/ou o efeito das doses de Zn pelo teste t (Student) para as variáveis respostas. Também foram realizadas análises de correlações entre o P e Zn recuperado pelos extratores e a concentração de P e Zn nos tecidos vegetais.

2.3 Resultados

2.3.1 Interação P-Zn na planta

Os resultados de massa seca da parte aérea se ajustaram ao modelo quadrático em função das doses de P submetida a maior dose de Zn (Figura 2.1A). Resultados semelhantes foram observados para a massa seca da parte aérea das plantas cultivadas em Latossolo (Figura 2.1B). Contudo, as plantas cultivadas em Latossolo com dose intermediária de Zn acumularam massa seca da parte aérea de forma linear. Já as plantas cultivadas com dose alta de Zn, apresentaram maior acúmulo de massa seca na dose 121 mg kg⁻¹.

Figura 2.1. Massa seca da parte aérea (MSPA) do algodoeiro cultivado em Neossolo Quartzarênico (A) e Latossolo (B) em resposta a interação de doses de P e Zn; Massa seca de raízes (MSRZ) de algodoeiro cultivado em Neossolo Quartzarênico (C) e Latossolo (D) em resposta a doses de P. Comparação de médias entre as doses de Zn pelo teste de Student (n = 4; p \leq 0,05). alto zinco = 6,0 mg dm⁻³; médio zinco = 1,5 mg dm⁻³; baixo zinco = 0 mg dm⁻³



Destaca-se que as plantas cultivadas com alta dose de Zn acumularam mais massa seca da parte aérea do que as plantas cultivadas com média dose de Zn, exceto na última dose de P. Interessantemente, tanto as plantas cultivadas em Neossolo Quartzarênico (Figura 2.1A),

quanto em Latossolo (Figura 2.1B) não responderam a adubação fosfatada, quando cultivadas com baixa dose de Zn. Já para a produção de massa seca de raiz, observou-se aumento linear em função das doses de P, não sendo observado efeito das doses de Zn para a produção de raízes, tanto no Neossolo Quartzarênico (Figura 2.1C), quanto no Latossolo (Figura 2.1D).

Observou-se interação das doses de P e Zn para as concentrações de P na folha diagnostica do algodoeiro nas duas classes de solos estudadas. No Neossolo Quartzarênico, a concentração de P foliar aumentou em função das doses de P combinadas com todas as doses de Zn (Figura 2.2A), todavia, as plantas cultivadas com baixo Zn demonstraram os maiores teores de P foliar. Na maior dose de P, as plantas cultivadas com baixa dose de Zn no Neossolo Quartzarênico, apresentaram concentração de P três vezes maior do que as plantas cultivadas com a dose recomendada de Zn – dose média. Resultado diferente foi observado para o teor de P em folha diagnostica das plantas cultivadas no Latossolo (Figura 2.2B). Observou-se efeito das doses de P apenas nas plantas cultivadas com alta e média dose de Zn, sendo que as plantas cultivadas com baixo Zn apresentaram os menores teores de P na folha. Na maior dose de P, as plantas cultivadas com alta dose de Zn, no Latossolo, apresentaram concentração de P quatro vezes maior do que as plantas cultivadas com baixa dose de Zn.

O acúmulo de P na massa seca da parte aérea do algodoeiro cultivado no Neossolo Quartzarênico aumentou em função das doses de P, na combinação com as três doses de Zn (Figura 2.2C). De forma semelhante ao observado ao teor foliar de P dessas plantas, as maiores médias foram encontradas nas plantas cultivadas com baixa dose de Zn. No Latossolo, o acúmulo de P na parte aérea aumentou em função das doses de P combinadas com a dose alta e média de Zn (Figura 2.2D), sendo observados os maiores valores para as plantas cultivadas com alto Zn. Comparando-se as plantas cultivadas na maior dose de P (180 mg dm⁻³), notou-se que as plantas cultivadas com alto Zn acumularam três vezes mais P na parte aérea, do que as plantas cultivadas com médio ou alto Zn no Neossolo (Figura 2.2 C). Já no Latossolo, comparando-se as plantas cultivadas na maior dose de P, notou-se que a adubação com alto Zn foi a que proporcionou o maior acúmulo de P na parte aérea – aproximadamente quatro vezes maior do que as plantas com nível baixo de Zn no solo.

O acúmulo de P nas raízes variou em função das doses de P no Neossolo Quartzarênico (Figura 2.2E) e Latossolo (Figura 2.2F), de forma semelhante ao observado para a produção de massa seca das raízes (Figura 2.1 C e D) Observando-se o modelo, notouse que o maior acúmulo de P nas raízes nas doses 176 e 156 mg kg⁻¹, para o solo arenoso e argiloso, respectivamente. Figura 2.2. Concentração de P na folha diagnóstica de algodoeiro cultivado em Neossolo Quartzarênico (A) e Latossolo (B) em resposta a interação de doses de P e Zn; Acúmulo de P na parte aérea (PA) de algodoeiro cultivado em Neossolo Quartzarênico (C) e Latossolo (D) em resposta a interação de doses de P e Zn. Acúmulo de P nas raízes (RZ) de algodoeiro cultivado em Neossolo Quartzarênico (E) e Latossolo (F) em resposta a doses de P. Comparação de médias entre as doses de Zn pelo teste de Student (n = 4; p \le 0,05). alto zinco = 6,0 mg dm⁻³; médio zinco = 1,5 mg dm⁻³; baixo zinco = 0 mg dm⁻³



A concentração de Zn na folha diagnostica de algodoeiro também foi influenciada pela interação das doses de P e Zn. A concentração de Zn reduziu em função das doses de P com a combinação de alta e média dose de Zn, no Neossolo Quartzarênico (Figura 2.3A) e Latossolo (Figura 2.3B). Destaca-se que as plantas cultivadas com baixo Zn apresentaram a menor concentração de Zn foliar, não sendo influenciada pelas doses de P, nos dois solos avaliados.

Figura 2.3. Concentração de Zn na folha diagnóstica de algodoeiro cultivado em Neossolo Quartzarênico (A) e Latossolo (B) em resposta a interação de doses de P e Zn; Acúmulo de Zn na parte aérea (PA) de algodoeiro cultivado em Neossolo Quartzarênico (C) e Latossolo (D) em resposta das doses de P e Zn; Acúmulo de Zn nas raízes (RZ) de algodoeiro cultivado em Neossolo Quartzarênico em comparação a doses de Zn (E) e em Latossolo em resposta a doses de P (F). Comparação de médias entre as doses de Zn pelo teste de Student (n = 4; p ≤ 0.05). alto zinco = 6.0 mg dm⁻³; médio zinco = 1.5 mg dm⁻³; baixo zinco = 0 mg dm⁻³



O acúmulo de Zn na parte aérea reduziu em função das doses de P combinadas com média e alta dose de Zn nas plantas cultivadas no Neossolo Quartzarênico (Figura 2.3C). Não foi observado efeito das doses de P para o acúmulo de Zn na parte aérea das plantas cultivadas em Latossolo (Figura 2.3D) e para o acúmulo de Zn nas raízes das plantas cultivadas em Neossolo (Figura 2.3E), sendo que o maior acúmulo de Zn na parte aérea e nas raízes ocorreu na maior dose de Zn. Já no solo Latossolo, apenas as doses de P aumentaram o acúmulo de Zn nas raízes (Figura 2.3F).

2.3.2 Fracionamento de P no solo

O P_{RTA}, Pi_{Bic}, o Po_{Bic}, Pi_{NaOH 0,1}, P_{HCI} e P_{Total} foram influenciados pelas doses de P e/ou Zn no Neossolo Quartzarênico (Figura 2.4). Não foram observados efeitos das doses de P e Zn na demais frações do solo estudadas no Neossolo Quartzarênico. Contudo, a concentração do P lábil (P_{RTA} + Pi_{Bic} + Po_{Bic}) foi alterada pela interação P-Zn. O teor de P_{RTA}, que representa o P da fase sólida que restabelece o equilíbrio de forma relativamente rápida com o P em solução, aumentou em função das doses de P para todas as doses de Zn estudadas (baixa, média e alta) no Neossolo Quartzarênico (Figura 2.4A). Observando o modelo, nota-se que os maiores teores de P_{RTA} foram encontrados nas doses 137, 111 e 171 mg kg⁻¹, para as doses baixa, média e alta de Zn, respectivamente. O teor P_{RTA} do solo adubado com baixo e médio Zn foram similares. Já, o solo adubado com alta dose de Zn (6 mg kg⁻¹) apresentou maiores teores de P_{RTA} na dose 90 e 180 mg kg⁻¹ de P (Figura 2.4 A).

O teor de Pi_{Bic} aumentou em função das doses de P combinadas com a maior dose de Zn adubada no Neossolo Quartzarênico, sendo que o maior teor de P nessa fração foi encontrado a partir da dose 146 mg kg⁻¹ de P (Figura 2.4B). Os teores de Pi_{Bic} nas doses baixa e média de Zn, se ajustaram ao modelo linear. Os teores de Pi_{Bic} foram maiores na dose alta de Zn do que na dose média e baixa de Zn, na comparação das doses 60 e 90 mg kg⁻¹ de P aplicadas no solo. Na maior dose 180 mg kg⁻¹ de P, os teores de Pi_{Bic} obtidos com as doses alta e média de Zn foram similares.

Os teores de Po_{Bic} para as doses alta e média de Zn, se ajustaram ao modelo linear no Neossolo Quartzarênico (Figura 2.4C). Os teores de Po_{Bic} na baixa dose de Zn não foram influenciados pelas doses de P, sendo observado apenas diferenças em função das doses de Zn. Destaca-se que os teores de Po_{Bic} foram maiores na alta dose de Zn em todas as doses de P. Houve efeito significativo isolado para nas doses de P aplicados nas frações $Pi_{NaOH 0,1}$ (Figura 2.4D) e Pi_{HC1} (Figura 2.4E), com ajuste linear e quadrático, respectivamente. Já os teores de P_{Total} se ajustaram ao modelo quadrático em função das doses de P em todas as doses de Zn (Figura 2.4F). Os maiores teores de P_{Total} foram encontrados nas doses 179, 157 e 161 mg kg⁻¹, para as doses baixa, média e alta de Zn, respectivamente.

Figura 2.4. Teor de P extraído por resina (P_{RTA}) (A); P inorgânico extraído por NaHCO₃ (Pi_{Bic}) (B); P orgânico extraído por NaHCO₃ (Po_{Bic}) (C) em resposta a interação de doses de P e Zn; Teor de P inorgânico extraído por NaOH – 0,1 mol L⁻¹ (Pi_{NaOH 0,1}) (D); P extraído por HCl (P_{HCl}) (E) em resposta a doses de P; Teor de P total (P_{Total}) (F) em resposta a interação de doses de P e Zn em solo de rizosfera de algodoeiro cultivado em Neossolo Quartzarênico. Comparação de médias entre as doses de Zn pelo teste de Student (n = 4; p ≤ 0,05). alto zinco = 6,0 mg dm⁻³; médio zinco = 1,5 mg dm⁻³; baixo zinco = 0 mg dm⁻³


No Latossolo as doses de P e/ou Zn alteraram os teores de P_{RTA} , Pi_{Bic} , Po_{Bic} , $Pi_{NaOH 0,1}$, Po_{NaOH 0,1} e P_{total} (Figura 2.5). Para as demais frações, não foram observados efeitos significativos. A fração P_{RTA} apresentou ajuste linear em função das doses de P combinadas com a dose alta e média de Zn (Figura 2.5A). Essa fração na dose baixa de Zn, não foi modificada pelas doses de P aplicadas. Os teores de P disponíveis no solo foram semelhantes quando comparadas as doses de Zn dentro da mesma dose de P, exceto na maior dose de P (180 mg kg⁻¹). Na maior dose de P, o teor alto e médio de Zn aumentou o P na solução do solo em comparação as plantas cultivadas sem adubação com Zn.

Os teores de Pi_{Bic} incrementaram com o aumento das doses de P no Latossolo, em todas as doses de Zn estudadas (Figura 2.5B). Os maiores teores de Pi_{Bic} foram encontrados na dose média de Zn (1,5 mg dm⁻³). O maior teor de Po_{Bic} também foi encontrado na dose média de Zn, no entanto, foi observado apenas efeito isolado das doses de Zn para essa fração de P no solo Latossolo (Figura 2.5C). Os teores de Pi_{NaOH 0,1} aumentaram com o incremento das doses de P, sendo o maior teor de P nessa fração observado para a dose de P de 130 mg kg⁻¹ (Figura 2.5D). Já a fração Po_{NaOH 0,1} foram modificados apenas pelas doses de Zn (Figura 2.5E). Semelhante a fração Po_{Bic}, a dose média de Zn proporcionou o maior teor de Po_{NaOH 0,1}.

Os resultados observados para os teores de P_{total} se ajustaram ao modelo quadrático em função das doses de P em todas as doses de Zn aplicadas no Latossolo (Figura 2.5F). Observando o modelo quadrático, nota-se que os maiores teores de P_{total} foram encontrados nas doses 143, 157 e 170 mg kg⁻¹, para as doses baixa, média e alta de Zn, respectivamente. Comparando as doses de Zn, nota-se que o maior teor de P_{total} foi obtido a partir da aplicação da maior dose de Zn.

Figura 2.5. Teor de P extraído por resina (P_{RTA}) (A); P inorgânico extraído por NaHCO₃ (Pi_{Bic}) (B) em resposta a interação de doses de P e Zn; Teor de P orgânico extraído por NaHCO₃ (Po_{Bic}) (C) em comparação a doses de Zn; Teor de P inorgânico extraído por NaOH – 0,1 mol L⁻¹ (Pi_{NaOH 0,1}) (D) em resposta a doses de P; Teor de P orgânico extraído por NaOH – 0,1 mol L⁻¹ (Po_{NaOH 0,1}) (E) em comparação a doses de Zn; Teor de P total (P_{Total}) (F) em resposta a interação de doses de P e Zn em solo de rizosfera de algodoeiro cultivado em Latossolo. Comparação de médias entre as doses de Zn pelo teste de Student (n = 4; p ≤ 0,05). alto zinco = 6,0 mg dm⁻³; médio zinco = 1,5 mg dm⁻³; baixo zinco = 0 mg dm⁻³



2.3.3 Fracionamento de Zn no solo

No Neossolo Quartzarênico e no Latossolo as frações referentes ao Zn_{Troc} e Zn_{Oxi} foram influenciados pela interação das doses de P e Zn, apresentando resposta semelhantes. Os teores de Zn_{Troc} reduziram com o incremento das doses de P no solo de rizosfera das plantas cultivadas com alto e médio Zn, nos dois solos avaliados (Figura 2.6A e B). Os teores de Zn_{Troc} foram maiores no solo de rizosfera das plantas cultivadas com alto Zn, exceto na maior dose de P (180 mg kg⁻¹).

O teor de Zn_{Oxi} aumentou em função das doses de P nos dois solos avaliados (Figura 2.6C e D). Os menores teores de Zn_{Oxi} foram encontrados no solo de rizosfera das plantas cultivadas com baixo Zn nos dois solos estudados. O Zn_{Oxi} no solo de rizosfera das plantas cultivadas em Neossolo Quartzarênico não foi influenciado pelas doses de P. Além disso, destaca-se que o teor de Zn_{Oxi} das plantas cultivadas com 180 mg dm⁻³ de P e alto Zn foi duas vezes maior do que as plantas cultivadas na mesma dose de P porém com baixo Zn, no Neossolo Quartzarênico. O mesmo foi observado para o Latossolo, no entando o teor de Zn_{Oxi} das plantas cultivadas cultivadas com a maior dose de P (180 mg dm⁻³) e alto Zn foi seis vezes maiores do que as plantas na mesma dose de P com baixo Zn.

Os teores totais de Zn (Zn_{Total}) no solo de rizosfera das plantas cultivadas em Neossolo Quartzarênico e Latossolo foram maiores na alta dose de Zn aplicada (Figura 2.6E e F), não apresentando efeito das doses de P. Vale destacar que o teor de Zn_{Oxi} e Zn_{Total} do solo de rizosfera das plantas cultivadas no Neossolo foi bem menor do que os teores dessa fração observado no Latossolo. Figura 2.6. Teor de Zn trocável (Zn_{Troc}) em resposta a interação de doses de P e Zn em solo de rizosfera de algodoeiro cultivadas em Neossolo Quartzarênico (A) e Latossolo (B). Teor de Zn ligado a óxidos (Zn_{Oxi}) em resposta a interação de doses de P e Zn em solo de rizosfera de algodoeiro cultivadas em Neossolo Quartzarênico (C) e Latossolo (D). Teor de Zn total (Zn_{Total}) em comparação a doses de Zn em solo de rizosfera de algodoeiro cultivado em Neossolo Quartzarênico (E) e Latossolo (F). Comparação de médias entre as doses de Zn pelo teste de Student (n = 4; p \leq 0,05). alto zinco = 6,0 mg dm⁻³; médio zinco = 1,5 mg dm⁻³; baixo zinco = 0 mg dm⁻³



2.3.4 Extratores

As correlações obtidas entre amostras de solo de solos de rizosfera e os tecidos vegetais foram positivas para todos os extratores utilizados (inclusive para a digestão total do solo - USEPA), tanto para o os teores de P (Tabela 2.1), quando para os teores de Zn (Tabela 2.2). Destaca-se que as correlações apresentaram nível de significância de 1% e coeficiente de correlação em torno de 80 e 90%. Esse resultado foi observado para os dois solos avaliados.

Tabela 2.1. Correlação entre a disponibilidade de P no solo de rizosfera e a concentração de P na folha diagnose, bem como o acúmulo na parte aérea e na raiz das plantas de algodão

	Folha diagnose	Parte aérea	Raiz
P _{RTA}	0.92**	0.86**	0.91**
Mehlich 1	0.90*	0.81**	0.80*
Mehlich 3	0.88*	0.83*	0.82*
Resina	0.98**	0.95**	0.92**
USEPA	0.88**	0.85**	0.84**
at 1 1 1 1 1 1			

**, * significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente Foram feitas as correlações descartando as duas maiores doses de P

Tabela 2.2. Correlação entre a disponibilidade de Zn no solo de rizosfera e a concentração de Zn na folha diagnose, bem como o acúmulo na parte aérea e na raiz das plantas de algodão

U i			U
	Folha diagnose	Parte aérea	Raiz
Zn _{Troc}	0.88**	0.95**	0.81**
Mehlich 1	0.88*	0.76**	0.71**
Mehlich 3	0.75*	0.75*	0.73*
DTPA	0.91**	0.97**	0.80**
USEPA	0.83**	0.88**	0.85**

**, * significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente Foram feitas as correlações descartando as duas maiores doses de P

2.4 Discussão

Os resultados demonstraram que a interação P-Zn foi dependente das propriedades químicas do solo, de modo que essa interação interferiu na distribuição destes elementos nas frações químicas avaliadas. Mesmo assim, a interação P-Zn nos dois solos usados para o cultivo modificou a produção de massa seca (Figura 2.1), a concentração e o acúmulo de P (Figura 2.2), bem como a concentração e o acúmulo de Zn (Figura 2.3). Isso demonstra que o controle da absorção desses nutrientes pela planta depende, primeiramente, das relações químicas desses elementos no solo de rizosfera antes da absorção pela planta.

Sob baixa disponibilidade de Zn no solo não foi verificada resposta das plantas quanto ao acréscimo de P, independente da dose utilizada (Figura 2.1A e B). Esse resultado é importante, pois o algodoeiro é muitas vezes cultivado em solos de baixa fertilidade em P e Zn, entretanto, em muitos casos, somente o P é suplementado. Destaca-se que a adubação com Zn aumentou os teores de P lábil ($P_{RTA} + Pi_{Bic} + Po_{Bic}$), estimulando a maior absorção de P pela planta. O Zn desempenha papel específico na via de transdução de sinal responsável pela regulação de genes que codificam a absorção e uso de P (ROSE et al., 2013). Ova et al. (2015) relataram que a maior produção de massa seca de plantas de trigo foi observada em altas doses de P apenas combinadas com altas doses de Zn. No presente trabalho, as plantas sem adubação de Zn apresentaram baixa produção de massa seca independente da classe textural do solo de cultivo. Contudo, o efeito do tipo de solo na interação P-Zn foi evidenciado pelos resultados de absorção de P e Zn pela planta (Figuras 2.2 e 2.3).

As plantas cultivadas em Neossolo com baixo Zn apresentaram maior concentração de P na folha diagnose e acúmulo desse nutriente na parte aérea do que as plantas cultivadas no mesmo solo com média e alta dose de Zn (Figura 2.2A e C). Diferentemente do observado no Latossolo, no qual as plantas cultivadas com baixo Zn e altas doses de P, não apresentaram alta absorção de P (Figura 2.2B e D). Além disso, comparando-se plantas cultivadas nos solos avaliados, observa-se diferentes concentrações foliares e acúmulos de P na parte aérea, mesmo com semelhante produção de massa seca (Figura 2.1A e B). Esse resultado é explicado pela interferência das relações químicas do solo de cultivo nos mecanismos de interação P e Zn.

A interação P-Zn no algodoeiro foi modulada pelo solo avaliado. No Neossolo, a adsorção de Р pelos óxidos referentes teores de Pi_{NaOH} aos 0.1 (15 mg kg⁻¹) (Figura 4D) foi menor do que a adsorção de P pelos óxidos do Latossolo (80 mg kg⁻¹) (Figura 5D). Desta maneira a baixa adsorção de P nos óxidos do Neossolo Quartzarênico, aumentou a disponibilidade de P em solução (P_{RTA}) (Figura 4A), que por sua vez foi absorvido em excesso nas maiores doses de P pelas plantas cultivadas em baixa dose de Zn – deficientes em Zn (concentração foliar = 20 mg kg⁻¹ – Figura 3A). Em condições adequadas de crescimento, a absorção de P pelas plantas é rigorosamente controlada, buscando manter a concentração de P em seus tecidos dentro dos limites fisiológicos (BOUAIN et al., 2014; KHAN et al., 2014). No entanto, este controle é reduzido sob a deficiência de Zn, levando ao alto acúmulo de P na planta (ROUACHED et al., 2010; SHAHZAD; ROUACHED; RAKHA, 2014).

Os teores de Po_{Bic} (Figura 5C) e Po_{NaOH 0,1} (Figura 5E) foram modificados apenas pelas doses de Zn no Latossolo, sendo que a dose baixa e alta de Zn reduziram os teores de P nessa fração. Os teores de P da fração Po_{Bic} e Po_{NaOH 0,1} são referentes ao teor de P de labilidade moderada complexado a substâncias húmicas, podendo ser fonte às plantas com o decorrer do tempo (REDEL et al., 2007). Esse efeito do Zn nos teores de Po foi evidenciado no Latossolo em função do maior teor de matéria orgânica desse solo (20 g dm⁻³) em comparação ao Neossolo avaliado (5 g dm⁻³), já que altos teores de Po são atribuídos a biomassa microbiana do solo responsável pela produção de compostos orgânicos fosfatados a partir da matéria orgânica (BÜNEMANN et al., 2008).

A redução dos teores de Po no Latossolo não modificaram a produção de massa seca das plantas e o acúmulo de P das plantas cultivadas com alta dose de Zn (Figura 2.1B e 2B). Contudo, destaca-se a importância da descrição do efeito do Zn no teor de Po do solo, já que o Po constitui em importante fonte de P estável em solos altamente intemperizados, como destacado por Rodrigues et al. (2016). Além disso, Pavinato et al. (2017) relataram que a fração orgânica de P no solo é importante fonte desse nutriente para o crescimento das culturas agrícolas em condições de baixos teores de P.

A concentração de Zn foliar reduziu em função das doses de P nos dois solos avaliados (Figura 2.3A e B). Destaca-se que o teor de Zn_{Oxi} aumentou em função das doses de P (Figura 2.6C e D), enquanto o teor de Zn_{Troc} reduziu em função das doses de P nos dois solos avaliados (Figura 2.6A e B). Desta maneira, o aumento da adsorção de Zn pelos óxidos reduziu o Zn disponível em solução, contribuindo para a redução da concentração de Zn foliar. Perez et al. (2011) relataram que o aumento da adsorção de Zn em óxidos por efeito da presença de fosfato é atribuído principalmente pela formação de complexo terciário óxido-P-Zn. Sugere-se que o mesmo ocorreu no presente trabalho. Desta maneira, a deficiência de Zn induzida por P também pode ser explicada pela redução de Zn disponível em solução fosfatada P, além dos mecanismos de interação dependentes da planta.

A interação P-Zn no algodoeiro no presente trabalho foi resultado da soma das relações químicas referentes ao solo de cultivo e das relações fisiológicas do metabolismo vegetal, sendo essa hipótese evidenciada pelas diferenças entre a produção de massa seca da parte aérea das plantas cultivadas em Neossolo Quartzarênico e Latossolo (Figura 2.1A e B). As plantas cultivadas no Neossolo Quartzarênico com média e alta dose de Zn apresentaram acúmulo de massa seca e concentração foliar de Zn semelhante (Figura 2.1A e 2.3A).

Já no Latossolo, a alta dose de Zn foi a que possibilitou os maiores resultados de massa seca da parte aérea e de concentração de Zn foliar (Figura 2.1B e 2.3B). Assim, as plantas cultivadas no Latossolo foram responsivas a maior dose de Zn, enquanto no Neossolo, em função da baixa adsorção de Zn, as plantas não apresentaram diferenças na produção de massa seca da parte aérea entre a dose média e alta de Zn (Figura 2.1A).

No Latossolo, a maior absorção de Zn das plantas cultivadas com alta dose de Zn, possibilitou o uso eficiente de P para produção de massa seca, apresentando maior massa seca da parte aérea (Figura 2.1B). O Zn possui papel de sinalizador no metabolismo em condições de baixa disponibilidade de P para absorção, sendo que plantas com alto Zn aumentam a eficiência no uso de P (HUANG et al., 2000; ROSE et al., 2013). Desta maneira, claro a existência do efeito dos atributos químicos do solo na interação P-Zn na planta, como resultado da disponibilidade de ambos os nutrientes na solução do solo.

