



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM AGRONOMIA

LORRAYNE GUIMARÃES BAVARESCO

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE TRANSPORTADORES DE FÓSFORO E
DESEMPENHO DE CULTIVARES DE *Megathyrus maximus* EM DIFERENTES
NÍVEIS DE FÓSFORO



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM AGRONOMIA

LORRAYNE GUIMARÃES BAVARESCO

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE TRANSPORTADORES DE FÓSFORO E
DESEMPENHO DE CULTIVARES DE *Megathyrus maximus* EM DIFERENTES
NÍVEIS DE FÓSFORO**

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientadora:
Profa. Dra. Alessandra Ferreira Ribas

Presidente Prudente - SP
2022

633.2
B353c

Bavaresco, Lorryne Guimarães.

Caracterização *in silico* de transportadores de fósforo e desempenho de cultivares de *Megathyrsus maximus* em diferentes níveis de fósforo / Lorryne Guimarães Bavaresco. – Presidente Prudente, 2022.

107 f.: il.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2022.

Bibliografia.

Orientadora: Alessandra Ferreira Ribas

1. Gramíneas forrageiras. 2. *Panicum* spp. 3. Comparação genômica. 4. Proteínas de membrana. 5. Crescimento de plantas. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DE TRANSPORTADORES DE FÓSFORO E DESEMPENHO DE CULTIVARES DE *Megathyrsus maximus* EM DIFERENTES NÍVEIS DE FÓSFORO"

AUTOR(A): LORRAYNE GUIMARÃES BAVARESCO

ORIENTADOR(A): Profa. Dra. ALESSANDRA FERREIRA RIBAS

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA em AGRONOMIA

Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. Alessandra Ferreira Ribas

UFPR – Universidade Federal do Paraná / Curitiba (PR) - UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)



Profa. Dra. Ana Claudia Pacheco Santos

UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)



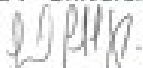
Prof. Dr. Nelson Barbosa Machado Neto

UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)



Prof. Dr. Flávio Henrique Silveira Rabêlo

UFLA - Universidade Federal de Lavras (MG)



Profa. Dra. Sílvia Graciele Hülse de Souza

UNIPAR – Universidade Paranaense / Umuarama (PR)

Presidente Prudente, 01 de novembro de 2022.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, em especial, ao meu avô Antônio Guimarães (*in memoriam*), exemplo de força, integridade e trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Alessandra Ferreira Ribas que acreditou em mim desde o início e me incentivou a ingressar no doutorado, embora eu não soubesse muito sobre análise de expressão gênica e bioinformática naquela época. Tenho grande admiração e gratidão por sua orientação, paciência, conhecimento e atenção, mesmo à distância, sempre esteve presente nas decisões e no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, José Tadeu Bavaresco e Edivina Guimarães Bavaresco, pelo apoio e amor incondicional, pela educação, dedicação e por estarem sempre ao meu lado, sendo responsáveis por me tornar uma pessoa melhor a cada dia.

Ao meu irmão Frederico Guimarães Bavaresco, pela amizade e companheirismo nos momentos que mais precisei.

À minha família, pelos valores, carinho, compreensão e ensinamentos, que me incentivaram a alcançar meus objetivos.

À Profa. Dra. Elizabeth Mie Hashimoto pelas orientações e ajuda na realização da análise estatística.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique dos Santos pelo apoio técnico e pelas valiosas contribuições dadas para a execução e avaliação deste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório e da Pós-graduação, em especial, Fláive, Diliane, Mariane, Bruna, Camila e Milena pela ajuda, cooperação, convivência e momentos de alegria compartilhados durante estes anos.

À Juliana, Gustavo e Marcelo pela amizade, comprometimento e colaboração na condução do experimento em casa de vegetação.

Aos funcionários e colegas dos laboratórios e Departamentos de Pesquisa e Análise, em especial, Cristiane, Luciana, Viviane e Mayara que sempre foram prestativas, contribuíram com conhecimento técnico e auxiliaram na execução das análises.

À banca examinadora de qualificação, Profa. Dra. Ana Cláudia Pacheco Santos e Prof. Tiago Benedito dos Santos pela revisão, correções e sugestões importantes para a redação deste trabalho.

A todos os professores que me acompanharam ao longo da minha jornada acadêmica, por terem contribuído para a minha formação e crescimento profissional.

À Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), pela infraestrutura, pelo apoio durante o curso e à equipe do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pelo apoio e concessão de Bolsa de Estudos (cod. 001).

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho

Muito obrigada!!!

*“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia”
(Robert Collier)*

RESUMO

Caracterização *in silico* de transportadores de fósforo e desempenho de cultivares de *Megathyrsus maximus* em diferentes níveis de fósforo

As gramíneas forrageiras são a principal fonte de alimentação de animais ruminantes, porém, a deficiência de fósforo (P) em solos tropicais afeta negativamente a produtividade e a qualidade das pastagens. As plantas possuem um sistema de aquisição e distribuição de fósforo complexo que envolve diferentes transportadores celulares. No entanto, os genes relacionados ao transporte de P em *Panicum* spp. são pouco estudados. O objetivo desse trabalho foi caracterizar *in silico* os genes *vacuolar H⁺-pirofosfatase* (VHP) e transportadores de fosfato (*PHT1* e *PHO1*) em *Panicum* spp. e, avaliar o perfil transcricional de transportadores de P e o desempenho de duas cultivares de *Megathyrsus maximus* (sin. *Panicum maximum*), sob níveis de P. As sequências dos genes descritos em *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* foram usadas para identificar sequências homólogas nas espécies *Panicum hallii* e *Panicum virgatum* disponíveis no *Phytozome* v 13. O experimento foi realizado em casa de vegetação, as mudas de duas cultivares (Mombaça e Aruana) de *M. maximus* foram submetidas a baixo e adequado P (0,05 mM e 1 mM de KH_2PO_4). Os parâmetros produtivos e a qualidade das forrageiras foram avaliados após 21 dias de crescimento nos tratamentos com níveis de P. Foram identificados 8, 12 e 3 genes em *P. hallii* e 14, 23 e 6 genes em *P. virgatum*, pertencentes às famílias VHP, *PHT1* e *PHO1*, respectivamente. Com base na comparação filogenética entre as espécies *Panicum* spp, foram desenhados iniciadores para quatro genes *MmVHP1*, *MmPHT1*, *MmPHO1b* e *MmPHO1c*, cuja expressão foi analisada em folhas e raízes de *M. maximus*. As cultivares apresentaram menor expressão do gene *MmVHP1* e maior expressão dos genes *MmPHT1* e *MmPHO1b* nas folhas, em resposta a baixo P. Nas raízes, a expressão do gene *MmPHT1* foi regulada positivamente. *MmPHO1c* apresentou baixa expressão e não foi induzido pelos tratamentos. A baixa disponibilidade de P reduziu o número de folhas, o perfilhamento, a biomassa da parte aérea e o valor nutricional de ambas as cultivares, no entanto, as plantas apresentaram maior crescimento de raízes de menor diâmetro. A qualidade nutricional da cv. Mombaça foi afetada pelo aumento de lignina e diminuição de hemicelulose em baixo P. Os resultados obtidos nesse trabalho reforçam o potencial de utilização de banco de dados de *Panicum* spp. para estudos em espécies relacionadas com genoma não sequenciado, como *M. maximus*, para a compreensão de estratégias de aquisição e uso interno de P pelas plantas em condições de baixa disponibilidade de P.

Palavras-chave: gramíneas forrageiras; *Panicum* spp; comparação genômica; proteínas de membrana; crescimento de plantas.

ABSTRACT

***In silico* characterization of phosphorus transporters and performance of *Megathyrsus maximus* cultivars at different phosphorus levels**

Forage grasses are the main source of food for ruminant animals, however, phosphorus (P) deficiency in tropical soils negatively affects pasture productivity and quality. Plants have a complex phosphorus acquisition and distribution system that involves different cellular transporters. However, genes related to P transport in *Panicum* spp. are little studied. The objective of this work was to characterize *in silico* the vacuolar H⁺-pyrophosphatase (VHP) and phosphate transporters (*PHT1* and *PHO1*) genes in *Panicum* spp. and, to evaluate the transcriptional profile of P transporters and the performance of two cultivars of *Megathyrsus maximus* (syn. *Panicum maximum*), under P levels. The gene sequences described in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* were used to identify homologous sequences in the species *Panicum hallii* and *Panicum virgatum* available in *Phytozome* v 13. The experiment was carried out in a greenhouse, the seedlings of two cultivars (Mombaça and Aruana) of *M. maximus* were submitted to low and adequate P (0.05 mM and 1 mM of KH₂PO₄). Productive parameters and forage quality were evaluated after 21 days of growth in treatments with P levels. We identified 8, 12 and 3 genes in *P. hallii* and 14, 23 and 6 genes in *P. virgatum*, belonging to the VHP families, *PHT1* and *PHO1*, respectively. Based on the phylogenetic comparison between *Panicum* spp species, primers were designed for four genes *MmVHP1*, *MmPHT1*, *MmPHO1b* and *MmPHO1c*, whose expression was analyzed in leaves and roots of *M. maximus*. The cultivars showed lower expression of the *MmVHP1* gene and higher expression of the *MmPHT1* and *MmPHO1b* genes in the leaves, in response to low P. In the roots, the expression of the *MmPHT1* gene was upregulated. *MmPHO1c* showed low expression and was not induced by the treatments. The low availability of P reduced the number of leaves, tillering, shoot biomass and nutritional value of both cultivars, however, the plants showed greater growth of smaller diameter roots. The nutritional quality of cv. Mombaça was affected by an increase in lignin and a decrease in hemicellulose at low P. The results obtained in this work reinforce the potential of using a *Panicum* spp. for studies in related species with a unsequenced genome, such as *M. maximus*, for the understanding of acquisition strategies and internal use of P by plants under conditions of low P availability.

Keywords: forage grasses; *Panicum* spp; genomic comparison; membrane proteins; plant growth.

LISTA DE SIGLAS

Al ³⁺	– Alumínio
At	– <i>Arabidopsis thaliana</i>
VHP	– <i>Pirofosfatase vacuolar</i>
Ca (NO ₃) ₂	– Nitrato de Cálcio
CDS	– Sequência de codificação
C-terminal	– Carboxi-terminal
CuCl ₂	– Cloreto de cobre
FDA	– Fibra em detergente ácido
FDN	– Fibra em detergente neutro
Fe ³⁺	– Ferro
Fe-EDTA (Na)	– Ácido etilenodiaminotetraacético de sódio e ferro (III)
H ⁺	– Hidrogênio
H ⁺ -ATPase	– Adenosina trifosfatase
H ₃ BO ₃	– Ácido bórico
KNO ₃	– Nitrato de potássio
MFS	– Superfamília de facilitadores principais
Mg ²⁺	– Magnésio
MgSO ₄	– Sulfato de Magnésio
MnCl ₂ .4H ₂ O	– Cloreto de manganês
MS	– Massa seca
NaMoO ₄ .H ₂ O	– Molibdato de Sódio
NDT	– Nutrientes digestíveis totais
N-terminal	– Amino terminal
Os	– <i>Oryza sativa</i>
P	– Fósforo
Pahal	– <i>Panicum hallii</i>
Pavir	– <i>Panicum virgatum</i>
PHO1	– <i>Phosphate 1</i>
PHS	– Simportadores de fosfato e hidrogênio
PHT	– <i>Phosphate Transporter</i>
Pi	– Fosfato inorgânico
PIB	– Produto interno bruto
Po	– Fósforo orgânico
RT-qPCR	– Quantificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real
TAIF	– Taxa de alongamento foliar
TApF	– Taxa de aparecimento foliar
TApP	– Taxa de aparecimento de perfilhos
ZnCl ₂	– Cloreto de zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Processo geral de transporte de fosfato pela planta.....	24
Figura 2 –	Árvore filogenética de proteínas da família <i>VHP</i> em <i>P. hallii</i> , <i>P. virgatum</i> , <i>A. thaliana</i> e <i>O. sativa</i>	38
Figura 3 -	Estruturas gênicas de genes <i>VHP</i> em <i>Panicum</i> spp.....	40
Figura 4 –	Análise dos motivos conservados das proteínas <i>VHP</i> em <i>Panicum</i> spp.....	41
Figura 5 –	Alinhamento de membros da família de genes <i>VHP</i> e análise de domínios funcionais conservados em <i>P. hallii</i> e <i>P. virgatum</i>	42
Figura 6 –	Árvore filogenética de proteínas da família <i>PHT1</i> em <i>P. hallii</i> , <i>P. virgatum</i> , <i>A. thaliana</i> e <i>O. sativa</i>	48
Figura 7 –	Estruturas gênicas de genes <i>PHT1</i> em <i>Panicum</i> spp.....	50
Figura 8 –	Análise dos motivos conservados das proteínas <i>PHT1</i> em <i>Panicum</i> spp.....	52
Figura 9 –	Árvore filogenética de proteínas da família <i>PHO1</i> em <i>P. hallii</i> , <i>P. virgatum</i> , <i>A. thaliana</i> e <i>O. sativa</i>	55
Figura 10 –	Estruturas gênicas de genes <i>PHO1</i> em <i>Panicum</i> spp.....	56
Figura 11 –	Análise dos motivos conservados das proteínas <i>PHO1</i> em <i>Panicum</i> spp.....	57
Figura 12 –	Mapa de calor da expressão de genes da família <i>VHP</i> em diferentes tecidos de <i>O. sativa</i>	58
Figura 13 –	Mapa de calor da expressão de genes da família <i>PHT1</i> em diferentes tecidos de <i>O. sativa</i>	59
Figura 14 –	Mapa de calor da expressão de genes <i>PHO1</i> em diferentes tecidos de <i>O. sativa</i>	60
Figura 15 –	Amplificação de genes candidatos utilizando cDNA de <i>M. maximus</i> por PCR convencional e coloração com brometo de etídio, em gel de agarose (1,5%)	78
Figura 16 –	Expressão relativa de genes em folhas de duas cultivares de <i>M. maximus</i> submetidas a diferentes níveis de fósforo.....	80
Figura 17 –	Expressão relativa de genes em raízes de duas cultivares de <i>M. maximus</i> submetidas a diferentes níveis de fósforo.....	81
Figura 18 –	Características estruturais vegetativas de duas cultivares de <i>M. maximus</i> cultivadas em solução nutritiva sob baixa e adequada disponibilidade de fósforo.....	82
Figura 19 –	Características morfogênicas de cultivares de <i>M. maximus</i> cultivadas em solução nutritiva sob baixa e adequada	

	disponibilidade de fósforo.....	83
Figura 20 –	Produção de biomassa da parte aérea e radicular de cultivares de <i>M. maximus</i> cultivadas em solução nutritiva sob baixa e adequada disponibilidade de fósforo.....	85
Figura 21 –	Teor de fósforo de cultivares de <i>M. maximus</i> cultivadas em solução nutritiva sob baixa e adequada disponibilidade de fósforo.....	86
Figura 22 –	Características morfológicas radiculares de cultivares de <i>M. maximus</i> cultivadas em solução nutritiva contendo baixa e adequada disponibilidade de fósforo.....	87
Figura 23 –	Comprimento radicular por classe de diâmetro de cultivares de <i>M. maximus</i> cultivadas em solução nutritiva sob baixa e adequada disponibilidade de fósforo.....	88
Figura 24 –	Área de superfície radicular por classe de diâmetro de cultivares de <i>M. maximus</i> cultivadas em solução nutritiva sob baixa e adequada disponibilidade de fósforo.....	89
Figura 25 –	Volume radicular por classe de diâmetro de cultivares de <i>M. maximus</i> cultivadas em solução nutritiva sob baixa e adequada disponibilidade de fósforo.....	90
Figura 26 –	Composição bromatológica de cultivares de <i>M. maximus</i> cultivadas em solução nutritiva sob baixa e adequada disponibilidade de fósforo.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Caracterização dos genes <i>Vacuolar H⁺-Pirofosfatase (VHP)</i> em <i>P. hallii</i> , <i>P. virgatum</i> , <i>A. thaliana</i> e <i>O. sativa</i>	37
Tabela 2 -	Caracterização dos genes <i>Phosphate Transporter 1 (PHT1)</i> em <i>P. hallii</i> , <i>P. virgatum</i> , <i>A. thaliana</i> e <i>O. sativa</i>	46
Tabela 3 -	Caracterização dos genes <i>Phosphate 1 PHO1</i> em <i>P. hallii</i> , <i>P. virgatum</i> , <i>A. thaliana</i> e <i>O. sativa</i>	54
Tabela 4 -	Sequências de iniciadores utilizados para análise quantitativa de transcriptase reversa RT-qPCR em <i>M. maximus</i>	79

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Importância das pastagens para a pecuária no Brasil	18
2.2	<i>Megathyrus maximus</i>	19
2.3	Dinâmica do fósforo do solo à planta	21
2.4	Genes relacionados ao transporte e aquisição de P	23
2.4.1	<i>Vacuolar H⁺-Pirofosfatase (VHP)</i>	24
2.4.2	Transportador de fosfato – <i>Phosphate transporter 1 (PHT1)</i>	26
2.4.3	Transportador de fosfato - <i>Phosphate 1 (PHO1)</i>	29
3	CAPÍTULO 1	31
3.1	INTRODUÇÃO	33
3.2	OBJETIVO	34
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.3.1	Identificação e caracterização de genes em espécies <i>Panicum spp.</i>	34
3.3.2	Análise filogenética, estrutura gênica e motivos conservados	35
3.3.3	Análise de expressão <i>in silico</i> da cultura do arroz	35
3.4	RESULTADOS	36
3.4.1	Genes <i>VHP</i> em <i>Panicum spp.</i>	36
3.4.2	Genes <i>PHT1</i> em <i>Panicum spp.</i>	45
3.3.3	Genes <i>PHO1</i> em <i>Panicum spp.</i>	53
3.3.4	Perfil transcricional dos genes em Arroz	58
3.5	DISCUSSÃO	60
3.6	CONCLUSÃO	69
4	CAPITULO 2	70
4.1	INTRODUÇÃO	72
4.2	OBJETIVO	73
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	73
4.3.1	Material vegetal e condições de crescimento	73
4.3.2	PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)	74
4.3.3	Características morfogênicas e estruturais	76
4.3.4	Parâmetros biométricos e nutricionais	77

4.3.5 Características morfológicas radiculares.....	77
4.3.6 Análises bromatológicas.....	77
4.3.7 Análise estatística	78
4.4 RESULTADOS.....	78
4.4.1 Seleção de iniciadores	78
4.4.2 Expressão de genes de <i>M. maximus</i>	80
4.4.3 Características morfogênicas de cultivares de <i>M. maximus</i>	82
4.4.4 Biomassa e absorção de P de cultivares de <i>M. maximus</i>	84
4.4.5 Características morfológicas da raiz sob deficiência de P.....	86
4.4.6 Composição bromatológica	90
4.5 DISCUSSÃO	92
4.6 CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS.....	98

1 INTRODUÇÃO

O fósforo é um macronutriente que desempenha funções importantes nas plantas, sendo componente de ácidos nucleicos, fosfolipídios e ATP (adenosina trifosfato), participa de aspectos fisiológicos e processos bioquímicos, que incluem estrutura de DNA e RNA, fotossíntese, respiração, síntese de carboidratos e proteínas, reações enzimáticas, estrutura e sinalização celular.

Os solos possuem fontes naturais de fósforo, que se encontram nas formas orgânica e inorgânica. A dinâmica do fósforo no solo está associada a fatores ambientais, a atividade de microrganismos e as propriedades físico-químicas do solo. Basicamente, a entrada de fósforo na solução do solo ocorre pela dissolução de minerais, dessorção das partículas de argila e solubilização microbiana do fósforo orgânico. Porém, o fósforo na forma inorgânica pode ser adsorvido nas superfícies coloidais do solo ou se ligar fortemente à óxidos de ferro e alumínio, em solos ácidos, e ao cálcio e magnésio, em solos alcalinos, criando complexos insolúveis menos disponíveis às plantas.