2.5 Conclusões

As doses de P e Zn modificaram a disponibilidade desses nutrientes nas frações avaliadas pelo fracionamento de P e extração sequencial de Zn no solo de rizosfera avaliado. O efeito das doses de P e Zn foi mais evidente no Latossolo em função de sua textura mais argilosa, consequentemente, é maior a probabilidade de interação entre os coloides do solo e os nutrientes avaliados. Sob altas concentrações de Zn, o teor de P disponível em solução aumenta, beneficiando o crescimento no algodoeiro. Altas doses de P aumentam o teor de Zn ligado a óxidos e reduz o teor de Zn prontamente disponível para absorção. Desta maneira, para o adequado manejo nutricional do algodoeiro, na necessidade da adubação com altas doses de P, deve-se levar em consideração os teores de Zn disponíveis para garantir a eficiente adubação fosfatada.

Portanto, a interação P-Zn é dependente das relações do solo, que por sua vez modificam a disponibilidade desses nutrientes na solução para posterior absorção. Todavia, como a dinâmica nutricional da planta, sob a perspectiva de absorção e utilização de P e Zn no metabolismo, responde a interação P-Zn?

3. Interação fósforo-zinco na dinâmica nutricional do algodoeiro: absorção de Zn aumenta o uso eficiente de P na fotossíntese

Resumo

O tema referente à interação fósforo (P) × zinco (Zn) ainda apresenta informações controversas. Ademais, as respostas desta interação quanto à eficiência do uso de nutrientes na fotossíntese são mal compreendidas. Desta maneira, objetivou-se investigar o efeito da interação P-Zn no acúmulo de nutrientes no tecido vegetal; nas alterações no processo fotossintético, determinadas pelas trocas gasosas, e consequentes mudanças no crescimento do algodão em resposta à nutrição de P e Zn. As plantas foram cultivadas em casa vegetação, em sistema de vasos com solução nutritiva com doses de P e Zn. O crescimento da raiz das plantas cultivadas com pouca disponibilidade de P e Zn foi semelhante ao das plantas cultivadas com altas doses combinadas de P e Zn. O desequilíbrio nutricional resultou em uma alteração da taxa fotossintética líquida e consequentes alterações no acúmulo de biomassa e no acúmulo de nutrientes. A interação P-Zn altera a dinâmica nutricional do algodoeiro modificando o crescimento da raiz e a taxa fotossintética, no entanto, essa interação não modifica a capacidade de absorção de P ou Zn por comprimento de raiz. O aumento da disponibilidade de P diminui a concentração de Zn em algodoeiro. Além disso, a deficiência de Zn prejudica a absorção adequada de P pelo algodoeiro, induzindo sintomas de toxicidade de P. Do mesmo modo, pouco P disponível para absorção para planta prejudica a absorção adequada de Zn, induzindo sintomas de toxicidade por Zn. Estes resultados indicam que o maior crescimento da planta de algodão só é alcançado com alta disponibilidade de P e Zn conjunta, e a maior disponibilidade de apenas um desses nutrientes separadamente pode levar a deficiência ou toxicidade, resultando em baixa eficiência na assimilação de CO₂.

Palavras-chave: comprimento e superfície de raiz; Deficiência de Zn induzida por P; eficiência no uso de nutrientes na fotossíntese; toxicidade por P; toxicidade por Zn.

Phosphorus-zinc interaction in the nutritional dynamics of cotton: Zn uptake increases the use efficiency of P in photosynthesis

Abstract

Interaction phosphorus (P) \times zinc (Zn) still presents controversial information. In addition, the responses of this interaction regarding the efficiency of nutrient use in photosynthesis are poorly understood. In this way, the objective was to investigate the effect of the interaction P-Zn on the accumulation of nutrients in the vegetal tissue; changes in the photosynthetic process, determined by gas exchange, and consequent changes in cotton growth in response to P and Zn nutrition. The plants were grown in greenhouse, in potting system with nutrient solution with different doses of P and Zn. Root growth of cultivated plants with low availability of P and Zn was similar to that of plants grown with combined high doses of P and Zn. Nutritional imbalance resulted in a change in the net photosynthetic rate and consequent changes in the biomass partition and nutrient accumulation. P-Zn interaction alters the nutritional dynamics of cotton by modifying root growth and photosynthetic rate; however, this interaction does not modify the absorptive capacity of P or Zn by root length. The increase in P availability decreases the concentration of Zn in cotton. In addition, Zn deficiency impairs the adequate absorption of P by the cotton, inducing symptoms of P toxicity. Similarly, little P available for plant absorption impairs adequate absorption of Zn, inducing Zn toxicity symptoms. These results indicate that greater growth of the cotton plant is only achieved with high availability of P and Zn together, and the increased availability of only one of these nutrients separately can lead to deficiency or toxicity, resulting in low efficiency in CO₂ assimilation.

Keywords: root length and surface; P-induced Zn deficiency; nutrient use efficiency in photosynthesis; P toxicity; Zn toxicity

3.1 Introdução

O efeito da interação fósforo (P) x zinco (Zn) já foi discutida para várias espécies. Os resultados sugerem mecanismos de regulação de absorção e uso desses nutrientes, sendo que a deficiência ou excesso de cada um deles modifica o balanço nutricional (REED, 1946; NORVELL; WELCH, 1993; ZHU; SMITH; SMITH, 2001; BROADLEY et al., 2010; OVA et al., 2015). Porém, as informações controversas sobre a interação P-Zn evidenciam a necessidade de trabalhos que investiguem essa relação nutricional baseados na elucidação de como as plantas respondem fisiologicamente a essa interação.

A deficiência de Zn é associada com o aumento da concentração de P na parte aérea, ou pode também ser entendida como causa do efeito de diluição de Zn no tecido. Marschner e Cakmak (1986) relataram que em condição de deficiência de Zn ocorreu aumento no transporte de P para parte aérea de plantas de algodão e redução de Zn fisiologicamente disponível. A deficiência de Zn induz a expressão de genes que aumentam a absorção de P nas raízes (HUANG et al., 2000) e seu transporte no xilema (KHAN et al., 2014), induzido o aumento de P na parte aérea vegetal. Entretanto, não foi observado efeito do Zn na regulação da absorção de P em outras culturas agrícolas, como a batata (BARDEN et al., 2011) e a *Brachiaria brizantha* (MARTINS et al., 2014).

O P pode também influenciar a absorção e o transporte de Zn. O aumento do acúmulo de P na parte aérea das plantas pode reduzir a solubilidade do Zn, diminuindo sua disponibilidade fisiológica (CAKMAK; MARSCHNER, 1987). Além disso, altas doses de P podem imobilizar o Zn na raiz reduzindo seu transporte (NICHLOS et al., 2012). Zhang et al. (2012) relataram que a aplicação de P reduziu a concentração de Zn no grão de trigo. Em condições de alta disponibilidade de P, pode ser observado o efeito de diluição em relação ao Zn. Isso ocorre em função do alto crescimento da parte aérea que não acompanha o aumento da capacidade de absorção de Zn (MARSCHNER, 2012). Entretanto, os resultados na literatura para a deficiência de Zn induzida pelo P poderiam raramente ser explicados somente pelo efeito de diluição, pois raramente também são relatadas as reduções das concentrações de outros micronutrientes (LI et al., 2003; BOUAIN et al., 2014; ZHANG et al., 2012).

Os resultados controversos sobre a interação P-Zn indicam que a absorção desses nutrientes é controlada por uma complexa rede de sinalização. Essas sinalizações são interligadas com absorção e redistribuição de P e Zn e buscam a eficiência fisiológica, reduzindo o estresse causado pela deficiência ou excesso desses nutrientes (HUANG et al., 2000; BOUAIN et al., 2014; KHAN et al., 2014). Estudos recentes forneceram evidências de base genética para a interligação destes dois elementos indicando a necessidade de maiores

estudos considerando, principalmente, as especificidades de cada espécie vegetal (ROUACHED et al., 2010; ROSE et al., 2013; SHAHZAD; ROUACHED; RAKHA, 2014).

A maioria dos trabalhos com interação P-Zn apresentam maior enfoque na dinâmica de absorção e utilização de nutrientes, tanto macro como micronutrientes (NICHOLS et al., 2012; FAGERIA; OLIVEIRA, 2014). Além da avaliação do acúmulo de nutrientes é necessário entender se esses nutrientes estão desempenhando suas funções fisiológicas. A correlação entre os resultados observados quanto o desenvolvimento vegetal, a avaliação nutricional e as trocas gasosas auxiliam o melhor entendimento da interação P-Zn em culturas, nas quais é comum a adubação com altas doses de P e Zn. Nesse contexto insere-se o algodoeiro com espécie responsiva a adubação por P e Zn (ARAÚJO; CAMACHO, 2012; SANTOS et al., 2015). O mecanismo de indução da deficiência de Zn por P já foram descritos para algodoeiro (MARSCHNER; CAKMAK, 1986; CAKMAK; MARSCHNER, 1987), no entanto, foram utilizados cultivares antigos com dinâmica nutricional e produtividade diferentes dos cultivares modernos (ROCHESTER; CONSTABLE, 2015). Desta maneira, a hipótese do trabalho é que a interação P-Zn altera a dinâmica nutricional do algodoeiro modificando a taxa fotossintética, que por sua vez resulta em alteração do crescimento vegetal. Assim, objetivou-se avaliar a interação P-Zn no acúmulo de nutrientes no tecido vegetal, nas alterações no processo fotossintético por meio de trocas gasosas, e consequente modificações no crescimento vegetal do algodoeiro em resposta a nutrição de P e Zn.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Condições experimentais

O experimento foi realizado em condições de casa de vegetação no período de janeiro a abril de 2015. A temperatura máxima, mínima e média, durante o período experimental foi: 40; 20 e 30°C, respectivamente. A umidade relativa do ar média de 65 % e radiação fotossinteticamente ativa máxima de aproximadamente 700 μ mol m⁻² s⁻¹. Foram utilizadas sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) da cultivar FMT 709.

As sementes foram colocadas para germinar em bandeja com vermiculita, umedecida com solução de sulfato de cálcio (CaSO₄ 10^{-4} mol L⁻¹). Quando as plantas emergidas atingiram cerca de 5 cm de altura foram transferidas para bandeja de plástico com capacidade de 40 L contendo solução nutritiva (HOAGLAND; ARNON, 1950) completa e diluída a 1/5 da concentração usual, denominada "solução de adaptação", de modo a agravar as carências nutricionais, considerando a contribuição das reservas da semente (dados não apresentados).

Após uma semana nesta solução de adaptação, as plantas foram transferidas individualmente para vasos plásticos (capacidade de 3,5 L – 100%) contendo soluções nutritivas (3,0 L – 100% da força iônica) e iniciando, portanto, os tratamentos. As plantas foram fixadas na região do colo com espuma de plástico e foram mantidas em aeração constante. A solução nutritiva obteve o valor de pH ajustado para 6,0 \pm 0,5 com NaOH (1 mol L⁻¹) e HCl (1 mol L⁻¹), quando necessário. As soluções foram trocadas semanalmente.

Foram estudadas as combinações de cinco doses de P (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mmol L⁻¹) e cinco doses de Zn (0,25; 0,75; 2,0; 3,0; 4,0 µmol L⁻¹), em estudo de superfície de resposta, num fatorial 5^2 fracionado, de acordo com Littel e Mott (1975). O delineamento experimental foi de blocos completos ao acaso, com quatro repetições. As 13 combinações das doses de P com as doses de Zn foram: 0,5-0,25; 0,5-2,0; 0,5-4,0; 1,0-0,75; 1,0-3,0; 2,0-0,25; 2,0-2,0; 2,0-4,0; 3,0-0,75; 3,0-3,0; 4,0-0,25; 4,0-2,0 e 4,0-4,0. O P e Zn foram fornecidos com KH₂PO₄ (com balanço do K para os tratamentos) e ZnCl₂, respectivamente.

A solução nutritiva foi preparada a partir da solução completa de Hoagland e Arnon (1950) e modificada para atender as doses de P e Zn do experimento. Para evitar a contaminação da solução pela presença indesejável de Zn, a qual poderia interferir nos resultados experimentais, foram utilizados reagentes ultrapuros. As plantas foram cultivas até o agravamento dos sintomas de carência de P e Zn. A solução nutritiva completa apresentou a seguinte composição: 12,0 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻; 4 mmol L⁻¹ de N-NH₄⁺; 6,0 mmol L⁻¹ de K; 4,0 mmol L⁻¹ de Ca; 2,0 mmol L⁻¹ de Mg; 2,0 mmol L⁻¹ de S; 50,0 µmol L⁻¹ de Cl; 25,0 µmol L⁻¹ de B; 0,5 µmol L⁻¹ de Cu; 53,7 µmol L⁻¹ de Fe; 2,0 µmol L⁻¹ de Mn.

Quando as plantas atingiram o estádio de emissão do primeiro botão floral - estádio B1 (60 dias após início dos tratamentos), segundo escala fenológica do algodoeiro (MARUR; HUANO, 2001) - foi realizada a coleta das folhas utilizadas para a diagnose foliar. A folha diagnose correspondeu à quinta folha completamente expandida partir do ápice da haste principal, considerando como folha completamente expandida aquela com tamanho mínimo de 2,5 cm (MALAVOLTA, VITTI; OLIVEIRA, 1997).

3.2.2 Trocas gasosas

Quando as plantas atingiram o estádio de emissão da primeira flor (80 dias após o início dos tratamentos), foi realizada a avaliação de trocas gasosas. As avaliações foram realizadas no limbo da folha diagnose. As avaliações de trocas gasosas consistiram em análises não destrutivas, sendo determinada a taxa de fotossintética líquida (*A*), a condutância estomática (*g_S*), a transpiração (*E*), a concentração carbono intracelular (*C_I*) e a eficiência instantânea de carboxilação (*k* = *A/Ci*). As avaliações foram realizadas no período da manhã, entre as 9:00 as 12:00 horas. Foi utilizado um analisador portátil de gás por infravermelho (*Infrared Gas Analyzer – IRGA, LI 6400, Li-Cor, Inc., Lincoln, NE, USA*). O fornecimento de CO₂ foi de aproximadamente de 380 µmol mol⁻¹. A intensidade luminosa foi de 2000 µmol m⁻² s⁻¹, com temperatura da folha mantida entre 20 a 25°C (EPHRATH et al., 2011; SANTOS et al., 2013; 2017).

3.2.3 Produção de massa seca das plantas

O experimento foi finalizado quando os sintomas de carência de P e Zn foram agravados, aos 90 dias após o início dos tratamentos, e correspondeu ao estádio fenológico de florescimento pleno, sem a presença de capulho. Na colheita, as plantas foram separadas em parte aérea (folhas + caule) e raiz. Em seguida, os limbos (das folhas recém-expandidas e maduras) tiveram suas áreas foliares quantificadas, por meio de sistema digital integrador de área LICOR[®], modelo LI-3100. A massa seca da parte aérea (folhas + caule) e da raiz foi quantificada ao final do experimento. O material foi identificado, acondicionado em sacos de papel e secado em estufa a \pm 65°C, durante 72 horas com posterior mensuração de massa.

3.2.4 Avaliação do sistema radicular

Na ocasião da colheita e separação das plantas as raízes foram imediatamente lavadas em água corrente utilizando-se duas peneiras sobrepostas com diâmetro de malha de 0,25 e 1,00 mm. Posteriormente, foram separadas em raiz pivotante e radicelas. A raiz pivotante não foi utilizada para as avaliações dos atributos radiculares (comprimento e superfície total de raízes) (ARAÚJO et al., 2004; LAVRES JUNIOR et al., 2008). Para a quantificação do comprimento e da superfície total de raízes, foi retirada uma sub-amostra para cada unidade experimental, cortando-se verticalmente um volume de raízes com cerca de 20 % da massa fresca total (ARAÚJO et al., 2004; LAVRES JUNIOR et al., 2008). Em seguida, essas subamostras foram colocadas em recipientes plásticos contendo água e armazenadas em geladeira $\pm 10^{\circ}$ C evitando-se, portanto, a desidratação e perda de massa seca por respiração durante a manipulação. Em seguida, as imagens das raízes foram obtidas com o auxílio de *scanner* e analisadas por meio do aplicativo SIARCS (Sistema Integrado para Análise de Raízes e Cobertura do Solo). Os valores totais de comprimento e superfície foram obtidos por regra de três entre os valores da subamostra e sua massa seca com a massa seca total de raízes de cada unidade experimental (LAVRES JUNIOR et al., 2008).

3.2.5 Análise química do tecido vegetal

Na folha diagnose, na parte aérea (folhas +caule) e nas raízes foram determinadas as concentrações de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn). O extrato para determinação de N foi obtido via digestão sulfúrica, sendo o N-total determinado pelo método analítico de micro-Kjeldahl. Para a determinação do demais nutrientes, foi obtido extrato via digestão nítrico-perclórica a partir do qual foram determinados os nutrientes usando a visualização radial do espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado (ICP-OES) equipado com câmara de nebulização. As seguintes linhas de emissão foram utilizadas: P I 213,618 nm; K I 769,897 nm; Ca I 422,673 nm;Mg I 280,270 nm; S I 181,972 nm; B I 249,773 nm; Cu I 324,754 nm; Fe II 259,940 nm; Mn II 259,373 nm e Zn II 231,865 nm. As concentrações de P e Zn também foram analisadas na parte aérea e raiz, sendo determinado a acúmulo de nutrientes pelo produto entre a massa seca (parte aérea ou raiz) e a concentração do nutriente na parte aérea e na raiz.

3.2.6 Eficiência de uso de P e Zn na fotossíntese

A partir dos resultados da taxa fotossintética líquida (*A*) e do acúmulo foliar de P e Zn, calcularam-se: i) eficiência no uso de P na fotossíntese (EUPfoto, µmol CO₂ mg P m⁻² s⁻¹) = (taxa fotossintética líquida, mmol CO₂ P m⁻² s⁻¹)/(acúmulo de P nas folhas, mg) e ii) eficiência no uso de Zn na fotossíntese (EUZnfoto, µmol CO₂ mg Zn m⁻² s⁻¹) = (taxa fotossintética líquida, µmol CO₂ m⁻² s⁻¹)/(acúmulo de Zn nas folhas, mg) (SMALL, 1972; HIDAKA; KITAYAMA, 2009).

3.2.7 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos às análises estatísticas utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 2000) e ao nível de significância de 5%. Os resultados foram analisados utilizando-se os procedimentos *MIXED* e *RSREG*. Nos casos em que a interação P-Zn não foi significativa os fatores foram analisados separadamente, por meio de procedimentos *GLM*.

3.3 Resultados

3.3.1 Crescimento das plantas

A massa seca da parte aérea foi influenciada pelas combinações de doses de P e Zn, sendo que as maiores doses proporcionaram os maiores acúmulos de massa seca da parte aérea (Figura 3.1A). A interação P-Zn também foi observada para produção de massa seca da raiz, bem como para o comprimento e superfície total de raízes (Figura 3.1B, C e D). As plantas cultivadas em altas doses de P e Zn apresentaram a maior produção de massa seca da raiz. Interessantemente, as plantas cultivadas em baixas doses desses nutrientes apresentaram semelhante produção de massa seca de raiz (Figura 3.1B). Resultado semelhante foi observado para o comprimento total das raízes (Figura 3.1C) e superfície total das raízes (Figura 3.1D).

As deficiências de P e Zn estimularam o crescimento das raízes como resposta adaptativa para a procura desses nutrientes limitantes. Já o maior desenvolvimento do sistema radicular em altas doses de P e Zn é explicado pela resposta do algodoeiro ao aumento do suprimento desses nutrientes em conjunto, representando pelo maior acúmulo de massa da parte aérea nas maiores doses de Zn e P (Figura 3.1A). A área foliar foi influenciada apenas pelas doses de P (Figura 3.1E). Vale destacar que, a partir da dose 1,1 mmol L⁻¹ a expansão da área foliar tornou-se mais evidente.

Figure 3.1. Produção de massa seca da parte aérea (A), massa seca de raiz (B), comprimento de raiz (C), superfície de raiz (D) e área foliar total (E) do algodoeiro em função das combinações de doses de P e Zn em solução nutritiva (n = 4; $p \le 0.05$)



3.3.2 Concentração e acúmulo de P e Zn

Constatou-se efeito da interação P-Zn para a concentração desses nutrientes na folha diagnose (Figura 3.2A e B) e no acúmulo desses nutrientes na parte aérea das plantas (Figura 3.2C e D). A concentração foliar de P aumentou em função do incremento deste macronutriente na solução nutritiva de cultivo (Figura 3.2A). Destaca-se que esse resultado foi evidenciado na menor dose de Zn (0,25 μ mol L⁻¹). À medida que a disponibilidade de Zn na solução nutritiva aumentou, o acúmulo de P na parte área foi reduzido (Figura 3.2C). Destaca-se que as plantas cultivadas na dose 3 mmol L⁻¹ de P combinada com a dose 0,75 μ mol L⁻¹ de Zn apresentaram necrose generalizada nas folhas mais velhas (Figura 3.3A), indicando toxidade por P. As plantas com sintoma de toxidez por P apresentaram a alta concentração de P (11 g kg⁻¹) e baixa concentração de Zn (23 mg kg⁻¹) na folha diagnose (Figura 3.2A e B).

As plantas cultivadas com a maior dose de Zn (4 μ mol L⁻¹) e dose 2 mmol L⁻¹ de P apresentaram sintomas de toxidade por Zn (Figura 3.3B). A concentração de Zn na folha utilizada para diagnose nessas plantas foi 40 mg kg⁻¹ (Figura 3.2B). Desta maneira, as plantas cultivadas com altas doses de P combinadas com baixas doses de Zn, ou altas doses de Zn combinadas com baixas doses de P, não regularam a absorção desses nutrientes, resultando em sintomas de toxidez. Todavia, os sintomas de toxidade não foram observados nas plantas cultivas na combinação da maior dose de P (4 mmol L⁻¹) e Zn (4 µmol L⁻¹).

O acúmulo de Zn na parte aérea aumentou em função da disponibilidade deste micronutriente na solução (Figura 3.2D). Além disso, observou-se que o aumento do acúmulo de Zn foi proporcional ao incremento de P disponível. Mesmo com o aumento do acúmulo de Zn na parte aérea, ao final do experimento, as plantas cultivadas com a maior dose de P (4 mmol L⁻¹) e com dose 2 µmol L⁻¹ de Zn apresentaram sintomas de deficiência de Zn (Figura 3.3C) (concentração de Zn nas folhas = 36 mg kg⁻¹). O sintoma observado para deficiência de Zn foi identificado por folhas em expansão apresentando-se cloróticas e com formato irregular (roseta). Em seguida, essas folhas já desenvolvidas, passaram a apresentar as áreas entre as nervuras com coloração azulada. As plantas cultivadas na menor dose de Zn (0,25 µmol L⁻¹), além desses sintomas, apresentaram entrenós mais curtos (Figura 3.3D). Destaca-se que o sintoma de deficiência de Zn foi observado primeiramente nas plantas cultivadas na menor dose de Zn (0,25 µmol L⁻¹) e dose 2 mmol L⁻¹ de P.

Figure 3.2. Concentração de P (A) e Zn (B) da folha diagnóstica de algodoeiro (quinta folha totalmente expandida da haste principal); acúmulo de P (C) e Zn (D) na parte aérea do algodoeiro em função das combinações de doses de P e Zn em solução nutritiva $(n = 4; p \le 0.05)$



Figure 3.3. Sintomas de toxicidade por P em folha diagnósticas (A); Sintomas de toxicidade por Zn em folha diagnóstica (B) e sintomas de deficiência por Zn em folhas novas (C); Sintomas severos de deficiência por Zn com menores internódios no caule (D) (Folhas e plantas saudáveis = Plantas que não apresentaram sintomas de deficiência ou toxicidade por P ou Zn; Toxicidade por P = plantas cultivadas em 3 mmol L⁻¹ P + 0,75 µmol L⁻¹ Zn; Toxicidade por Zn = plantas cultivadas com 2 mmol L⁻¹ P + 4 µmol L⁻¹ Zn; Deficiência por Zn = plantas cultivadas com 2 mmol L⁻¹ P + 2 µmol L⁻¹ Zn; Deficiência severa por Zn = plantas cultivadas com 2 mmol L⁻¹ Zn; Deficiência severa por Zn = plantas cultivadas com 2 mmol L⁻¹ Zn; Deficiência severa por Zn = plantas cultivadas com 2 mmol L⁻¹ Zn; Deficiência severa por Zn = plantas cultivadas com 2 mmol L⁻¹ Zn; Deficiência severa por Zn = plantas cultivadas com 2 mmol L⁻¹ Zn; Deficiência severa por Zn = plantas cultivadas com 2 mmol L⁻¹ Zn; Deficiência severa por Zn = plantas cultivadas com 2 mmol L⁻¹ Cn; Deficiência severa por Zn = plantas cultivadas com 2 mmol L⁻¹ Cn; Deficiência severa por Zn = plantas cultivadas com 2 mmol L⁻¹ Cn; Deficiência severa por Zn = plantas cultivadas com 2 mmol L⁻¹ Cn; Deficiência severa por Zn = plantas cultivadas com 2 mmol L⁻¹ Cn; Deficiência severa por Zn = plantas cultivadas com 2 mmol L⁻¹ Cn; Deficiência severa por Zn = plantas cultivadas com 2 mmol L⁻¹ Cn; Deficiência severa por Zn = plantas cultivadas com 2 mmol L⁻¹ Cn; Deficiência cultivadas com 2 mmol L⁻¹ Cn; Deficiência cultivadas com 2 mmol L⁻¹ Cn; Deficiência severa por Zn = plantas cultivadas com 2 mmol L⁻¹ Cn; Deficiência cultivadas cultivadas com 2 mmol L⁻¹ Cn; Deficiência cultivadas cultivadas cultivadas cultivadas cultivadas cultivatas cultivatas cultivatas cultivatas cultivatas cultivatas cultivatas cultivatas



Na raiz, os acúmulos de P e Zn foram influenciados pelas doses de P (Figura 3.4A e B). Com o incremento da disponibilidade de P, houve aumento linear na absorção de P e Zn pelas raízes. O acúmulo de Zn na raiz também foi influenciado pelas doses de Zn (Figura 3.4C), sendo que o incremento das doses de Zn aumentou a absorção desse micronutriente na raiz. Destaca-se que taxa de absorção de nutrientes por comprimento de raiz (acúmulo de P ou Zn na raiz/comprimento de raiz) não apresentou efeito das doses de P e Zn, o que rechaça a hipótese de que o P insolubiliza o Zn nas raízes diminuindo sua absorção. Não foi observado efeito da interação P-Zn na concentração de macro e micronutrientes (Tabela 3.1). Porém foram observados efeitos das doses de P e Zn no acúmulo de N, K, Ca, Mg, S e Mn na parte aérea e o acúmulo de N, K, Ca, Mg, S, B e Fe na raiz das plantas de algodão. Já as doses de Zn incrementaram o acúmulo de Cu e Fe na parte aérea e reduziram o acúmulo de Mn na parte aérea.

Figure 3.4. Acúmulo de P (A) e Zn na raiz [B] em função das doses de P em solução nutritiva; e acúmulo de Zn na raiz [C] em função das doses de P em solução nutritiva (n = 4; $p \le 0.05$)



doses de P e Zn				1		1	1 /			1
D	oses	Ν	K	Ca	Mg	S	В	Cu	Fe	Mn
Р	Zn			-g kg ⁻¹				mg	kg ⁻¹	
0,5	0,25	31,23	26,48	24,45	9,26	7,37	89,42	8,83	423,77	14,34
0,5	2,0	32,42	28,96	24,77	8,51	6,26	73,87	9,10	282,04	18,12
0,5	4,0	32,98	30,83	26,16	8,01	8,57	71,11	7,71	221,05	12,93
1,0	0,75	30,85	26,01	25,63	8,94	8,22	73,60	7,82	350,23	13,44
1,0	3,0	30,85	30,83	21,17	8,06	7,02	71,30	8,16	318,35	13,71
2,0	0,25	30,60	25,70	25,91	8,71	7,04	57,42	7,65	233,03	19,64
2,0	2,0	33,89	22,60	23,44	8,20	7,96	101,24	7,25	251,92	12,81
2,0	4,0	30,88	26,48	18,59	6,00	5,78	56,10	7,76	169,49	15,36
3,0	0,75	30,95	21,82	19,47	6,57	5,17	63,60	6,74	269,47	17,76
3,0	3,0	32,81	28,19	29,11	9,42	8,95	83,39	5,73	268,47	24,73
4,0	0,25	35,36	27,72	30,12	9,22	10,20	83,56	8,64	226,94	17,71
4,0	2,0	31,23	26,48	24,45	9,26	7,37	89,42	8,83	423,77	14,34
4,0	4,0	32,42	28,96	24,77	8,51	6,26	73,87	9,10	282,04	18,12

Tabela 3.1. Concentração de nitrogênio (N), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe) e manganês (Mn) da folha diagnóstica de algodoeiro (quinta folha totalmente expandida da haste principal) cultivar FMT 209 para as doses de P e Zn

Tabela 3.2. Acúmulo [Y] de nitrogênio (N), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe) e manganês (Mn) na parte aérea e raiz do algodoeiro cultivar FMT 209, para as doses de P e Zn [X]

	Acúmulo de Nutrientes	\mathbb{R}^2	Acúmulo de Nutrientes	\mathbb{R}^2					
	Parte aérea								
	Doses de P		Doses de Zn						
Ν	$Y_N = 311,39 + 26,00*P$	0,75*	-	n.s.					
Κ	$Y_{K} = 111,73 + 10,46*P$	0,78*	-	n.s.					
Ca	$Y_{Ca} = 377,00 + 56,57*P$	0,76**	-	n.s.					
Mg	$Y_{Mg} = 129,73 + 15,44*P$	0,65*	-	n.s.					
S	$Y_{S} = 183,85 + 26,08*P$	0,85*	-	n.s.					
В	-	n.s.	-	n.s.					
Cu	-	n.s.	$Y_{Cu} = 60,26 + 16,17*Zn$	0,78**					
Fe	-	n.s.	$Y_{Fe} = 641,70 + 210,03*Zn$	0,96**					
Mn	$Y_{Mn} = 256,46 + 53,99 * P$	0,85*	$Y_{Mn} = 53,16 - 14,07*Zn$	0,90*					
		Raiz							
	Doses de P		Doses de Zn						
Ν	$Y_N = 47,95 + 9,97*P$	0,73**	-	n.s.					
Κ	$Y_{K} = 11,11 + 1,17*P$	0,63*	-	n.s.					
Ca	-	n.s.	-	n.s.					
Mg	$Y_{Mg} = 6,52 + 0,51 * P$	0,77*	-	n.s.					
S	$Y_S = 14,14 + 1,93*P$	0,80**	-	n.s.					
В	$Y_B = 107,01 + 10,58*P$	0,91*	-	n.s.					
Cu	-	n.s.	-	n.s.					
Fe	$Y_{Fe} = 5981,42 + 1186,22*P$	0,73*	-	n.s.					
Mn	-	n.s.	-	n.s.					

n = 4 replicatas biológicas; R^2 = coeficiente de variação; n.s. não é significativo (p < 0,05). ** é significativo a 0,01; e * é significativo a (0,05)

3.3.3 Trocas gasosas

A maior taxa fotossintética líquida (A) ocorreu nas maiores doses de P combinadas com as maiores doses de Zn (Figura 3.5A). O aumento da disponibilidade P sem o incremento da concentração de Zn na solução resultou em baixa taxa fotossintética. A maior condutância estomática (g_s) e a taxa de transpiração (E) também foram observadas na combinação das maiores doses de P e Zn (Figura 3.5B e C). Contudo, o efeito positivo da disponibilidade de Zn para a g_s e para E foi mais evidente do que o efeito do P. Vale destacar que a alta condutância estomática e a alta transpiração foram observadas nas maiores doses de Zn, independente das doses de P. Não ocorreu efeito das doses de P e Zn para a concentração carbono intracelular (Ci). Contudo a eficiência de carboxilação instantânea (k) seguiu o mesmo padrão da taxa fotossintética líquida (Figura 3.5D), em que as maiores doses de P e Zn proporcionaram a maior eficiência de carboxilação.

Figure 3.5. Taxa fotossintética liquida (*A*) (A), condutância estomática (g_s) (B), transpiração (*E*) (C) e eficiência de carboxilação ($k = A/C_i$) (D) avaliadas na folha diagnóstica de algodoeiro (quinta folha totalmente expandida da haste principal em função das combinações de doses de P e Zn em solução nutritiva (n = 4; p ≤ 0,05)



3.3.4 Eficiência de uso de P e Zn na fotossíntese

Não foi observado o efeito da interação P-Zn para as eficiências no uso de P e Zn na fotossíntese. No entanto foi observado efeito isolado das doses de P e Zn. O aumento da concentração de P na solução de cultivo reduziu a EUPfoto (Figura 3.6A). Por outro lado, a EUPfoto aumentou a medida do que a concentração de Zn em solução nutritiva foi aumentada (Figura 3.6B). Em plantas cultivadas com maior concentração de Zn em solução (4 μ mol L⁻¹), a EUPfoto foi 3,5 vezes maior que o das plantas com a menor concentração de Zn (0,25 μ mol L⁻¹). Resultado semelhante foi observado para EUZnfoto, no qual o aumento da concentração de Zn na solução reduziu a EUZnfoto (Figura 3.6C), enquanto o aumento da concentração de Zn na solução reduziu a EUZnfoto (Figura 3.6D). Em plantas cultivadas com a maior concentração de P em solução (4 mmol L⁻¹), a EUZnfoto foi duas vezes maior do que as plantas cultivadas com menor dose de P (0,5 mmol L⁻¹).

Figure 3.6. Eficiência no uso de fosforo na fotossíntese (EUPfoto) em função das doses de P (A); e doses de Zn em solução nutritiva (B); Eficiência no uso de zinco na fotossíntese (EUZnfoto) em função das doses de P (C); e doses de Zn em solução nutritiva (D) para o algodoeiro (n = 4; $p \le 0.05$)



3.4 Discussão

Os resultados indicaram que a interação P-Zn influencia a dinâmica nutricional do algodoeiro, refletindo em modificações no crescimento vegetal. Os resultados de concentração e de acúmulo de P demonstraram o controle da absorção de P pelo Zn (Figura 3.2). Isso porque em baixas doses de Zn, as plantas apresentaram alto acúmulo de P (Figura 3.2C), alta concentração de P na folha diagnose (Figura 3.2A) e sintomas de toxidez por esse macronutriente (Figura 3.3A). Em condições normais de crescimento a absorção de P pelas plantas é rigorosamente controlada, buscando manter a concentração de P em seus tecidos dentro dos limites fisiológicos e homeostase (HUANG et al., 2000; BOUAIN et al., 2014; KHAN et al., 2014). No entanto, este controle é reduzido sob a deficiência de Zn, levando ao acúmulo de P (ROUACHED et al., 2010; ROSE et al., 2013; SHAHZAD; ROUACHED; RAKHA, 2014). O Zn desempenha papel específico na via de transdução de sinal responsável pela regulação de genes que codificam transportadores de P (ROSE et al., 2013). Huang et al. (2000) relataram que a deficiência de Zn sinaliza, de forma específica, o aumento da expressão de transportadores de P de alta afinidade na raiz, independente da disponibilidade de P no meio de cultivo. Além do aumento da expressão desses transportadores na raiz, a deficiência de Zn também aumenta a expressão de transportadores de P para o xilema, consequentemente, contribuindo para o acúmulo de P na parte aérea (KHAN et al., 2014). Dessa maneira, as plantas de algodão deficientes em Zn não

As altas doses de Zn na solução nutritiva (4 µmol L⁻¹), reduziram a concentração e o acúmulo de P na parte aérea (Figura 3.2B e D). Esta redução na absorção de P está associada ao aumento do acúmulo de Zn nas raízes, que induz a planta a absorver menos P (BROADLEY et al., 2010; ROSE et al., 2013). Contudo esse efeito foi evidenciado nas maiores doses de P, indicando o efeito benéfico do controle de absorção de P pelo Zn em condições de alta disponibilidade de P. Os resultados de massa seca da parte aérea confirmam essa hipótese (Figura 3.1A), pois os maiores acúmulos de massa seca foram encontrados nas plantas cultivadas com as maiores doses de P e Zn. As plantas submetidas à alta dose de P e doses menores que 4 µmol L⁻¹ de Zn apresentaram menor produção de massa seca da parte aérea. Além disso, as plantas cultivadas com a dose 3 mmol L⁻¹ de P e 0,75 µmol L⁻¹ de Zn, apresentaram sintoma de toxidade por P (Figura 3.3A). Desta maneira, o aumento de P na solução nutritiva foi utilizado para incremento da produção de massa seca das plantas apenas quando a disponibilidade de Zn também foi incrementada.

controlaram eficientemente a absorção de P da solução nutritiva.

As plantas cultivadas com 4 mmol L⁻¹ de P e 2 µmol L⁻¹ de Zn apresentaram concentração de P na folha diagnose (Figura 3.2B) acima da faixa de suficiência (KURIHARA et al., 2013), contudo também apresentaram sintoma de deficiência de Zn (Figura 3.3C).Vale destacar que os sintomas de deficiência (Figura 3.3C) dessas plantas apresentaram-se de forma menos severa do que àquelas cultivadas na menor dose de Zn (0,25 µmol L⁻¹) (Figura 3.3D), não sendo observado redução de crescimento das plantas. Contudo, descarta-se a hipótese que o acumulo de massa seca induziu o sintoma de deficiência de Zn (efeito de diluição), pois no presente trabalho não foi observado redução da concentração dos outros micronutrientes em função das doses de P (Tabela 3.1). Ademais, o aumento da concentração de P na solução nutritiva incrementou o acúmulo de macro e micronutrientes pelo efeito das doses de P no incremento de massa seca da parte aérea. Desta maneira, o sintoma de deficiência de Zn induzido pelo incremento de P na solução nutritiva pode ser explicado pela redução da disponibilidade fisiológica de Zn pelo P, como relatado em algodoeiro (CAKMAK; MARSCHNER, 1987).

Comparando-se substratos de cultivos - solo e solução nutritiva - para diversas espécies, há relatos de que em condições de cultivo em solo, altas doses de P reduzem o acúmulo de Zn na parte aérea de várias culturas agrícolas (ZHU; SMITH; SMITH, 2001; LI et al., 2003; BROADLEY et al., 2010; OVA et al., 2015). Porém, o efeito negativo de altas doses de P no acúmulo de Zn no tecido vegetal não foi observado em vários trabalhos com solução nutritiva (NICHOLS et al., 2012), inclusive no algodoeiro (CAKMAK; MARSCHNER, 1986). Ova et al. (2015) relataram que o efeito negativo de altas doses de P no acúmulo de Zn no tecido vegetal é potencializado pela interação de micorrizas com o sistema radicular. Os mesmos autores não encontraram efeito de redução da concentração de Zn na parte aérea e em raízes de trigo cultivados em solução nutritiva. No solo, o aumento dos teores de P disponíveis reduz a colonização das micorrizas nas raízes reduzindo a absorção de Zn (WATTS-WILLIAMS et al., 2013). Contudo no presente trabalho, foi observada a "deficiência de Zn induzida pelo P". Os resultados do presente trabalho confirmam a hipótese que o efeito negativo do P na absorção de Zn é variável de acordo com a espécie estudada e que ocorre variação entre genótipos da mesma espécie. Assim, fica evidente a necessidade de trabalhos que abordem o balanço nutricional em relação à complexa interação P-Zn ao longo do tempo de cultivo, utilizando diferentes ferramentas e metodologias de diagnose foliar.

O algodoeiro apresentou capacidade para modificar sua morfologia radicular em condições de deficiência de P e Zn na tentativa de adaptar-se ao estresse causado pela baixa disponibilidade desses nutrientes (Figura 3.1B, C e D). As plantas cultivadas com baixa

disponibilidade de P e/ou Zn apresentaram desenvolvimento de raiz semelhante às plantas cultivadas com altas doses de P e Zn. Devido ao fluxo difusivo do transporte de P e Zn no solo, o aumento expressivo do crescimento radicular associado às mudanças na arquitetura radicular e à expansão do comprimento e superfície radicular são respostas adaptativas que aumentam o contato íon-raiz sinalizadas pela deficiência desses nutrientes (LYNCH; BROWN, 2001). A restrição no desenvolvimento vegetal em condições de deficiência de P e Zn transformam as raízes em forte dreno de carboidratos, estimulando seu desenvolvimento (RAMAEKERS et al., 2010; ROSE et al., 2013).

A elevada destinação de fotoassimilados para as raízes em condições de baixa disponibilidade de P já foi relatado por Zambrosi et al. (2012) em citrus. Já Martins et al. (2014) relataram maior desenvolvimento radicular em condições de baixa disponibilidade de Zn em *Brachiaria brizantha*. Vale destacar que em condições de deficiência de P e Zn, a quantidade de raízes finas e de menor comprimento foi maior do que em condições de alto suprimento de P e Zn. Esse resultado indica característica adaptativa do algodoeiro a condições de deficiência de P e Zn, possibilitando que a produção de massa seca, do comprimento e da superfície radicular fossem semelhantes àquelas observadas para as plantas cultivadas com altas doses de P e Zn (Figura 3.1). Mesmo assim, a absorção de P e Zn por comprimento de raiz não foi influenciada pela interação. Desta maneira, a deficiência de P modifica a capacidade de absorção por comprimento de raiz.

O Zn não exerceu efeito significativo na expansão da área foliar (Figura 3.1E). Todavia, em condições de deficiência de Zn, o algodoeiro apresentou menor expansão das folhas novas (CAKMAK; MARSCHNER, 1987), o que é explicado pela redução da síntese do aminoácido triptofano, precursor da biossíntese de auxina (ZHAO, 2010). Contudo, esse efeito só foi observado no tratamento com a menor dose de Zn (0,25 μ mol L⁻¹), não sendo observado o efeito das doses de Zn na expansão foliar (Figura 3.1E). As doses de Zn acima de 0,25 μ mol L⁻¹ foram suficientes para não possibilitar o efeito das doses de Zn na expansão foliar. Martins et al. (2015) também relataram a ausência do efeito do Zn na expansão foliar de *Brachiaria brizantha*. Já o incremento de P na solução de cultivo aumentou a área foliar (Figura 3.1E).

A menor *A* foi encontrada nas plantas cultivadas com as menores doses de P e Zn (Figura 3.5A). A redução na fotossíntese em plantas deficientes em P ocorre pela inativação de proteínas envolvidas na regulação do processo de assimilação de CO₂, no ciclo de Calvin e na cadeia transportadora de elétrons (ZHANG et al., 2014). O efeito positivo do P na taxa

fotossintética foi relatado diversas eucalipto já para culturas, como 0 (WU et al., 2014) e a cana-de-açúcar (ZAMBROSI et al., 2016). As baixas doses de Zn também limitaram a taxa fotossintética provavelmente pela redução da atividade da anidrase carbônica. A anidrase carbônica eleva a concentração de CO₂ no cloroplasto (ESCUDERO-ALMANZA et al., 2012). Siddiqui et al. (2015) relataram a atividade da anidrase carbônica em plantas é altamente correlacionada com a concentração de Zn disponível no metabolismo vegetal.

O efeito do Zn na anidrase carbônica pode também explicar os resultados observados para a condutância estomática e taxa de transpiração (Figura 3.5B e C). A anidrase carbônica participa da regulação da abertura e fechamento dos estômatos (ESCUDERO-ALMANZA et al., 2012). Desta maneira, a deficiência por Zn reduziu as relações hídricas em função do efeito deletério na atividade da anidrase carbônica. A menor produção de massa seca das plantas cultivadas com baixas doses de P e Zn, além dos efeitos negativos desses nutrientes no processo fotossintético, também são explicadas pela modificação fonte-dreno ocasionada pela interação. Como estratégia adaptativa a deficiência desses nutrientes as plantas alocaram o baixo carbono assimilado para o desenvolvimento do sistema radicular (Figura 3.1B, C e D).

A maior taxa fotossintética, observada apenas nas plantas cultivadas com altas doses de P e Zn, indica o uso eficiente desses nutrientes quando disponibilizados em conjunto (Figura 3.5). Portanto, a disponibilidade de P aumentou a capacidade de utilização Zn pelas plantas, sendo o inverso verdadeiro (Figura 3.6B e D). Além disso, a alta absorção de P e Zn (Figura 3.2) induziu a maior atividade fotossintética, resultando em alta produção de massa seca (Figura 3.1A). Desta maneira, para o algodoeiro, fica claro a existência de um mecanismo de controle molecular de absorção de P, sinalizado pela absorção de Zn pelas raízes dessa espécie.

O aumento da disponibilidade P em solução nutritiva reduziu a eficiência de uso de P na fotossíntese (EUPfoto), da mesma forma que o aumento da disponibilidade de Zn diminuiu a eficiência de uso de Zn na fotossíntese (EUZnfoto) (Figuras 3.6A e D). Este resultado já era esperado, porque a alta disponibilidade de P para a absorção não estimula estratégias adaptativas para a eficiência de uso P pela planta (SANTOS et al., 2015). Da mesma forma, a alta disponibilidade de Zn não estimula a planta a usar Zn de forma eficiente na fotossíntese. Por outro lado, o aumento da disponibilidade de Zn em solução nutritiva aumentou a EUPfoto, da mesma forma que o aumento da disponibilidade de P aumentou a EUZnfoto (Figuras 5.6B e C). Desta forma, o Zn estimula mecanismos fisiológicos que melhoram a capacidade do algodoeiro para utilizar P na fotossíntese. O presente trabalho sugere que Zn

aumenta a disponibilidade fisiológica de P, provavelmente, alocando esse nutriente para as células onde é mais necessário. Além disso, é possível que o mesmo efeito explique o aumento de EUZnfoto devido à maior disponibilidade de P em solução de cultivo. Mecanismos moleculares poderiam estimular a eficiência de uso desses dois nutrientes por meio de rede de sinalização e regulação. Para uma agricultura sustentável em todo o mundo é necessário estimular trabalhos que avaliem a compreensão da sinalização de sinalização P-Zn.

3.5 Conclusões

A interação P-Zn altera a dinâmica nutricional do algodoeiro modificando o crescimento da raiz e a taxa fotossintética, no entanto, essa interação não modifica a capacidade absorção de P ou Zn por comprimento de raiz. O aumento da disponibilidade de P diminui a concentração de Zn em algodoeiro. Além disso, a deficiência de Zn prejudica a absorção adequada de P nesta espécie, induzindo sintomas de toxicidade de P. Do mesmo modo, pouco P disponível para absorção pela planta prejudica a absorção adequada de Zn, induzindo sintomas de toxicidade por Zn. Estes resultados indicam que o maior crescimento da planta de algodoeiro só é alcançado com alta disponibilidade de P e Zn conjunta, e a maior disponibilidade de apenas um desses nutrientes separadamente pode levar a deficiência ou toxicidade, resultando em baixa eficiência na assimilação de CO₂.

Portanto, a interação P-Zn modifica relações de absorção, transporte e utilização de P e Zn, sendo que o Zn aumenta a eficiência de P na fotossíntese, bem como, o P aumenta a eficiência de Zn na fotossíntese. Mas como esse aumento da eficiência ocorre? Disponibilidade fisiológica? Modificação nas relações fotoquímicas? Mecanismo de atenuação do estresse a deficiência ou toxicidade?

4. Interação P-Zn nas respostas fisiológicas em algodoeiro: disponibilidade fisiológica, trocas gasosas, relações fotoquímicas e metabolismo antioxidante

Resumo

Na maioria das regiões agrícolas, o teor disponível de no solo P e Zn é baixo, causando deficiência por Zn e/ou P em plantas, consequentemente, reduzindo a produtividade agrícola. Contudo, ainda existem informações controvérsias sobre a interação desses nutrientes, sendo que a melhor compreensão dessa interação pode sugerir melhorias na adubação destes nutrientes, que por sua vez, normalmente são focadas na assimilação individual do elemento. Desta maneira, o objetivo com esse trabalho foi verificar a disponibilidade fisiológica de P e Zn por meio da atividade enzimática da fosfatase ácida e da anidrase carbônica, bem como descrever o efeito da interação nas respostas de trocas gasosas, fotoquímicas e de sistema antioxidante do algodoeiro. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos com solução nutritiva e com doses de P e Zn. Os resultados demonstraram que a absorção e uso de P e Zn são correlacionadas. O excesso ou baixa disponibilidade individual de ambos os nutrientes limitaram o crescimento do algodoeiro, exceto quando disponibilizados conjuntamente em excesso. As plantas que não foram cultivadas com concentração adequada de P e Zn em solução nutritiva obtiveram redução nas trocas gasosas, nas relações fotoquímicas e no metabolismo oxidativo. A disponibilidade de altas doses de P e Zn conjuntas possibilitam atenuação do estresse, estimulando o metabolismo antioxidativo, que por sua vez proporcionou relações de trocas gasosas e fotoquímicas semelhantes do algodoeiro cultivados em doses adequadas de P e Zn. O desbalanço da homeostase de P-Zn no algodoeiro desregulou uma série de eventos biológicos, resultando em deficiência e toxicidade por P ou Zn.

Palavras-chave: Deficiência por Zn; Toxicidade por P; Deficiência por P; Toxicidade por Zn; P-Zn homeostase.

P-Zn interaction on physiology responses in cotton: physiological availability, gas exchange, photochemical relations and antioxidant metabolism

Abstract

In most agricultural regions, the available soil P and Zn content is low, causing deficiency by Zn and / or P in plants, consequently reducing agricultural productivity. However, there is still controversial information about the interaction of these nutrients, and a better understanding of this interaction may explain the increased efficiency of use of these nutrients, which in turn, are usually focused on the individual assimilation of the element. The objective of this work was to verify the physiological availability of P and Zn through the enzymatic activity of acid phosphatase and carbonic anhydrase, as well as to describe the effect of the interaction in the gaseous, photochemical and antioxidant system responses of cotton. The plants were grown in greenhouse, in pots with nutrient solution and with doses of P and Zn. The results showed that the absorption and use of P and Zn are correlated. The excess or low individual availability of both nutrients limited the growth of cotton, except when made available together. Plants that were not cultivated with adequate concentration of P and Zn in nutrient solution obtained reduction in gas exchange, photochemical relations and oxidative metabolism. The availability of high doses of P and Zn together enables stress attenuation by stimulating the antioxidative metabolism, which in turn provided similar gaseous and photochemical relations of the cotton cultivated in adequate doses of P and Zn. The unbalance of P-Zn homeostasis in cotton has deregulated a number of biological events, resulting in P or Zn deficiency and toxicity.

Keywords: Zn deficiency; P toxicity; P deficiency; Zn toxicity; P-Zn homeostasis.

4.1 Introdução

O fósforo (P) e o zinco (Zn) são elementos essenciais para o desenvolvimento vegetal. Contudo, na maioria das regiões agrícolas, o teor disponível desses nutrientes é baixo, causando deficiência por Zn e/ou P em plantas, consequentemente, reduzindo a produtividade agrícola (GIANQUINTO et al., 2000). Desta maneira, a agricultura mundial tornou-se dependente de fertilizantes fontes de P e Zn, a fim de garantir a adequada produção. No entanto, esta estratégia tem impactos econômicos e ecológicos adversos, particularmente para o P. Prevê-se que as fontes minerais de P serão esgotadas em algumas décadas (ROY et al., 2016). Assim, esforços substanciais devem ser estimulados para a melhoraria da nutrição de P e Zn nas plantas.

Na literatura, os resultados sugerem que a absorção e uso de P e Zn é regulada por rede complexa de mecanismos fisiológicos inter-relacionada, sendo que a deficiência ou excesso de cada desses nutrientes modifica o metabolismo vegetal de forma diferente de acordo com a espécie avaliada (REED, 1946; BROADLEY et al., 2010; OVA et al., 2015). Além disso, o efeito da interação P-Zn pode até mesmo variar entre genótipos. Essa especificidade da interação P-Zn foi demonstrada pela diferença entres variedades de brássica (BROADLEY et al., 2010) e alface (BOUAIN et al., 2014). Contudo, ainda existem informações controvérsias sobre a interação desses nutrientes, de modo que a melhor compreensão dessa interação pode explicar falhas na adubação, que por sua vez, normalmente são focadas na assimilação individual do elemento.