A baixa disponibilidade de fósforo na maioria dos solos tropicais é um fator limitante para a produtividade de gramíneas forrageiras. A deficiência de fósforo no estabelecimento e na manutenção das pastagens prejudica o crescimento das plantas, o desenvolvimento do sistema radicular e reduz o perfilhamento e a produção de matéria seca, resultando na degradação da área cultivada nos anos subsequentes.

Para a recuperação do potencial produtivo das pastagens, a prática mais comum adotada pelos pecuaristas, a fim de aumentar a disponibilidade de fósforo no solo, é a utilização de fertilizantes inorgânicos. No entanto, grande parte do fosfato fornecido, via adubação, pode ser imobilizado pelo solo, sendo necessária a aplicação desse mineral em grandes quantidades para suprir a sua baixa eficiência. Além disso, os fertilizantes fosfatados inorgânicos são produzidos a partir de reservas de rocha fosfática, que são fontes finitas e não renováveis, tornando-os cada vez mais caro e de difícil acesso a longo prazo.

As plantas naturalmente desenvolveram mecanismos de adaptação a ambientes com limitada disponibilidade de fósforo. As raízes das plantas por estarem em contato direto com o solo, são mais sensíveis as alterações de concentração de fosfato disponível na solução do solo e, portanto, são mais

suscetíveis a mudanças morfológicas, como aumento do comprimento e densidade das raízes laterais e formação de pelos radiculares que permitem maior exploração do solo. As alterações moleculares como a regulação da expressão gênica, também podem ajudar a melhorar a eficiência do uso de fósforo pelas plantas. Estudos têm demonstrado que os genes envolvidos no transporte de fosfato pelas células podem melhorar a absorção e translocação de fósforo em plantas. Portanto, a identificação e a análise da expressão desses genes, assim como os aspectos fisiológicos, podem contribuir para a seleção e melhoramento genético de espécies gramíneas com maior potencial produtivo de biomassa em solos deficientes em P.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância das pastagens para a pecuária no Brasil

As espécies forrageiras são economicamente significativas em diversas regiões do mundo, estima-se que as pastagens usadas na alimentação de animais representam 67% da área agrícola global, o que corresponde a 3,2 bilhões de hectares, em 2019 (FAO, 2021). A pecuária é uma das atividades mais importantes para a economia brasileira. No ano de 2020, a pecuária de corte teve um faturamento de 747,05 bilhões de reais, correspondendo a 10% do produto interno bruto (PIB) (ABIEC, 2021).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de carne bovina, com o rebanho de 187,55 milhões de cabeças e o número de 41,5 milhões de animais abatidos, destinando 26,07% do total de carne produzida à exportação. O mercado interno é responsável pelo consumo de 73,93% da produção brasileira de carne bovina, com média *per capita* de 36,39 kg ano⁻¹ (ABIEC, 2021).

As pastagens desempenham papel fundamental na pecuária brasileira, cerca de 85% da carne bovina é produzida à pasto, cuja área total compreende 165,2 milhões de hectares (ABIEC, 2021). A criação de gado em pastagens bem manejadas resulta em baixo custo de produção, menores riscos econômicos e impactos ambientais, em relação aos sistemas de confinamentos adotados em outros países. Além disso, a alimentação à pasto oferece melhor bem-estar animal, não compete com fontes de alimentação humana, gera um produto saudável e de elevada qualidade nutricional (DIAS-FILHO, 2014).

Nas últimas décadas, o modelo de produção pecuária no Brasil tem mudado e passou a priorizar tecnologias mais intensivas e sustentáveis, havendo um aumento da eficiência das pastagens, sem a necessidade de ampliação de áreas utilizadas (VILELA; MARTHA JÚNIOR; MARCHÃO, 2012). No entanto, a degradação das pastagens em áreas tropicais ainda é um dos fatores limitantes à produtividade pecuária. No Brasil, estudos indicam que 50% das áreas de pastagens em sistemas extensivos apresentam algum grau de degradação (DIAS-FILHO, 2014).

As principais causas de degradação das pastagens estão relacionadas as condições do solo, a seleção inadequada da espécie forrageira, a taxa de lotação

animal e a adoção de práticas culturais incorretas. Os solos localizados em regiões tropicais, em sua maioria, são fortemente intemperizados e apresentam baixa disponibilidade de nutrientes, especialmente de fósforo, acidez elevada e baixo conteúdo de matéria orgânica (FRANCISCO; BONFIM-SILVA; TEIXEIRA, 2017).

A correção da acidez e da fertilidade do solo insuficientes na fase de estabelecimento da cultura e a falta de reposição dos nutrientes extraídos, pela planta forrageira, durante anos de exploração, aceleram o processo de degradação das pastagens, reduzindo a produção de matéria seca e limitando a taxa de lotação de animais (FRANCISCO; BONFIM-SILVA; TEIXEIRA, 2017). Portanto, a recuperação da capacidade produtiva destas áreas pelo uso de corretivos e fertilizantes, de maneira compatível com as necessidades nutricionais da planta, são determinantes para a melhoria da eficiência das pastagens.

2.2 *Megathyrus maximus*

A gramínea *Megathyrus maximus* (sin. *Panicum maximum* Jacq.) é uma espécie forrageira perene, pertencente à família Poaceae, subfamília Panicoideae e tribo Paniceae. A espécie é originária do Leste da África e a maior diversidade genética encontra-se nos países Quênia e Tanzânia (JANK *et al.*, 2008; SOUSA *et al.*, 2011). Nessas regiões, a gramínea é naturalmente avistada às margens de florestas, como vegetação pioneira em áreas recém desmatadas e em áreas de savana, com algumas árvores isoladas, onde crescem sob condições de sombreamento leve (PARSONS, 1972).

A espécie *M. maximus* corresponde a aproximadamente a 10% da área de pastagem no Brasil (JANK *et al.*, 2014). A utilização de cultivares pertencentes ao gênero *Megathyrus* têm aumentado na última década, devido ao alto potencial produtivo, qualidade nutricional e ampla adaptabilidade a condições climáticas (SOUSA *et al.*, 2011). No entanto, as cultivares disponíveis demandam alta fertilidade do solo, o que acaba limitando o seu cultivo em solos tropicais altamente intemperizados (JANK *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2018).

A propagação dessa espécie ocorre por sementes e a sua reprodução geralmente é por apomixia, mas ecotipos sexuais também se encontram na natureza, permitindo o cruzamento e a obtenção de plantas híbridas. O embrião (2n) de sementes apomíticas não é derivado de uma fecundação, portanto seu código

genético é idêntico à planta-mãe. No entanto, assim como ocorre no processo sexual normal, os núcleos polares são fecundados pelo pólen e a formação do endosperma é híbrida ($2n+n$). A espécie apresenta o número básico de $x=8$ cromossomos. As plantas apomíticas são caracterizadas como tetraplóides ($2n=4x=32$ cromossomos) e as plantas sexuais são diplóides ($2n=16$ cromossomos) (JANK *et al.*, 2008).

O capim Colônia foi a primeira cultivar introduzida e difundida no Brasil no século XIX (PARSONS, 1972). Posteriormente, em decorrência de programas de melhoramento realizado por diversas instituições de pesquisa no Brasil, a partir de avaliações e seleções fenotípicas à campo de acessos naturais trazidos da África, foram lançadas as cultivares de *M. maximus* denominadas Centenário, Centauro, Vencedor, Tobiatã, Tanzânia, Mombaça, Aruana, Áries, Atlas e Massai (híbrido espontâneo entre *Megathyrus maximus* x *Megathyrus infestum*) (VALLE; JANK; RESENDE, 2009). As últimas cultivares lançadas foram a BRS Zuri, em 2014 e os primeiros híbridos resultantes de cruzamento BRS Tamani e BRS Quênia, em 2015 (JANK *et al.*, 2017).

A cultivar Mombaça se destaca entre as forrageiras por apresentar alta capacidade produtiva, podendo atingir 40 t de matéria seca $ha^{-1} ano^{-1}$. A elevada porcentagem de folhas, com teor médio de 16% de proteína bruta, permite a utilização dessa cultivar em sistemas intensivos de pastejo rotacionado e produção de silagem. Essa gramínea tem como característica crescimento cespitoso, folhas largas e porte alto, com altura média de 1,7 m (MACHADO *et al.*, 2010).

Em contrapartida, a cultivar Aruana é uma gramínea de porte baixo, com altura entre 70 e 90 cm, sendo a menor cultivar de *M. maximus* disponível no mercado. O capim Aruana apresenta crescimento cespitoso, folhas estreitas e curtas, de coloração verde escura e colmos finos, que resultam em menor potencial de produção, com 18 a 21 t de matéria seca $ha^{-1} ano^{-1}$. Essa cultivar se destaca pela alta capacidade de perfilhamento, rápida rebrota e boa cobertura do solo, podendo ser empregada em consórcio com outras culturas, em sistemas de produção de ovinos, bovinos de corte e de leite e criação de cavalos (DUARTE, 2011; SILVA; BORTOLINI, 2012).

2.3 Dinâmica do fósforo do solo à planta

O fósforo (P) é um macronutriente necessário para o crescimento e desenvolvimento das plantas, envolvido em vários processos metabólicos, como geração de energia celular, fotossíntese, formação de carboidratos, processo de respiração, controle de reações enzimáticas, síntese de proteínas, sinalização, fixação de nitrogênio e componente estrutural, como ácidos nucleicos e fosfolipídios (VANCE; UHDE-STONE; ALLAN, 2003).

O fósforo no solo pode ser encontrado na forma orgânica (Po) e inorgânica (Pi). O Po no solo é proveniente de resíduos vegetais, animais e material microbiano em decomposição e representa de 30 a 65% do total de fósforo nos solos. Por encontrar-se imobilizado, a liberação de Po é decorrente de processos de mineralização pela ação de ácidos orgânicos e fosfatases secretadas pelos microrganismos do solo ou pelas raízes das plantas (SHEN *et al.*, 2011).

Na solução do solo, o fósforo inorgânico (Pi) é absorvido pelas plantas nas formas aniônicas H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} (SRIVASTAVA *et al.*, 2018). A entrada de P na solução do solo pode ocorrer pela dissolução de minerais, dessorção das partículas de argila e mineralização da matéria orgânica ou pela adição de fertilizantes e aplicação de resíduos vegetais e animais (JOHAN *et al.*, 2021).

Em regiões tropicais, onde prevalecem solos ácidos e deficientes em P, devido ao material de origem, o fosfato pode ser adsorvido por óxidos de ferro (Fe^{3+}) e alumínio (Al^{3+}), enquanto em solos alcalinos o Pi é reativo com cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) (MLODZINSKA; ZBOINSKA, 2016). Além disso, o Pi também pode se ligar a fração argila e a matéria orgânica presente no solo, especialmente ao ácido fítico (fitato), tornando-se temporariamente indisponível às plantas (SHEN *et al.*, 2011; WIEL; LINDEN; SCHOLTEN, 2016). A baixa taxa de difusão do fósforo devido às fortes reações com os componentes do solo, tornam esse nutriente imóvel e menos disponível para as plantas (FARAJIA; HASANZADEH; HEIDARI, 2021). Além disso, grande parte do fósforo se concentra nas camadas superficiais do solo, o que torna o acesso pelas plantas dependente do desenvolvimento radicular mais denso e raso (HEUER *et al.*, 2016).

A concentração de Pi disponível na solução do solo, geralmente, é inferior a $10 \mu\text{M}$, porém, a concentração de fosfato nos tecidos vegetais é relativamente alta, variando de 5 a 20 mM (HASAN *et al.*, 2016). Como a concentração de Pi é muito

baixa na solução do solo, as plantas absorvem o Pi contra um gradiente de concentração, sendo necessário transportadores especializados nas membranas celulares dos tecidos radiculares para a aquisição de Pi solúvel e de mecanismos eficientes de translocação, requerendo a coordenação de um conjunto de proteínas com atividades de transporte de Pi entre os compartimentos celulares das plantas (GU *et al.*, 2016; LAMBERS, 2022).

Estima-se que 50% dos solos agrícolas no mundo são deficientes em fósforo, devido ao material de origem, a reposição insuficiente de fósforo extraído pelas culturas ou as propriedades fixadoras do solo (HEUER *et al.*, 2016). A limitação de fósforo no solo pode ser superada pela aplicação de fertilizantes inorgânicos, produzidas a partir de rochas fosfáticas, no entanto, devido à sua natureza não renovável, outras estratégias mais sustentáveis são abordadas para melhorar a eficiência e a utilização de fósforo (EUP) em áreas agrícolas (WIEL; LINDEN; SCHOLTEN, 2016). A EUP pode ser alcançada pelo aumento da absorção de P do solo (eficiência de aquisição de P) ou pela maior capacidade de produção por unidade de P absorvido (eficiência de utilização de P) (RAMAEKERS *et al.*, 2010; ZHANG; LIAO; LUCAS *et al.*, 2014).

As plantas desenvolveram uma série de respostas fisiológicas e morfológicas adaptativas a ambientes com baixa disponibilidade de Pi, que ajudam a superar o estresse e a equilibrar os níveis de Pi interno (SRIVASTAVA *et al.*, 2018). Os sintomas característicos e visíveis de deficiência de fósforo em plantas são a redução do crescimento da parte aérea e o acúmulo de antocianina, pigmentação roxa que ocorre geralmente em tecidos foliares, para proteger os cloroplastos e ácidos nucleicos da luz ultravioleta (MLODZINSKA; ZBOINSKA, 2016). Além disso, as plantas são capazes de induzir e regular proteínas transportadoras de Pi, redistribuir o Pi de folhas mais velhas, utilizar o Pi armazenado no vacúolo, alterar a arquitetura radicular, realizar simbiose com microrganismos e exsudar compostos na rizosfera para disponibilizar o Pi retido no solo (RAMEKERS *et al.*, 2010).

A baixa disponibilidade de Pi no solo pode afetar a arquitetura radicular das plantas, reduzindo o crescimento da raiz primária e promovendo o desenvolvimento de raízes laterais e pelos radiculares, resultando em aumento da proporção raiz/parte aérea (VANCE; UHDE-STONE; ALLAN, 2003). O crescimento de raízes com morfologia mais fina e alongada aumenta a densidade radicular em superfície e permite maior exploração das camadas superficiais do solo, região mais fértil em

fósforo e favorável para as associações simbióticas com micorrizas, que produzem ácidos orgânicos e fosfatases ácidas, aumentando a disponibilidade de Pi na rizosfera (RAMAEKERS *et al.*, 2010, SHEN *et al.*, 2011, WIEL; LINDEN; SCHOLTEN, 2016).

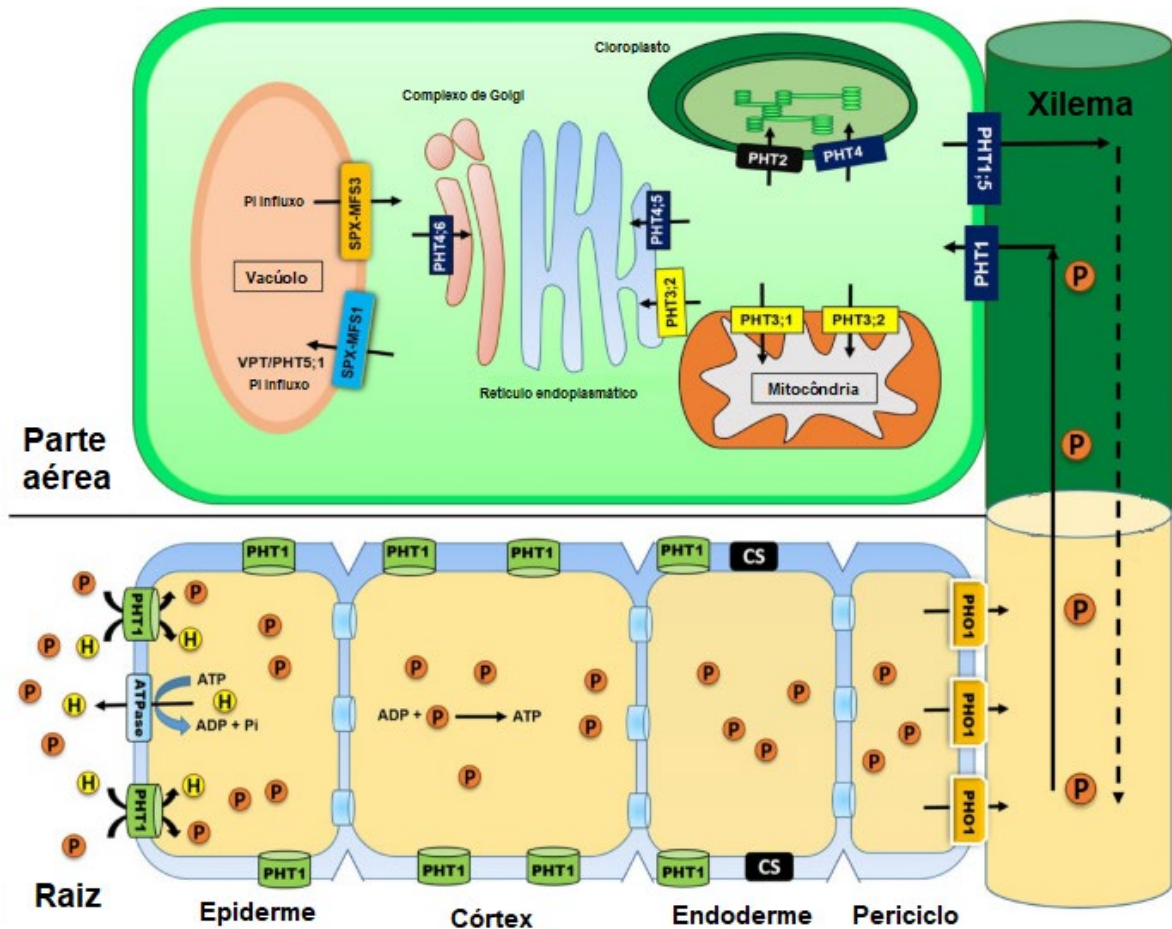
2.4 Genes relacionados a absorção e transporte de P

A absorção de fósforo da solução do solo pelas raízes das plantas é um processo ativo e dependente de transportadores específicos (SUN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2019). Os transportadores de fosfato codificados por membros da família *PHT1* (*Phosphate transporter*) em conjunto com o bombeamento de prótons H⁺ são responsáveis pelo movimento de fosfato inorgânico pela membrana plasmática para o interior das células epidérmicas e pelos radiculares (NUSSAUME *et al.*, 2011; MLODZINSKA; ZBOINSKA, 2016).

O movimento de íons de Pi nas células da raiz em direção ao xilema pode ser mediado pela via apoplástica, pelo movimento radial de íons até o cilindro central através de espaços intercelulares, ou pela via simplástica, pelo movimento de íons intracelulares por plasmodesmas (SMITH *et al.*, 2003). No entanto, devido a parede celular das raízes ter carga negativa, existe uma atração de cátions e uma repulsão de ânions, o que acaba dificultando a movimentação de Pi pelo apoplasto (SATTELMACHER, 2001). Além disso, o fluxo de Pi através do apoplasto na raiz pode ser bloqueado ao nível da endoderme pelas estrias de Caspary, uma zona na qual a parede celular é impregnada por compostos hidrofóbicos como a suberina e a lignina, que reduzem a permeabilidade de solutos e forçam a passagem de Pi da camada externa do córtex, para o interior das células da endoderme, via simplasto (HAMBURGER *et al.*, 2002).