A absorção de Zn pela planta controla o acúmulo de P em plantas. Os efeitos negativos da deficiência de Zn na absorção de P e a superacumulação nas folhas têm sido observados em várias espécies de plantas, como o milho (DWIVEDI et al., 1974), cevada (HUANG et al., 2000), alface (BOUAIN et al., 2014) e Arabidopsis (KHAN et al., 2014). Os resultados demonstram que as plantas perdem a capacidade de regular absorção de P sob deficiência de Zn e podem acumular P em excesso, levando a sintomas de toxicidade. Por outro lado, parece que a aplicação excessiva de Zn reduz a concentração de P nas plantas (REED, 1946; CAKMAK; MARSCHNER, 1987; BROADLEY et al., 2010). Além disso, a interação se torna mais complexa, pois altas concentrações de P no tecido vegetal reduzem a concentração de Zn solúvel em água e, portanto, diminui a disponibilidade fisiológica de Zn (CAKMAK; MARSCHNER, 1987; OVA et al., 2015). Mesmo assim, as respostas fisiológicas subjacentes às interações na planta continuam a ser decifradas, principalmente em cultivares modernos de culturas agrícolas exigentes na fertilização com P e Zn.

Entre as culturas agrícolas exigentes em P e Zn para a obtenção de alta produtividade, insere-se o algodoeiro (Gossypium hirsutum L.). A limitação do cultivo do algodoeiro pelo baixo suprimento de P e Zn é comum em condições de cultivo no Brasil, especialmente depois da intensificação e aumento de produtividade da cotonicultura (SANTOS et al., 2015). Além do aumento da produtividade, o P está relacionado com o comprimento e qualidade da fibra, sendo comum a adubação de altas doses de P no algodoeiro. Contudo, a alta disponibilidade de P reduz a disponibilidade fisiológica do Zn na espécie, reduzindo a atividade da superóxido dismutase e, consequentemente, promovendo o estresse oxidativo (CAKMAK; MARSCHNER, 1987). Mesmo assim, não existem relatos na literatura do efeito da interação P-Zn no sistema antioxidante vegetal, sendo escassas descrições do efeito da deficiência ou toxicidade de P e/ou Zn no estresse oxidativo. Sugere-se que a interação P-Zn altere o crescimento do algodoeiro, como resultado de modificações nas relações de trocas gasosas e fotoquímicas, bem como no estimulo do estresse oxidativo. Desta maneira, o objetivo com esse trabalho foi verificar a disponibilidade fisiológica de P e Zn por meio da atividade enzimática da fosfatase ácida e da anidrase carbônica, bem como descrever o efeito da interação nas respostas de trocas gasosas, fotoquímicas e de sistema antioxidante do algodoeiro.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Condições experimentais

O experimento foi realizado em condições de casa de vegetação no período de janeiro a março de 2016. A temperatura máxima, mínima e média, durante o período experimental foi: 35; 25 e 30°C, respectivamente. A umidade relativa do ar média foi de 70% e a radiação fotossinteticamente ativa máxima foi de aproximadamente 710 μ mol m⁻² s⁻¹. Foram utilizadas sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) da cultivar FMT 709.

As sementes foram colocadas para germinar em bandeja com vermiculita, umedecida com solução de sulfato de cálcio (CaSO₄, 10^{-4} mol L⁻¹), e quando as plantas emergidas atingiram cerca de 5 cm de altura foram transferidas para bandeja de plástico com capacidade de 40 L contendo solução nutritiva (HOAGLAND; ARNON, 1950) completa e diluída a 1/5 da concentração usual, denominada "solução de adaptação", de modo a agravar as carências nutricionais, considerando a contribuição das reservas da semente (dados não apresentados). Após uma semana nesta solução de adaptação, as plantas foram transferidas individualmente para vasos plásticos (capacidade de 3,5 L) contendo soluções nutritivas

(3,0 L) e iniciando, portanto, os tratamentos. As plantas foram fixadas na região do colo com espuma de plástico e foram mantidas em aeração constante. Durante o desenvolvimento experimental, foi realizada a renovação das soluções nutritivas a cada sete dias, completando-se o volume dos vasos diariamente com água deionizada quando necessário.

Foram utilizadas três doses de P e Zn em um esquema fatorial 3x3, com cinco repetições. O delineamento experimental foi o de blocos completos ao acaso, sendo que as concentrações de P utilizadas na solução foram: adequada P (4,0 mmol L⁻¹); baixa P (0,5 mmol L⁻¹) e alta P (8,0 mmol L⁻¹). Já as concentrações de Zn utilizadas foram: adequada Zn (4 μ mol L⁻¹); baixa Zn (0,5 μ mol L⁻¹) e alta Zn (8,0 μ mol L⁻¹). A escolha das doses adequadas, baixa e altas de P e Zn foram baseadas nos resultados do capítulo 3. As nove combinações das doses de P com as doses de Zn foram: baixo P e baixo Zn (T1); adequado P e baixo Zn (T2); alto P e baixo Zn (T3); baixo P e adequado Zn (T4); adequado P e alto Zn (T8); alto P e alto Zn (T9). O P e Zn foram fornecidos com KH₂PO₄ (com balanço do K para os tratamentos) e ZnCl₂, respectivamente.

Para evitar a contaminação da solução pela presença indesejável de Zn e de outros elementos, a qual poderia interferir nos resultados experimentais, foram utilizados reagentes ultrapuros. A solução nutritiva completa apresentou a seguinte composição: 12,0 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻; 4 mmol L⁻¹ de N-NH₄⁺; 6,0 mmol L⁻¹ de K; 4,0 mmol L⁻¹ de Ca; 2,0 mmol L⁻¹ de Mg; 2,0 mmol L⁻¹ de S; 50,0 µmol L⁻¹ de Cl; 25,0 µmol L⁻¹ de B; 0,5 µmol L⁻¹ de Cu; 53,7 µmol L⁻¹ de Fe; 2,0 µmol L⁻¹ de Mn.

Quando as plantas atingiram o estádio de emissão do primeiro botão floral - estádio B1 (60 dias após início dos tratamentos), segundo escala fenológica do algodoeiro (MARUR; HUANO, 2001) - foi realizada a coleta das folhas utilizadas para a diagnose foliar. A folha diagnose correspondeu à quinta folha completamente expandida partir do ápice da haste principal, considerando como folha completamente expandida aquela com tamanho mínimo de 2,5 cm (MALAVOLTA, VITTI; OLIVEIRA, 1997). Cerca de 70 dias após o início dos tratamentos, os sintomas de carência de P e Zn foram agravados, sendo o experimento finalizado. Nesta ocasião, as plantas apresentavam-se no estádio fenológico de florescimento pleno, sem a presença de capulho. Ao final do experimento, antes da retirada das plantas, foram mensurados os parâmetros de trocas gasosas e da fluorescência da clorofila. Posteriormente, amostras de folha e raízes foram obtidas para a avaliação bioquímica do sistema antioxidativo e em seguida foram armazenadas em *freezer* -80°C. Parte dessas folhas foi utilizada para determinação da atividade da fosfatase ácida e anidrase carbônica.

4.2.2 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila

As avaliações foram realizadas no limbo da folha diagnose. As avaliações foram realizadas no período da manhã, entre as 9:00 as 12:00 horas. Foi utilizado um analisador portátil de gás por infravermelho (*Infrared Gas Analyzer – IRGA, LI 6400XT, Li-Cor, Inc., Lincoln, NE, USA*), sendo utilizada a quinta folha superior expandida. O fornecimento de CO₂ foi de aproximadamente de 380 µmol mol⁻¹. A intensidade luminosa foi de 2000 µmol m⁻² s⁻¹, com temperatura da folha mantida entre 20 a 25°C (EPHRATH et al., 2011; SANTOS et al., 2013; 2017). As avaliações de trocas gasosas consistiram em análises não destrutivas, sendo determinada a taxa de fotossintética líquida (*A*), a condutância estomática (*g_S*), a transpiração (*E*) e a concentração carbono intracelular (*C_l*). Também foram calculadas e a eficiência instantânea de carboxilação (*k* = *A*/*C_l*). Além disso, foram avaliadas as medidas da emissão de fluorescência de clorofila.

A fluorescência da clorofila a foi mensurada com o fluorômetro modulado 6400-40 LCF (Licor Inc. Lincoln NE, EUA) acoplado ao LI-6400XT, concomitantemente com as medidas de trocas gasosas. Usando os sinais emitidos antes e após o pulso de saturação $(\lambda < 710 \text{ nm}, \text{Q} \sim 8000 \text{ }\mu\text{mol} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ }0.8 \text{ s})$ e após a excitação do fotossistema I (FSI) por luz vermelho-distante (λ =735 nm, Q ~ 5 µmol m⁻² s⁻¹, 3,0 s), os seguintes parâmetros foram monitorados: fluorescência em estado de equilíbrio (Fs) e máxima ($F_{M'}$) captadas em tecidos adaptados a luz ($Q = 2000 \text{ } \mu\text{mol } \text{m}^{-2} \text{ } \text{s}^{-1}$) e a fluorescência mínima (Fo') após a excitação do fotossistema I. A partir destes parâmetros, foram calculadas a fluorescência variável na luz ($Fv' = F_M'$ - Fs), a eficiência quântica efetiva do fotossistema II (*FSII*) $[F_q'/F_M'=(F_M'-F_s)/F_M']$, o transporte aparente de elétrons (ETR= $Fq'/Fm'*f*Q*\alpha folha$), onde f é a fração da energia absorvida usada pelo fotossistema II, assumido como 0,5 em plantas e afolha é a absorbância da folha (0,85). Ao final do experimento, foram avaliadas também a fluorescência máxima (F_M) e a fluorescência mínima (Fo) em tecidos adaptados ao escuro, sendo calculados a eficiência quântica potencial do FSII em tecidos adaptados ao escuro, F_V / F_M , o coeficiente de extinção não-fotoquímica [NPQ=(Fm-F_M')/F_M'] (EDWARDS; BAKER, 1993; SILVEIRA et al., 2016).

4.2.3 Atividade da Fosfatase Ácida (FA, EC. 3.1.3.2)

A determinação da atividade da FA foi realizada seguindo método descrito por Raposo et al. (2004). Uma amostra de 100 mg do tecido foliar foi picada e incubado com 8 mL de para-nitrofenilfosfato (250 μ mol L⁻¹), em tampão acetato de sódio 0,1 mol L⁻¹, a
pH 4,0 e mantido em banho-maria por 30 minutos a 30°C. Posteriormente, foram adicionado 2 mL de NaOH (2 mol L⁻¹) a 5 mL do sobrenadante e as leituras foram realizadas em colorímetro com comprimento de onda a 490 nm. A determinação da atividade da FA se deu em função da concentração de fosfato do extrato estabelecida por curva padrão.

4.2.4 Atividade da Anidrase Carbônica (AC, EC.4.2.1.1)

A atividade da AC foi determinada pelo método de Wilbur e Anderson (1948). Uma amostra de 400 mg do tecido foliar foi homogeneizada em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 8,3) contendo 2-mercaptoetanol 10 mM e EDTA 1 mM. Após completa homogeneização, as amostras foram transferidas para tubos e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, à 4°C. A atividade de CA foi medida pela adição de 100 μ L do extrato de enzima foliar a 6 mL de tampão Tris-HCl 20 mM (pH 8,3). A reação foi iniciada com a adição de 4 mL de água saturada com CO₂ gelada. Em seguida foi registrado o tempo necessário para a queda do pH de 8,3 a 6,3 na presença (Ts) e na ausência (T0) utilizando um medidor de pH. A unidade de atividade adotada foi a "unidade enzimática" (E.U.) sendo calculada pela fórmula: Unidades g⁻¹ de massa fresca = 2(T0 – Ts) / T0 (g MS).

4.2.5 Determinação do peróxido de hidrogênio e da peroxidação de lipídeos

A concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi determinada de acordo com metodologia descrita por Alexieva et al. (2001). As amostras de folhas e raízes foram maceradas com solução de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) a 0,1% na proporção de 0,2 g / 2 mL para folhas e para raízes, com 20% de polivinilpirrolidona (PVPP) (m:v). Após completa homogeneização, as amostras foram transferidas para tubos e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, à 4°C. Foram retirados 200 µL do sobrenadante, aos quais foram adicionados 200 µL de tampão fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹ (pH 7,5) e 800 µL de solução 1 mol L⁻¹ de iodeto de potássio (KI). Os tubos foram colocados em gelo e permaneceram no escuro durante 1 hora. Após esse período, as amostras permaneceram no escuro por 20 minutos, porém em temperatura ambiente para a estabilização da reação, e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 390 nm. A quantidade de H₂O₂ foi expressa em nmol/g de massa fresca.

Para a análise da concentração de malondialdeído (MDA) foi utilizado o método descrito por Heath e Packer (1968). Amostras de lâminas foliares e raízes foram maceradas em solução de TCA 0,1% na proporção de 0,2 g / 2 mL para folhas e para raízes, com 20% de PVPP (m:v). Após completa homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm

por 10 minutos, à 4°C. Foi retirado 0,25 mL do sobrenadante e transferido para outro tubo contendo 1,0 mL de solução TCA 20% e ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,5%. A mistura foi incubada a 95°C por 30 minutos, e em seguida resfriada em gelo por 10 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, e posteriormente realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 535 e 600 nm. A quantidade de MDA foi expressa em nmol/g de massa fresca.

4.2.6 Extração de e proteínas

O material vegetal (folhas e raízes) foi macerado em almofariz contendo nitrogênio líquido e armazenado em *freezer* -80°C. Os extratos proteicos foram obtidos a partir de 0,25 gramas de material vegetal fresco, juntamente com adição de PVPP correspondente a 20% (m:v). Procedeu-se a extração proteica, utilizando-se solução tampão fosfato de potássio a 100 mmol L⁻¹ (pH 7,5), EDTA (ácido etileno diamino tetracético) a 1 mmol L⁻¹ e DDT (ditiotreitol) a 1 mmol L⁻¹. Os extratos homogeneizados foram centrifugados a 10.000 rpm por 30 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi armazenado em *eppendorfs*, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *freezer* -80°C.

A concentração de proteína solúvel foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando-se o BSA (*bovine serum albumin*) como padrão. Alíquotas de 20 µL, quantificadas em triplicatas foram misturadas em 1 mL de reagente de *Bradford*. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Os resultados foram expressos em mg proteína/mL.

4.2.7 Atividade da Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). A reação foi conduzida em uma câmara de reação (caixa), sob iluminação de lâmpada fluorescente de 15 W, a 25 °C. Foi adicionado 50 μ L da amostra a uma mistura de 5 mL, contendo tampão fosfato de sódio (50 mmol/L) pH 7.8, metionina (13 mmol/L), NBT (75 mmol/L), EDTA (0.1 mmol L⁻¹) e riboflavina (2 μ mol L⁻¹). Os tubos foram colocados no interior da caixa tampada, e mantidos sob a iluminação dentro da caixa por 15 minutos, para formação do composto *blue* formazana produzido pela fotoreação do NBT. Enquanto outros tubos de ensaio com a mesma mistura foram mantidos recobertos com papel alumínio para evitar a entrada de luz, que consistiram no branco de cada amostra. Após os 15 minutos o material foi homogeneizado através de agitação em *vortex*. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 560 nm, e os resultados serão expressos em U SOD/mg de proteína.

4.2.8 Atividade da Catalase (CAT, 1.11.1.6)

A atividade da CAT foi determinada de acordo com o método descrito por Kraus, McKersie e Fletcher (1995), adaptado por Azevedo et al. (1998). O ensaio enzimático foi realizado a 25°C e o meio de reação continha 1 mL de solução tampão fosfato de potássio a 100 mmol L⁻¹ (pH 7,5) e H₂O₂ a 30 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 25 μ L de extrato vegetal e a atividade enzimática foi determinada pelo monitoramento da degradação do H₂O₂. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 240 nm durante 1 minuto. Os resultados foram expressos em μ mol/min/mg proteína.

4.2.9 Atividade da Ascorbato Peroxidase (APX, EC. 1.11.1.11)

A atividade da APX foi realizada utilizando o método descrito por Nakano e Asada (1981). O ensaio enzimático foi realizado a 30°C, em meio de reação contendo 950 μ L de solução composta de tampão fosfato de potássio a 80 mmol L⁻¹ (pH 7,0), ascorbato a 5 mmol L⁻¹, EDTA a 1 mmol L⁻¹ e H₂O₂ a 1 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 50 μ L de extrato vegetal e a atividade enzimática foi determinada em virtude da oxidação do ascorbato pelo H₂O₂. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 290 nm por 1 minuto. Os resultados foram expressos em μ mol/min/mg proteína.

4.2.10 Atividade da Guaiacol Peroxidase (GPX, EC.1.11.1.7)

A atividade da GPX foi realizada utilizando o método descrito por Matsuno e Uritani (1972). O ensaio enzimático foi realizado em cubetas, em meio de reação, que continham 797,5 μ L de tampão fosfato-citrato (fosfato dissódicodibásico a 0,2 mol L⁻¹ e ácido cítrico a 0,1 mol L⁻¹) (pH 5,0), 2,5 μ L de extrato vegetal e 50 μ L de guaiacol (0,05%), nas quais procedeu-se a agitação em *vortex*. Posteriormente adicionaram-se 50 μ L de H₂O₂ (0,3%), agitando-se mais uma vez em *vortex* e, logo após, colocou-se o conjunto de cubetas em banho-maria a 30°C, por 15 minutos. Em seguida, as cubetas foram colocadas em gelo e adicionaram-se 50 μ L de metabissulfito de sódio (2%) e agitou-se em *vortex* novamente. Após 10 minutos a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados foram expressos em μ mol/min/mg proteína.

4.2.11 Área foliar e produção de massa seca das plantas

Na ocasião da colheita das plantas ocorreu a separação do material em folhas, caule e raízes. Em seguida, os limbos das folhas recém-expandidas e maduras tiveram suas áreas foliares quantificadas, por meio de sistema digital integrador de área LICOR[®], modelo

LI-3100. A massa seca da parte aérea (folhas + caule) e da raiz foi quantificada ao final do experimento. O material foi identificado, acondicionado em sacos de papel e secado em estufa $a \pm 65^{\circ}$ C, durante 72 horas com posterior mensuração de massa.

4.2.12 Análise química do tecido vegetal

No tecido vegetal foram determinadas as concentrações de P e Zn. O extrato para determinação foi obtido extrato via digestão nítrico-perclórica a partir do qual foram determinados os nutrientes usando a visualização radial do espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado (ICP-OES) equipado com câmara de nebulização. As seguintes linhas de emissão foram utilizadas: P I 213,618 nm e Zn II 231,865 nm. O acúmulo de nutrientes foi calculado pelo produto entre a massa seca (parte aérea ou raiz) e a concentração do nutriente no tecido vegetal.

4.2.13 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos às análises estatísticas utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 2000). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F ($p \le 0,05$) e à comparação das médias dos tratamentos, realizadas pelo teste de Tukey ($p \le 0,05$)

4.3 Resultados

4.3.1 Crescimento das plantas

As plantas cultivadas com concentração adequada de P e Zn (4 mmol L⁻¹ de P + 4 μ mol L⁻¹ de Zn) e concentração alta de P e Zn (8 mmol L⁻¹ de P + 8 μ mol L⁻¹ de Zn) em solução nutritiva obtiveram o maior acúmulo de massa seca da parte aérea (Figura 1A). Destaca-se que apenas estas plantas não apresentaram sintomas visuais de deficiência ou toxicidade. Por outro lado, a combinação entre a menor concentração de P e Zn na solução nutritiva (0,5 mmol L⁻¹ de P + 0,5 μ mol L⁻¹ de Zn), proporcionou a menor produção de massa seca da parte aérea (Figura 4.1) e da raiz (Figura 4.1B), bem como a menor altura (Figura 4.1C) e área foliar (Figura 4.1D) das plantas. Desta maneira, a limitação combinada de P e Zn foi o mais limitante para o crescimento do algodoeiro, do que as outras combinações avaliadas.

As plantas cultivadas na combinação de baixo Zn e adequado P (0,5 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P) apresentaram sintomas de deficiência por Zn, sendo observado o formato irregular (roseta) das folhas em expansão, além do aparecimento de pequenas manchas cloróticas nas folhas recém-expandidas. Já as plantas cultivadas com baixo Zn e alto P (0,5 μ mol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P) possuíam nas folhas mais velhas necrose generalizada, indicando toxicidade por P. Interessantemente, as plantas com sintomas de deficiência por Zn (0,5 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P) e toxicidade por P (0,5 μ mol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P) e toxicidade por P (0,5 μ mol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P) obtiveram semelhes resultados para produção de massa seca da parte aérea, altura do caule e área foliar (Figura 4.1). Essas plantas apresentaram decréscimo de 80%, 65% e 73% na produção de massa seca da parte aérea, altura do caule e área foliar, respectivamente em relação as plantas cultivadas com dose adequada de Zn e P (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P).

Figura 4.1. Produção de massa seca da parte aérea (A); massa seca da raiz (B); altura (C); e área foliar (D) do algodoeiro em função das combinações de doses de P e Zn na solução nutritiva. Baixo P = 0,5 mmol L⁻¹; Adequado P = 4 mmol L⁻¹; Alto P = 8 mmol L⁻¹; Baixo Zn = 0,5 µmol L⁻¹; Adequado Zn = 4 µmol L⁻¹; Alto Zn = 8 µmol L⁻¹. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (n = 5; $p \le 0,05$)



A dose adequada de Zn combinada com baixo P induziu a deficiência por P nas plantas cultivadas nessa solução nutritiva (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 0,5 mmol L⁻¹ de P). Essas plantas apresentaram desenvolvimento lento, escurecimento das folhas novas (verde-escuras) e amarelecimento das folhas mais velhas. Além disso, foi verificada redução de 65%, 75% e 52% na produção de massa seca da parte aérea, altura do caule e área foliar, respectivamente em relação às plantas cultivadas em solução nutritiva adequada (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P) (Figura 4.1).

Observou-se a "deficiência de Zn induzida por P" nas plantas cultivadas com adequado Zn e alto P na solução nutritiva de cultivo (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P). Os sintomas foram semelhantes àqueles das plantas cultivadas com baixo Zn e adequado P (0,5 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P), contudo foi observado apenas o formato irregular das folhas em expansão, sem necrose nas folhas já expandidas e entrenós mais curtos. A "deficiência de Zn induzida por P" reduziu a produção de massa seca da parte aérea, a altura do caule e a área foliar em de 42%, 73% e 21%, respectivamente em relação às plantas cultivadas solução nutritiva controle (Figura 4.1).

Sintomas por toxicidade de Zn foram verificados nas plantas cultivadas com combinações de alto Zn e baixo P (8 µmol L⁻¹ de Zn + 0,5 mmol L⁻¹ de P) e de alto Zn e adequado P (8 µmol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P). Nessas plantas foram observados o aparecimento de pontos necróticos nas folhas mais velhas com posterior queda das mesmas, bem como menor crescimento. Ocorreu redução no acúmulo de massa seca da parte aérea, na altura do caule e da área foliar dessas plantas de 58 %, 62 %, e 50 %, respectivamente em relação às plantas cultivadas solução nutritiva adequada (Figura 4.1). Todavia, os sintomas de toxicidade não foram observados nas plantas cultivas na combinação da maior dose de P (8 mmol L⁻¹) e Zn (8 µmol L⁻¹). A produção de massa seca da raiz não foi modificada pelas combinações de P e Zn na solução de cultivo, exceto nas combinações baixo Zn e P (0,5 µmol L⁻¹ de Zn + 0,5 mmol L⁻¹ de P) e adequado Zn e baixo P (4 µmol L⁻¹ de Zn + 0,5 mmol L⁻¹ de P) aumentaram em quase duas vezes a massa seca da raiz em relação ao controle (Figura 4.1B).

4.3.2 Concentração e acúmulo de P e Zn

A concentração de P na folha diagnose aumentou em função do incremento da concentração de P na solução nutritiva (Figura 4.2A), exceto na combinação alto Zn e P (8 μ mol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P). A maior concentração de P na folha diagnose foi encontrada nas plantas cultivadas com baixo Zn e alto P na solução nutritiva (0,5 μ mol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P). Essas plantas aumentaram em três vezes a concentração de P (17 g kg⁻¹), em comparação com as plantas cultivadas com adequado P e Zn na solução nutritiva (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P). Ademais, observaram-se as menores concentrações de P foliar nas plantas cultivadas com baixo P (0,5 mmol L⁻¹) independentemente, da concentração de Zn na solução de cultivo (concentração foliar de P dessas plantas = 0,5 g kg⁻¹). Desta maneira, as plantas cultivadas com disponibilidade adequada de Zn apresentaram maior capacidade na regulação da absorção de P.

A concentração de Zn obtida na folha diagnose foi menor nas plantas cultivadas com baixo Zn, independentemente do suprimento de P na solução nutritiva (Figura 4.2B). Observou-se redução na concentração de Zn dessas plantas de 50%, em comparação à concentração verificada nas plantas cultivadas em solução nutritiva controle (4 µmol L⁻¹ de Zn e 4 mmol L⁻¹ de P). As plantas cultivadas em solução nutritiva com adequado Zn (4 µmol L⁻¹) e alto Zn (8 µmol L⁻¹), apresentaram redução da concentração de Zn em função do aumento da concentração de P na solução de cultivo (Figura 4.2B). Destaca-se que as plantas cultivadas com alto Zn e baixo P (8 µmol L⁻¹ de Zn + 0,5 mmol L⁻¹ de P) apresentaram concentração foliar de Zn duas vezes maior do que as plantas cultivadas com adequado P e Zn. Assim, as plantas cultivadas com a maior disponibilidade de P para a absorção, reduziram a concentração de Zn na folha diagnose.

O acúmulo de P na parte aérea (Figura 4.2C) foi semelhante aos resultados observado para a concentração de P na folha diagnose (Figura 4.2A), observando-se aumento da absorção de P em função do incremento da concentração deste macronutriente na solução de cultivo em todas as concentrações de Zn avaliadas, exceto no tratamento controle (4 µmol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P). Comparando-se as plantas cultivadas com adequado Zn (4 µmol L⁻¹) na solução de cultivo, notou-se que a dose baixo P (0,5 mmol L⁻¹) e alto P (8 mmol L⁻¹) induziu a redução do acúmulo de P na parte aérea em 97% e 44%, respectivamente, em comparação com as plantas cultivadas com adequado P (4 mmol L⁻¹). Ademais, o maior acúmulo de P foi observado nas plantas que apresentaram sintomas de toxicidade por P (0,5 µmol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P).

Figura 4.2. Concentração de fósforo (P) (A) e zinco (Zn) (B) na folha diagnose; Acúmulo de P (C) e Zn (D) na parte aérea; Acúmulo de P (E) e Zn (F) na raiz em função das combinações de doses de P e Zn na solução nutritiva. Baixo P = 0,5 mmol L⁻¹; Adequado P = 4 mmol L⁻¹; Alto P = 8 mmol L⁻¹; Baixo Zn = 0,5 µmol L⁻¹; Adequado Zn = 4 µmol L⁻¹; Alto Zn = 8 µmol L⁻¹. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (n = 5; p \leq 0,05)



O acúmulo de Zn na parte aérea foi maior nas plantas cultivadas com alto Zn na solução de cultivo (8 μ mol L⁻¹), independente da concentração de P na solução, bem como nas plantas cultivadas com adequado Zn e P (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P) (Figura 4.2D). Destaca-se que as plantas cultivadas com alto Zn e baixo P (8 μ mol L⁻¹ de Zn + 0,5 mmol L⁻¹ de P) incrementaram em 17% o acúmulo de Zn na parte aérea, em comparação com as plantas cultivadas com adequado Zn e P. Destaca-se que nessas plantas

foram observados sintomas severos de toxicidade por Zn, além da maior concentração de Zn na folha diagnose observada (46 mg kg⁻¹) (Figura 4.2B). Também notou que as plantas cultivadas com baixo Zn e adequado P - deficientes em Zn (0,5 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P) – obtiveram concentração de Zn na folha diagnose e acúmulo de Zn na parte aérea menor do que às plantas cultivadas com adequado Zn a alto P – deficiência de Zn induzida por P (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P).

O acúmulo de P na raiz foi menor nas plantas cultivadas com baixo P (0,5 mmol L⁻¹ de P), independente da concentração de Zn na solução de cultivo (Figura 4.2E). As plantas cultivadas com alto P e Zn apresentaram o maior acúmulo de P nas raízes. Para o acúmulo de Zn nas raízes, o maior valor foi observado nas plantas cultivadas com alto Zn (4 μ mol L⁻¹) combinadas com baixo P (0,5 mmol L⁻¹), adequado P (4 mmol L⁻¹) e alto P (8 mmol L⁻¹), sendo observado incremento de 20%, 21% e 62%, respectivamente em relação as plantas cultivadas em solução nutritiva adequada (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P). Alto acúmulo de Zn nas raízes também foi observado nas plantas com sintomas de deficiência por P, ou seja, cultivadas com adequado Zn e baixo P (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 0,5 mmol L⁻¹ de P). Ademais, o menor acúmulo de Zn na raiz ocorreu nas plantas cultivadas com baixo Zn (0,5 μ mol L⁻¹).

4.3.3 Atividade da fosfatase ácida e anidrase carbônica

A atividade da FA foi maior nas plantas cultivadas com adequado Zn e baixo P (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 0,5 mmol L⁻¹ de P) (Figura 4.3 A) - plantas que exibiram sintomas visuais de deficiência por P. Essas planas apresentaram aumento de quatro vezes a atividade FA. As plantas cultivadas com baixo Zn (0,5 μ mol L⁻¹ de Zn) independente da concentração de P em solução também apresentaram aumento em 1,5 vezes da atividade dessa enzima em comparação com as plantas cultivadas com adequado Zn e P (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P). De forma semelhante, as plantas cultivadas com alto Zn e baixo P (8 μ mol L⁻¹ de Zn + 0,5 mmol L⁻¹ de P) também apresentaram aumento em 1,5 vezes da atividade da FA em comparação as plantas cultivadas com adequado P e Zn. Por sua vez, a atividade da AC (Figura 4.3B) apresentou resultados semelhantes ao observado para a concentração de Zn nas folhas diagnose (Figura 4.2 B). As plantas cultivadas em solução nutritiva com adequado suprimento de Zn (4 μ mol L⁻¹) e alto Zn (8 μ mol L⁻¹), demonstraram redução da atividade da AC em função do aumento da concentração de P na solução de cultivo (Figura 4.3B), guardando relação com a redução da concentração de Zn nas folhas utilizadas para diagnose

(Figura 2.4.B), com a redução da quantidade acumulada de Zn na parte aérea (Figura 4.2 D) e incremento do conteúdo de P na parte aérea (Figura 4.2 C).

Figura 4.3. Atividade nas folhas da fosfatase ácida, *FA* (A) e da anidrase carbônica, *AC* (B) em função das combinações de doses de P e Zn na solução nutritiva. Baixo P = 0,5 mmol L⁻¹; Adequado P = 4 mmol L⁻¹; Alto P = 8 mmol L⁻¹; Baixo Zn = 0,5 µmol L⁻¹; Adequado Zn = 4 µmol L⁻¹; Alto Zn = 8 µmol L⁻¹. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (n = 5; p \leq 0,05)



4.3.4 Trocas gasosas e atividade fotoquímica

A resposta da *A* (Figura 4.4A), modulada pela interação P-Zn foi semelhante àquela observada para a produção de massa seca da parte aérea (Figura 4.1A). Nas plantas cultivadas em solução nutritiva com concentração adequada de P e Zn (4 µmol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P) e concentração alta de P e Zn (8 µmol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P) foram observados os maiores resultados de *A*, g_S (Figura 4.4B), *E* (Figura 4.4C) e *k* (Figura 4.4D). Não foram observadas diferenças para concentração carbono intracelular (*C*₁) entre os tratamentos. Já plantas cultivadas com baixo P e Zn na solução nutritiva (0,5 µmol L⁻¹ de Zn e 0,5 mmol L⁻¹ de P), apresentaram redução de 22%, 13% 17% e 22% de *A*, g_S , *E* e *k*, respectivamente em relação as plantas cultivadas com dose adequada de P e Zn (4 µmol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P). Desta maneira, a limitação combinada de P e Zn foi o mais limitante para os parâmetros de trocas gasosas avaliados, semelhante ao observado para a massa seca da parte aérea, massa seca da raiz, altura e área foliar (Figura 4.1).

Nas plantas com sintomas de deficiência por Zn (0,5 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P) e toxicidade por P (0,5 μ mol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P), notou-se A com redução de 45% em relação as plantas cultivas em solução nutritiva controle (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P) (Figura 4.3A). Já as plantas com sintomas de deficiência por

P (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 0,5 mmol L⁻¹ de P), deficiência de Zn induzida por P (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P) e toxicidade por Zn (8 μ mol L⁻¹ de Zn + 0,5 ou 4 mmol L⁻¹ de P) apresentaram redução da *A* em 64% em relação as plantas cultivas em solução nutritiva com adequado P e Zn,.

Figura 4.4. Taxa fotossintética líquida, *A* (A); condutância estomática, g_S (B); transpiração, *E* (C); e eficiência instantânea de carboxilação, *k* (D) avaliadas na folha diagnose do algodoeiro em função das combinações de doses de P e Zn na solução nutritiva. Baixo P = 0,5 mmol L⁻¹; Adequado P = 4 mmol L⁻¹; Alto P = 8 mmol L⁻¹; Baixo Zn = 0,5 µmol L⁻¹; Adequado Zn = 4 µmol L⁻¹; Alto Zn = 8 µmol L⁻¹. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (n = 5; p ≤ 0,05)



Plantas com sintomas de deficiência por Zn (0,5 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P), de toxicidade por P (0,5 μ mol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P), de deficiência por P (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 0,5 mmol L⁻¹ de P), deficiência de Zn induzida por P (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P) e toxicidade por Zn (8 μ mol L⁻¹ de Zn + 0,5 ou 4 mmol L⁻¹ de P) apresentaram redução da *gs* em 64%, 39%, 66 %, 72% e 55%, respectivamente, em relação as plantas cultivas em solução nutritiva com adequado P e Zn. Comparando-se a *E* das plantas, observou-se que a deficiência por Zn (0,5 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P), a toxicidade por P (0,5 μ mol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P), a deficiência por P (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 0,5 mmol L⁻¹ de P), a deficiência de Zn induzida por P (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 8 mmol L⁻¹ de P) e a toxicidade por Zn (8 μ mol L⁻¹ de Zn + 0,5 ou 4 mmol L⁻¹ de P) limitou a

E em 75%, 54%, 77%, 72% e 50%, respectivamente, em relação as plantas cultivas em solução nutritiva com adequado P e Zn. Desta maneira, a modificação das concentrações de P e Zn na solução de cultivo, influenciou as relações hídricas do algodoeiro (g_s e *E*). Verificouse que nas plantas com sintomas de deficiência por Zn (0,5 µmol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P), de toxicidade por P (0,5 µmol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P), de deficiência por P (4 µmol L⁻¹ de Zn + 0,5 mmol L⁻¹ de P), de deficiência de Zn induzida por P (4 µmol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P) e de toxicidade por Zn (8 µmol L⁻¹ de Zn + 0,5 ou 4 mmol L⁻¹ de P), *k* reduziu em 64%, 39%, 69%, 70% 44% e 46%, respectivamente, em relação as plantas cultivas em solução nutritiva com adequado P e Zn (4 µmol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P).

As plantas quem não foram cultivadas com a combinação de adequada concentração de P e Zn (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P) e alta concentração de P e Zn (8 μ mol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P) em solução nutritiva de cultivo reduziram a F_V/F_M (Figura 4.5A), a F_q'/F_M' (Figura 4.5B) e o ETR (Figura 4C) indicando inibição do processo fotoquímico no algodoeiro. Além disso, essas plantas exibiram incremento do NPQ (Figura 4.4D).

Figura 4.5. Eficiência quântica potencial do fotossistema II, F_V / F_M (A); eficiência quântica efetiva do fotossistema II, F_q'/F_M' (B); transporte aparente de elétrons, *ETR* (C); e á coeficiente de extinção não-fotoquímica, *NQP* (D) em função das combinações de doses de P e Zn na solução nutritiva. Baixo P = 0,5 mmol L⁻¹; Adequado P = 4 mmol L⁻¹; Alto P = 8 mmol L⁻¹; Baixo Zn = 0,5 µmol L⁻¹; Adequado Zn = 4 µmol L⁻¹; Alto Zn = 8 µmol L⁻¹. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (n = 5; p ≤ 0,05)



4.3.5 Avaliação dos sistemas antioxidantes

A concentração de proteínas solúveis nas folhas foi menor nas plantas que não foram cultivadas com dose adequada de P e Zn (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P) e alta de P e Zn (8 μ mol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P) (Figura 4.6A). Baixas concentrações de P e Zn na solução nutritiva de cultivo (0,5 μ mol L⁻¹ de Zn + 0,5 mmol L⁻¹ de P) limitaram significativamente a concentração de proteínas solúveis nas folhas dessas plantas, representando redução de 91% em relação às plantas cultivadas com doses adequadas de Zn e P. Já para as demais combinações de P e Zn na solução de cultivo observou-se redução na concentração de proteínas solúveis nas folhas em 58% em comparação com as plantas cultivadas em solução nutritiva controle (Figura 4.6A).

A menor concentração de proteínas solúveis na raiz foi encontrada nas plantas cultivadas com baixo Zn (0,5 μ mol L⁻¹) e com baixo P (0,5 mmol L⁻¹) (Figura 4.6B), com decréscimo na concentração de proteínas de 50% em relação as plantas cultivadas em solução nutritiva com adequado Zn e P. Plantas cultivadas com adequado Zn apresentaram aumento da concentração de proteína na raiz a medida que disponibilidade de P em solução de cultivo aumentou. O mesmo resultado foi observado nas plantas cultivadas com alto Zn o (Figura 4.6B). Destaca-se que as plantas cultivas com alto Zn e P (8 μ mol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P) obtiveram concentração de proteínas três vezes maior do que plantas cultivadas em solução controle.

As plantas não cultivadas com adequado P e Zn apresentaram aumento na peroxidação lipídica (Figura 4.6C e D) e no acúmulo de peroxido de hidrogênio (Figura 4.6E e F) tanto na folha, quanto na raiz. Contudo, as plantas cultivadas com alto P e Zn apresentaram concentração de MDA e H_2O_2 nas folhas semelhantes as plantas cultivadas com adequado P e Zn. A ordem de incremento de MDA e H_2O_2 nas folhas (Figura 4.6C e E) foi semelhante. Comparando-se as plantas cultivadas com baixo Zn (0,5 µmol L⁻¹), notou que o incremento da disponibilidade de P em solução de cultivo aumentou a peroxidação lipídica (Figura 4.6C) e o acúmulo de peroxido de hidrogênio (Figura 4.6E) nas folhas. As plantas cultivadas com baixo Zn e alto P (0,5 µmol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P) apresentaram incremento de 363% e 522% de MDA e H_2O_2 , respectivamente, comparando-se plantas cultivadas em solução nutritiva adequada (Figura 4.6C e E). Plantas cultivadas com adequado Zn (4 µmol L⁻¹) obtiveram aumento do MDA e de H_2O_2 nas folhas quando cultivadas com baixo P ou alto P (Figura 4.6C e E).

Figura 4.6. Concentração de proteínas solúveis nas folhas (A) e nas raízes (B); Concentração de malondialdeído (MDA) nas folhas (C) e nas raízes (D); Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas folhas (E) e nas raízes (F) do algodoeiro em função das combinações de doses de P e Zn na solução nutritiva. Baixo P = 0,5 mmol L⁻¹; Adequado P = 4 mmol L⁻¹; Alto P = 8 mmol L⁻¹; Baixo Zn = 0,5 µmol L⁻¹; Adequado Zn = 4 µmol L⁻¹; Alto Zn = 8 µmol L⁻¹. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (n = 5; $p \le 0,05$)



A concentração adequada de Zn e baixo de P em solução nutritiva (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 0,5 mmol L⁻¹ de P) incrementou em 158% 116% o MDA e o H₂O₂ nas folhas, respectivamente, em relação as plantas cultivadas solução nutritiva adequada (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P). Já as plantas cultivadas com adequado Zn e alto P (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P) apresentaram incremento de 219% e 274% no MDA e H₂O₂, respectivamente, em comparação a plantas cultivadas solução controle (Figura 4.6C e E). Já

as concentrações de MDA e o H_2O_2 nas folhas nas plantas cultivadas com alto Zn (8 µmol L⁻¹) reduziram apenas na dose alta de P em solução de cultivo (8 µmol L⁻¹) (Figura 4.6C e E). Comparando-se os tecidos, os níveis de MDA e H_2O_2 foram sempre maiores nas raízes, em relação às concentrações observadas nas folhas.

Resultado semelhante na ordem de incremento de MDA e H_2O_2 na raiz também foi observado (Figura 4.6D e F). Já nas raízes das plantas cultivadas com baixo Zn (0,5 µmol L⁻¹), o incremento da concentração de P em solução de cultivo reduziu o conteúdo de MDA e H_2O_2 . O mesmo foi observado nas plantas cultivas com alto Zn (8 µmol L⁻¹). As plantas cultivas com baixo Zn e P (0,5 µmol L⁻¹ de Zn + 0,5 mmol L⁻¹ de P), adequado Zn e baixo P (4 µmol L⁻¹ de Zn + 0,5 mmol L⁻¹ de P) e alto Zn e baixo P (8 µmol L⁻¹ de Zn + 0,5 mmol L⁻¹ de P) apresentaram incrementos de 187%, 344% e 344% de MDA e de 221%, 327% e 322% de H_2O_2 , respectivamente em relação às plantas cultivadas na solução controle.

Em todos os tratamentos, exceto para a condição de combinação adequada de P e Zn, a atividade da CAT aumentou, tanto nas folhas (Figura 4.7A), quanto nas raízes (Figura 4.7B). Comparando-se as plantas cultivadas com baixo Zn (0,5 μ mol L⁻¹ de Zn), observou-se que não houve efeito das doses de P na atividade da CAT nas folhas e raízes. Nas plantas cultivadas com adequado Zn (4 μ mol L⁻¹), a redução de P (4 mmol L⁻¹ de P) ou o incremento de P (8 mmol L⁻¹ de P) na solução favoreceu o incremento da atividade da CAT nas folhas e na raiz (Figura 4.7A e B). As plantas cultivadas com adequado Zn e baixo P (4 μ mol L⁻¹ de P), incrementaram a atividade da enzima na folha, respectivamente, em duas e dozes vezes, e na raiz em duas vezes, em relação as plantas cultivadas em solução nutritiva controle. Nas folhas e na raiz das plantas cultivadas com alto Zn e alto P (8 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P) constatou-se maior incremento de CAT, com atividade dessa enzima 17 vezes superior nessas plantas do que nas plantas cultivadas em solução com adequado P e Zn (Figura 4.7A e B).

Nas folhas das plantas cultivadas com alto Zn (8 μ mol L⁻¹ de Zn), a atividade da SOD foi três vezes maior do que nas plantas cultivadas em solução nutritiva com adequado P e Zn (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P) (Figura 4.7C). Por outro lado, as plantas cultivadas com baixo suprimento de Zn (0,5 μ mol L⁻¹), bem como as plantas com sintomas de deficiência por Zn induzido por elevado suprimento de P (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P), apresentaram a menor atividade de SOD, com redução da atividade da enzima nas folhas e nas raízes (Figura 4.7C e D).

Figura 4.7. Atividade da catalase (CAT) nas folhas (A) e nas raízes (B); Atividade da superóxido dismutase (SOD) nas folhas (C); e nas raízes (D); Atividade da ascorbato peroxidase (APX) nas folhas (E) e nas raízes (F); Atividade da guiacol peroxidade (GPX) nas folhas (G) e nas raízes (H) do algodoeiro em função das combinações de doses de P e Zn na solução nutritiva. Baixo P = 0,5 mmol L⁻¹; Adequado P = 4 mmol L⁻¹; Alto P = 8 mmol L⁻¹; Baixo Zn = 0,5 µmol L⁻¹; Adequado Zn = 4 µmol L⁻¹; Alto Zn = 8 µmol L⁻¹. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (n = 5; $p \le 0,05$)



A menor atividade da APX nas folhas (Figura 4.7E) e nas raízes (Figura 4.7F) foi observada nas plantas cultivadas em solução nutritiva com adequado P e Zn (4 μ mol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P). O mesmo resultado foi observado para a atividade da GPX nas folhas (Figura 4.7G) e nas raízes (Figura 4.7H). Analisando as plantas cultivadas com baixo Zn (0,5 μ mol L⁻¹), observou-se que o aumento da disponibilidade de P reduziu a atividade na folha da APX (Figura 4.6E) e da GPX (Figura 4.6G). Destaca-se que as plantas cultivadas com baixo Zn e P (0,5 μ mol L⁻¹ de Zn + 0,5 mmol L⁻¹ de P) apresentaram atividade da APX e GPX na folha dez vezes maior do que as plantas cultivadas em solução nutritiva com adequado P e Zn. Já as plantas cultivadas com adequado Zn (4 μ mol L⁻¹), a redução ou aumento da disponibilidade da APX e GPX nas folhas e nas raízes (Figura 4.6E e G). Por outro lado, comparando-se as plantas cultivadas com alto Zn (8 μ mol L⁻¹), a maior disponibilidade de P na solução (8 mmol L⁻¹ de P) induziu a maior atividade da APX e GPX nas folhas e nas raízes.

4.4 Discussão

Os resultados deste estudo descreveram os efeitos da interação P-Zn na disponibilidade fisiológica desses nutrientes para a atividade de enzimas relacionadas com o uso de P e Zn no metabolismo vegetal. O excesso ou baixa disponibilidade de ambos os nutrientes limitaram o crescimento do algodoeiro, exceto quando disponibilizados em alto suprimento concomitantemente (Figura 4.1). Os resultados de concentração e de acúmulo de P e Zn permitiram entender como as plantas modulam a absorção mútua desses nutrientes (Figura 4.2), refletindo em modificações nas respostas fisiológicas avaliadas no presente trabalho.

As plantas que não foram cultivadas em solução nutritiva com concentração adequada de P e Zn (4 µmol L⁻¹ de Zn + 4 mmol L⁻¹ de P), ou alta de P e Zn (8 µmol L⁻¹ de Zn + 8 mmol L⁻¹ de P), obtiveram redução na F_V/F_M e na F_q'/F_M' (Figura 4.5A e B). Esses parâmetros indicam estresse no aparato fotossintético (KRAUSE; WEIS, 1991; TANYOLAÇ; EKMEKÇI; ÜNALAN, 2007). Além disso, foi verificado que maior quantidade de energia luminosa foi dissipada (Figura 4.5D), menor quantidade de energia luminosa foi absorvida (Figura 4.5C), e por fim, uma menor quantidade de energia foi usada pelo algodoeiro para a carboxilação da RUBISCO (Figura 4.4A e D). Além disso, o desequilíbrio no suprimento de P e Zn na solução de cultivo induziu a modificação do metabolismo oxidativo, reduzindo a concentração de proteínas solúveis e aumentando as concentrações de MDA e peróxido de hidrogênio nas folhas e na raiz (Figura 4.6). O estresse oxidativo induziu uma resposta enzimática para prevenir dano oxidativo causado pela deficiência ou toxicidade de P e Zn (Figura 4.7), porém essa resposta enzimática não foi efetiva, exceto para as plantas cultivadas com alto P e zn. O desbalanço da homeostase de P-Zn no algodoeiro desregulou uma série de eventos biológicos, resultando em modificação no tecido, resultando no sintoma. No presente trabalho foram observados sintomas de deficiência e toxicidade por P e Zn, bem como a "deficiência de Zn induzida pelo excesso de P".

As plantas com sintomas de deficiência por Zn (T2) e "deficiência de Zn induzida pelo P" (T6) apresentaram o mesmo padrão das respostas fisiológicas avaliadas (Figura 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 e 4.7) e da absorção de P e Zn (Figura 4.2). Essas plantas apresentaram redução na capacidade de carboxilação ($A \ e \ k$) (Figura 4.4A e D) e nas relações hídricas ($g_S \ e \ E$) (Figura 4.4B e C). O efeito deletério do Zn na capacidade de carboxilação e nas relações hídricas é explicado pela redução da atividade da anidrase carbônica nas plantas deficientes em Zn (Figura 4.3B).

A AC catalisa reversivelmente a conversão de CO_2 para o íon HCO_3 , que pode ser dissolvido com mais facilidade e utilizado nas reações de carboxilação (ESCUDERO-ALMANZA et al., 2012). Além disso, vários trabalhos demonstram a redução da atividade dessa enzima em plantas deficientes em Zn (SASSAKI et al., 1998; ESCUDERO-ALMANZA et al., 2012; SIDDIQUI et al., 2015), como observado no presente estudo (Figura 4.2H). A redução da atividade da anidrase carbônica em plantas deficientes por Zn reduz a transferência de CO₂ da cavidade estomática para o sítio de fixação de CO₂ (SASAKI et al., 1998), explicando a redução do *A* e *k* (Figura 4.4A e D) das plantas deficientes em Zn (T2 e T6). Santos et al. (2013) também relataram redução acentuada da *A*, *g*_S e *E* em plantas de pinhão-manso deficientes em Zn.

O efeito do Zn na anidrase carbônica também explica a redução observada para a g_s e *E* (Figura 4.4B e C). A anidrase carbônica participa da regulação da abertura e fechamento dos estômatos (ESCUDERO-ALMANZA et al., 2012). No processo de quebra do íon HCO₃ (catalisado pela anidrase carbônica) para a carboxilação de CO₂ pela Rubisco, ocorre aumento do pH, que por sua vez aumenta a hidrólise de carboidrato nas células estomáticas, por meio da ativação da amilase. A redução do acúmulo de carboidrato nas células estomáticas aumenta o potencial osmótico, causando a entrada de água nessas células e a abertura estomática (CASSON; GRAY, 2008). Tavali et al. (2009) demonstram a relação positiva das relações hídricas de plantas de pistache com a atividade da anidrase carbônica. Além das trocas gasosas, a deficiência por Zn induziu efeitos deletérios nas relações fotoquímicas, indicado pela redução do F_v/F_M e F_q'/F_M' (Figura 4.5A e B).

A deficiência por Zn reduziu a ETR (Figura 4.5C) provavelmente em função da produção de espécies reativadas de oxigênio, que por sua vez, causaram danos na cadeia transportadora de elétrons nos cloroplastos. O aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio em plantas deficientes por Zn ocorre em função da menor atividade da Cu-Zn superóxido dismutase (SOD), que desempenha um papel importante em processos redox (GRATÃO et al., 2005). Além disso, o Zn atua como cofator da violaxantina de-epoxidase, que por sua vez tem papel importante no *quenching* não fotoquímico, sintetizando carotenoides (MÜLLER-MOULÉ et al., 2002), explicando o aumento do NPQ (Figura 4.5D). Destaca-se que as plantas deficientes em Zn (T2 e T6) apresentaram alta concentração de P da folha diagnose e acúmulo na parte aérea (Figura 4.2A e C). Desta maneira, as plantas deficientes em Zn não controlaram eficientemente a absorção de P. Esse resultado foi evidente nas plantas cultivadas com alto P e baixo Zn (T3), as quais apresentaram sintomas de toxicidade por P.