Ao atingir o cilindro central vascular, após as células da endoderme, o Pi é carregado no xilema através de transportadores *PHO1* (*Phosphate 1*) para a parte aérea das plantas. A distribuição e a remobilização de Pi pelos tecidos da parte aérea são facilitadas por proteínas pertencentes as famílias *PHT2*, *PHT3*, *PHT4* e *PHT5* (NUSSAUME *et al.*, 2011; FABIANSKA; BUCHER; HAUSLER, 2019; PRATHAP *et al.*, 2022) (Figura 1).

Figura 1 - Processo geral de transporte de fosfato pela planta.



Adaptado (PRATHAP *et al.*, 2022)

Os transportadores *PHT1* (*Phosphate transporter 1*) são proteínas localizadas nas membranas plasmáticas, envolvidas na captação de P_i nas raízes. O gene *PHO1* (*Phosphate1*), localizado nas endomembranas do complexo de Golgi e trans-Golgi, contribui principalmente para o transporte de P_i a longa distância, sendo responsável pelo efluxo de P_i para fora das células, encaminhando o P_i pelos vasos do xilema. Os genes transportadores de fosfato *PHT2*, *PHT3*, *PHT4* e *PHT5/VPT1* são responsáveis pela distribuição e translocação de P_i nos cloroplastos, mitocôndrias, complexo de Golgi e vacúolo, respectivamente.

2.4.1 Vacuolar H^+ -Pirofosfatase (VHP)

O transporte de solutos entre os compartimentos celulares é dependente da homeostase do pH, por meio da importação e exportação de prótons na membrana das células vegetais. As plantas possuem três tipos de enzimas bombeadoras de hidrogênio, H^+ -adenosina trifosfatase do tipo P (H^+ -ATPase) e do tipo V (V-ATPase), bem como as vacuolares H^+ -pirofosfatases (H^+ -PPases) (SCHUMACHER, 2014).

A H^+ -ATPase do tipo P bombeia prótons para fora das células pela hidrólise de ATP e cria um gradiente de concentração através da membrana plasmática, que

permite o movimento de Pi para dentro das células (HAMBURGER *et al.*, 2002). O complexo vacuolar H⁺-ATPase do tipo V, acidifica o vacúolo e outros compartimentos intracelulares, auxiliando no desenvolvimento embrionário e na expansão celular, enquanto, as proteínas H⁺-PPases usam a energia da hidrólise de pirofosfato inorgânico (PPi) no citoplasma para bombear prótons ativamente para o vacúolo das células vegetais (LI *et al.*, 2005).

O PPi é um subproduto gerado por meio de diferentes processos metabólicos, como a síntese de ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos e lipídios em células vegetais (PRIMO *et al.*, 2019). O acúmulo de PPi no citoplasma inibe as reações de polimerização celulares. Portanto, a H⁺-PPase sequestra o PPi em excesso no citoplasma e o utiliza como fonte de energia para o transporte ativo de prótons para os vacúolos em expansão. Em células maduras, a atividade metabólica diminui e, conseqüentemente, o PPi fica menos disponível reduzindo o transporte de solutos para o vacúolo (MAESHIMA, 2000).

A energia liberada durante a hidrólise de PPi é equivalente a aproximadamente 60% da energia liberada pela hidrólise de ATP, sendo uma fonte de energia alternativa quando os níveis de ATP são baixos (PRIMO *et al.*, 2019). Portanto, a energia gerada pela quebra de PPi pelas H⁺-PPases pode ajudar as plantas a economizar ATP, em condições de estresse abiótico (SCHILLING *et al.*, 2017).

O genoma da *Arabidopsis thaliana* contém três genes que codificam dois tipos de enzimas H⁺-PPase. O tipo I contém um único gene *vacuolar H⁺-pirofosfatase AtVHP1*, também conhecido como *AVP1*, que necessita de K⁺ para a sua ativação enzimática e têm moderada sensibilidade ao Ca²⁺, enquanto, o tipo II é composto por dois genes *AtVHP2;1* e *AtVHP2;2*, insensível ao K⁺ e hipersensível ao Ca²⁺ (SARAFIAN *et al.*, 1992; DROZDOWICZ; KISSINGER; REA, 2001; SEGAMI *et al.*, 2018).

Os genes *VHP* do tipo I desempenham papéis importantes na regulação do pH celular, no gradiente eletroquímico de H⁺ e no transporte ativo de íons inorgânicos pelas membranas celulares (ZHANG *et al.*, 2020). Estudos anteriores mostram que os genes *VHP1* estão relacionados a promoção de crescimento e a adaptação de plantas em condições de estresse abióticos, como seca, salinidade e baixo suplemento de nutrientes (SCHILLING *et al.*, 2017; HEUER *et al.*, 2017; HUSSAIN *et al.*, 2020).

A tolerância ao sal em plantas que superexpressam o gene *AVP1* é atribuída ao aumento da alocação de Na^+ para o vacúolo, enquanto, a resistência à seca está relacionada a capacidade osmorregulatória, com maior sequestro de íons e acúmulo de solutos no vacúolo (GAXIOLA; REGMI; HIRSCHI, 2016). Além disso, as H^+ -PPases do tipo I também podem contribuir no acúmulo de antocianinas e no aumento do metabolismo e transporte de sacarose no floema de tecidos fonte para tecidos dreno (SUN *et al.*, 2017; PRIMO *et al.*, 2019; HUSSAIN *et al.*, 2020).

O aumento da produção de biomassa da parte aérea e da raiz, a maior capacidade fotossintética e a melhor eficiência na absorção e no uso interno de nutrientes, tem sido relatado em plantas que superexpressam o gene *VHP1* (PAEZ-VALÊNCIA *et al.*, 2013; PIZZIO *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2014; FAN *et al.*, 2017). Além disso, a maior capacidade de acidificação da rizosfera foi correlacionada a regulação positiva da H^+ -PPase e a maior atividade de H^+ -ATPase na membrana plasmática (GAXIOLA; REGMI; HIRSCHI, 2016). A acidificação da rizosfera é um mecanismo importante na nutrição das plantas, porque contribui para a solubilidade de nutrientes e também melhora o transporte de auxina, aumentando a ramificação lateral e a secreção de ácidos orgânicos nas raízes (FAN *et al.*, 2017).

2.4.2 Transportador de fosfato – *Phosphate transporter 1 (PHT1)*

Os genes *Phosphate transporter (PHT)* codificam co-transportadores de Pi / H^+ que são responsáveis pela aquisição e translocação de fosfato entre órgãos e compartimentos subcelulares nas plantas (LAMBERS, 2022). De acordo com a identidade das sequências e a localização subcelular os transportadores de fosfato em plantas são classificados em cinco famílias: *PHT1*, *PHT2*, *PHT3*, *PHT4* e *PHT5* (WANG *et al.* 2017). A família de genes *PHT1* está localizada na membrana plasmática e desempenha papel importante na absorção de Pi na rizosfera, bem como na translocação de Pi na parte aérea das plantas (NUSSAUME *et al.*, 2011), enquanto, o transporte, a distribuição e o armazenamento de Pi dentro dos compartimentos celulares são mediados por membros das famílias *PHT2*, *PHT3*, *PHT4* e *PHT5*, que estão localizadas em diferentes organelas vegetais como cloroplastos, mitocôndrias, complexo de Golgi e vacúolo, respectivamente (WANG *et al.*, 2017).

A família *PHT1* contém um número maior de membros, em relação as demais famílias *PHT* identificadas em espécies de plantas estudadas (NUSSAUME *et al.*, 2011; GU *et al.*, 2016). As proteínas *PHT1* pertencem à família de simportadores de Pi e H⁺ (PHS) e estão incluídas na superfamília de facilitadores principais (MFS), que transportam solutos de baixa massa molecular através das membranas celulares (LIU *et al.*, 2011; LIAO *et al.*, 2019), como íons de fosfato, arsenato, selenito, fosfito, sulfato, nitrato e cloreto (GU *et al.*, 2016).

Os transportadores MFS usam o gradiente de prótons gerados pelas bombas ATPases na membrana plasmática, para conduzir o transporte de substratos contra o próprio gradiente de concentração, para o citoplasma (NIÑO-GONZÁLEZ *et al.*, 2019). A proporção química para o transporte de fosfato e prótons através da membrana da célula vegetal é de dois a quatro íons H⁺ para cada molécula de Pi (AI *et al.*, 2009; MLODZINSKA; ZBOINSKA, 2016). A família MFS representa o maior grupo de transportadores secundário, com proteínas de tamanho semelhantes, que variam de 400 a 600 aminoácidos (LIAO *et al.*, 2019) e compartilham topologia com 12 domínios transmembranares putativos, separados em dois grupos por um loop hidrofílico, contendo seis domínios, com N e C terminais orientados para o citoplasma (LIU *et al.*, 2011; MLODZINSKA; ZBOINSKA, 2016).

As proteínas *PHT1* são divididas em dois níveis de afinidade, devido a absorção e ao transporte interno de Pi em plantas ocorrer em uma ampla faixa de concentração de Pi (SHIN *et al.*, 2004). Os transportadores de fosfato de alta afinidade funcionam na faixa de 2 a 10 µM de concentração de Pi e, são normalmente regulados pela deficiência de Pi, enquanto, os transportadores de fosfato de baixa afinidade operam em altas concentrações na faixa de 500 µM até mesmo a 1000 µM e, podem ser constitutivamente expressos (RAMAEKERS *et al.*, 2010; FARAJIA; HASANZADEH; HEIDARI, 2021). As diferentes afinidades podem refletir em diferentes papéis funcionais no transporte de Pi entre as células ou tecidos das plantas, como na absorção de Pi do solo e na translocação ou remobilização do Pi armazenado dentro da planta (CEASAR *et al.*, 2014).

Os membros da família *PHT1* são conservados e compartilham sequências de alta identidade entre as espécies vegetais. Além disso, a maioria dos membros *PHT1* são expressos nas raízes das plantas (NUSSAUME *et al.*, 2011). Em *A. thaliana*, nove genes (*AtPHT1;1* - *AtPHT1;9*) da família *PHT1* foram identificados e, a maioria deles são preferencialmente expressos nas células da epiderme e pelos

radiculares (MUDGE *et al.*, 2002). Em particular, os genes *AtPHT1;1* e *AtPHT1;4* desempenham um papel predominante na aquisição de Pi e os níveis de transcrição são maiores em relação aos demais membros (SHIN *et al.*, 2004). *AtPHT1;5* demonstra maior nível de transcrição nas folhas do que nas raízes e parece ser mais relevante na redistribuição de Pi entre os órgãos vegetativos, enquanto, o gene *AtPHT1;7* está envolvido no transporte de Pi em grãos de pólen (MUDGE *et al.*, 2002; NAGARAJAN *et al.*, 2011).

Em arroz, a maioria dos membros da família *PHT1* são transportadores de Pi específicos de raiz (MLODZINSKA; ZBOINSKA, 2016). O gene *OsPHT1;1* foi relatado como de alta afinidade e constitutivamente expresso em arroz, independentemente do nível de fornecimento de Pi (SUN *et al.*, 2012), enquanto, *OsPHT1;2* é um transportador de Pi de baixa afinidade, responsável pela translocação de Pi das raízes para a parte aérea, sob condições deficientes de Pi (AI *et al.*, 2009). O gene *OsPHT1;3* contribui para a aquisição e distribuição de Pi interno, sob níveis de fósforo extremamente baixos (CHANG *et al.*, 2019).

OsPHT1;4 facilita a aquisição e a mobilização de Pi, e também desempenha papel importante no desenvolvimento embrionário em sementes de arroz (ZHANG *et al.*, 2015). *OsPHT1;6* é um transportador de Pi de alta afinidade que permite tanto a absorção, quanto a translocação de Pi da raiz para a parte aérea (AI *et al.*, 2009), enquanto, o transportador *OsPHT1;8* além de atuar na redistribuição de Pi de órgãos fonte para drenos, também, contribui para o transporte de Pi do endosperma para o embrião em sementes de arroz (JIA *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2015).

Os genes *OsPHT1;11* e *OsPHT1;13* estão envolvidos na captação de Pi, por meio de colonização de fungos micorrízicos arbusculares (PASZKOWSKI *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2012). Estima-se que mais de 80% das plantas terrestres podem estabelecer sistemas de captação de Pi por meio de simbiose regulada por transportadores *PHT1* específicos nas raízes, em resposta à micorrização (GU *et al.*, 2016). Em particular, os transportadores *OsPHT1;5/1;7/1;12* são os únicos membros do arroz com maior nível de expressão em outros órgãos do que nas raízes (GU *et al.*, 2016). A atividade do gene *OsPHT1;5* é mais alta em brotos em estágio vegetativo, enquanto *OsPHT1;7* e *OsPHT1;12* são mais expressos em anteras, com atividade semelhante ao ortólogo *AtPHT1;6* (GU *et al.*, 2016).

2.4.3 Transportador de fosfato - *Phosphate 1 (PHO1)*

O transporte de fósforo pelas células vegetais é um processo dinâmico, o qual envolve a passagem do nutriente por várias membranas, organelas e tecidos (PRATHAP *et al.*, 2022). O fósforo disponível na solução do solo, após ser absorvido pelas raízes da planta, se movimenta pelas células do córtex, em direção ao cilindro central vascular, onde através de um fluxo de transpiração e pressão é transportado pelos vasos do xilema para a parte aérea, sendo translocado, posteriormente para o caule, folhas, flores, frutos e sementes (WANG *et al.*, 2004; GU *et al.*, 2016; MLODZINSKA; ZBOINSKA, 2016).

O gene *PHO1 (Phosphate1)* identificado pela primeira vez em *A. thaliana* (POIRIER *et al.*, 1991), codifica uma proteína da subfamília SPX-EXS que é responsável pelo carregamento de Pi pelo xilema e, portanto, transporta o Pi das raízes para a parte aérea das plantas (WANG *et al.*, 2018). A expressão desse gene ocorre predominantemente no tecido vascular da raiz e na parte inferior do hipocótilo, com atividade nas células do periciclo e do parênquima xilemático (HAMBURGER *et al.*, 2002). No interior celular, a proteína *PHO1* foi detectada em endomembranas do complexo de Golgi e trans-Golgi (TGN), bem como em estruturas vesiculares, sendo proposto que a exportação de Pi pelas células vegetais ocorre por meio de endossomos, que são liberados para o espaço extracelular, por exocitose, para depois serem incorporados as células condutoras do xilema (ARPAT *et al.*, 2012; LUAN *et al.*, 2017).

As proteínas *PHO1* contém dois domínios conservados, um domínio SPX tripartido N-terminal, com propriedade hidrofílica, e um domínio EXS, C-terminal hidrofóbico, composto por seis domínios transmembranares (WANG *et al.*, 2004). Ambos os terminais são localizados em direção ao citoplasma (WEGE *et al.*, 2016). O domínio SPX é encontrado em uma variedade de proteínas envolvidas na homeostase de fósforo em seres eucariontes (LIU *et al.*, 2018), e o domínio EXS é essencial para o funcionamento da *PHO1*, sendo responsável pela sinalização e atividade de exportação de Pi à longa distância, bem como pela localização adequada da proteína no complexo de Golgi e trans-Golgi (WEGE *et al.*, 2016).

Em *Arabidopsis*, a família *PHO1* é composta por 11 membros, *AtPHO1* e dez homólogos *AtPHO1;H1* a *AtPHO1;H10* (HAMBURGER *et al.*, 2002). Embora a maioria desses genes tem expressão nos tecidos vasculares de raízes, alguns

homólogos também são expressos em folhas, caules, flores e tecidos não vasculares, incluindo hidatódios, tricomas, células epidérmicas da raiz e grãos de pólen, indicando que essas proteínas podem regular a homeostase e o transporte de Pi em diversas células e tecidos da planta (WANG *et al.*, 2004).

Os genes *AtPHO1* e *AtPHO;H1* são os únicos membros em *Arabidopsis* envolvidos no transporte de Pi no xilema à longa distância (STEFANOVIC *et al.*, 2007). Os demais genes *AtPHO1;H2* a *H10*, formam um subclado exclusivo de plantas eudicotiledôneas, cujas funções ainda são pouco conhecidas (GU *et al.*, 2016). Em arroz, três genes *PHO1* foram identificados *OsPHO1;1*, *OsPHO1;2* e *OsPHO1;3* e possuem um transcrito antisense cis-natural localizado na extremidade 5', porém, apenas o gene *OsPHO1;2* exibe função semelhante ao gene *AtPHO1* de *A. thaliana* (SECCO; BAUMANN; POIRIER, 2010).

3 CAPÍTULO 1

Identificação e caracterização *in silico* de genes transportadores de fósforo em *Panicum* spp.

RESUMO

Os genes transportadores de fósforo (*VHP*, *PHT1* e *PHO1*) são responsáveis por processos metabólicos de aquisição, transporte e translocação de P pelas plantas. Estudos sobre a regulação desses genes são importantes para melhorar a eficiência do uso de P pelas plantas em condições de baixa disponibilidade de P. Embora os membros da família desses transportadores tenham sido identificados em diferentes culturas, não há uma análise genômica abrangente dessas famílias em *Panicum* spp. O objetivo foi identificar e caracterizar *in silico* essas três famílias de genes relacionadas ao transporte de fósforo em *Panicum* spp. As sequências dos genes descritos em *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* foram usadas para identificar sequências homólogas nos genomas das espécies *Panicum hallii* e *Panicum virgatum*, disponíveis no *Phytozome* v 13. As relações filogenéticas, propriedades físico-químicas, localização subcelular e análise estrutural das proteínas, que inclui a estrutura gênica, os motivos e os domínios conservados, foram examinadas em cada família de transportador de P. Além disso, os dados de perfil de expressão *in silico* desses genes em vários tecidos e estágios de desenvolvimento do arroz foram analisados pelo eFP Browser. Foram identificados 8, 12 e 3 genes em *P. hallii* e 14, 23 e 6 genes em *P. virgatum*, pertencentes as famílias *VHP*, *PHT1* e *PHO1*, respectivamente. A análise filogenética mostrou que os membros de cada família de transportadores de P foram divididos em grupos, assim como as espécies *A. thaliana* e *O. sativa*. A previsão da localização subcelular indicou que os transportadores de P nas espécies de *Panicum* spp. podem ser encontrados na membrana celular, vacúolo e complexo de Golgi. O número de íntrons/éxons e motivos proteicos foram conservados em cada grupo formado nas famílias de genes *VHP*, *PHT1* e *PHO1*. Entretanto, a distribuição desses genes foi desigual nos cromossomos. A análise de dados *in silico* mostrou diferenças consideráveis no padrão de expressão dos transportadores de P em vários tecidos do arroz, em condições normais de crescimento, indicando uma divergência funcional desses genes em cada família, que pode ser explorada em espécies gramíneas. Esse estudo foi o primeiro a caracterizar *in silico* as famílias de genes *VHP*, *PHT1* e *PHO1* em *Panicum* spp. e fornece informações de base molecular que podem ser úteis em estudos futuros sobre a caracterização funcional desses genes em espécies de gramíneas pertencentes a subfamília Panicoideae, visando o melhoramento genético de plantas em condições de deficiência em P.

Palavras-chave: Análise filogenética. *VHP*. *PHT1*. *PHO1*. Deficiência de fósforo.

ABSTRACT

Identification and *in silico* characterization of phosphorus transporting genes in *Panicum* spp.