O excesso de P nas plantas é incomum, no entanto algumas espécies, especialmente da família Proteaceae, possuem baixa capacidade de regular a absorção de P, exibindo sintomas de toxicidade por P em ambientes naturais (SHANE et al., 2004a; 2004b; HAWKINS et al., 2008). Os mesmos autores relataram sintomas por toxicidade semelhante ao observado no presente trabalho. Cakmak e Marshner (1987) também observaram sintomas por toxidade de P em algodoeiro cultivado em solução nutritiva com altas doses de P e com omissão de Zn. Contudo, de forma geral, as plantas controlam rigorosamente a absorção de P mantendo a concentração deste macronutriente nos limites fisiológicos (HUANG et al., 2000; BOUAIN et al., 2014; KHAN et al., 2014). O Zn desempenha papel específico na via de transdução de sinal responsável pela regulação de genes que regulam a absorção de P (HUANG et al., 2000; ROSE et al., 2013; KHAN et al., 2014), sendo que plantas deficientes em Zn perdem a capacidade de regulação na absorção de P (ROUACHED et al., 2010; ROSE et al., 2013; SHAHZAD; ROUACHED; RAKHA, 2014). No presente trabalho, as baixas concentrações de Zn na solução nutritiva, reduziram a capacidade do algodoeiro em controlar a absorção de P em altas doses, induzido a toxicidade por P. A toxicidade por P induziu efeitos deletérios nas trocas gasosas, nas reações fotoquímicas e no metabolismo antioxidante (Figuras 4.4, 4.5, e 4.7). Shane et al. (2004a) também relataram efeito deletério do excesso de P nas folhas de *Hakea prostrata* para os parâmetros fotossintéticos.

O maior acúmulo de massa seca de raiz foi encontrada nas plantas deficientes em P (T4) (Figura 4.1B). Desta maneira, o algodoeiro apresentou capacidade de produzir massa seca de raiz em condições de deficiência por P na tentativa de adaptar-se ao estresse causado pela deficiência desse nutriente. Em algumas espécies vegetais, a deficiência por P transforma as raízes em forte dreno de carboidratos (ROSE et al., 2013), estimulando o crescimento radicular e à expansão do comprimento e superfície radicular (LYNCH; BROWN, 2001). O aumento do crescimento de raiz em condições de baixa disponibilidade de P já foi relatado por Zambrosi et al. (2012) em citrus e por Santos et al. (2015) em algodoeiro. Contudo, a baixa disponibilidade de P induziu efeitos negativos nas relações de trocas gasosas, fotoquímicas, bem como no metabolismo antioxidativo (Figuras 4.4, 4.5, 4.6 e 4.7).

O P desempenha um papel importante na composição dos cloroplastos e na fotossíntese, com um papel regulador na ativação da RUBISCO e na proporção de intermediários fosforilados do ciclo de Calvin (HERNÁNDEZ; MUNNÉ-BOSCH, 2015). Sob limitação severa de P, a assimilação líquida de CO₂ pode ser reduzida, refletindo uma limitação na atividade de RUBISCO e a inativação das enzimas envolvidas na regeneração de ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) (ZHANG et al., 2014), explicando os baixos resultados observados para *A* e *k* (Figura 4.4A e D). A deficiência de P também modifica a ultraestrutura foliar (ZAMBROSI et al., 2017) que prejudica as relações hídricas das plantas e explicando a redução de *g*^S e *E* no presente trabalho (Figura 4.4B e C). Santos et al. (2017) também relataram redução significativa da *A*, *g*^S e *E* e *k* para o pinhão-manso, cultivado em condições de baixa disponibilidade de P.

A fosforilação de ADP também é inibida no estroma de cloroplasto sob deficiencia de P, limitando a regeneração de RuBP. Ademais, a baixa oferta de NADPH e ATP – comum em plantas deficientes por P - pode levar à baixa eficiência de PSII e ao estresse foto-oxidativo (HERNÁNDEZ; MUNNÉ-BOSCH, 2015), explicando a redução da ETR (Figura 4.5B), bem como aumento do NQP (Figura 4.5D) no presente trabalho. Como resultado do comprometimento da regeneração de RuBP, as plantas podem apresentar comprometimento do metabolismo antioxidativo (HERNÁNDEZ; MUNNÉ-BOSCH, 2015), explicando os resultados observados para a redução no conteúdo de proteínas solúveis e o aumento do conteúdo de MDA e peróxido de hidrogênio nas folhas e raízes de algodoeiro deficientes em P (Figura 4.6).

No presente trabalho as plantas deficientes em P exibiram a maior atividade da FA (Figura 4.2G). A alta atividade da enzima fosfatase ácida constitui em resposta adaptativa à baixa disponibilidade de P, sendo que as plantas utilizam a fosfatase ácida para promover a

desfosforilação de compostos orgânicos, disponibilizando P inorgânico para manutenção do metabolismo celular, principalmente para o processo fotossintético (SANTOS et al., 2017).

As plantas cultivadas com alto Zn, combinadas com baixo e médio P (T7 e T8) apresentaram sintomas de toxicidade por Zn, bem como alta concentração foliar deste elemento (Figura 4.2B). O excesso de Zn na folha afeta negativamente a biossíntese de clorofila, a capacidade de carboxilação da Rubisco e a ultraestrutura de estômatos (CHEN et al., 2008), explicando os resultados observados para *A*, *k*, $g_s \in E$ (Figura 4.3). O excesso de Zn também induz lesões no aparato fotossintético, uma vez que em concentrações tóxicas, há alteração na integridade das membranas do tilacóide (CAMBROLLÉ et al., 2015), explicando a redução da ETR e o aumento do NQP (Figura 4). Resultados similares foram observados em plantas de aveia expostas à toxicidade de Zn (TIECHER et al., 2016). Além disso, a produção de espécies reativas de oxigênio promovem danos oxidativos em ácidos nucleicos, proteínas, açúcares e lipídios (CHERIF et al., 2010). Contudo, plantas cultivadas com alto Zn e com alto P não apresentaram sintomas de toxicidade por Zn.

As plantas cultivadas com alto P e Zn (T9) apresentaram crescimento (Figura 4.1), parâmetros de trocas gasosas (Figura 4.4), relações fotoquímicas (Figura 4.5) concentração de proteínas solúveis nas folhas (Figura 4.6A), concentração de MDA nas folhas (Figura 4.6C) e concentração de peróxido nas folhas (Figura 4.6E) semelhantes às plantas cultivadas com adequado P e Zn (T5). Porém, as plantas cultivadas com alto P e Zn indicaram estresse oxidativo na raiz em função do aumento da concentração de MDA e H_2O_2 e proteínas solúveis (Figura 4.6B, D e F). Além disso, as atividades das enzimas de proteção antioxiativa foram muito maiores nas raízes dessas plantas (Figura 4.7).

Geralmente, as células das plantas desenvolvem um mecanismo pelo qual o elemento tóxico, entrando no citosol da célula é mediatamente complexado e inativado (GRATÃO et al., 2005). No presente trabalho, o maior acúmulo de P e Zn na raiz indica que o algodoeiro complexou o P e o Zn em excesso na raiz. Assim, as plantas acumularam P e Zn nas raízes para evitar o dano oxidativo na parte aérea. Em condições de P em excesso, uma maior proporção de Zn pode ser mantida nas raízes, formando fosfatos de zinco na via apoplastica do córtex radicular, que por fim, modifica a distribuição de Zn entre raízes e atirar (CAKMAK; MARSCHNER, 1987). No presente trabalho, o excesso de P e Zn possibilitou o maior acúmulo desses nutrientes nas raízes, evitando o dano oxidativo na parte aérea e possibilitando o funcionamento adequado do metabolismo fotossintético (Figura 4.4 e 4.5).

O aumento expressivo da concentração de proteínas solúveis e da atividade das enzimas do sistema antioxidante nas raízes constituiu em estratégia adaptava para tolerar o

dano oxidativo na raiz (Figuras 4.5 e 4.6). Para sua proteção, as células das plantas também são equipadas com enzimas desintoxicantes de radicais de oxigênio, como a CAT, a APX e a SOD. Várias plantas superiores empregam atividades enzimáticas relacionadas ao metabolismo das plantas para tolerar o dano oxidativo (GRATÃO et al., 2005). No presente trabalho, além do acúmulo de P e Zn na raiz, o excesso desses nutrientes de forma conjunta (T9) também estimulou a atividade da CAT, SOD, APG e GPX nas folhas, como estratégia de tolerância a concentração em excesso de P e Zn no tecido vegetal.

As atividades das enzimas também aumentaram nos outros estresses (deficiência por P, deficiência por Zn, deficiência por Zn induzida por P, toxicidade por P, toxicidade por Zn). Portanto, é sugerido que o sistema de defesa antioxidante não protegeu suficientemente as plantas sob esses estresses. O sistema antioxidante só foi efetivo no alto suprimento de P e Zn combinados. Essas enzimas, além de participarem diretamente na remoção de espécies reativas a oxigênio, também estão associadas a processos que dissipam o excesso de poder redutor. As enzimas SOD, APX e GPX, por exemplo, estão envolvidas na chamada reação de Mehler, em que elétrons da cadeia transportadora de elétrons cloroplastídica são transferidos ao oxigênio molecular que é, então, convertido a água. A catalase, por sua vez, está normalmente relacionada à detoxificação de processos como a fotorrespiração e a beta-oxidação. Diversos estudos relatam que o aumento na atividade dessas enzimas constitui a primeira e, também, a principal linha de defesa contra o estresse oxidativo. De fato, em alguns trabalhos envolvendo plantas mutantes que apresentam maior atividade dessas enzimas foi

4.5 Conclusões

O desequilíbrio no suprimento de P e de Zn às plantas promove redução nas trocas gasosas, nas relações fotoquímicas e no metabolismo oxidativo. A interação desregulou uma série de eventos biológicos, resultando em deficiência e toxicidade por P ou Zn. A disponibilidade de altas concentrações de P e Zn conjuntas possibilitam atenuação do estresse por excesso, refletindo em relações de trocas gasosas e fotoquímicas semelhantes aos das plantas cultivadas em doses adequadas de P e Zn (tratamento controle). Portanto, a interação modifica a disponibilidade fisiológica, a relações de trocas gasosas, relações fotoquímicas e metabolismo antioxidante. Mas como o Zn aumenta a eficiência do uso de P na fotossíntese? Modifica a expressão de alguns genes que codificam a biossíntese de transportadores de P na raiz de algodoeiro e otimizam o transporte de P da raiz para a parte aérea?

5. Interação P-Zn na expressão de transportadores de P em algodoeiro: um enfoque molecular

Resumo

Existem poucos trabalhos que abordam a dinâmica nutricional do fósforo (P) a nível molecular em culturas agrícolas (e.g. algodoeiro), com disponibilidade variada de zinco (Zn). Além disso, sabe-se que dinâmica nutricional de P está interligada com a absorção de zinco (Zn), sendo necessária a avaliação do efeito da interação P-Zn nas bases moleculares de absorção de P. Desta maneira, objetivou-se caracterizar a família de genes PHOl em algodoeiro, identificando homólogos de AtPHOl. Além disso, objetivou-se avaliar o efeito da interação P-Zn na expressão de PHOl homólogos ao AtPHOl em Gossypium hirsutum L. Plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos com solução nutritiva e com doses de P e Zn. Analisou-se a expressão de genes codificadores de transportadores de P das raízes para o xilema (PHO1). A interação P-Zn no algodoeiro modificou o crescimento, as trocas gasosas e a dinâmica nutricional desses elementos, bem como a expressão de PHO1 e PHO1b. A análise filogenética revelou dois genes com homologia com AtPHO1: PHO1 (XP 016699491.1) e PHO1b (XP 016724443.1). A expressão dos genes PHO1 e PHO1b é regulada pelo tempo em condições de baixa disponibilidade de P para absorção. O adequado transporte à longa distância de P em algodoeiro, das raízes para a parte aérea, é provavelmente mediado pelos genes PHO1 e PHO1b, os quais são expressos apenas em condições de deficiência de P, todavia, somente com a disponibilidade adequada de Zn para absorção.

Palavras-chave: transporte no xilema; P-Zn homeostase; transportadores de P; eficiência do uso de P.

P-Zn interaction in the expression of P transporters in cotton: a molecular approach

Abstract

There are few studies that address the nutritional dynamics of phosphorus (P) at the molecular level in agricultural crops (cotton), with varying availability of zinc (Zn). In addition, it is known that nutritional dynamics of P is interconnected with zinc absorption (Zn), and it is necessary to evaluate the effect of the interaction P-Zn on the molecular bases of absorption of P. In this way, the objective was to characterize the family of PHO1 genes in cotton, identifying homologues of AtPHO1. In addition, the objective of this study was to evaluate the effect of the P-Zn interaction on the expression of PHO1 homologues to AtPHO1 in Gossypium hirsutum L. Plants were grown in greenhouse, in pots with nutrient solution and at doses of P and Zn. The expression of genes encoding the P-transporters of xylem roots (PHO1) was analyzed. The P-Zn interaction in the cotton modified the growth, the gas exchanges and the nutritional dynamics of these elements, as well as the expression of *PHO1* Phylogenetic analysis revealed two genes with AtPHO1: PHO1 and PHO1b. (XP 016699491.1) and PHO1b (XP 016724443.1) homology. Expression of the genes PHO1 and PHO1b is time regulated under conditions of low availability of P for uptake. The adequate long-distance transport of P in cotton from the roots to the shoot is probably mediated by the genes PHO1 and PHO1b, which are expressed only under conditions of P deficiency, however, only with the adequate availability of Zn for absorption.

Keywords: Xylem transporters; P-Zn homeostase; P transporter; P use efficiency.

5.1 Introdução

O fósforo (P) é essencial para o crescimento das plantas e desempenha um papel fundamental no metabolismo. Embora grandes quantidades de P possam ser encontradas no solo, os teores disponíveis de P são baixos em função da alta capacidade de adsorção edáfica. Assim, a deficiência de P limita o crescimento e o desenvolvimento das plantas, reduzindo significativamente a produtividade das culturas (MOORE et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016). Desta maneira, altas quantidades de fertilizantes fosfatados são utilizadas, causando impactos econômicos e ecológicos adversos. Prevê-se que as fontes minerais de P serão esgotadas em algumas décadas (ROY et al., 2016). Desta maneira, esforços substanciais devem ser estimulados para a melhoraria da nutrição de P em plantas.

Para garantir a concentração de P no tecido vegetal suficiente para o desenvolvimento vegetal adequado, as plantas desenvolveram ampla variedade de adaptações morfológica, fisiológica, bioquímica e genética, com o objetivo de otimizar a absorção de P a partir da solução do solo e sua distribuição para diferentes órgãos e compartimentos subcelulares (RAGHOTHAMA, 2000; POIRIER; BUCHER, 2002). Embora os primeiros genes envolvidos no transporte de fosfatos tenham sido caracterizados em *Arabidopsis thaliana* (MUCHHAL et al., 1996), alguns trabalhos com transporte de P a nível molecular tem sido feito em outras espécies, principalmente para os genes que codificam os transportadores P de alta afinidade pertencentes à família PHT1. O PHT1 está envolvido na absorção de P a nível celular, bem como envolvidos na sinalização de deficiência por P (SECCO; BAUMANN; POIRER, 2010). Esse gene já foi descrito para *Medicago truncatula; Solanum tuberosum; Solanum lycopersicum; Oryza sativa; Hordeum vulgare* e *Zea mays* (LIU, C.M. et al., 1998; LIU, H. et al., 1998; CHIOU et al., 1997; PASZKOWSKI et al., 2002; NAGY et al., 2005; YI et al., 2005; TESFAYE et al., 2007; ZHOU et al., 2008).

No entanto, outros transportadores de P foram menos bem estudados no nível molecular em plantas diferentes de *Arabidopsis*, como os membros da Família PHOI (HAMBURGER et al., 2002; BOUAIN et al., 2014). O PHOI foi identificado pela primeira vez em *Arabidopsis* como um gene que desempenha um papel importante no transporte de P das raízes para a parte aérea (POIRIER et al., 1991). O mutante Atphol é deficiente no transporte de P das raízes para o xilema, resultando em deficiência de P em todos os tecidos vegetais da parte aérea (POIRIER et al., 1991). O gene *AtPHOI* contém dois domínios, denominados SPX e EXS, que foram identificados em proteínas de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo super expresso em condições de deficiência por P. Destaca-se que *AtPHOI* é

principalmente expresso nas células de raiz e na parte inferior do hipocótilo (HAMBURGER et al., 2002). A família PHOI em Arabidopsis compreende 11 membros (WANG et al., 2004). Os estudos de complementação revelaram que em mutantes sem a expressão de *AtPHO1*, somente os genes *AtPHOI* e *AtPHO1;HI* podem resgatar os defeitos da mutação, indicando que apenas esses dois genes estão envolvidos no transporte de P a longa distância de raízes para parte aérea (STEFANOVIC et al., 2007). O papel dos outros nove genes *PHOI* é amplamente desconhecido, com exceção do homólogo *PHO1;H4*, que desempenha um papel na resposta dos hipocótilos à luz azul (KANG; Ni, 2006), bem como o tamanho da semente (ZHOU et al., 2009) e floração (ZHOU; NI, 2009). Esses resultados indicam que os membros da família PHOI têm papéis que vão além do transporte de P.

As culturas agrícolas são dependentes da adubação fosfatada, mesmo assim existem poucos trabalhos que correlacionam a expressão do gene *PHO1* com a absorção e uso fisiológico de P. Além disso, sabe-se que dinâmica nutricional deste macronutriente está interligada com a absorção de zinco (Zn), sendo que a deficiência ou excesso em um elemento afetam o estado nutricional do outro (REED, 1946; NORVELL; WELCH, 1993; ZHU; SMITH; SMITH, 2001; BROADLEY et al., 2010; BOUAIN et al., 2014; OVA et al., 2015). Recentemente foi demonstrado em *Arabidopsis* que a deficiência por Zn afeta expressão do *AtPHO1* (KHAN et al., 2014). Mesmo assim, não existem relatos do efeito da interação P-Zn na expressão do gene *PHO1* em outras espécies. Assim, destaca-se a importância de estudos que descrevam o efeito da nutrição por P e da interação P-Zn na expressão de *PHO1*. Nesse sentido insere-se espécies que possuem produtividade limitada pelo baixo suprimento de P e Zn, como o algodoeiro. O algodoeiro (*Gossypium hirsutm* L.) é uma planta da família das Malváceas já cultivada na antiguidade. A fibra é o principal produto do algodoeiro e sua pluma, o algodão, é a fibra vegetal mais cultivada pelo homem, sendo uma das fibras naturais utilizadas pela indústria têxtil (ROCHESTER; CONSTABLE, 2015).

Diante do exposto fica claro que os mecanismos que regulam a dinâmica nutricional de P são de grande importância para aumentar a produtividade. Além disso, o transporte de P a nível molecular no algodoeiro não foi ainda relatado. Desta maneira, objetivou-se caracterizar a família de genes *PHOl* em algodoeiro, identificando homólogos de *AtPHOl*. Além disso, objetivou-se avaliar o efeito da interação P-Zn na expressão de *PHOl* homólogos ao *AtPHOl* em *Gossypium hirsutum*.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Condições experimentais

O estudo foi realizado em condições de casa de vegetação no período de janeiro a março de 2017. A temperatura máxima, mínima e média, durante o período experimental foi: 34; 26 e 31°C, respectivamente. A umidade relativa do ar média foi de 75% e a radiação fotossinteticamente ativa máxima foi de aproximadamente 710 µmol m⁻² s⁻¹. Foram utilizadas sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) da cultivar FMT 709.

As sementes foram colocadas para germinar em bandeja com vermiculita, umedecida com solução de sulfato de cálcio (CaSO₄, 10^{-4} mol L⁻¹), e quando as plantas emergidas atingiram cerca de 5 cm de altura foram transferidas para bandeja de plástico com capacidade de 40 L contendo solução nutritiva (HOAGLAND; ARNON, 1950) completa e diluída a 1/5 da concentração usual, denominada "solução de adaptação", de modo a agravar as carências nutricionais, considerando a contribuição das reservas da semente (dados não apresentados). Após uma semana nesta solução de adaptação, as plantas foram transferidas individualmente para vasos plásticos (capacidade de 3,5 L) contendo soluções nutritivas (3,0 L) e iniciando, portanto, os tratamentos. As plantas foram fixadas na região do colo com espuma de plástico e foram mantidas em aeração constante. Durante o desenvolvimento experimental, foi realizada a renovação das soluções nutritivas a cada sete dias, completando-se o volume dos vasos diariamente com água deionizada se necessário.

A solução nutritiva completa apresentou a seguinte composição: 12,0 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻; 4 mmol L⁻¹ de N-NH₄⁺; 6,0 mmol L⁻¹ de K; 4,0 mmol L⁻¹ de Ca; 2,0 mmol L⁻¹ de Mg; 2,0 mmol L⁻¹ de S; 50,0 µmol L⁻¹ de Cl; 25,0 µmol L⁻¹ de B; 0,5 µmol L⁻¹ de Cu; 53,7 µmol L⁻¹ de Fe; 2,0 µmol L⁻¹ de Mn. O primeiro experimento avaliou a regulação da expressão dos transportadores de P em função do tempo. No segundo experimento foi avaliado o efeito da interação P-Zn na expressão relativa dos genes transportadores de P.

5.2.2 Experimento I - expressão dos transportadores de P em função do tempo

Nesse experimento as plantas foram cultivadas em solução sem P ou sem Zn (omissão total), depois do cultivo na solução de adaptação. O delineamento foi o de blocos completos ao acaso sendo definidas cinco épocas para retiradas de seis plantas (seis repetições) por tratamento. Desta maneira, o experimento possuía 60 plantas. As cinco épocas de avaliação foram: 0 dias, 2 dias, 10 dias e 30 e 60 dias sem P ou Zn. As plantas foram coletadas e separadas em parte aérea e raiz.

5.2.3 Experimento II- expressão dos transportadores de P em função da interação

Nesse experimento as plantas floram cultivadas em duas doses de P e três doses de Zn em um fatorial 2x3 com cinco repetições. O delineamento foi o de blocos completos ao acaso, sendo que os teores de P utilizados foram: adequado P (4,0 mmol L^{-1} - recomendado pelos resultados do capítulo 2) e baixo P (0,5 mmol L⁻¹). Já os teores de Zn utilizados foram: adequado Zn (4 μ mol L⁻¹); baixo Zn (0,5 μ mol L⁻¹) e alto Zn (8,0 μ mol L⁻¹). A escolha das doses adequadas, baixa e altas de P e Zn foram baseadas nos resultados do capítulo 2. O P e Zn foram fornecidos com KH₂PO₄ (com balanço do K para os tratamentos) e ZnCl₂, respectivamente. Quando as plantas atingiram o estádio de emissão do primeiro botão floral estádio B1 (60 dias após início dos tratamentos), segundo escala fenológica do algodoeiro (MARUR; HUANO, 2001) - foi realizada a coleta das folhas utilizadas para a diagnose foliar. A folha diagnose correspondeu à quinta folha completamente expandida partir do ápice da haste principal, considerando como folha completamente expandida aquela com tamanho mínimo de 2,5 cm (MALAVOLTA, VITTI; OLIVEIRA, 1997). Cerca de 70 dias após o início dos tratamentos, os sintomas de carência de P e Zn foram agravados, sendo o experimento finalizado. As plantas apresentavam-se no estádio fenológico de florescimento pleno, sem a presença de capulho. Ao final do experimento, antes da retirada das plantas, foram mensurados os parâmetros de trocas gasosas. As plantas foram coletadas e separadas em parte aérea e raiz.

5.2.4 Trocas gasosas

As avaliações foram realizadas no limbo da folha diagnose. As avaliações foram realizadas no período da manhã, entre as 9:00 as 12:00 horas. Foi utilizado um analisador portátil de gás por infravermelho, sendo utilizada a quinta folha superior expandida. O fornecimento de CO₂ foi de aproximadamente de 380 µmol mol⁻¹. A intensidade luminosa foi de 2000 µmol m⁻² s⁻¹, com temperatura da folha mantida entre 20 a 25°C (SANTOS et al., 2017). As avaliações de trocas gasosas consistiram em análises não destrutivas, sendo determinada a taxa de fotossintética líquida (*A*), a condutância estomática (*g*₅), a transpiração (*E*) e a concentração carbono intracelular (*C*₁). Também foi calculada a eficiência instantânea de carboxilação (*k* = *A*/*C*₁).

5.2.5 Análise química do tecido vegetal

No tecido vegetal foi determinadas as concentrações de P e Zn. O extrato para determinação foi obtido extrato via digestão nítrico-perclórica a partir do qual foram determinados os nutrientes usando a visualização radial do espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado (ICP-OES) equipado com câmara de nebulização. As seguintes linhas de emissão foram utilizadas: P I 213,618 nm e Zn II 231,865 nm. O acúmulo de nutrientes foi calculado pelo produto entre a massa seca (parte aérea ou raiz) e a concentração do nutriente no tecido vegetal.

5.2.6 Eficiências nutricionais

A partir dos dados de crescimento e concentração de P do experimento II calcularamse: i) eficiência de utilização de P (EUP, $g^2 mg$) = (massa seca da parte aérea, g)²/(acúmulo de P na parte aérea, mg) (SIDDIQI; GLASS, 1981); ii) eficiência de transporte de P (ETP, %) = (acúmulo na parte área de P, mg/acúmulo total na planta (parte aérea + raiz) de P, mg)) x 100 (LI et al., 1991); iii) eficiência de absorção de P (EAP, mg g⁻¹) = (acúmulo total de P, mg)/(massa seca do sistema radicular, g) (SWIADER; CHYAN; FREIJI, 1994); iv) eficiência no uso de P na fotossíntese (EUPfoto, µmol CO₂ mg P m⁻² s⁻¹) = (taxa fotossintética líquida, mmol CO₂ P m⁻² s⁻¹)/(acúmulo de P nas folhas, mg) (SMALL, 1972; HIDAKA; KITAYAMA, 2009).

5.2.7 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para análise de expressão gênica, amostras de raiz dos dois experimentos foram coletadas e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA (LEAL et al., 2007). As amostras foram maceradas em N líquido e transferidas para um microtubo de 2 mL, ao qual foi adicionado 1 mL de tampão pré-aquecido à 65°C (2% CTAB; 2% PVP; 2 M NaCl; 100 mM Tris; 25 mM EDTA; 2% β-mercaptoethanol). Após a homogeneização em banho-maria à 65°C por cerda de 30 min, as amostras foram colocadas no gelo por 1 min, seguida da adição de 1 mL de CIA (clorofórmio: álcool-isoamílico 24:1) e de uma centrifugação a 9.000 g por 10 min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL adicionando um volume igual de CIA, que foi emulsionado seguido de uma centrifugação a 9.000 g por 10 min a 4°C. Novamente, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL adicionando um volume igual de CIA, que foi emulsionado seguido de 10 M de LiCl (0,1 vol) e incubação a 4°C por 12 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 9.000 g por 30 min a 4°C, seguido do

descarte do sobrenadante. O *pellet* formado foi lavado duas vezes com 500 μ L de 75% etanol (etanol: H₂O DEPC inativa 3:1) e centrifugadas a 9.000 g por 10 min a 4°C. Por fim, foi feita a ressuspensão do *pellet* em 30 μ L de água DEPC inativa. O RNA foi quantificado em NanoDrop e sua integridade confirmada via eletroforese.