Phosphorus transporter genes (*VHP*, *PHT1* and *PHO1*) are responsible for metabolic processes of P acquisition, transport and translocation by plants. Studies on the regulation of these genes are important to improve the efficiency of P use by plants in conditions of low P availability. Although family members of these transporters have been identified in different cultures, there is no comprehensive genomic analysis of these families in *Panicum* spp. The objective was to identify and characterize *in silico* these three families of genes related to phosphorus transport in *Panicum* spp. The sequences of the genes described in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* were used to identify homologous sequences in the genomes of the species *Panicum hallii* and *Panicum virgatum*, available in *Phytozome* v 13. Phylogenetic relationships, physicochemical properties, subcellular localization, and structural analysis of proteins, which includes gene structure, motifs, and conserved domains, were examined in each P transporter family. In addition, the *in silico* expression profile data of these genes in various tissues and developmental stages of rice were analyzed by eFP *Browser*. We identified 8, 12 and 3 genes in *P. hallii* and 14, 23 and 6 genes in *P. virgatum*, belonging to the *VHP*, *PHT1* and *PHO1* families, respectively. Phylogenetic analysis showed that members of each family of P transporters were divided into groups, as well as the species *A. thaliana* and *O. sativa*. Prediction of subcellular localization indicated that P transporters in *Panicum* spp. they can be found in the cell membrane, vacuole and Golgi complex. The number of introns/exons and protein motifs were conserved in each group formed in the *VHP*, *PHT1* and *PHO1* gene families. However, the distribution of these genes was uneven on the chromosomes. Analysis of *in silico* data showed considerable differences in the expression pattern of P transporters in various rice tissues, under normal growth conditions, indicating a functional divergence of these genes in each family, which can be exploited in grass species. This study was the first to characterize *in silico* the *VHP*, *PHT1* and *PHO1* gene families in *Panicum* spp. and provides molecular-based information that may be useful in future studies on the functional characterization of these genes in grass species belonging to the Panicoideae subfamily, aiming at the genetic improvement of plants under P-deficient conditions.

Keywords: Phylogenetic analysis. Membrane proteins. *VHP*. *PHT1*. *PHO1*. Phosphorus deficiency.

3.1 INTRODUÇÃO

A absorção e a translocação de fósforo inorgânico (Pi) entre as células vegetais é mediada por proteínas transportadoras de fosfato *PHT1*, que funcionam como simportadores de Pi e H⁺ na membrana plasmática das células das plantas. A maioria dessas proteínas são preferencialmente expressas em raízes e demonstram uma resposta específica a concentrações de Pi no solo. A família de genes transportadores *PHO1* desempenha funções na transferência de Pi das raízes para a parte aérea das plantas e na transdução de sinal em resposta a deficiência de Pi.

O transporte de Pi é um processo ativo que requer gasto de energia. Assim, como a concentração de fosfato no solo é determinante para a regulação de genes transportadores, a homeostase do pH das células vegetais é essencial para o transporte de íons e funções celulares. O gene *vacuolar H⁺-pirofosfatase VHP1* tem atividade osmorregulatória no tonoplasto pelo bombeamento de prótons para o vacúolo e controla as concentrações intracelulares de P_oPi, fonte de energia celular alternativa que pode contribuir para o crescimento de plantas e a tolerância a condições de baixo P.

Embora estudos anteriores tenham caracterizado os papéis potenciais de alguns membros *VHP*, *PHT1* e *PHO1* em plantas cultivadas, não existe análise genômica ampla da família desses genes em *Panicum* spp. As espécies *Panicum hallii* e a *Panicum virgatum* são gramíneas C₄, perenes, pertencentes a subfamília Panicoideae, com distribuição nativa em regiões da América do Norte. Essas plantas são cultivadas para a produção de forragem, e têm sido alvo de estudo e desenvolvimento como matéria-prima para biocombustíveis. *P. hallii* é uma gramínea diploide (2n=18 cromossomos) e *P. virgatum* é tetraploide (2n=4x=36 cromossomos), ambas possuem genoma disponível no banco de dados *Phytozome* v 13 e, portanto, podem ser utilizadas como plantas modelo para o estudo da biologia e da evolução adaptativa de gramíneas relacionadas (HUNT *et al.*, 2014; PALACIO-MEJÍA *et al.*, 2021).

Nesse sentido, o entendimento de mecanismos moleculares de absorção e transporte de fósforo, assim como a regulação transcricional e possíveis funções desses genes são de extrema importância para a seleção e o melhoramento genético de gramíneas da subfamília Panicoideae.

3.2 OBJETIVO

O objetivo com esse capítulo foi identificar e caracterizar *in silico* genes transportadores de fósforo em *Panicum hallii* e *Panicum virgatum* por meio de análise comparativa desses genes com as espécies *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Identificação e caracterização de genes em espécies *Panicum* spp.

Os membros das famílias *VHP*, *PHT1* e *PHO1* em *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* foram obtidos nos bancos de dados *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR) (<https://www.arabidopsis.org/>) e *Rice genome annotation* (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>), respectivamente. Em seguida, as sequências de aminoácidos de cada gene foram utilizadas como isca (“*query*”) para a busca de proteínas homólogas nos genomas das espécies *P. hallii* v3.1 e *P. virgatum* v5.1, disponíveis no *PHYTOZOME* versão 13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>; GOODSTEIN *et al.*, 2012). O ponto de corte usado para a identificação de genes homólogos foi definido em *e-value* (0,0). A análise do domínio de todas as sequências de proteínas foi posteriormente verificada no banco de dados Pfam 35.0 (<https://pfam.xfam.org/>) e apenas as sequências que apresentaram os domínios conservados de cada gene foram mantidas. Para os genes com “*splicing*” alternativo, o transcrito principal foi usado para as análises posteriores.

A nomeação de genes *VHP* do tipo I encontrados no arroz neste estudo, foi equivalente aos genes previamente relatados por Muto *et al.* (2011), que utilizou o banco de dados *The Rice Annotation Project*. Em *Panicum* spp. os genes *VHP*, *PHT1* e *PHO1* foram nomeados com as letras iniciais dos nomes científicos de cada espécie, seguido pela abreviação do respectivo gene e ordem numérica correspondente às relações filogenéticas com as espécies *Arabidopsis* e arroz, levando-se em consideração a localização cromossômica de cada gene. Portanto, nos referimos a esses genes como *PhVHP*, *PhPHT1* e *PhPHO1* em *P. hallii* e *PvVHP*, *PvPHT1* e *PvPHO1* em *P. virgatum*.

As propriedades físico-químicas das proteínas como o número de aminoácidos (aa), o peso molecular (KDa), o ponto isoelétrico (pI) e a hidropatia média (GRAVY) foram caracterizadas pela ferramenta *Expasy/ProtParam* (<https://web.expasy.org/protparam/>; GASTEIGER *et al.*, 2005). A localização subcelular de todas as proteínas identificadas foi prevista no software *online Plant-mPLoc* (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>; CHOU; SHEN, 2010).

3.3.2 Análise filogenética, estrutura gênica e motivos conservados

As sequências de proteínas de cada família *VHP*, *PHT1* e *PHO1* em *A. thaliana*, *O. sativa*, *P. hallii* e *P. virgatum* foram alinhadas, por meio do programa *ClustalW* (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). Com base no alinhamento das sequências de cada família, foi construída uma árvore filogenética não enraizada pelo método Neighbor-Joining (NJ) utilizando o *software* MEGA versão 11.0.9 (TAMURA *et al.*, 2021). O número de *bootstrap* foi definido em 1000 repetições. O alinhamento das sequências para detecção dos motivos funcionais foi realizado com o uso do *software* *DNAMAN* versão 10 Demo (Lynnon Biosoft, USA).

A distribuição de íntrons e éxons dos genes foi determinada comparando as sequências de codificação (CDS) com as suas sequências genômicas correspondentes, usando o programa *online Gene Structure Display Server - GSDS 2.0* (<http://gsds.gao-lab.org/>; HU *et al.*, 2015). Os motivos conservados nas proteínas foram identificados usando a plataforma *Multiple Em for Motif Elicitation - MEME* versão 5.1.1 (<http://meme-suite.org/>; BAILEY *et al.*, 2009), sendo definido o número máximo de 15 motivos.

3.3.3 Análise do padrão de expressão da cultura do arroz *in silico*

O padrão de expressão gênica nos tecidos e estágios de desenvolvimento da cultura do arroz, espécie modelo entre as monocotiledôneas, foi analisado individualmente pelo uso de identificações (IDs) dos genes usando o banco de dados de microarranjos *Rice electronic Fluorescent Pictograph – eFP Browser* (JAIN *et al.*, 2007), disponível em <http://bar.utoronto.ca/efprice/cgi-bin/efpWeb.cgi>, *Bio-analytic Resource for Plant Biology* (BAR), da Universidade de Toronto. Os níveis de

expressão normalizados pelo método *Robust Multiarray Average* (RMA) foram usados para gerar o mapa de calor no *CIMminer* (<https://discover.nci.nih.gov/cimminer/home.do>), incluindo informações de raízes primárias, folha jovem, folha madura, meristema apical, inflorescência e semente do arroz.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Genes *VHP* em *Panicum* spp.

Foram identificados oito membros da família *VHP* em *P. hallii* e 14 membros em *P. virgatum*, por meio de pesquisa *BLASTp*, usando as sequências de proteínas *VHP* de *Arabidopsis* e arroz como consulta, os quais apresentam 3 e 7 membros, respectivamente (Tabela 1). A proteína Os02g33490.1 foi a única sequência identificada em arroz que não foi caracterizada *in silico* até o momento. As proteínas codificadas por esses genes foram confrontadas com o banco de dados *Pfam* e apresentaram o domínio H⁺-PPase (PF03030).

A análise de localização cromossômica mostrou que os genes *VHP* foram diferentemente distribuídos entre as espécies, sendo localizados em um cromossomo (Chr. 01) de *A. thaliana*, em quatro cromossomos (Chr. 01, 02, 05 e 06) de *O. sativa*, em cinco cromossomos (Chr. 01, 03, 04, 05 e 09) de *P. hallii* e em quatro cromossomos (Chr. 01, 03, 04, e 05) de *P. virgatum* (Tabela 1).

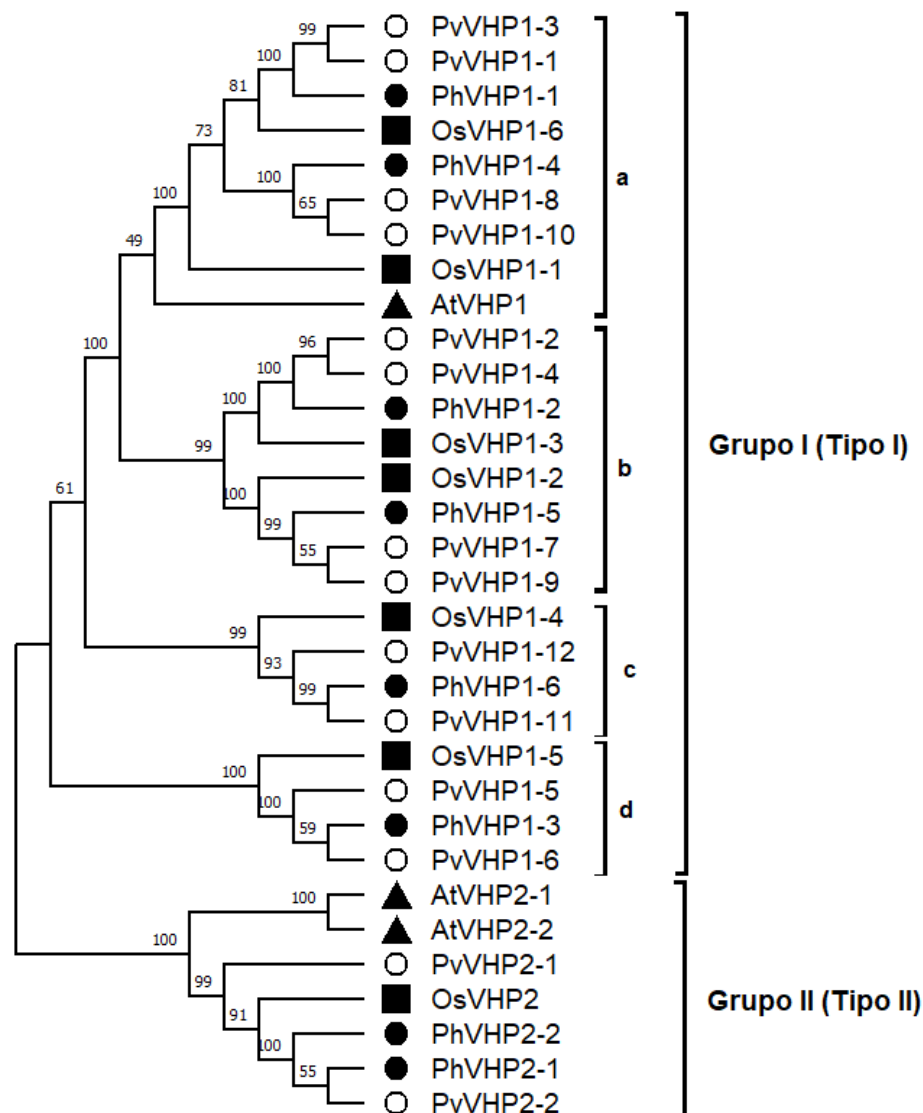
As propriedades físico-químicas das proteínas *VHP* em *Panicum* spp. como o comprimento variou de 347 a 799 aminoácidos, o peso molecular variou de 35,80 a 84,73 KDa e o ponto isoelétrico foi de 5,09 a 9,36, com a maioria em torno de 5,0 (Tabela 1). Os valores de GRAVY foram positivos ficando entre 0,377 e 0,630, indicando que a propriedade dessas proteínas é hidrofóbica. A localização subcelular mostrou que a maioria das proteínas *VHP* em *Panicum* spp. estão localizadas no vacúolo, exceto *PvVHP2;1* (Pavir.3KG230800.2), que está localizada no complexo de Golgi (Tabela 1). Os parâmetros físicos e químicos da maioria dos genes encontrados nas espécies *Panicum* spp. foram semelhantes aos observados em *A. thaliana* e *O. sativa*.

Tabela 1 – Caracterização dos genes Vacuolar H⁺-Pirofosfatase (VHP) em *P. hallii*, *P. virgatum*, *A. thaliana* e *O. sativa*.

Nome do gene	ID do gene	Localização cromossômica	Proteína (aa)	(KDa)	pl	GRAVY	Localização Subcelular
<i>Arabidopsis thaliana</i>							
<i>AtVHP1</i>	At1G15690.1	Chr1:5398926..5402519 sentido	770	80,82	5,13	0,615	Vacúolo
<i>AtVHP2;1</i>	At1G78920.1	Chr1:29671413..29676992 sentido	802	85,13	5,54	0,621	Aparelho de Golgi, Vacúolo
<i>AtVHP2;2</i>	At1G16780.1	Chr1:5739468..5744237 antisenso	851	91,00	7,90	0,529	Aparelho de Golgi, Vacúolo
<i>Oryza sativa</i>							
<i>OsVHP1;1</i>	Os06g43660.1	Chr6:26272897..26278666 sentido	782	81,76	5,26	0,585	Vacúolo
<i>OsVHP1;2</i>	Os06g08080.1	Chr6:3919501..3924409 sentido	767	80,05	5,54	0,611	Vacúolo
<i>OsVHP1;3</i>	Os02g55890.1	Chr2:34210400..34215008 antisenso	762	79,85	5,39	0,566	Vacúolo
<i>OsVHP1;4</i>	Os01g23580.1	Chr1:13237248..13246183 sentido	773	79,76	5,84	0,580	Vacúolo
<i>OsVHP1;5</i>	Os05g06480.1	Chr5:3335248..3339817 antisenso	770	79,01	5,04	0,540	Vacúolo
<i>OsVHP1;6</i>	Os02g09150.1	Chr2:4693810..4699300 antisenso	770	80,18	5,32	0,610	Vacúolo
<i>OsVHP2</i>	Os02g33490.1	Chr2:19912292..19921107 antisenso	799	84,71	5,50	0,585	Vacúolo
<i>Panicum hallii</i>							
<i>PhVHP1;1</i>	Pahal.1G064300.1	Chr01:4399992..4406483 antisenso	766	80,10	5,38	0,620	Vacúolo
<i>PhVHP1;2</i>	Pahal.1G434800.1	Chr01:58220227..58223648 antisenso	762	79,58	5,31	0,599	Vacúolo
<i>PhVHP1;3</i>	Pahal.3G127900.1	Chr03:8289448..8293334 antisenso	767	79,27	5,10	0,584	Vacúolo
<i>PhVHP1;4</i>	Pahal.4G069800.1	Chr04:4660427..4667728 antisenso	769	80,48	5,26	0,581	Vacúolo
<i>PhVHP1;5</i>	Pahal.4G306900.1	Chr04:49330145..49335019 antisenso	762	79,37	5,49	0,621	Vacúolo
<i>PhVHP1;6</i>	Pahal.5G342400.1	Chr05:37494085..37500184 sentido	775	80,12	6,10	0,578	Vacúolo
<i>PhVHP2;1</i>	Pahal.3G315300.1	Chr03:22859450..22869003 antisenso	799	84,62	5,44	0,556	Vacúolo
<i>PhVHP2;2</i>	Pahal.9G215600.1	Chr09:13945535..13958827 antisenso	799	84,73	5,36	0,553	Vacúolo
<i>Panicum virgatum</i>							
<i>PvVHP1;1</i>	Pavir.1KG085500.1	Chr01:6928690..6936376 antisenso	767	80,23	5,38	0,621	Vacúolo
<i>PvVHP1;2</i>	Pavir.1KG521900.1	Chr01:54742218..54745543 antisenso	762	79,69	5,48	0,591	Vacúolo
<i>PvVHP1;3</i>	Pavir.1NG081300.1	Chr01:6679097..6686431 antisenso	766	80,17	5,38	0,630	Vacúolo
<i>PvVHP1;4</i>	Pavir.1NG503100.1	Chr01:64959074..64962734 antisenso	762	79,67	5,25	0,593	Vacúolo
<i>PvVHP1;5</i>	Pavir.3KG174000.1	Chr03:10775807..10780970 antisenso	765	78,88	5,23	0,608	Vacúolo
<i>PvVHP1;6</i>	Pavir.3NG221073.1	Chr03:10451590..10459599 antisenso	768	79,37	5,20	0,604	Vacúolo
<i>PvVHP1;7</i>	Pavir.4KG090000.1	Chr04:6210675..6215838 sentido	762	79,59	5,32	0,628	Vacúolo
<i>PvVHP1;8</i>	Pavir.4KG338300.1	Chr04:40597480..40603513 sentido	769	80,43	5,40	0,589	Vacúolo
<i>PvVHP1;9</i>	Pavir.4NG071052.1	Chr04:5783674..5788600 sentido	762	79,50	5,18	0,625	Vacúolo
<i>PvVHP1;10</i>	Pavir.4NG248900.1	Chr04:42818153..42823249 sentido	769	80,45	5,26	0,581	Vacúolo
<i>PvVHP1;11</i>	Pavir.5KG256000.1	Chr05:19097447..19103001 sentido	776	80,06	5,69	0,534	Vacúolo
<i>PvVHP1;12</i>	Pavir.5NG342100.1	Chr05:20398826..20403219 sentido	347	35,80	9,36	0,377	Vacúolo
<i>PvVHP2;1</i>	Pavir.3KG230800.2	Chr03:32018806..32024109 antisenso	549	58,62	5,09	0,601	Aparelho de Golgi
<i>PvVHP2;2</i>	Pavir.3NG147200.1	Chr03:33255494..33265795 antisenso	799	84,73	5,44	0,562	Vacúolo

Para obter informações sobre as relações evolutivas e classificar as proteínas VHP nas espécies *P. hallii* e *P. virgatum*, as sequências encontradas foram alinhadas e comparadas com as sequências identificadas em *A. thaliana* e *O. sativa*, por meio de árvore filogenética usando o método Neighbor-Joining (Figura 2).

Figura 2 – Árvore filogenética de proteínas da família VHP em *P. hallii*, *P. virgatum*, *A. thaliana* e *O. sativa*.



Fonte: A autora.

A árvore filogenética não enraizada foi construída pelo método (NJ), com 1000 repetições de bootstrap. As sequências das proteínas VHP e as espécies correspondentes são: *A. thaliana* (At, triângulo), *O. sativa* (Os, quadrado), *P. hallii* (Ph, círculo preto) e *P. virgatum* (Pv, círculo branco).

De acordo com a distribuição filogenética, as proteínas VHP foram divididas em dois grupos principais, semelhantes a *A. thaliana*. O grupo I teve o maior número

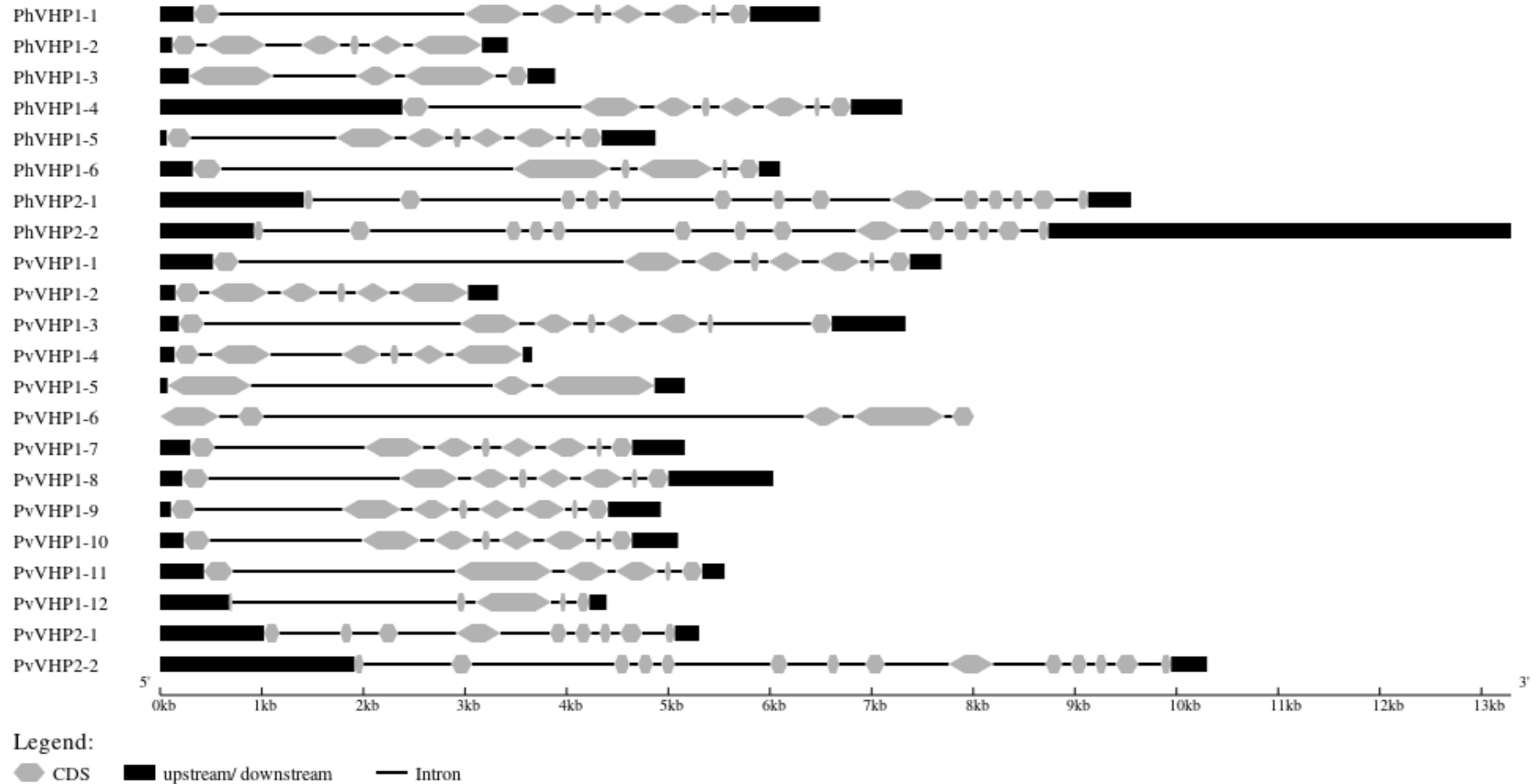
de membros de plantas gramíneas com 24 proteínas do tipo I, enquanto, o grupo II apresentou o menor número, com cinco membros do tipo II. As proteínas VHP do tipo I podem ser classificadas em quatro subgrupos (a – d) (Figura 2). Dentro do subgrupo a, dois membros de *P. hallii* e quatro membros de *P. virgatum* agruparam-se com dois genes de arroz (*OsVHP1;1* e *OsVHP1;6*) e um de *Arabidopsis* (*AtVHP1*). No subgrupo b, dois membros de *P. hallii* e quatro membros de *P. virgatum* agruparam-se a *OsVHP1;2* e *OsVHP3* do arroz. Nos subgrupos c e d, pelo menos um membro em *P. hallii* e dois em *P. virgatum* foram homólogos a *OsVHP1;4* e *OsVHP1;5* do arroz, respectivamente (Figura 2). No grupo II, as espécies de *P. hallii* e *P. virgatum*, assim como a *Arabidopsis* (*AtVHP2;1* e *AtVHP2;2*), possuem duas sequências de proteínas do tipo II, diferente do arroz, que foi detectado somente uma proteína, denominada nesse estudo de *OsVHP2* (Figura 2).

A estrutura genética dos genes *VHP* em *Panicum* spp. diferiu quanto ao arranjo e o número de éxons e íntrons (Figura 3). Os genes pertencentes ao grupo I tiveram menor número de íntrons, variando de 2 a 7, enquanto, os genes do grupo II apresentaram maior número, variando entre 8 a 13 íntrons (Figura 3).

Os motivos conservados das proteínas VHP nas espécies de *Panicum* spp. foram identificados e designados de 1 a 15 (Figura 4). Os motivos 1, 2, 8, 11 e 15 foram conservados e apresentaram a mesma ordem de distribuição em todas as proteínas VHP. As sequências *PhVHP1;3*, *PvVHP1;5*, e *PvVHP1;6* não apresentaram o motivo 13 como as demais proteínas VHP. Com exceção das sequências *PvVHP1;12* e *PvVHP2;1*, todas as proteínas apresentaram o motivo 3, por duas vezes, na mesma ordem na parte inicial das sequências (Figura 4).

O tipo e o número de motivos foram diferentes entre os dois grupos *VHP*. O grupo I apresentou maior número de motivos, em relação ao grupo II. No grupo I, a maioria dos membros tiveram o motivo 4 em suas sequências e, exceto *PvVHP1;12*, todos os membros do grupo I apresentaram os motivos 5, 7, 10 e 12 (Figura 4). Além disso, o motivo 14 foi encontrado em 10 proteínas VHP1 de *Panicum* spp. e os motivos 1, 3, 9 e 11 se repetiram em algumas proteínas. Em geral, os motivos 1, 6 e 9 foram conservados na extremidade C-terminal das sequências VHP1. No grupo II, três sequências apresentaram estruturas semelhantes, com o motivo 13 na região N-terminal e a presença repetida do motivo 14. As quatro proteínas VHP2 de *Panicum* spp. apresentaram os motivos 1, 3 e 9 na extremidade C-terminal (Figura 4).

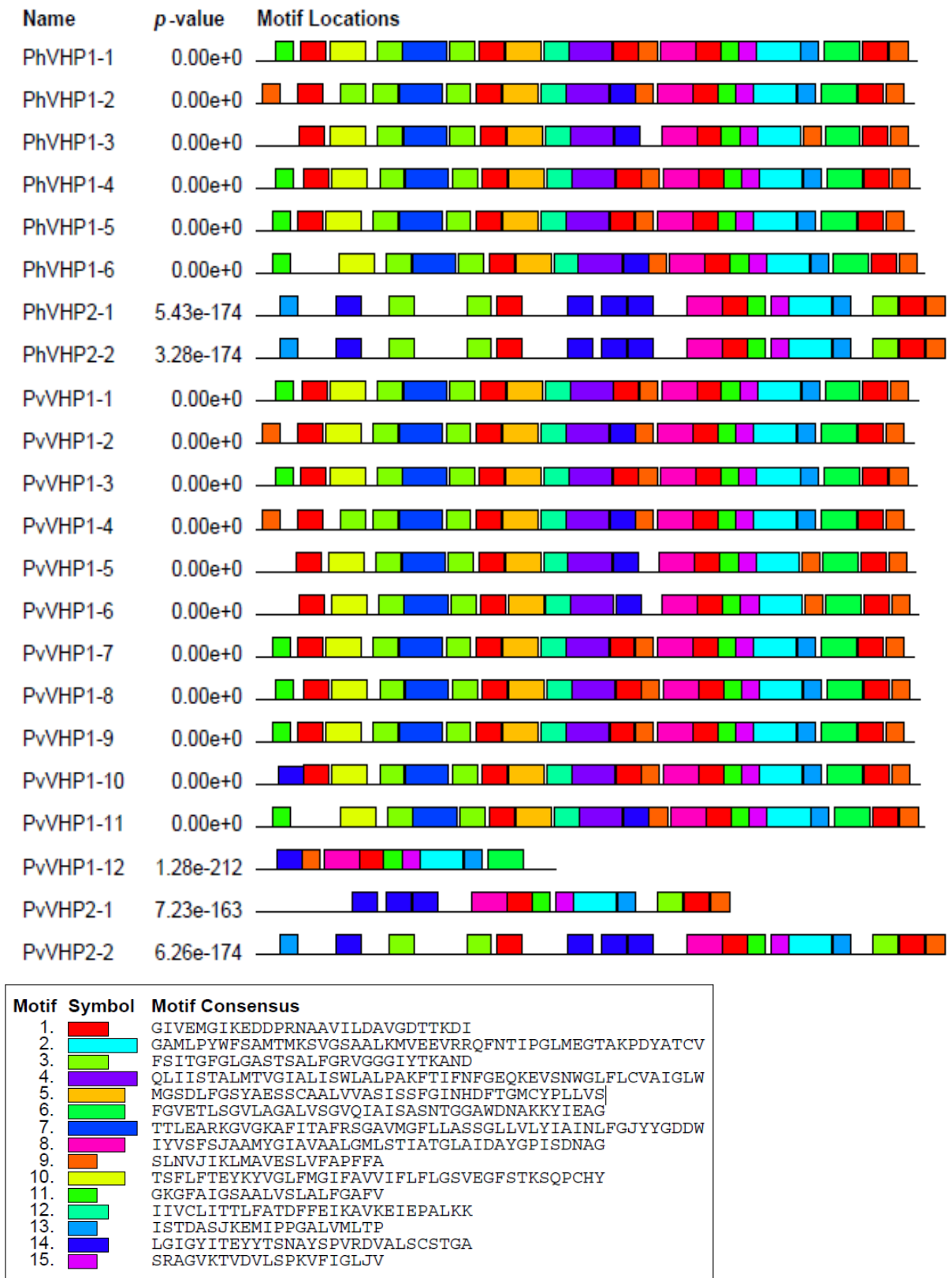
Figura 3 – Estruturas gênicas de genes *VHP* em *Panicum* spp.



Fonte: A autora.

As caixas cinzas representam os éxons da sequência de codificação (CDS), as caixas pretas indicam regiões não traduzidas e as linhas pretas mostram os introns. A barra de escala na parte inferior indica o comprimento dos genes em Kb.

Figura 4 – Análise dos motivos conservados das proteínas VHP em *Panicum* spp.



Fonte: A autora.

Continuação

1

PHVHP1-1.seq	IYGGDDWEG.....LFEAITGYGLGGSSMALFGRVGGGIYTKAA	DVGADLVGKVERNI	PEDDDPRNPAVIADNVGDNVGD	287
PHVHP1-2.seq	LYYGGDDWEG.....LFESITGYGLGGSSMALFGRVGGGIYTKAA	DVGADLVGKVERNI	PEDDDPRNPAVIADNVGDNVGD	283
PHVHP1-3.seq	LYYGGDDWEG.....LYESITGYGLGGSSVALFGRVGGGIYTKAA	DVGADLVGKVERNI	PEDDDPRNPAVIADNVGDNVGD	288
PHVHP1-4.seq	IYGGDDWEG.....LYEAITGYGLGGSSMALFGRVGGGIYTKAA	DVGADLVGKVERNI	PEDDDPRNPAVIADNVGDNVGD	290
PHVHP1-5.seq	LYYGGDDWEG.....LFESITGYGLGGSSMALFGRVGGGIYTKAA	DVGADLVGKVERNI	PEDDDPRNPAVIADNVGDNVGD	283
PHVHP1-6.seq	LYYGGDDWEG.....LYESVTGYGLGGSSMALFGRVGGGIYTKAA	DVGADLVGKVERNI	PEDDDPRNPAVIADNVGDNVGD	298
PHVHP2-1.seq	VWLGVDSPGSMKVTDLPLLLLVGYGFGASFVALFAQLGGGIYTKAA	DVGADLVGKVEQGI	PEDDDPRNPAVIADLVGDNVGD	307
PHVHP2-2.seq	VWLGVDSPGSMKVTDLPLLLLVGYGFGASFVALFAQLGGGIYTKAA	DVGADLVGKVEQGI	PEDDDPRNPAVIADLVGDNVGD	307
PVVHP1-1.seq	IYGGDDWEG.....LFEAITGYGLGGSSMALFGRVGGGIYTKAA	DVGADLVGKVERNI	PEDDDPRNPAVIADNVGDNVGD	288
PVVHP1-2.seq	LYYGGDDWEG.....LFESITGYGLGGSSMALFGRVGGGIYTKAA	DVGADLVGKVERNI	PEDDDPRNPAVIADNVGDNVGD	283
PVVHP1-3.seq	IYGGDDWEG.....LFEAITGYGLGGSSMALFGRVGGGIYTKAA	DVGADLVGKVERNI	PEDDDPRNPAVIADNVGDNVGD	287
PVVHP1-4.seq	LYYGGDDWEG.....LFESITGYGLGGSSMALFGRVGGGIYTKAA	DVGADLVGKVERNI	PEDDDPRNPAVIADNVGDNVGD	283
PVVHP1-5.seq	LYYGGDDWEG.....LYESITGYGLGGSSMALFGRVGGGIYTKAA	DVGADLVGKVERNI	PEDDDPRNPAVIADNVGDNVGD	286
PVVHP1-6.seq	LYYGGDDWEG.....LYESITDYGLGGSSVALFGRVGGGIYTKAA	DVGADLVGKVERNI	PEDDDPRNPAVIADNVGDNVGD	289
PVVHP1-7.seq	LYYGGDDWEG.....LFESITGYGLGGSSMALFGRVGGGIYTKAA	DVGADLVGKVERNI	PEDDDPRNPAVIADNVGDNVGD	283
PVVHP1-8.seq	IYGGDDWEG.....LYEAITGYGLGGSSMALFGRVGGGIYTKAA	DVGADLVGKVERNI	PEDDDPRNPAVIADNVGDNVGD	290
PVVHP1-9.seq	LYYGGDDWEG.....LFESITGYGLGGSSMALFGRVGGGIYTKAA	DVGADLVGKVERNI	PEDDDPRNPAVIADNVGDNVGD	283
PVVHP1-10.seq	IYGGDDWEG.....LYEAITGYGLGGSSMALFGRVGGGIYTKAA	DVGADLVGKVERNI	PEDDDPRNPAVIADNVGDNVGD	290
PVVHP1-11.seq	LYYGGDDWEG.....LYESVTGYGLGGSSVALFGRVGGGIYTKAA	DVGADLVGKVERNI	PEDDDPRNPAVIADNVGDNVGD	299
PVVHP1-12.seq	0
PVVHP2-1.seq	SWVVEYTPKLLMLELWLEKLSREYQKMI LAILLSLLFWLVLTMLE	57
PVVHP2-2.seq	VWLGVDSPGSMKVTDLPLLLLVGYGFGASFVALFAQLGGGIYTKAA	DVGADLVGKVEQGI	PEDDDPRNPAVIADLVGDNVGD	307
Consensus

PHVHP1-1.seq	IAGMGSDLFSGYAESSCAALVVASISSFGINHEFTP..MVYPLLSSVGI	IACLITTLFATDFFEIKAVNEIEPALKKQL	365	
PHVHP1-2.seq	IAGMGSDLFSGYAESSCAALVVASISSFGVNHDFTG..MCPYLLVSSVGI	IVCLITTLFATDFFEIKAVNEIEPALKKQL	361	
PHVHP1-3.seq	IAGMGSDLFSGYAESSCAALFVASISSFGTEHNFAA..MMYPLLVS	AVGLLVCVAVTTLVATDISEVCTDEIGPALKKQI	366	
PHVHP1-4.seq	IAGMGSDLFSGYAESSCAALVVASISSFGINHEFTP..MLYPLLSSVGI	IACLITTLFATDFFEIKAVNEIEPALKKQL	368	
PHVHP1-5.seq	IAGMGSDLFSGYAESSCAALVVASISSFGINHEFTP..MCPYLLVSSVGI	IVCLITTLIATDFFEIKAVNEIEPALKKQL	361	
PHVHP1-6.seq	IAGMGSDLFSGYAESSCAALFVASISSFGADHDFAA..VAYPLLSAAGLLV	CLVLTLLATDFFEMVKTVRGVAEPALKKQL	376	
PHVHP2-1.seq	CAARGADLFESIAAEIISAMILGGTMAQRCKIEDPSGFI	LFPLVHVSFDLVSSVGLISIRGTRDPLISPIEDPMS...	384	
PHVHP2-2.seq	CAARGADLFESIAAEIISAMILGGTMAQRCKIEDPSGFI	LFPLVHVSFDLVSSVGLISIRGTRDPLISPIEDPMS...	384	
PVVHP1-1.seq	IAGMGSDLFSGYAESSCAALVVASISSFGINHEFTP..MVYPLLSSVGI	IACLITTLFATDFFEIKAVNEIEPALKKQL	366	
PVVHP1-2.seq	IAGMGSDLFSGYAESSCAALVVASISSFGVNHDFTG..MCPYLLVSSVGI	IVCLITTLFATDFFEIKAVNEIEPALKKQL	361	
PVVHP1-3.seq	IAGMGSDLFSGYAESSCAALVVASISSFGINHEFTP..MVYPLLSSVGI	IACLITTLFATDFFEIKAVNEIEPALKKQL	365	
PVVHP1-4.seq	IAGMGSDLFSGYAESSCAALVVASISSFGVNHDFTG..MCPYLLVSSVGI	IVCLITTLFATDFFEIKAVNEIEPALKKQL	361	
PVVHP1-5.seq	IAGMGSDLFSGYAESSCAALFVASISSFGTEHNFAA..MMYPLLSA	AVGLLVCVAVTTLVATDISEVCTDEIGPALKKQI	364	
PVVHP1-6.seq	IAGMGSDLFSGYAESSCAALFVASISSFGTEHNFAA..MMYPLLSA	AVGLLVCVAVTTLVATDISEVCTDEIGPALKKQI	367	
PVVHP1-7.seq	IAGMGSDLFSGYAESSCAALVVASISSFGINHEFTP..MCPYLLVSSVGI	IVCLITTLFATDFFEIKAVNEIEPALKKQL	361	
PVVHP1-8.seq	IAGMGSDLFSGYAESSCAALVVASISSFGINHEFTP..MLYPLLSSVGI	IACLITTLFATDFFEIKAVNEIEPALKKQL	368	
PVVHP1-9.seq	IAGMGSDLFSGYAESSCAALVVASISSFGINHEFTP..MCPYLLVSSVGI	IVCLITTLFATDFFEIKAVNEIEPALKKQL	361	
PVVHP1-10.seq	IAGMGSDLFSGYAESSCAALVVASISSFGINHEFTP..MLYPLLSSVGI	IACLITTLFATDFFEIKAVNEIEPALKKQL	368	
PVVHP1-11.seq	IAGMGSDLFSGYAESSCAALFVASISSFGADHDFAA..VAYPLLSAAGLLV	CLVLTLLATDFFEMVKTVRGVAEPALKKQL	377	
PVVHP1-12.seq	0
PVVHP2-1.seq	TAARGADLFESIAAEIISAMILGGTMAQRCKIEDPSGFI	LFPLVHVSFDLVSSVGLISIRGTRDPLISPIEDPMS...	134	
PVVHP2-2.seq	CAARGADLFESIAAEIISAMILGGTMAQRCKIEDPSGFI	LFPLVHVSFDLVSSVGLISIRGTRDPLISPIEDPMS...	384	
Consensus