Após a quantificação, cerca de 2 μ g do RNA de cada amostra foi tratado empregando 1 U de DNAse I (Invitrogen; Carlsbad, CA, EUA) em tampão apropriado, 2 U de RNAseout (Invitrogen) e água ultrapura DEPC inativa, em reação incubada a 37°C por 30 min. A reação foi parada com a adição de EDTA, e incubada a 65°C por 10 min. Amostras de 1 μ g de RNA total tratado e o oligodT (0,5 μ g μ L⁻¹) foram desnaturadas a 70°C por 10 min e incubadas a 4°C por 2 min, seguido da adição de 4 μ L de 5X First-Strand Buffer, 1mM dNTP, 40 U de RNAseOUT (Invitrogen), 1 μ L de DTT 0,1 M e 20 U da enzima SuperScript III RT (Invitrogen). A reação foi então incubada a 55°C por 1 h, seguida de incubação a 70°C por 10 min e 4°C por 2 min.

5.2.8 Identificação do gene PHO1 em algodoeiro e desenho de iniciadores

Os iniciadores foram elaborados utilizando-se o programa Primer3, designando-se a temperatura de dissociação (Tm) entre 59 e 61°C, e o tamanho de amplicons entre 80 a 250 pb. O par de iniciadores de cada gene foi testado no programa NetPrimer para estabilidade, Tm, conteúdo de GC (%) e interações entre iniciadores. Os iniciadores foram desenhados com base nos TCs de algodão relativos a genes que codificam proteínas dos genes ortólogos PHO1 em *Arabidopsis thaliana*, *Oryza Sativa* e *Gossypium raimondii* (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Sequências de iniciadores (*primers*) relativos aos genes que codificam proteínas transportadoras de P (*PHO1*) e o gene referência empregado (Ubiquitina), com seus respectivos tamanhos esperado do amplicons, utilizados para análise quantitativa de transcritos reversos

Nome	Sequência dos primers	Amplicon
PHO1 For	AATTCGGCAAGCAGCAGGG	112
PHO1 Rev	TTGAAGTGACGGCGGAGATG	
PHO1b For	CCGCGTTCATCGTCATCTTCT	194
PHO1b Rev	GCCTTCCGCTTCTCAACTTTCT	
UBCP For	CGGAAAGAGGTGAAGATGTCAAC	159
UBCP Rev	GGATCTTGCTGCAACCTCTTAAA	

Genes de referência de acordo com Kim et al., 2013.

5.2.9 Análise de amplificação quantititiva de transcritos reversos (RT-qPCR)

A análise quantitativa de transcritospor RT-qPCR foi realizada no RotorGene-3000 (CorbettResearch), utilizando reações contendo 5 μ L de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 0,5 μ L de cada iniciador (5 μ mol L⁻¹), 1 μ L do cDNA 1:10 (v:v) e água Milli-Q estéril, sendo que foram feitas triplicatas para cada combinação gene/amostra. O perfil da reação foi designado com duas temperaturas iniciais: 50°C por 2min e 95°C por 2 min, seguidos de 45 ciclos de dois passos: 95°C por 15 s e 60°C por 30 s. Após a amplificação, foi determinada a curva de dissociação entre 72 e 95°C. O experimento incluiu controle negativo (sem cDNA) e a curva padrão de três pontos de diluição serial de cDNA controle. A aquisição dos dados em tempo real foi efetuada com o programa RotorGene Real-Time Analysis 6.0 (Corbett Research, Austrália), o qual forneceu os valores de ciclo limite de leitura (CT), eficiência da PCR e R² associada. Para a normalização de cada amostra analisada, foi calculada a variação quantitativa de expressão dos genes alvos de forma relativa aos genes de referência com o auxílio do programa Relative Expression Software Tool (REST-384), disponível em http://rest.gene-quantification.info/.

5.2.10 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos às análises estatísticas utilizando-se o programa estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 2000). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F ($p \le 0.05$) e à comparação das médias dos tratamentos, realizadas pelo teste de Tukey ($p \le 0.05$)

5.3 Resultados

5.3.1 Análise filogenética dos homólogos PHOl em algodão (Gossypium hirsutum)

Foi realizada análise filogenética para inferir a relação evolutiva entre as proteínas da família PHO1 identificadas, determinando-se sua homologia com as proteínas PHO1 em *Arabidopsis thaliana, Oryza Sativa* e *Gossypium raimondii*. Uma árvore filogenética (Figura 1) foi gerada após o alinhamento dos aminoácidos deduzidos. A análise da base de dados do genoma do *Gossypium hirsutum* indiciou a formação de três ramos. A partir disso, foram observados dois genes com homologia com *AtPHOl* (At3g23430.1), sendo esses genes referidos como *PHO1* (XP 016699491.1) e *PHO1b* (XP 016724443.1) (Figura 5.1). As outras proteínas apresentaram grau menor de similaridade com a AtPHO1, não sendo avaliadas.



5.3.2 Regulação da expressão de *PHO1a* e *PHO1b* em resposta a deficiência de fósforo e zinco

O gene *PHO1* demonstrou aumento da expressão em função do tempo quando cultivado em solução nutritiva com omissão total de P. A partir dos 30 dias, a expressão relativa do gene *PHO1* em raízes de algodão foi aproximadamente 40 vezes maior do que na primeira época de avaliação (0 dias). Por outro lado, o gene não apresentou efeito da omissão de Zn na solução nutritiva em função do tempo (Figura 5.2B).





O gene *PHO1b* também apresentou aumento da expressão relativa já na segunda época de avaliação (2 dias com omissão total de P). Destaca-se que a partir dos 30 dias com omissão de P em solução nutritiva, a expressão relativa foi 3 vezes maior que na primeira época de avaliação (0 dias) (Figura 5.2C). Também não foi observado efeito da omissão do Zn na expressão do *PHO1b* em solução nutritiva com adequado P (Figura 5.2D).

5.3.3 Regulação da expressão de PHO1a e PHO1b na interação P-Zn

A expressão do gene *PHO1* foi maior nas plantas cultivadas com de baixo P (0,5 mmol L⁻¹) combinadas com adequado ou alto Zn (4 ou 8 μ mol L⁻¹ de Zn) (Figura 5.3A). Destaca-se que as plantas cultivadas com baixo P e adequado Zn apresentaram aumento de seis vezes o nível de expressão relativa do *PHO1*. O gene *PHO1b* também foi mais expresso em plantas cultivadas com baixo P com adequado ou alto Zn (Figura 5.3B). Contudo, essa expressão foi maior nas plantas cultivadas baixo P e alto Zn em solução nutritiva. Os dois genes apresentaram menor nível de expressão relativa em plantas cultivadas com adequado P combinadas com qualquer dose de Zn, bem como nas plantas cultivadas com baixo P e Zn (0,5 mmol L⁻¹ de P + 0,5 μ mol L⁻¹ de Zn).

Figura 5.3. Nível de expressão relativa de *PHO1* (A) e *PHO1b* (B) do algodoeiro em função das combinações de doses de P e Zn na solução nutritiva. Baixo P = 0,5 mmol L⁻¹; Adequado P = 4 mmol L⁻¹; Baixo Zn = 0,5 µmol L⁻¹; Adequado Zn = 4 µmol L⁻¹; Alto Zn = 8 µmol L⁻¹. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (n = 5; $p \le 0,05$)



5.3.4 Concentrações de P e Zn

A menor concentração de P na folha diagnose foi observada nas plantas cultivadas com baixo P e Zn (0,5 mmol L⁻¹ de P + 0,5 μ mol L⁻¹ de Zn) (Figura 5.4A). O incremento de Zn na solução nutritiva aumentou a concentração de P da folha diagnose das plantas cultivadas com baixo P. Já as plantas cultivadas com adequado P e baixo Zn (4 mmol L⁻¹ de P

+ 0,5 μ mol L⁻¹ de Zn) apresentaram a maior concentração de P foliar. A concentração de Zn na folha diagnose foi maior à medida que foi maior a disponibilidade de Zn em solução nutritiva, independente da concentração de P em solução (Figura 5.4B).

Figura 5.4. Concentração de fósforo (P) (A) e zinco (Zn) (B) na folha diagnose; Acúmulo de P (C) e Zn (D) na parte aérea; Acúmulo de P (E) e Zn (F) na raiz em função das combinações de doses de P e Zn na solução nutritiva. Baixo P = 0,5 mmol L⁻¹; Adequado P = 4 mmol L⁻¹; Baixo Zn = 0,5 µmol L⁻¹; Adequado Zn = 4 µmol L⁻¹; Alto Zn = 8 µmol L⁻¹. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (n = 5; $p \le 0,05$)



Os resultados de acúmulo de P na parte aérea das plantas cultivadas com baixo P apresentaram resultado semelhante à concentração de P em folha diagnose (Figura 5.4C). O incremento de Zn na solução nutritiva aumentou a absorção de P pela parte aérea em condições de estresse por deficiência de P. Já em condições de adequado P, o maior acúmulo de P foi observado nas plantas cultivadas com adequado Zn. O alto ou baixo suprimento de Zn em solução nutritiva reduziu o acúmulo de P da parte aérea das plantas cultivadas com adequado P. Os resultados de acúmulo de Zn na parte aérea das plantas cultivadas com baixo P também apresentaram resultado semelhante à concentração de Zn em folha diagnose (Figura 5.4D). O aumento da concentração de Zn em solução de cultivo aumentou a absorção de Zn dessas plantas. Já as plantas cultivadas com adequado P apresentaram maior acúmulo de Zn na parte aérea quando cultivadas também com adequado Zn.

5.3.5 Crescimento e trocas gasosas

A produção de massa seca da parte aérea foi maior nas plantas cultivadas com adequado P e Zn (Figura 5.5A). Destaca-se que as plantas cultivadas com baixo P combinadas com baixo, adequado e alto Zn apresentaram redução na massa seca de 75%, 53% e 50%, respectivamente em relação às plantas cultivadas com adequado P e Zn. Plantas cultivadas com adequado P combinadas com baixo ou alto Zn também apresentaram redução de 50% no acúmulo de massa seca em relação às plantas cultivadas com adequado P e Zn. Para a massa seca da raiz, apenas as plantas cultivadas com baixo P e adequado Zn apresentaram acúmulo de massa seca de raiz duas vezes maior do que as plantas cultivadas com adequado P e Zn (Figura 5.5B). Já a altura e área foliar foram modificadas pelas concentrações de P e Zn em solução de forma semelhante ao observado pela massa seca da parte aérea (Figura 5.5C e D).

Figura 5.5. Produção de massa seca da parte aérea (A); massa seca da raiz (B); altura (C); e área foliar (D) do algodoeiro em função das combinações de doses de P e Zn na solução nutritiva. Baixo P = 0,5 mmol L⁻¹; Adequado P; Baixo Zn = 0,5 µmol L⁻¹; Adequado Zn = 4 µmol L⁻¹; Alto Zn = 8 µmol L⁻¹. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (n = 5; p \leq 0,05)



As plantas cultivadas com baixo P e Zn reduziram em 75% altura em relação às plantas cultivadas com adequado P e Zn. As demais combinações de P e Zn induziram redução de 50% na altura das plantas em comparação das plantas cultivadas com adequado P e Zn. As plantas cultivadas com baixo P e Zn também apresentara menor área foliar – redução de 82% em relação as plantas cultivadas com adequado P e Zn. As outras combinações de P e Zn reduziram em 45% a área foliar.

A modificação das combinações de P em Zn em solução nutritiva resultou em alteração nas relações de trocas gasosas. As plantas cultivadas com adequado P e Zn apresentaram a maior *A*, *gs*, *E* e *k* (Figura 5.6). Observando as plantas cultivadas com baixo P, o aumento da concentração de Zn em solução (adequado e alto Zn), induziu aumento das trocas gasosas (*A*, *gs*, *E* e *k*). Plantas cultivadas com baixo P e Zn reduziram em 80%, 86%, 81% e 82% a *A*, *gs*, *E* e *k* em relação as plantas cultivadas com adequado P e Zn. Comparando-se as plantas cultivadas com adequado P, notou-se que as plantas cultivas com baixo Zn e alto Zn reduziram *A*, *gs*, *E* e *k* de forma semelhante.
Figura 5.6. Taxa fotossintética líquida, *A* (A); condutância estomática, *gs* (B); transpiração, *E* (C); e eficiência instantânea de carboxilação, *k* (D) avaliadas na folha diagnose do algodoeiro em função das combinações de doses de P e Zn na solução nutritiva. Baixo P = 0,5 mmol L⁻¹; Adequado P = 4 mmol L⁻¹; Baixo Zn = 0,5 µmol L⁻¹; Adequado Zn = 4 µmol L⁻¹; Alto Zn = 8 µmol L⁻¹. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (n = 5; p ≤ 0,05)



5.3.6 Eficiências nutricionais

A EAP foi maior nas plantas cultivadas com adequado P (Figura 5.7A), sendo que as plantas cultivadas com adequado P e Zn apresentaram maior capacidade na absorção de P. Observando as plantas cultivadas com baixo P, notou-se que o aumento da dose de Zn (adequado e alto Zn) induziu a maior aumento da EAP. Plantas cultivadas com baixo P combinadas com adequado e alto Zn demonstraram o dobro da EAP em relação às plantas cultivadas com baixo P e Zn. Para a ETP, apenas as plantas cultivadas com baixo P e Zn apresentaram baixa capacidade de transporte de P (Figura 5.7B). O aumento da disponibilidade de Zn induziu ETP das plantas cultivadas com baixo P, semelhante daquelas cultivadas com adequado P.

Figura 5.7. Eficiência na absorção de fósforo (P) (EAP) (A); Eficiência no transporte de P (ETP) (B); Eficiência no uso de P (EUP) (C); e Eficiência no uso de P na fotossíntese (EUPfoto) (D) em função das combinações de doses de P e Zn na solução nutritiva. Baixo P = 0,5 mmol L⁻¹; Adequado P = 4 mmol L⁻¹; Baixo Zn = 0,5 µmol L⁻¹; Adequado Zn = 4 µmol L⁻¹; Alto Zn = 8 µmol L⁻¹. Letras distintas diferem pelo teste de Tukey (n = 5; p \leq 0,05)



Em relação à EUP, as plantas cultivadas em solução nutritiva com baixo P combinadas adequado ou alto Zn demonstraram a maior EUP (Figura 5.7C). Plantas cultivadas com baixo P e Zn apresentaram a mesma capacidade de uso de P do que as plantas cultivadas com adequado P e Zn. Já a EUPfoto, observando as plantas cultivadas com baixo P, notou-se que o aumento da disponibilidade de Zn reduziu a capacidade do uso de P na fotossíntese (Figura 5.7D). Já observando as plantas cultivadas com adequado P, notou-se que a redução ou aumento da disponibilidade de Zn induz a redução da EUPfoto.

5.4 Discussão

A dinâmica nutricional de P e Zn é correlacionada, sendo que interações complexas regulam a homeostase destes nutrientes (MARSCHNER; CAKMAK, 1986; WEBB; LONERAGAN, 1988; 1990; NORVELL; WELCH, 1993; HUANG et al., 2000; KHAN et al., 2014). Os resultados de crescimento (Figura 5.5) e trocas gasosas (Figura 5.6) corroboram com a hipótese que a interação P-Zn altera a dinâmica nutricional no algodoeiro, refletindo na

modificando o desenvolvimento do algodoeiro. O crescimento das plantas cultivadas com adequado P, foi menor quando cultivadas com baixo Zn (0,5 µmol L⁻¹) ou alto Zn (8 µmol L⁻¹). Além disso, apresentaram aumento da concentração e acúmulo de Zn em função da maior disponibilidade de Zn em solução nutritiva (Figura 5.4B, C e F). Desta maneira, as plantas cultivadas com adequado P apresentaram os efeitos deletérios da deficiência ou excesso de Zn. Além do efeito direto do Zn, destaca-se que essas plantas apresentaram redução da EAP, EUP e EUPfoto (Figura 5.7A, C e D), bem como modificação na concentração e acúmulo de P na parte aérea em relação as plantas cultivadas com adequado P e Zn (Figura 5.4A e C). Desta maneira, as plantas cultivadas com adequado Com baixo ou alto Zn em solução nutritiva, apresentaram crescimento reduzido pelo resultado conjunto da deficiência e excesso de Zn e pela menor eficiência na regulação de absorção e uso de P no metabolismo. Tanto em eudicotiledôneas, quanto em monocotiledôneas, a deficiência de Zn tem sido associada ao acúmulo de P em excesso na parte aérea (REED, 1946; NORVELL; WELCH, 1993; ZHU; SMITH; SMITH, 2001; BROADLEY et al., 2010; OVA et al., 2015).

No presente trabalho as plantas cultivadas com baixo Zn e adequado P apresentaram concentração de P na folha diagnose (Figura 5.4A) acima da faixa de suficiência (KURIHARA et al., 2013), indicando menor regulação na absorção de P por essas plantas. Alguns trabalhos descreveram o efeito da perda de regulação da expressão de transportadores de P em plantas deficientes em Zn (HUANG et al., 2000; KHAN et al., 2014). A deficiência de Zn induz genes que aumentam a absorção de P nas raízes (HUANG et al, 2000) e seu transporte no xilema (KHAN et al., 2014) induzido o aumento de P na parte aérea vegetal. Contudo, destaca-se que nas plantas cultivadas com adequado P, o Zn não influenciou o nível de expressão relativa do PHO1 e PHO1b (Figura 3). Mesmo assim, nessas plantas foi observado aumento da absorção de P, ou seja, plantas cultivadas com adequado P combinadas com baixo ou alto Zn em solução nutritiva, modificaram a absorção de P (Figura 5.4A e C), induzindo a redução no processo fotossintético (Figura 5.6) que por sua vez refletiu na redução de crescimento (Figura 5.5). Provavelmente, em algodoeiro, os genes PHO1 e PHO1b não estão relacionados com o acúmulo em excesso de P na parte aérea em condições de disponibilidade de P adequada combinada com deficiência por Zn. A avaliação dos genes homólogos do PHO1 e PHO1b não demonstrou variação significativa em função do tempo em plantas cultivadas sem Zn em solução nutritiva (Figura 5.2B e D), corroborando a hipótese que as expressões dos genes PHO1 e PHO1b não são modificadas pela deficiência ou excesso de Zn em algodoeiro cultivado com disponibilidade de P adequada.

Por outro lado, o nível de expressão dos genes *PHO1* e *PHO1b* demonstrou variação significativa em função do tempo no cultivo do algodoeiro em solução nutritiva sem P (Figura 5.2A e C), o que é uma característica comum para transportadores de alta afinidade - *HATS* (*High Affinity Transport System*) (SECCO; BAUMANN; POIRER, 2010). Quando o P é limitante em solos cultivados, as plantas utilizam estratégias adaptativas com o objetivo de aumentar a aquisição de fosfato nas raízes por meio da maior expressão de HATS (KHAN et al., 2014). Assim o aumento da expressão do *PHO1* e *PHO1b* em raízes de algodoeiro induziu o maior transporte de P das raízes para a parte aérea em condições de baixa disponibilidade de P. Ressalta-se que isso só foi observado nas plantas cultivadas em solução nutritiva com baixo P combinadas com adequado ou alto Zn (Figura 5.3). Portanto, o transporte adequado de P das raízes para a parte aérea, em condições de deficiência por P, mediado pelos genes *PHO1* e *PHO1b* em algodoeiro, só ocorre efetivamente em status nutricional de Zn adequado. Plantas deficientes em P e Zn não expressam adequadamente os genes *PHO1* e *PHO1b*.

Considerando que a proteína PHO1 é envolvida no transporte de P das raízes para o xilema, os resultados sugerem que a expressão dos genes *PHO1* e *PHO1b*, a redução da ETP das plantas deficientes em P e Zn (Figura 5.7B) corroboram com a importância dos genes *PHO1* e *PHO1b* para o transporte de P das raízes para a parte aérea.

Apesar de P e Zn serem elementos essenciais em plantas, os componentes genéticos envolvidos nesta interação P-Zn permanecem pouco estudados. Embora se saiba que exista correlação entre as rotas metabólicas de absorção, transporte e uso de P e Zn em plantas, os principais genes que atuam nessa coordenação em culturas agrícolas ainda precisam ser identificados. A identificação dos agentes moleculares que controlam absorção de P pelas plantas é de grande importância para melhoria da produtividade das culturas em solos com baixa disponibilidade de P.

5.5 Conclusões

A análise filogenética revelou dois genes com homologia com AtPHOI: PHOI (XP 016699491.1) e PHO1b (XP 016724443.1). Os genes PHO1 e PHO1b é regulado pelo tempo em condições de baixa disponibilidade de P para absorção. O transporte adequado de em algodoeiro das raízes para a parte aérea é provavelmente mediado pelos genes PHO1 e PHO1b, os quais são expressos em condições de deficiência por P, apenas com a disponibilidade adequada de Zn para absorção.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse trabalho indicaram que a manutenção da dinâmica nutricional de P e Zn no algodoeiro está interligada. Esta interação oferece vantagens para as plantas tolerarem a deficiência ou excesso de P e Zn em diferentes ambientes. Os resultados forneceram provas em favor de uma base genética para interconexão desses dois elementos. Além disso, provavelmente, a co-regulação da dinâmica nutriticional de P e Zn é diferente em variedades da mesma planta, por exemplo. O desafio futuro será desenvolver uma abordagem abrangente para a compreensão dos mecanismos de coordenação da homeostase desses dois elementos, descobrindo novas sinalizações e redes reguladoras envolvidas na interação P-Zn para os distintos genótipos, ou fenótipos. A combinação de transcriptômica e metabolômica pode ser uma ferramenta efetiva para esclarecer a co-regulação entre as vias metabólicas de absorção e uso de P e Zn, bem como poderia indicar os metabólitos mais ou menos influenciados pela interação P-Zn. Finalmente, o desenvolvimento de uma compreensão abrangente da interação P-Zn é de grande interesse científico, além de crucial para a agricultura sustentável em todo o mundo.

REFERÊNCIAS

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, p. 1337-1344, 2001.

ARAÚJO, A.P.; FERNANDES, A.M.; KUBOTA, F.Y.; BRASIL, F.C.; TEIXEIRA, M.G. Sample size for measurement of root traits on common bean by images analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 9, p. 313-318, 2004.

ARRUDA, B.; RODRIGUES, M.; SOLTHANGHEISI, A.; RICHARDSON, A.E.; ANDREOTE, F.D.; PAVINATO, P.S. Biological and morphological traits of sugarcane roots in relation to phosphorus uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 16, p. 901-915, 2016.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wildtype and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 280-292, 1998.

BARDEN, S.A.; HOPKINS, B.G.; JOLLEY, V.D.; WEBB, B.L.; NICHOLS, B.A.; BUXTON, E.A. Zinc, manganese and phosphorus interrelationships and their effects on iron and copper in chelator-buffered solution grown russet burbank potato. Journal of Plant Nutrition, New York, v. 34, p. 1144-1163, 2011.

BOUAIN, N.; SHAHZAD, Z.; ROUACHED, A.; KHAN, G.A.; BERTHOMIEU, P.; ABDELLY, C.; POIRER, Y.; ROUACHED, H. Phosphate and zinc transport and signalling in plants: toward a better understanding of their homeostasis interaction. **Experimental Botany**, Oxford, v. 30, p. 2-17, 2014.

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, p. 248-259, 1976.

BROADLEY, M.R.; LOCHLAINN, S.O.; HAMMOND, J.P.; BOWEN, H.C.; CAKMAK, I.; EKER, S.; ERDEM, H.; KING, G.J.; WHITE P.J. Shoot zinc (Zn) concentration varies widely within *Brassica oleracea* L. and is affected by soil Zn and phosphorus (P) levels. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Kent, v. 85, p. 375–380, 2010.

BROOKES, P.C.; POWLSON, D.S. Preventing phosphorus losses during perchloric acid digestion of sodium bicarbonate soil extracts. Journal of the Science of Food and Agriculture, Sussex, v. 32, p. 671-674, 1981.

BÜNEMANN, E.K.; SMERNIK, R.J.; MARSCHNER, P.; MCNEILL, A.M. Microbial synthesis of organic and condensed forms of phosphorus in acid and calcareous soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 932-946, 2008.

CAKMAK, I.; MARSCHNER, H. Mechanism of phosphorus induced zinc deficiency in cotton. I. Zinc deficiency-enhanced uptake rate of phosphorus. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 68, p. 483–490, 1986.

CAKMAK I.; MARSCHNER H. Mechanism of phosphorus induced zinc deficiency in cotton. III. Changes in physiological availability of zinc in plant. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 70, p. 13–20, 1987.

CAMBROLLÉ, J.; GARCÍA, J.L.; FIGUEROA, M.E.; CANTOS, M. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. **Chemosphere**, Oxford, v. 120, p. 171-178, 2015.

CASSON, S.; GRAY, J.E. Influence of environmental factors on stomatal development. **New Phytologist**, London, v. 178, p. 9-23, 2008.

CHEN, W.; YANG, X.; HE, Z.; FENG, Y.; HU, F. Differential changes in photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence and chloroplast ultrastructure between Zn-efficient and Zn-inefficient rice genotypes (*Oryza sativa*) under low zinc stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 132, p. 89-101, 2008.

CHERIF, J.; MEDIOUNI, C.; AMMAR, W.B.; JEMAL, F. Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). Journal of Environmental Sciences, Peoples, v. 23, p. 837-844, 2011.