PHVHP1-1.seq	IISTVMTIGIALISWLGLPYTFTIFNFGVQKTVHS	Q.LFL VAV LWAGLIIGFVTE Y SNAYS QDV DSCR A	444
PHVHP1-2.seq	IISTALMTVGIALISWLALPAKFTIFNFGEOKEVSN	G.LFL VAI LWAGLIIGYVTE Y SNAYS QDV DACR A	440
PHVHP1-3.seq	LISTVMTGGIAAIVTFLALPARFTLDFDGNKHKVN	H.LFI VSA LWAGLVIGYVTE F SNAYG QAV RSCR A	445
PHVHP1-4.seq	IISTAVMTVGIALVSWLGLPYTFTIFNFGAQTUVSN	Q.LFL VAV LWAGLVIGFVTE Y SNAYS QDV DSCR A	447
PHVHP1-5.seq	VISTALMTVGIALISWLALPAKFTIFNFGAQTUVSN	G.LFF VAI LWAGLIIGFVTE Y SNAYS QDV DSCR A	440
PHVHP1-6.seq	IISTVMTVAALVVSFAALPANFTLDFDGVAKVQVN	H.LFF VAT LWAGLAIGFVTE F SNAYS RDV DSCR A	455
PHVHP2-1.seq	IMQKGSYVTIMLAVLTFGVSTRWLLY...TEQAPSA	LNFMAL GLV IITAYAFVWISK Y DYKHE RLL LSSS H	461
PHVHP2-2.seq	IMQKGSYVTIMLAVLTFGVSTRWLLY...TEQAPSA	LNFMAL GLV IITAYAFVWISK Y DYKHE RLL LSSS H	461
PVVHP1-1.seq	IISTVMTIGIALISWLGLPYTFTIFNFGVQKTVHS	Q.LFL VAV LWAGLIIGFVTE Y SNAYS QDV DSCR A	445
PVVHP1-2.seq	IISTALMTVGIALISWLALPAKFTIFNFGEOKEVSN	G.LFL VAI LWAGLIIGYVTE Y SNAYS QDV DACR A	440
PVVHP1-3.seq	IISTVMTIGIALISWLGLPYTFTIFNFGVQKTVHS	Q.LFL VAV LWAGLIIGFVTE Y SNAYS QDV DSCR A	444
PVVHP1-4.seq	IISTALMTVGIALISWLALPAKFTIFNFGEOKEVSN	G.LFL VAI LWAGLIIGYVTE Y SNAYS QDV DACR A	440
PVVHP1-5.seq	LISTVMTGGVAAVTFALPARFTLDFDGNKHKVN	H.LFI VST LWAGLVIGYVTE F SNAYG RAV RSCR A	443
PVVHP1-6.seq	LISTVMTGGVAAVTFALPARFTLDFDGNKHKVN	H.LFI VSA LWAGLVIGYVTE F SNAYG RAV RSCR A	446
PVVHP1-7.seq	IISTALMTVGIAIISWLALPAKFTIFNFGAQTUVSN	G.LFF VAI LWAGLIIGFVTE Y SNAYS QDV DSCR A	440
PVVHP1-8.seq	IISTAVMTVGIALVSWLGLPYTFTIFNFGAQTUVSN	Q.LFL VAV LWAGLVIGFVTE Y SNAYS QDV DSCR A	447
PVVHP1-9.seq	IISTALMTVGIALISWLALPAKFTIFNFGAQTUVSN	G.LFF VAI LWAGLIIGFVTE Y SNAYS QDV DSCR A	440
PVVHP1-10.seq	IISTAVMTVGIALVSWLGLPYTFTIFNFGAQTUVSN	Q.LFL VAV LWAGLVIGFVTE Y SNAYS QDV DSCR A	447
PVVHP1-11.seq	VVSTVMTVAALVVSFAALPANFTLDFDGEVQKVN	H.LFF VAI LWAGLAIGFVTE F SNAYS RDV DSCR A	456
PVVHP1-12.seqMRGDPECHFG	H.LFF VAI LWAGLAIGFVTE F SNTYS RDV DACK A	53
PVVHP2-1.seq	IMQKGSYVTIMLAVLTFGVSTRWLLY...TEQAPSA	LNFMAL GLV IITAYAFVWISK Y DYKHE RLL LSSS H	211
PVVHP2-2.seq	IMQKGSYVTIMLAVLTFGVSTRWLLY...TEQAPSA	LNFMAL GLV IITAYAFVWISK Y DYKHE RLL LSSS H	461
Consensus	w c g y t pv a tg

PHVHP1-1.seq	A V F LAL YK VIIPIFA AFS FLSFSL.....	AAMY V V AL IATG AI AY S	510
PHVHP1-2.seq	A V F LAL YK VIIPIFA AVG VVSFTI.....	AAMY I V AL IATG SI AY S	506
PHVHP1-3.seq	A V F LAV YK VIIPILA AAA YAGFRL.....	AAMY I L AL IATG AI AY S	511
PHVHP1-4.seq	A V F LAL YK VIIPIFA AFS FLSFSL.....	AAMY V V AL IATG AI AY S	513
PHVHP1-5.seq	A V F LAL YK VIIPIFA AVS VVSFSI.....	AAMY I V AL IATG AI AY S	506
PHVHP1-6.seq	A V F LAL YK VIVPVFA AVS YVGFLL.....	ASII I V AL VATG AI AY S	521
PHVHP2-1.seq	G I A VSL ME TALPVLV SVA ISAYWLGQTSGLVDES	GNPTGGFL T V TM AGYV TM MF A	541
PHVHP2-2.seq	G I A VSL ME TALPVLV SVA ISAYWLGQTSGLVDES	GNPTGGFL T V TM AGYV TM MF A	541
PVVHP1-1.seq	A V F LAL YK VIIPIFA AFS FLSFSL.....	AAMY V V AL IATG AI AY S	511
PVVHP1-2.seq	A V F LAL YK VIIPIFA AVG VVSFTI.....	AAMY I M AL IATG SI AY S	506
PVVHP1-3.seq	A V F LAL YK VIIPIFA AFS FLSFSL.....	AAMY V V AL IATG AI AY S	510
PVVHP1-4.seq	A V F LAL YK VIIPIFA AVG VVSFTI.....	AAMY I V AL IATG SI AY S	506
PVVHP1-5.seq	A V F LAV YK VIVPILA AAA YAGFRL.....	AAMY I L AL IATG AI AY S	509
PVVHP1-6.seq	A V F LAV YK VIVSILA AAA YAGFRL.....	AAMY I L AL IATG AI AY S	512
PVVHP1-7.seq	A V F LAL YK VIIPIFA AVS VVSFSI.....	AAMY I V AL IATG AI AY S	506
PVVHP1-8.seq	A V F LAL YK VIIPIFA AFS FLSFSL.....	AAMY V V AL IATG AI AY S	513
PVVHP1-9.seq	A V F LAL YK VIIPIFA AVS VVSFSI.....	AAMY I V AL IATG AI AY S	506
PVVHP1-10.seq	A V F LAL YK VIIPIFA AFS FLSFSL.....	AAMY V V AL IATG AI AY S	513
PVVHP1-11.seq	A V F LAL YK VIVPVFA AVS YVGFLL.....	ASII I V AL VATG AI AY S	522
PVVHP1-12.seq	A V F LAL YK VIVPVFA AVS YVGFLL.....	ASII I V AL VATG AI AY S	519
PVVHP2-1.seq	G I A VSL ME TALPVLV SVA ISAYWLGQTSGLVDES	GNPTGGFL T V TM AGYV TM MF A	291
PVVHP2-2.seq	G I A VSL ME TALPVLV SVA ISAYWLGQTSGLVDES	GNPTGGFL T V TM AGYV TM MF A	541
Consensus	tn i g g s i i g a a gmlst l d gpi dnag

3.4.2 Genes *PHT1* em *Panicum* spp.

Com base nas nove sequências da família de transportadores de fosfato (*PHT1*) relatadas em *A. thaliana* e 13 em *O. sativa*, foram identificados um total de 12 membros de *PHT1* em *P. hallii* e 23 membros em *P. virgatum* (Tabela 2). A análise de domínio revelou a presença do domínio Sugar_tr (PF00083) em todas as sequências. Os genes *PHT1* foram distribuídos em quatro cromossomos (Chr. 01, 02, 03 e 05) de *Arabidopsis*, em seis cromossomos (Chr. 01, 03, 04, 06, 08 e 10) de arroz e em cinco cromossomos (Chr. 02, 04, 05, 07 e 09) das espécies *P. hallii* e *P. virgatum*. Os cromossomos 07 e 09 tiveram maior abundância de genes *PHT1* em ambas as espécies de *Panicum* spp. (Tabela 2).

O comprimento das proteínas *PHT1* presumidas em *Panicum* spp. variou de 447 a 584 aa, o peso molecular variou de 49,23 a 63,20 KDa e o pI variou de 7,01 a 9,35. Os valores de GRAVY foram positivos e variaram entre 0,226 e 0,507, indicando que as proteínas são hidrofóbicas. A localização subcelular mostrou que todos os membros de *PHT1* encontrados em ambas as espécies de *Panicum* spp. estão presentes na membrana plasmática (Tabela 2), assim, como os genes da família *PHT1* em *A. thaliana* e *O. sativa*.

Tabela 2 – Caracterização dos genes *Phosphate Transporter 1 (PHT1)* em *P. hallii*, *P. virgatum*, *A. thaliana* e *O. sativa*.

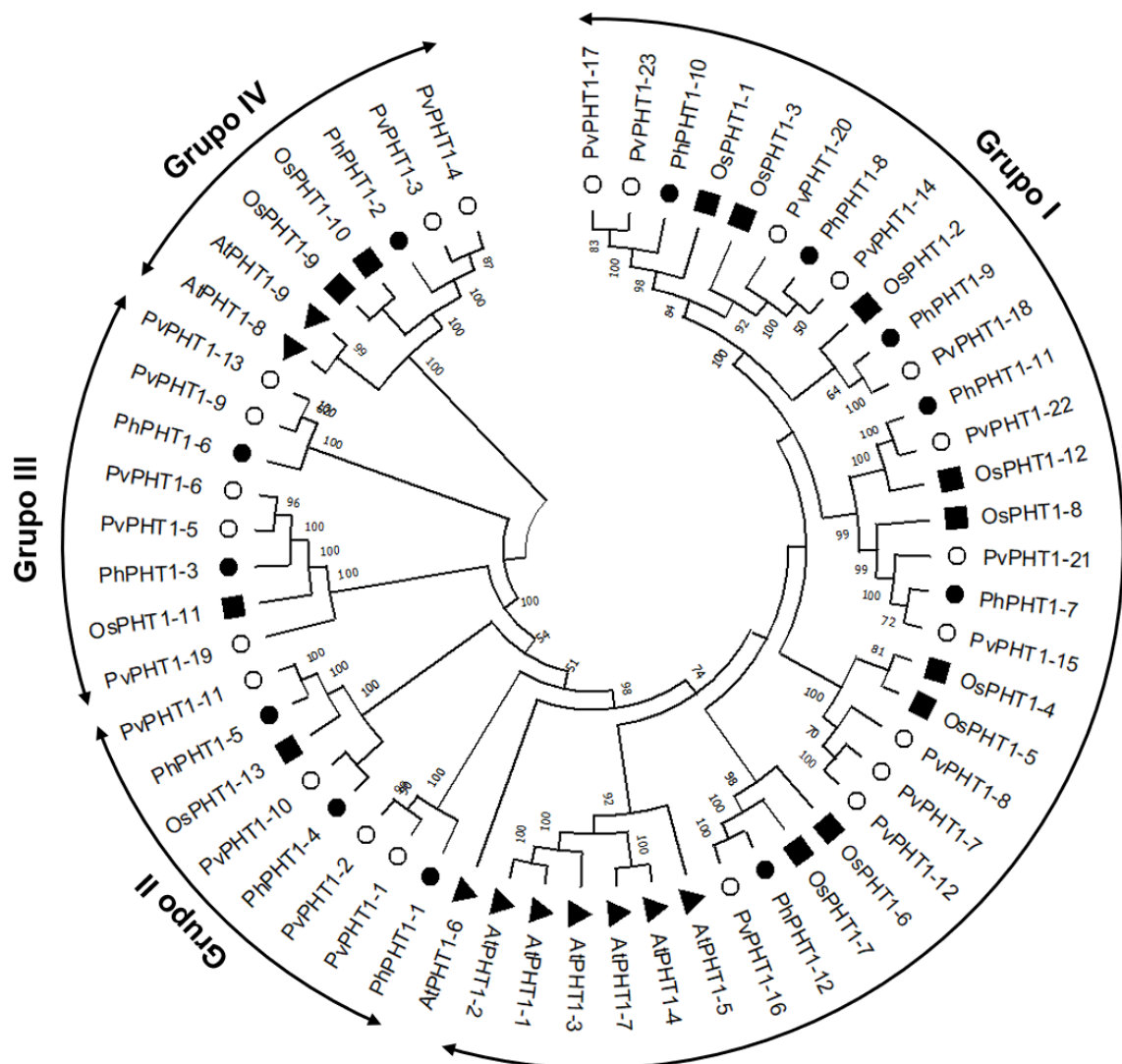
Nome do gene	ID do gene	Localização cromossômica	Proteína (aa)	(KDa)	pI	GRAVY	Localização Subcelular
<i>Arabidopsis thaliana</i>							
<i>AtPHT1;1</i>	AT5G43350.1	Chr5:17399769..17402158 antisenso	524	57,62	9,11	0,351	Membrana celular
<i>AtPHT1;2</i>	AT5G43370.1	Chr5:17415698..17417972 senso	524	57,64	9,12	0,350	Membrana celular
<i>AtPHT1;3</i>	AT5G43360.1	Chr5:17409524..17411214 senso	521	57,26	9,11	0,388	Membrana celular
<i>AtPHT1;4</i>	AT2G38940.1	Chr2:16257157..16260253 senso	534	58,60	8,35	0,323	Membrana celular
<i>AtPHT1;5</i>	AT2G32830.1	Chr2:13927606..13929763 antisenso	542	59,21	8,55	0,337	Membrana celular
<i>AtPHT1;6</i>	AT5G43340.1	Chr5:17393598..17395148 antisenso	516	56,25	9,05	0,457	Membrana celular
<i>AtPHT1;7</i>	AT3G54700.1	Chr3:20248214..20250948 antisenso	535	58,33	8,35	0,319	Membrana celular
<i>AtPHT1;8</i>	AT1G20860.1	Chr1:7254007..7258677 antisenso	534	59,16	8,20	0,320	Membrana celular
<i>AtPHT1;9</i>	AT1G76430.1	Chr1:28678935..28682062 antisenso	532	58,70	8,76	0,404	Membrana celular
<i>Oryza sativa</i>							
<i>OsPHT1;1</i>	Os03g05620.1	Chr3:2807555..2809678 antisenso	527	57,46	8,57	0,361	Membrana celular
<i>OsPHT1;2</i>	Os03g05640.1	Chr3:2815438..2817367 antisenso	528	57,84	8,84	0,401	Membrana celular
<i>OsPHT1;3</i>	Os10g30770.1	Chr10:16027859..16029439 senso	526	56,93	8,40	0,393	Membrana celular
<i>OsPHT1;4</i>	Os04g10750.2	Chr4:5846286..5849390 senso	538	58,83	8,48	0,298	Membrana celular
<i>OsPHT1;5</i>	Os04g10690.1	Chr4:5811323..5813082 antisenso	548	59,87	8,61	0,253	Membrana celular
<i>OsPHT1;6</i>	Os08g45000.1	Chr8:28244202..28246028 senso	534	57,79	9,09	0,400	Membrana celular
<i>OsPHT1;7</i>	Os03g04360.1	Chr3:2010987..2013532 antisenso	526	56,60	8,97	0,453	Membrana celular
<i>OsPHT1;8</i>	Os10g30790.2	Chr10:16035403..16038231 antisenso	541	59,11	8,76	0,328	Membrana celular
<i>OsPHT1;9</i>	Os06g21920.1	Chr6:12680638..12681851 senso	211	22,44	7,01	0,273	Membrana celular
<i>OsPHT1;10</i>	Os06g21950.1	Chr6:12691975..12694849 antisenso	552	58,87	8,69	0,456	Membrana celular
<i>OsPHT1;11</i>	Os01g46860.1	Chr1:26725194..26726953 antisenso	555	60,09	8,98	0,359	Membrana celular
<i>OsPHT1;12</i>	Os03g05610.1	Chr3:2804141..2805943 senso	541	58,70	7,60	0,374	Membrana celular
<i>OsPHT1;13</i>	Os04g10800.1	Chr4:5865176..5868178 senso	508	56,55	8,09	0,466	Membrana celular
<i>Panicum hallii</i>							
<i>PhPHT1;1</i>	Pahal.2G106300.1	Chr02:8376463..8378077 antisenso	537	57,36	8,31	0,352	Membrana celular
<i>PhPHT1;2</i>	Pahal.4G239400.1	Chr04:43387149..43391723 senso	575	61,56	9,16	0,310	Membrana celular
<i>PhPHT1;3</i>	Pahal.5G221400.1	Chr05:13564011..13566343 senso	567	61,61	7,14	0,318	Membrana celular
<i>PhPHT1;4</i>	Pahal.7G040400.1	Chr07:10548016..10549685 senso	531	59,21	7,01	0,405	Membrana celular
<i>PhPHT1;5</i>	Pahal.7G040500.1	Chr07:10565187..10567311 senso	505	55,24	8,86	0,497	Membrana celular
<i>PhPHT1;6</i>	Pahal.7G273800.1	Chr07:43068854..43070770 antisenso	509	54,20	9,12	0,453	Membrana celular

Continuação tabela 2

<i>PhPHT1;7</i>	Pahal.9G235200.1	Chr09:15710373..15712909	senso	543	58,80	8,40	0,380	Membrana celular
<i>PhPHT1;8</i>	Pahal.9G235300.1	Chr09:15715405..15717312	antisenso	523	56,89	8,11	0,392	Membrana celular
<i>PhPHT1;9</i>	Pahal.9G602600.1	Chr09:71132145..71134156	senso	527	57,68	8,72	0,399	Membrana celular
<i>PhPHT1;10</i>	Pahal.9G602700.1	Chr09:71137879..71140217	senso	522	56,98	8,87	0,390	Membrana celular
<i>PhPHT1;11</i>	Pahal.9G602800.1	Chr09:71140923..71142775	antisenso	537	58,38	8,91	0,391	Membrana celular
<i>PhPHT1;12</i>	Pahal.9G613800.1	Chr09:71832907..71835183	senso	584	63,20	9,35	0,368	Membrana celular
<i>Panicum virgatum</i>								
<i>PvPHT1;1</i>	Pavir.2KG234800.1	Chr02:16901915..16905870	antisenso	538	57,15	9,03	0,365	Membrana celular
<i>PvPHT1;2</i>	Pavir.2NG278400.1	Chr02:15628197..15629790	antisenso	530	56,38	8,72	0,385	Membrana celular
<i>PvPHT1;3</i>	Pavir.4KG118300.1	Chr04:14277571..14281706	antisenso	578	61,22	9,30	0,343	Membrana celular
<i>PvPHT1;4</i>	Pavir.4NG218165.1	Chr04:16131487..16134460	antisenso	496	52,16	9,22	0,317	Membrana celular
<i>PvPHT1;5</i>	Pavir.5NG410100.1	Chr05:49723900..49725677	antisenso	568	61,71	8,75	0,350	Membrana celular
<i>PvPHT1;6</i>	Pavir.5KG426600.1	Chr05:42357809..42359909	antisenso	571	61,67	8,15	0,384	Membrana celular
<i>PvPHT1;7</i>	Pavir.7KG002900.1	Chr07:12887254..12892953	antisenso	537	58,90	8,29	0,293	Membrana celular
<i>PvPHT1;8</i>	Pavir.7KG003200.1	Chr07:12929577..12931482	senso	540	59,21	8,01	0,226	Membrana celular
<i>PvPHT1;9</i>	Pavir.7KG327100.1	Chr07:45422725..45424258	antisenso	498	52,55	9,01	0,507	Membrana celular
<i>PvPHT1;10</i>	Pavir.7NG002300.1	Chr07:16052372..16054033	senso	528	58,70	8,50	0,444	Membrana celular
<i>PvPHT1;11</i>	Pavir.7NG027800.1	Chr07:16011290..16013135	antisenso	512	56,20	8,90	0,487	Membrana celular
<i>PvPHT1;12</i>	Pavir.7NG050100.2	Chr07:15950824..15952429	senso	534	58,65	8,02	0,300	Membrana celular
<i>PvPHT1;13</i>	Pavir.7NG288200.1	Chr07:43569808..43571647	antisenso	505	53,59	9,31	0,453	Membrana celular
<i>PvPHT1;14</i>	Pavir.9KG216300.1	Chr09:24512845..24514619	antisenso	525	57,11	8,07	0,374	Membrana celular
<i>PvPHT1;15</i>	Pavir.9KG216400.1	Chr09:24498111..24501269	senso	543	58,73	8,59	0,391	Membrana celular
<i>PvPHT1;16</i>	Pavir.9KG579500.1	Chr09:68460426..68462788	senso	529	56,58	8,97	0,450	Membrana celular
<i>PvPHT1;17</i>	Pavir.9KG591600.2	Chr09:67234725..67238359	senso	447	49,23	8,81	0,346	Membrana celular
<i>PvPHT1;18</i>	Pavir.9KG591700.2	Chr09:67230092..67231976	senso	527	57,53	8,58	0,411	Membrana celular
<i>PvPHT1;19</i>	Pavir.9NG075702.1	Chr09:4740918..4742508	senso	529	57,49	8,38	0,413	Membrana celular
<i>PvPHT1;20</i>	Pavir.9NG331900.1	Chr09:26374008..26375513	antisenso	457	50,00	7,70	0,365	Membrana celular
<i>PvPHT1;21</i>	Pavir.9NG332000.1	Chr09:26367142..26369356	senso	542	58,54	8,58	0,376	Membrana celular
<i>PvPHT1;22</i>	Pavir.9NG745900.1	Chr09:78863549..78865470	antisenso	538	58,32	9,08	0,398	Membrana celular
<i>PvPHT1;23</i>	Pavir.9NG745800.3	Chr09:78860941..78862917	senso	522	57,10	9,18	0,372	Membrana celular

As proteínas PHT1 encontradas em *P. hallii* e *P. virgatum*, agruparam-se com os genes conhecidos nas espécies modelo (Figura 6). Porém, o número de seqüências proteicas das espécies *Panicum* spp. foi mais semelhante as proteínas do arroz, em comparação com as seqüências da *Arabidopsis*. As proteínas PHT1 de *Panicum* spp. foram divididas em quatro grupos (Grupo I a IV) (Figura 6).

Figura 6 – Árvore filogenética de proteínas da família PHT1 em *P. hallii*, *P. virgatum*, *A. thaliana* e *O. sativa*.



Fonte: A autora.

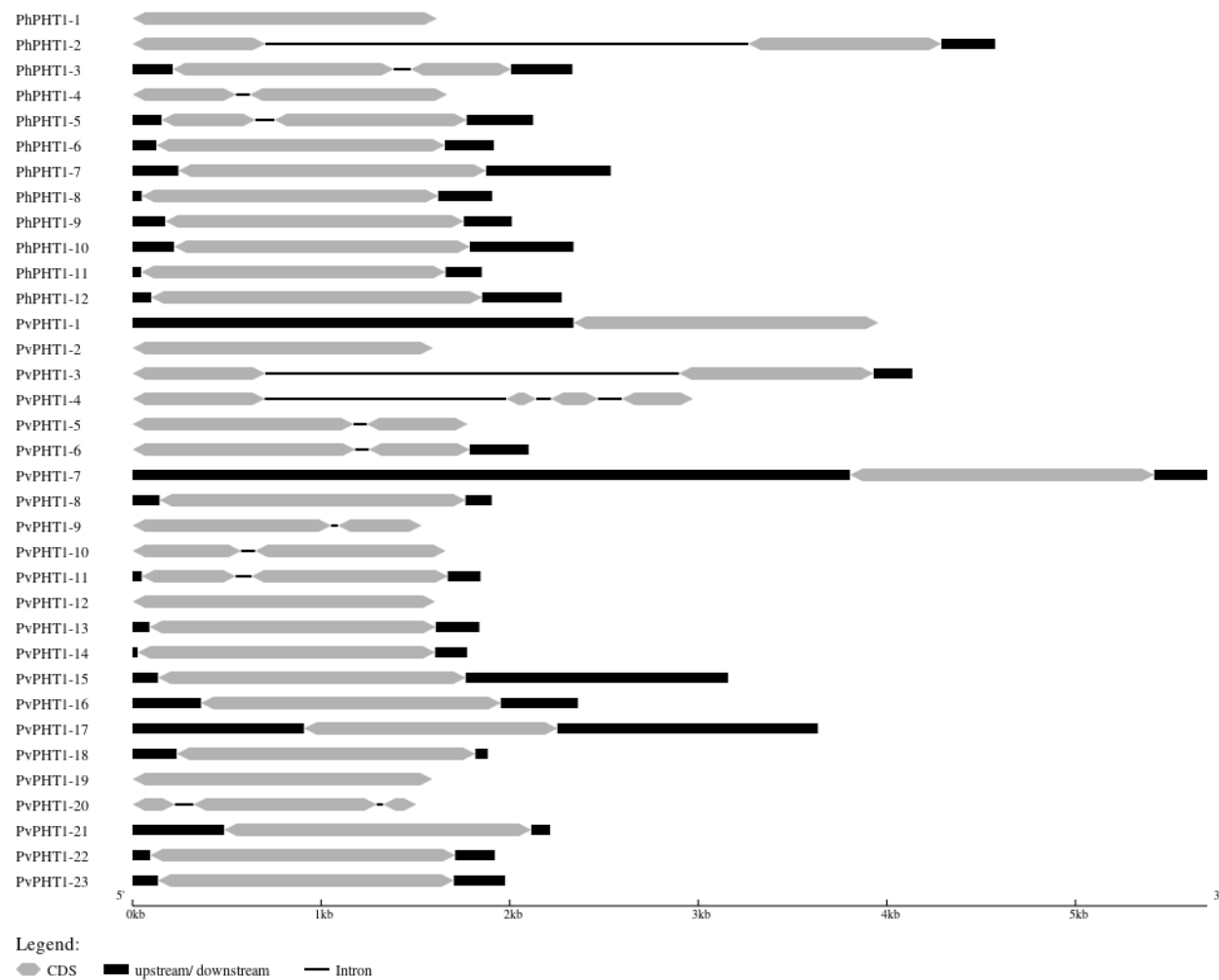
A árvore filogenética não enraizada foi construída pelo método (NJ), com 1000 repetições de bootstrap. As seqüências das proteínas PHT1 e as espécies correspondentes são: *A. thaliana* (At, triângulo), *O. sativa* (Os, quadrado), *P. hallii* (Ph, círculo preto) e *P. virgatum* (Pv, círculo branco).

O grupo I reuniu a maioria das proteínas PHT1 das espécies estudadas, incluindo seis proteínas de *P. hallii*, 12 proteínas de *P. virgatum*, nove proteínas de *O. sativa* (*OsPHT1;1/1;2/1;3/1;4/1;5/1;6/1;7/1;8/1;12*) e seis proteínas de *Arabidopsis* (*AtPHT1;1/1;2/1;3/1;4/1;5/1;7*) (Figura 6). Dentro do grupo I, as proteínas PHT1 da planta eudicotiledônea *Arabidopsis* foram agrupadas separadamente das espécies monocotiledôneas. Nenhuma proteína homóloga ao gene *AtPHT1;6* foi identificada nas espécies gramíneas, ficando esse gene fora dos grupos principais (Figura 6).

No grupo II, três sequências de *P. hallii* e quatro sequências de *P. virgatum* mostraram uma relação próxima com o gene *OsPHT1;13* (Figura 6). No grupo III, dois genes de *P. hallii* e cinco de *P. virgatum* foram homólogos ao gene *OsPHT1;11* do arroz. O grupo IV foi constituído por uma proteína PHT1 de *P. hallii* (*PhPHT1;2*) e um par de proteínas nas espécies *P. virgatum* (*PvPHT1;3* e *PvPHT1;4*), *O. sativa* (*OsPHT1;9/1;10*) e *A. thaliana* (*AtPHT1;8/1;9*) (Figura 6).

Os resultados da estrutura dos membros da família PHT1 mostram que o número de éxons em *Panicum* spp. variou de 1 a 4 (Figura 7). A maioria das sequências de codificação dos genes PHT1 não apresentaram íntrons (23 genes), algumas sequências apresentaram apenas um íntron (10 genes) e duas sequências tiveram 2 e 3 íntrons. As sequências *PhPHT1;2* e *PvPHT1;3*, apresentaram íntrons de maior tamanho, com 2561 e 2193 bases, respectivamente. Enquanto, as sequências *PvPHT1;1* e *PvPHT1;7* tiveram maior comprimento de regiões não traduzidas (UTRs) à montante da sequência de codificação (Figura 7).

Figura 7 – Estruturas gênicas de genes *PHT1* em *Panicum* spp.



Fonte: A autora.

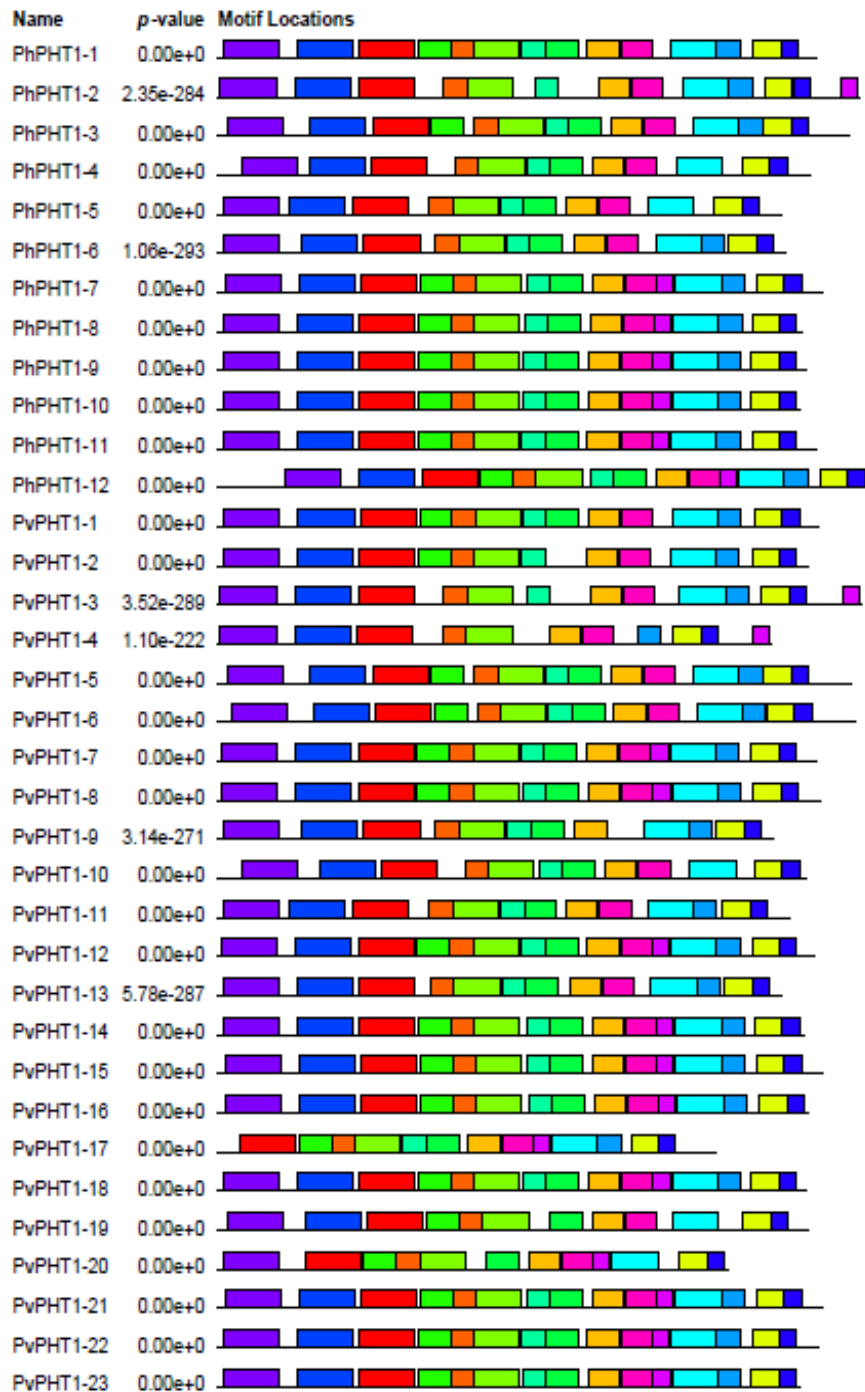
As caixas cinzas representam os éxons da sequência de codificação (CDS), as caixas pretas indicam regiões não traduzidas e as linhas pretas mostram os íntrons. A barra de escala na parte inferior indica o comprimento dos genes em Kb.

A distribuição dos motivos na família *PHT1* foi altamente conservada, porém diferenças foram observadas de acordo com os grupos formados na árvore filogenética (Figura 8). A maioria dos membros do grupo I apresentaram 15 motivos conservados em suas sequências, enquanto, os membros dos grupos II, III e IV apresentaram menor número de motivos. Em comparação as outras proteínas do grupo I, a sequência *PvPHT1;17* não apresentou os motivos 4 e 7 e a sequência *PvPHT1;20* não teve os motivos 7,12 e 13 (Figura 8).

A distribuição dos motivos na família *PHT1* foi altamente conservada, porém diferenças foram observadas de acordo com os grupos formados na árvore filogenética (Figura 8). A maioria dos membros do grupo I apresentaram 15 motivos conservados em suas sequências, enquanto, os membros dos grupos II, III e IV apresentaram menor número de motivos. Em comparação as outras proteínas do grupo I, a sequência *PvPHT1;17* não apresentou os motivos 4 e 7 e a sequência *PvPHT1;20* não teve os motivos 7,12 e 13 (Figura 8).

As proteínas do grupo II não apresentaram o motivo 15 e em algumas sequências não foram encontrados os motivos 6, 11 e 13 (Figura 8). O motivo 15 também ficou ausente nas proteínas do grupo III, e os motivos 8, 11,12 e 13 não foram detectados em determinadas sequências desse grupo. No grupo IV, as sequências *PhPHT1;2* e *PvPHT1;3* foram muito semelhantes e não apresentaram os motivos 6 e 11, além desses motivos, a sequência *PvPHT1;4* não apresentou os motivos 2 e 12. Em comparação as demais proteínas da família *PHT1*, as sequências de *Panicum* spp. agrupadas no grupo IV foram as únicas a apresentarem o motivo 15 na região C-terminal (Figura 8).

Figura 8 – Análise dos motivos conservados das proteínas PHT1 em *Panicum* spp.



Motif	Symbol	Motif Consensus
1.		ATLCFFRPWLGGIGGDYPLSATIMSEYANKRTRGAFIAAVFAMQGGFGL
2.		YAFTPFFANFGPNSTTFIVPAEIPPARLRSTCHGISAAAGK
3.		YWRMKMPETARYTALVARNAKQAAADMSRVLNVEIAEEQEK
4.		QLNVLAALDQAKTQWYHFTAIVIAGMGPFDDAYDLPCISLVTKLLGRIYY
5.		MNALEEVPRIARAQALIALCGTIPGYWF
6.		HLLGTTSTWFLLDIAFYSQLFQKDI FSK
7.		AVNGVALCGTLAQQLFFGWLGDKLRKRVMGTMLLLMMVVCISIASGLSFGS
8.		ALIDVVGRFAIQLLGPFMMTVFMLGLAV
9.		QADYVWRI ILLMPGAVPAALTY
10.		RNALFVLAGTNPGLGFPFTLLVPESK
11.		IVALIVSAAFRRARYPAPAYQDDPAASTVP
12.		VLAAGNEYGLFSRQFARRHGL
13.		AGAIIGAPGFLYAAQDPDKPK
14.		GKSL EEISGENEDDE
15.		PYHHWTTPGHHTGFV

Fonte: A autora.

3.4.3 Genes *PHO1* em *Panicum* spp.

A busca por genes *PHO1* homólogos a *Arabidopsis* e ao arroz, resultou na identificação de três genes *PHO1* em *P. hallii* e seis genes em *P. virgatum* (Tabela 3). Os genes que codificam as proteínas PHO1 nos genomas das espécies de *Panicum* spp. apresentaram os domínios SPX (PF03105) e EXS (PF03124). A análise de distribuição cromossômica revelou que os genes *PHO1* nas espécies Panicoideae estão distribuídos em três cromossomos. Foram exibidos em cada um dos cromossomos Chr01, Chr04 e Chr05 um gene de *P. hallii* e dois genes de *P. virgatum* (Tabela 3).

As sequências de codificação dos genes *PHO1* em *Panicum* spp. apresentaram comprimentos que variaram de 769 a 853 aminoácidos, os PMs previstos foram de 86,57 a 97,00 KDa e os valores de pI foram de 9,04 a 9,52 (Tabela 3). Com exceção de *PhPHO1;1* e *PvPHO1;1*, os valores de GRAVY das proteínas restantes foram menores que zero, portanto, a maioria das proteínas são hidrofílicas. A análise de localização subcelular indicou que todas as proteínas *PHO1* em *Panicum* spp. estão localizadas na membrana celular, no entanto, as proteínas *PhPHO1;1* e *PvPHO1;2* também estão presentes no vacúolo. Na espécie *O. sativa* as proteínas PHO1 estão localizadas somente na membrana celular, enquanto, na *A. thaliana* a previsão da localização subcelular apontou que além da membrana celular essas proteínas também podem ser encontradas no vacúolo, no cloroplasto, na mitocôndria e no núcleo (Tabela 3).