CHIOU, T.J.; LIU, H.; HARRISON, M.J. The spatial expression patterns of a phosphate transporter (MtPTl) from Medicago truncatula indicate a role in phosphate transport at the root/soil interface. **Plant Journal**, Oxford, v. 25, p. 281-293, 2001.

CLARK, C.J.; MCBRIDE, M.B. Adsorption of Cu(II) by allophane as affected by phosphate. **Soil Science**, Tokyo, v. 38, p. 412–421, 1984.

CONDRON, L.M.; GOH, K.M.; NEWMAN, R.H. Nature and distribution of soil phosphorus as revealed by a sequential extraction method followed by ³¹P nuclear magnetic ressonance analysis. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 36, p. 199–207, 1985.

DICK, W.A.; TABATABAI, M.A. Determination of orthophosphate in aqueous solutions containing labile organic and inorganic phosphorus compounds. Journal of Environmental **Quality**, Madison, v. 6, p. 82–85, 1977.

DWIVEDI, R.S.; RANDHAWA, N.S.; BANSAL, R.L. Phosphorus-zinc interaction I. Sites of immobilization of zinc in maize at high level of phosphorus. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 43, p. 639–648, 1975.

EDWARDS, G.E.; BAKER, N.R. Can CO₂ assimilation in maize leaves be predicted accurately from chlorophyll fluorescence analysis? **Photosynthesis Research**, Dordrecht, p. 37, v. 89-102, 1993.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306 p.

EPHRATH, J.E.; TIMLIN, D.J.; REDDY, V.; BAKER, J. Irrigation and elevated carbon dioxide effects on whole canopy photosynthesis and water use efficiency in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Biosystems**, Oxon, v.,145, p.,202-215, 2011.

ESCUDERO-ALMANZA, D.J.; OJEDA-BARRIOS, D.L.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, O.A.; CHÁVEZ, E.S.; RUÍZ-ANCHONDO, T.; SIDA-ARREOLA, J.P. Carbonic anhydrase and zinc in plant physiology. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Casilla, v. 72, p. 140-146, 2012.

FAGERIA, N.K.; OLIVEIRA, J. P. Nitrogen, phosphorus and potassium interactions in upland rice. Journal of Plant Nutrition, New York, v. 37, p. 1586-1600, 2014.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 59, p. 309-314, 1977.

GIANQUINTO, G.A.; ABU-RAYYAN, A.; TOLA, L.D.; PICCOTINO, D.; PEZZAROSSA, B. Interaction effects of phosphorus and zinc on photosynthesis, growth and yield of dwarf bean grown in two environments. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 220, p. 219-228, 2000.

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

HAMBURGER, D.; REZZONICO, E.; MACDONALD-COMBER, P.J.; SOMERVILLE, C.; POIRIER, Y. Identification and characterization of the Arabidopsis PHOI gene involved in phosphate loading to the xylem. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 889-902, 2002.

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

HAWKINS, H.-J.; HETTASCH, H.; MESJASZ-PRZYBYLOWICZ, J.; PRZYBYLOWICZ, W.; CRAMER, M.D. Phosphorus toxicity in the Proteaceae: a problem in post-agricultural lands. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 117, p. 357–365, 2008.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, v. 125, p. 189-198, 1968.

HEDLEY, M.J.; STEWART, J.W.B.; CHAUHAN, B.S. Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 46, p. 970–976, 1982.

HERNÁNDEZ, I.; MUNNÉ-BOSCH, S. Linking phosphorus availability with photooxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, p. 2889–2900, 2015. HIDAKA, A.; KITAYAMA, K. Divergent patterns of photosynthetic phosphorus-use efficiency versus nitrogen-use efficiency of tree leaves along nutrient-availability gradients. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 97, p. 984–991, 2009.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water-culture method for growing plants without soil.** Berkeley: California Agricultural Experiment Station, College of Agriculture, University of California, 1950. (Circular, 347).

HUANG, C.; BARKER, S.J.; LANGRIDGE, P.; SMITH, F.W.; GRAHAM, R.D. Zinc deficiency up-regulates expression of high-affinity phosphate transporter genes in both phosphate-sufficient and -deficient barley roots. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 124, p. 415–422, 2000.

KANG, X.; NI, M. *Arabidopsis* SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1 contains SPX and EXS domains and acts in cryptochrome signaling. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 921–934, 2006.

KHAN, G.A; BOURAINE, S.; WEGE, S.; LI, Y.; CARBONNEL, M.; BERTHOMIEU, P.; POIRIER, Y.; ROUACHED, H. Coordination between zinc and phosphate homeostasis involves the transcription factor PHR1, the phosphate exporter PHO1, and its homologue PHO1;H3 in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany, Oxford, v. 65, v. 871–884, 2014.

KIM, H.J.; TANG, Y.; MOON, H.S.; DELHOM, C.D.; FANG, D.D. Functional analyses of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) immature fiber (im) mutant infer that fiber cell wall development is associated with stress responses. **BMC Genomics**, London, v. 14, v. 889, 2013.

KIZILGOZ, I.; SAKIN, E. The effects of increased phosphorus application on shoot dry matter, shoot P and Zn concentrations in wheat (*Triticum durum* L.) and maize (*Zea mays* L.) grown in a calcareous soil. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 9, p. 5893-5896, 2010.

KRAUS, T.E.; EVANS, R.C.; FLETCHER, R.A.; PAULS, K.P. Paclobutrazol enhances tolerances to increased levels of UV-B radiation in soybean (*Glycine max*) seedlings. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 73, p. 797-806, 1995.

KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annual Review of Plant Biology, Palo Alto, v. 42, p. 313-349, 1991.

KURIHARA, C.H.; VENEGAS, V.H.A.; NEVES, J.C.L.; NOVAIS, R.F.; STAUT, L.A. Faixas de suficiência para teores foliares de nutrientes em algodão e em soja, definidas em função de índices DRIS. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, p. 412-419, 2014.

LEAL, G.A.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; FIGUEIRA, A. Gene differentially expressed in *Theobroma cacao* associated with resistance to witches 'broom disease caused by *Crinipellis perniciosa*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 40, p. 741-752, 2007.

LI, B.; SE, M.; HL, A. Genetic variation in nitrogen use efficiency of loblolly pine seedlings. **Forest Science**, Bethesda, v. 37, p. 613-626, 1991.

LI, H.Y.; ZHU, Y.G.; SMITH, S.E.; SMITH, F.A. Phosphorus-zinc interactions in two barley cultivars differing in phosphorus and zinc efficiencies. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 26, p. 1085–1099, 2003.

LINDSAY, W.L.; NORWELL, W.A. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 42, p. 421-428, 1978.

LITTELL, R.C.; MOTT, G.O. Computer assisted design and analysis of response surface experiments in agronomy. **Proceedings of Soil & Crop Science Society of Florida**, Madison, v. 34, p. 94-97, 1975.

LIU, C.M.; MUCHHAL, U.S.; MUKATIRA, U.; KONONOWICZ, A.K.; RAGHOTHAMA, K.G. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 116, p. 91-99, 1998.

LIU, H.; TRIEU, A.T.; BLAYLOCK, L.A.; HARRISON, M.J. Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, St. Paul, v. 11, p. 14-22, 1998.

LONERAGAN, J.F.; GROVE, T.S.; ROBSON, A.D.; SNOWBALL, K. Phosphorus toxicity as a factor in zinc-phosphorus interactions in plants. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 43, p. 966-972, 1982.

LYNCH, J.P.; BROWN, K. Topsoil foraging – an architectural adaptation of plants to low phosphorus availabity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 237, p. 225-237, 2001.

LYNCH, J.P.; BROWN, K.M. Root strategies for phosphorus acquisition. In: HAMMOND, J.P.; WHITE, P.J. (Ed.). **The ecophysiology of plant–phosphorus interactions**. Dordrecht: Springer, 2008. p. 83–116.

MACEDO, F.G.; BRESOLIN, J.D.; SANTOS, E.F.; FURLAN, F.; SILVA, W.T.L.; POLACCO, J.C.; LAVRES J. Nickel availability in soil as influenced by liming and its role in soybean nitrogen metabolism. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, p. 1358, 2016. doi: 10.3389/fpls.2016.01358.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1980. 251 p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press, 2012. 651 p.

MARSCHNER, H.; CAKMAK, I. Mechanism of phosphorus induced zinc deficiency in cotton. II. Evidence for impaired shoot control of phosphorus uptake and translocation under zinc deficiency. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 68, p. 491–496, 1986.

MARTINS, L.E.C.; MONTEIRO, F.A.; PEDREIRA, B.C. Metabolic change, tillering and root system of *Brachiaria brizantha* in response to phosphorus and zinc nutrition. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 37, p. 509-519, 2014.

MARTINS, L.E.C.; MONTEIRO, F.A.; PEDREIRA, B.C. Photosynthesis and leaf area of *Brachiaria brizantha* in response to phosphorus and zinc nutrition. Journal of Plant Nutrition, New York, v. 38, p. 754-767, 2015.

MARUR, C.J.; RUANO, O. A reference system for determination of developmental stages of upland cotton. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fribosas**, Campina Grande, v. 5, p. 313–317, 2001.

MATSUNO, H.; URATANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black root. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 13, p. 1091-1101, 1972.

MCBRIDE, M.B. Sorption of copper(II) on aluminum hydroxide as affected by phosphate. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 49, p. 843–846, 1985.

MEHLICH, A. Mehlich-3 soil test extractant: a modification of Mehlich-2 extractant. Communications in Soil Science and Plant Analysis, New York, v. 15, p. 1409-1416, 1984.

MOORE, A.; HINES, S.; BROWN, D.; FALEN, C.; MARTI, M.H.; CHAHINE, M.; NORELL, R.; IPPOLITO, J.; PARKINSON, S.; SATTERWHITE, M. Soil-plant nutrient interactions on manure-enriched calcareous soils. **Agronomy Journal**, Madison, v. 106, p. 73-19, 2014.

MUCHHAL, U.S.; PARDO, J.M.; RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 93, p. 10519-10523, 1996.

MÜLLER-MOULÉ, P.; CONKLIN, P.L.; NIYOGI, K.K. Ascorbate deficiency can limit violaxanthinde-epoxidase activity in vivo. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 128, p. 970–977, 2002.

MURPHY, J.; RILEY, J.P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 27, p. 31–36, 1962.

NAGY, R.; KARANDASHOV, V.; CHAGUE, V.; KALINKEVICH, K.; TAMASLOUKHT, M.; XU, G; JAKOBSEN, I.; LEVY, A.A.; AMRHEIN, N.; BUCHER, M. The character ization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lyco persicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. **Plant Journal**, Oxford, v. 42, p. 236-250, 2005.

NAGY, R.; VASCONCELOS, M.J.V.; ZHAO, S.; MCELVER, J.; BRUCE, W.; AMRHEIN, N.; RAGHOTHAMA, K.G.; BUCHER, M. Differential regulation of five Phtl phosphate transporters from maize (*Zea mays* L.). **Plant Biology**, Stuttgart, v. 8, p. 186-197, 2006.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is savenged by ascorbate-especific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, p. 867-880, 1981.

NAVARRETE, A.A.; MELLIS, E.V.; ESCALAS, A.; LEMOS, L.N.; LAVRES JUNIOR, J.; QUAGGIO, J.A.; ZHOU, J.; TSAI, S.M. Zinc concentration affects the functional groups of microbial communities in sugarcane-cultivated soil. Agriculture, Ecosystems & Environment, Amsterdam, v. 236, p. 87-197, 2017.

NELSON, W.L.; MEHLICH, A.; WINTERS, E. The development, evaluation and use of soil test for phosphorus availability. **Agronomy Journal**, Madison, v. 4, p. 153–188, 1953.

NICHOLS, B.A.; HOPKINS, B.C.; JOLLEY, V.D.; WEBB, B.L.; GREENWOOD, B.G.; RUCK, J.R. Phosphorus and zinc interactions and their relationships with other nutrients in maize grown in chelator-buffered nutrient solution. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 35, p. 123-141, 2012.

NORVELL, W.A.; WELCH, R.M. Growth and nutrient uptake by barley (*Hordeum vulgare* L. cv Herta): studies using an N-(2-hydroxyethyl) ethylenedinitrilotriacetic acid-buffered nutrient solution technique (I. Zinc ion requirements). **Plant Physiology**, Lancaster, v. 101, p. 619–625, 1993.

OVA, E.A.; KUTMAN, U.B.; OZTURK, L.; CAKMAK, I. High phosphorus supply reduced zinc concentration of wheat in native soil but not in autoclaved soil or nutrient solution. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 393, p. 147–162, 2015.

PASZKOWSKI, U.; KROKEN, S.; ROUX, C.; BRIGGS, S.P. Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 99, p. 13324-13329, 2015.

PAVINATO, P.S.; RODRIGUES, M.; SOLTHANGHEISI, A.; SARTOR, L.R.; WITHERS, P.J.A. Effects of cover crops and phosphorus sources on maize yield, phosphorus uptake, and phosphorus use efficiency. **Agronomy Journal**, Madison, v. 109, p. 1039-1047, 2017.

PÉREZ-NOVO, C.; BERMÚDEZ-COUSO, A.; LÓPES-PERIAGO, E.; FERNÁNDES-CALVIÑO, D.; ARIAS-ESTÉVEZ, M. Zinc adsorption in acid soils influence os phosphate. **Geoderma**, Amsterdam, v. 162, p. 358-364, 2011.

POIRIER, Y.; BUCHER, M. Phosphate transport and homeostasis in Arabidopsis. In: SOMERVILLE, C.R.; MEYEROWITZ, E.M. (Ed.). **The Arabidopsis Book**. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists, 2002.

POIRIER, Y.; THOMA, S.; SOMERVILLE, C.; SCHIEFELBEIN, J. A mutant of Arabidopsis deficient in xylem loading of phosphate. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 97, p. 1087-1093, 1991.

RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate transport and signaling. Current Opinion in Plant Biology, Oxford, v. 3, p. 182-187, 2000.

RAIJ, B.V.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA H.; QUAGGIO J.A.; editores. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Campinas: Instituto Agronômico; 2001.

RAIJ, B. VAN; QUAGGIO, J.A.; SILVA, N. M. Extraction of phosphorus, potassium, calcium, and magnesium from soils by an ion-exchange resin procedure. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 17, v. 547-566, 1986.

RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. 2. ed. Campinas: Instituto Agronômico, 1997. 285 p.

RAPOSO, R.W.C.; MURAOKA, T.; BASSO, L.C.; LAVRES JUNIOR, J.; FRANZINI, V.I. Acid phosphatase activity and leaf phosphorus content in soybean cultivars. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, p. 439-445, 2004.

REED H. Effects of zinc deficiency on phosphate metabolism of the tomato plant. American Journal of Botany, Oxford, v. 33, p. 778–784, 1946.

ROCHESTER, I.J.; CONSTABLE, G.A. Improvements in nutrient uptake and nutrient useefficiency in cotton cultivars released between 1973 and 2006. Field Crops Research, Amsterdam, v. 173, p. 14–21, 2015.

RODRIGUES, M.; PAVINATO, P.S.; WITHERS, P.J.A.; TELES, A.P.B.; HERRERA, W.F.B. Legacy phosphorus and no tillage agriculture in tropical oxisols of the Brazilian savanna. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 542, v. 1050-1061, 2016.

ROSE, T.J.; IMPA, S.M.; ROSE, M.T.; PARIASCA-TANAKA, J.; MORI, A.; HEUER, S.; JOHNSON-BEEBOUT, S.E.; WISSUWA, M. Enhancing phosphorus and zinc acquisition efficiency in rice: a critical review of root traits and their potential utility in rice breeding. **Annals of Botany**, Oxford, v. 112, p. 331-45, 2013.

ROUACHED, H.; ARPAT, A.B.; POIRIER, Y. Regulation of phosphate starvation responses in plants: signaling players and cross-talks. **Molecular Plant**, Cambridge, v. 3, p. 288–299, 2010.

ROY, E.D.; RICHARDS, P.D.; MARTINELLI, L.A.; COLETTA, L.D.; LINS, S.R.M.; VAZQUEZ, F.F.; WILLIG, E.; SPERA, S.A.; VANWEY, L.K.; PORDER S. The phosphorus cost of agricultural intensification in the tropics. **Nature Plants**, London, v. 2, p. 16043, 2016.

SANTOS, E.F.; MACEDO, F.G.; ZANCHIM, B.J.; LIMA, G.P.P.; LAVRES, J. Prognosis of physiological disorders in physic nut to N, P, and K deficiency during initial growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 115, p. 249-258. 2017.

SANTOS, E.; MARCANTE, N; MURAOKA, T; CAMACHO, M. Phosphorus use efficiency in pima cotton (*Gossypium barbadense* L.) genotypes. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 75, p. 210-215, 2015.

SANTOS, E.F.; ZANCHIM, B.J.; CAMPOS, A.G.; GARRONE, R.F.; LAVRES JUNIOR, J. Photosynthesis rate, chlorophyll content and initial development of physic nut without micronutrient fertilization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, p. 1334-1342, 2013.

SASAKI, H.; HIROSE, T.; WATANABE, Y.; OHSUGI, R. Carbonic Anhydrase Activity and CO2-Transfer Resistance in Zn-Deficient Rice Leaves. **Plant Physiology,** Lancaster, v. 118, p. 929–934, 1998.

SECCO, D.; BAUMANN, A.; POIRER, Y. Characterization of the Rice PHO1 Gene Family Reveals a Key Role for *OsPHO1;2* in Phosphate Homeostasis and the Evolution of a Distinct Clade in Dicotyledons. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 152, p. 1693-1704, 2010.

SHAHZAD, Z.; ROUACHED, H.; RAKHA, A. Combating mineral malnutrition through iron and zinc biofortification of cereals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Hoboken, v. 13, p. 329–346, 2014.

SHANE, M.W.; MCCULLY, M.E.; LAMBERS, H. Tissue and cellular phosphorus storage during development of phosphorus toxicity in *Hakea prostrata* (Proteaceae). Journal of Experimental Botany, Oxford, v. 55, p. 1033–1044, 2004a.

SHANE, M.W.; SZOTA, C.; LAMBERS, H. A root trait accounting for the extreme phosphorus sensitivity of *Hakea prostrata* (Proteaceae). **Plant, Cell & Environment,** Oxford, v. 27, p. 991–1004. 2004b.

SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 4, p. 289-302, 1981.

SIDDIQUI, S.N.; UMAR, S.; IQBAL, M. Zinc-induced modulation of some biochemical parameters in a high- and a low-zinc-accumulating genotype of *Cicer arietinum* L. grown under Zn-deficient condition. **Protoplasma**, Wien, v. 252, p. 1335-1345, 2015.

SILVEIRA M. L.; ALLEONI L. R. F.; O'CONNOR G. A.; CHANG A. C. Heavy metal sequential extraction methods: a modification for tropical soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 64, p. 1929-1938, 2006.

SILVEIRA, N.M.; FRUNGILLO, L.; MARCOS, F.C.C.; PELEGRINO, M.T.; MIRANDA, M.T.; SEABRA, A.B.; SALGADO, I.; MACHADO, E.C.; RIBEIRO, R.V. Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit. **Planta**, Berlin, v. 244, p. 181-190, 2016.

SMALL, E. Photosynthetic rates in relation to nitrogen recycling as an adaptation to nutrient deficiency in peat bog plants. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 50, p. 2227–2233, 1972.

SMITH, S.E.; SMITH, F.A. Roles of arbusular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigm from cellular to ecosystem scales. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.62, p.227–250, 2011.

STEFANOVIC, A.; RIBOT, C.; ROUACHED, H.; WANG, Y.; CHONG, J.; BELBAHRI, L.; DELESSERT, S.; POIRIER, Y. Members of the PHOI gene family show limited functional redundancy in phosphate transfer to the shoot, and are regulated by phosphate deficiency via distinct pathways. **Plant Journal**, Oxford, v. 50, p. 982-994, 2007.

SWIADER, J.M.; CHYAN, Y.; FREIJI, F.G. Genotypic differences in nitrate uptake and utilization efficiency in pumpkin hybrids. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 17, p. 1687-1699, 1994.

TANYOLAÇ, D.; EKMEKÇI, Y.; ÜNALAN, S. Changes in photochemical and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) leaves exposed to excess copper. **Chemosphere**, Oxford, v. 6, p. 89-98, 2007.

TAVALLALI, V.; RAHEMI, M.; MAFTOUN, M.; PANAHI, B.; KARIMI, S.; RAMEZANIAN, A.; VAEZPOUR, M. Zinc influence and salt stress on photosynthesis, water relations, and carbonic anhydrase activity in pistachio. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 123, p. 272–279, 2009.

TENG, W.; DENG, Y.; CHEN, X.P.; XU, X.F.; CHEN, R.Y.; LV, Y; ZHAO, Y.Y.; ZHAO, X.Q.; HE, X.; LI, B. ; TONG, Y.P.; ZHANG, F.S.; LI, Z.S. Characterization of root response to phosphorus supply from morphology to gene analysis in field-grown wheat. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, p. 1403–1411, 2013.

TESFAYE, M.; LIU, J.; ALLAN, D.L.; VANCE, C.P. Genomic and genetic control of phosphate stress in legumes. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 144, p. 594-603, 2007.

THAKUR, S.K.; TOMAR, N.K.; PANDEYA, S.B. Influence of phosphate on cadmium sorption by calcium carbonate. **Geoderma**, Amsterdam, v. 130, p. 240–249, 2006.

TIECHER, T.; CERETTA, C.A.; FERREIRA, P.A.A.; NICOLOSO, F.T.; SORIANI, H.H.; TASSINARI, A.; PARANHOS, J.T.; CONTI, L.D.; BRUNETTO, G. 2016. Physiological and nutritional status of black oat (*Avena strigose* Schreb.) grown in soil with interaction of high doses of copper and zinc. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 106, p. 253-263, 2016.

USEPA. Method 3050b: Acid digestion of sediments, sludges and soils. Washington, DC: EPA, 1996. 12 p.

WANG, Y.; RIBOT, C.; REZZONICO, E.; POIRIER, Y. Structure and expression profile of the Arabidopsis PHOI gene family indicates a broad role in inorganic phosphate homeostasis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 135, p. 400-411, 2004.

WATTS-WILLIAMS, S.J.; TURNEY, T.W.; PATTI, A.F.; CAVAGNARO, T.R. Uptake of zinc and phosphorus by plants is affected by zinc fertilizer material and arbuscular mycorrhizas. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 376, p. 165-175, 2014.

WEBB, W.J.; LONERAGAN, J.F. Effect of zinc deficiency on growth, phosphorus concentration, and phosphorus toxicity of wheat plants. Soil Science Society of America Journal, Madison, v. 52, p. 1676–1680, 1988.

WEBB, W.J.; LONERAGAN, J.F. Zinc translocation to wheat roots and its implications for a phosphorus/zinc interaction in wheat plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 13, p. 1499–1512, 1990.

WILBUR, K.M.; ANDERSON, N.G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. Journal of Biological Chemistry, San Francisco, v. 176, p. 147–154, 1948.

WU, P; MA, X.; TIGABU, M.; HUANG, Y.; ZHOU, L.; CAI, L.; HOU, X.; ODEN, P.C. Comparative growth, dry matter accumulation and photosynthetic rate of seven species of *Eucalypt* in response to phosphorus supply. **Journal of Forestry Research**. Peoples, v. 25, p. 377–383, 2014.

YI, K.; WU, Z.; ZHOU, J.; DU, L.; GUO, L.; WU, Y.; WU, P. OsPTFl, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 138, p. 2087-2096, 2005.

ZAMBROSI, F.C.B.; MATTOS JUNIOR, D.; FURLANI, P.R.; QUAGGIO, J.A. Efficiency of phosphorus uptake and utilization in citrus rootstocks. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, p. 486-496, 2012.

ZAMBROSI, F.C.B.; MESQUITA, G.L.; MENINO, G.; TANAKA, F.A.O.; MATTOS, D.; QUAGGIO, J.A. Anatomical and ultrastructural damage to citrus leaves from phosphite spray depends on phosphorus supply to roots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 416, p. 1-13, 2017.

ZAMBROSI, F.C.B.; RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; GARCIA, J.C. Phosphorus deficiency impairs shoot regrowth of sugarcane varieties. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 52, p. 1-11, 2016.

ZHANG, K.; HANHAN, L.; PELIN, T.; HUAN, C. Comparative proteomic analyses provide new insights into low phosphorus stress responses in maize leaves. **PlosOne**, San Francisco, v. 9, n. 5, e.98215, 2014.

ZHANG, W.; LIU, D.; LIU, Y.; CUI, Z.; CHEN, X.; ZOU, C. Zinc uptake and accumulation in winter wheat relative to changes in root morphology and mycorrhizal colonization following varying phosphorus application on calcareous soil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 197, p. 74–82, 2016.

ZHANG, Y.Q.; DENG, Y.; CHEN, R.Y.; CUI, Z.L.; CHEN, X.P.; YOST, R.; ZHANG, F.S.; ZOU, C.Q. The reduction in zinc concentration of wheat grain upon increased phosphorus-fertilization and its mitigation by foliar zinc application. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 361, p. 143–152, 2012.

ZHAO, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. Annual Review of Plant Biology, Palo Alto, v. 61, p. 49-64, 2010.

ZHOU, J.; JIAO, F.C.; WU, Z.C.; LI, Y.Y.; WANG, X.M.; HE, X.W.; ZHONG, W.Q.; WU, P. OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and exces sive phosphate accumulation in shoots of plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 146, p. 1673-1686, 2008.

ZHOU, Y.; NI, M. SHB1 plays dual roles in photoperiodic and auton omous flowering. **Developmental Biology**, San Diego, v. 331, p. 50-57, 2009.

ZHOU, Y.; ZHANG, X.J.; KANG, X.J.; ZHAO, X.Y.; ZHANG, X.S.; NI, M. Short Hypocotyl Under Blue1 associates with MINISEED3 and HAIKU2 promoters in vivo to regulate Arabidopsis seed development. **Plant Cell**, Rockville, v. 21, p. 106-117, 2009.

ZHU, Y.G.; SMITH, S.E.; SMITH, F.A. Plant growth and cation composition of two cultivars of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) differing in P uptake efficiency. Journal of Experimental Botany, Oxford, v. 52, p. 1277–1282, 2001.