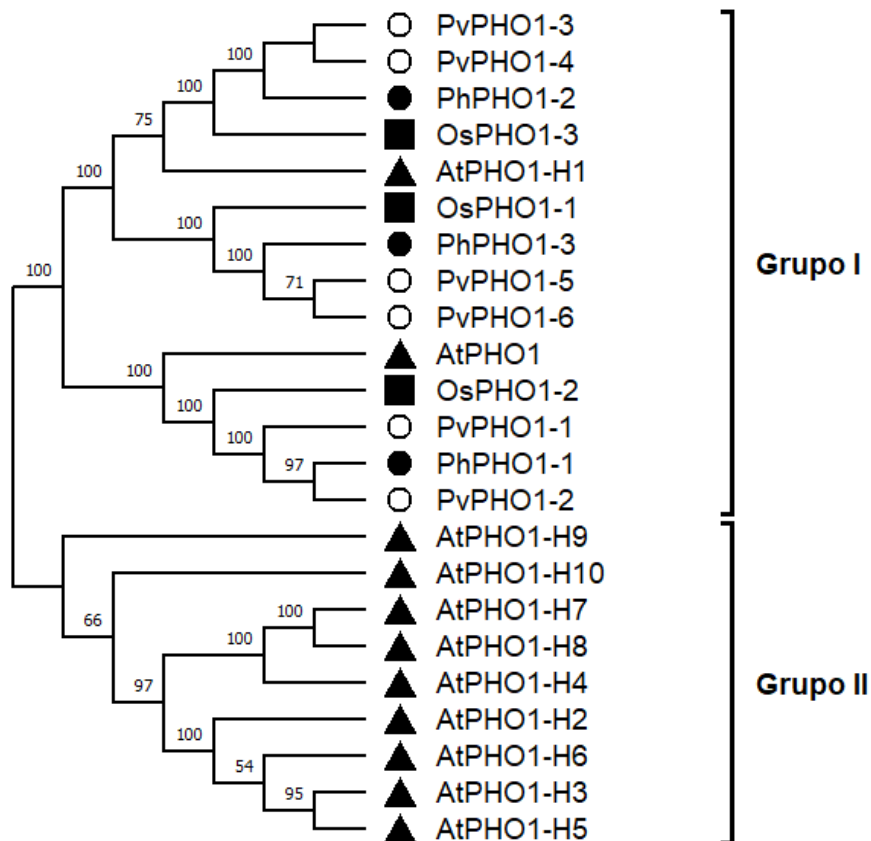
A análise filogenética separou os genes *PHO1* em dois grupos distintos (Figura 9). No grupo I, houve a formação de dois subgrupos onde as proteínas *PhPHO1;1* e *PvPHO1;1/1;2* das espécies de *Panicum* spp., assim como *OsPHO1;2* em arroz, agruparam-se com a proteína *AtPHO1* da *Arabidopsis*, enquanto, as proteínas *PhPHO1;2/1;3* em *P. hallii*, *PvPHO1;3/1;4/1;5/1;6* em *P. virgatum* e *OsPHO1;2/1;3* em arroz foram agrupadas a *AtPHO1;H1* em *Arabidopsis*. Além disso, foi observado que as proteínas das espécies de *Panicum* spp. tiveram maior homologia com os três genes do arroz (*OsPHO1;1*, *OsPHO1;2* e *OsPHO1;3*). A espécie *P. hallii* teve uma proteína homóloga para cada gene anotado no arroz, enquanto, a espécie *P. virgatum* apresentou duas sequências homólogas (Figura 9).

Tabela 3 – Caracterização dos genes *Phosphate 1 PHO1* em *P. hallii*, *P. virgatum*, *A. thaliana* e *O. sativa*.

Nome do gene	ID do gene	Localização cromossômica	Proteína (aa)	(KDa)	pI	GRAVY	Localização Subcelular
<i>Arabidopsis thaliana</i>							
<i>AtPHO1</i>	AT3g23430.1	Chr3:8387398..8393467 antisenso	782	90,54	9,46	-0,142	Membrana celular
<i>AtPHO1;H1</i>	AT1g68740.1	Chr1:25812449..25816983 antisenso	784	90,71	9,03	-0,167	Membrana celular, Vacúolo
<i>AtPHO1;H2</i>	AT2g03260.1	Chr2:987934..992332 antisenso	807	93,33	9,38	-0,193	Cloroplasto, Vacúolo
<i>AtPHO1;H3</i>	AT1g14040.1	Chr1:4810115..4814724 senso	813	93,84	9,39	-0,156	Membrana celular, Mitocôndria, Vacúolo
<i>AtPHO1;H4</i>	AT4g25350.1	Chr4:12962965..12966629 antisenso	745	86,99	9,27	-0,099	Membrana celular, Vacúolo
<i>AtPHO1;H5</i>	AT2g03240.1	Chr2:972756..977531 antisenso	823	95,05	8,86	-0,241	Membrana celular
<i>AtPHO1;H6</i>	AT2g03250.1	Chr2:981983..986662 antisenso	756	87,85	8,90	-0,083	Cloroplasto, Núcleo, Vacúolo
<i>AtPHO1;H7</i>	AT1g26730.1	Chr1:9241036..92449 senso	750	87,33	9,31	-0,084	Membrana celular
<i>AtPHO1;H8</i>	AT1g35350.1	Chr1:12980689..12984740 antisenso	751	87,40	9,22	-0,077	Membrana celular
<i>AtPHO1;H9</i>	AT3g29060.1	Chr3:11044731..11048677 antisenso	800	92,44	9,48	-0,205	Mitocôndria, Vacúolo
<i>AtPHO1;H10</i>	AT1g69480.1	Chr1:26114024..26117955 antisenso	777	90,60	9,09	-0,179	Membrana celular
<i>Oryza sativa</i>							
<i>OsPHO1;1</i>	Os01g02000.1	Chr1:537710..543355 senso	799	91,19	9,16	-0,145	Membrana celular
<i>OsPHO1;2</i>	Os02g56510.1	Chr2:34609408..34615666 senso	815	91,52	9,48	-0,069	Membrana celular
<i>OsPHO1;3</i>	Os06g29790.1	Chr6:17130053..17134973 senso	860	98,06	8,97	-0,184	Membrana celular
<i>Panicum hallii</i>							
<i>PhPHO1;1</i>	Pahal.1G440700.1	Chr01:58619442..58625151 antisenso	801	89,89	9,52	0,008	Membrana celular, Vacúolo
<i>PhPHO1;2</i>	Pahal.4G246400.1	Chr04:44501501..44507007 antisenso	843	95,79	9,17	-0,098	Membrana celular
<i>PhPHO1;3</i>	Pahal.5G445000.1	Chr05:53297898..53303266 senso	826	92,08	9,04	-0,158	Membrana celular
<i>Panicum virgatum</i>							
<i>PvPHO1;1</i>	Pavir.1KG537800.1	Chr01:55299648..55305684 antisenso	769	86,57	9,51	0,044	Membrana celular
<i>PvPHO1;2</i>	Pavir.1NG563700.1	Chr01:65392112..65397925 antisenso	798	89,73	9,50	-0,002	Membrana celular, Vacúolo
<i>PvPHO1;3</i>	Pavir.4KG225400.1	Chr04:13601960..13607248 senso	853	97,00	9,13	-0,131	Membrana celular
<i>PvPHO1;4</i>	Pavir.4NG083100.1	Chr04:14891879..14897147 senso	846	96,48	9,21	-0,126	Membrana celular
<i>PvPHO1;5</i>	Pavir.5KG145200.1	Chr05:10521657..10526761 antisenso	809	90,32	9,12	-0,156	Membrana celular
<i>PvPHO1;6</i>	Pavir.5NG149900.1	Chr05:11252037..11257265 antisenso	827	92,10	9,17	-0,135	Membrana celular

O grupo II foi composto apenas por proteínas da *Arabidopsis* AtPHO1;H2 a AtPHO1;H10. As gramíneas (monocotiledôneas) apresentaram membros apenas no grupo I, enquanto, a *Arabidopsis* (eudicotiledônea) apresentou membros nos grupos I e II (Figura 9).

Figura 9 – Árvore filogenética de proteínas da família *PHO1* em *P. hallii*, *P. virgatum*, *A. thaliana* e *O. sativa*.

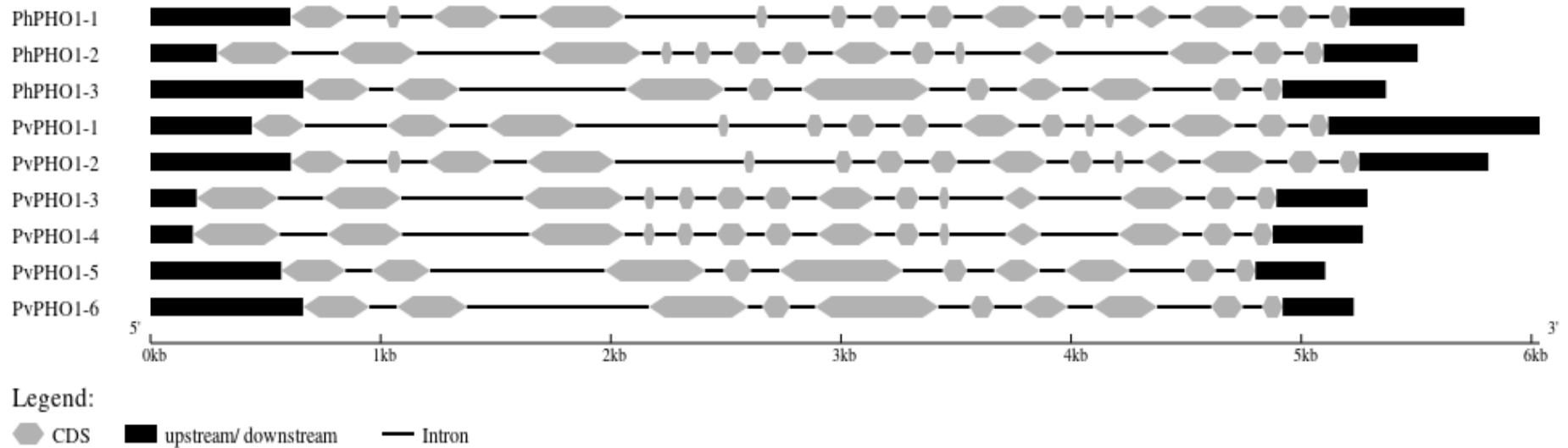


Fonte: A autora.

A árvore filogenética não enraizada foi construída pelo método (NJ), com 1000 repetições de bootstrap. As sequências das proteínas PHO1 e as espécies correspondentes são: *A. thaliana* (At, triângulo), *O. sativa* (Os, quadrado), *P. hallii* (Ph, círculo preto) e *P. virgatum* (Pv, círculo branco).

A estrutura dos genes *PHO1* em *Panicum* spp. foi altamente conservada entre as sequências que apresentaram homologia com o arroz na árvore filogenética (Figura 10). Os genes de *Panicum* spp. homólogos ao gene *OsPHO1;1* apresentaram 9 íntrons, com exceção da sequência *PvPHO1;1* que apresentou um íntron a menos, os demais genes homólogos ao *OSPHO1;2* tiveram 14 íntrons, e os homólogos ao *OSPHO1;3* tiveram 13 íntrons.

Figura 10 – Estruturas gênicas de genes *PHO1* em *Panicum* spp.



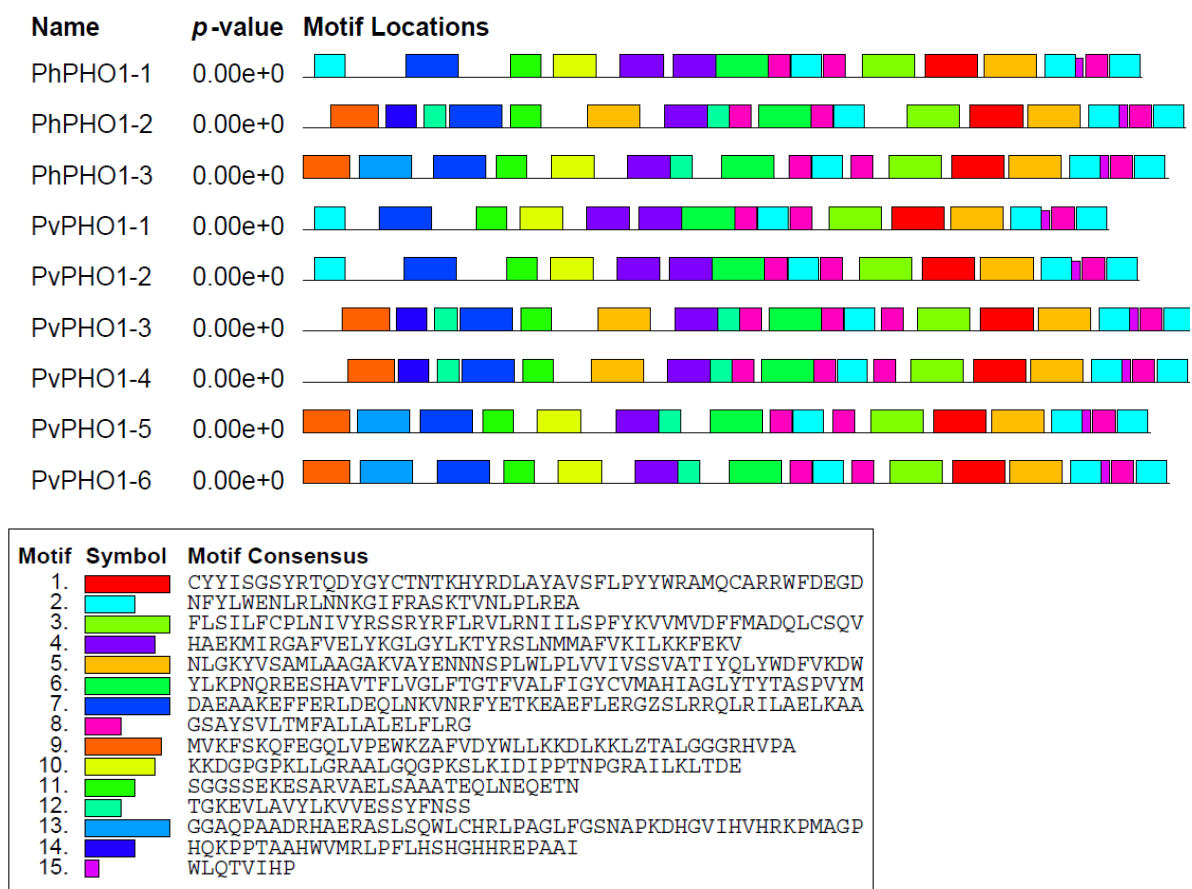
Fonte: A autora.

As caixas cinzas representam os éxons da sequência de codificação (CDS), as caixas pretas indicam regiões não traduzidas e as linhas pretas mostram os íntrons. A barra de escala na parte inferior indica o comprimento dos genes em Kb.

As proteínas PHO1 das espécies de *Panicum* spp. mais próximas de cada subfamília do arroz na classificação filogenética tiveram combinações de motivos semelhantes (Figura 11). Em geral, os motivos foram bastante conservados dentro de cada subfamília. As proteínas de *Panicum* spp. homólogas ao gene *OsPHO1;1* não apresentaram o motivo 14 e foram as únicas a apresentarem o motivo 13. As proteínas homólogas a *OsPHO1;2* não apresentaram os motivos 9, 12, 13 e 14 (Figura 11).

Os motivos encontrados na parte inicial das sequências homologas a *OsPHO1;2* diferiram das outras subfamílias, com a presença do motivo 2 como N-terminal e repetição do motivo 4. O motivo 14 só apareceu nas proteínas homólogas ao gene *OsPHO1;3* e os motivos 10 e 13 ficaram ausentes. Além disso, essas proteínas apresentaram os motivos 5 e 12 por duas vezes e na sequência PhPHO1;2 foi observada a falta de uma repetição do motivo 8 (Figura 11).

Figura 11 – Análise dos motivos conservados das proteínas PHO1 em *Panicum* spp.

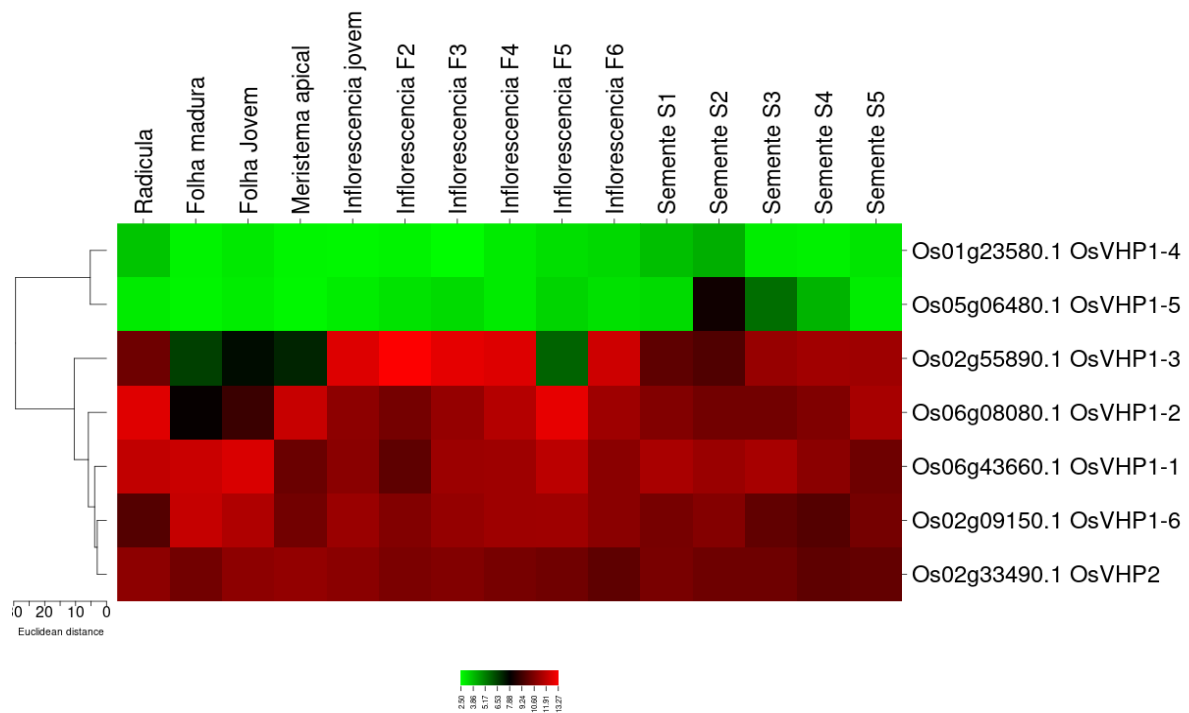


Fonte: A autora.

3.3.4 Perfil transcricional dos genes em Arroz

Para identificar potenciais genes candidatos em resposta a deficiência de fósforo foi verificado o perfil transcricional dos genes *VHP*, *PHT1* e *PHO1* em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento do arroz, sob condições normais de crescimento disponível no banco de dados *Rice – eFP Browser* (BAR). O mapa de calor mostrou diferença de expressão da família *VHP* nos tecidos do arroz (Figura 12). Os genes *OsVHP1;1*, *OsVHP1;6* e *OsVHP2;1* apresentaram altos níveis de expressão em todos os tecidos analisados, enquanto, os genes *OsVHP1;4* e *OsVHP1;5* mostraram baixos níveis de expressão. O gene *OsVHP1;1* apresentou maior valor de expressão nas folhas, *OsVHP1;2* teve maior expressão na radícula e meristema apical, enquanto *OsVHP1;3* apresentou maior expressão em tecidos de inflorescência (Figura 12).

Figura 12 – Mapa de calor da expressão de genes da família *VHP* em diferentes tecidos de *O. sativa*.

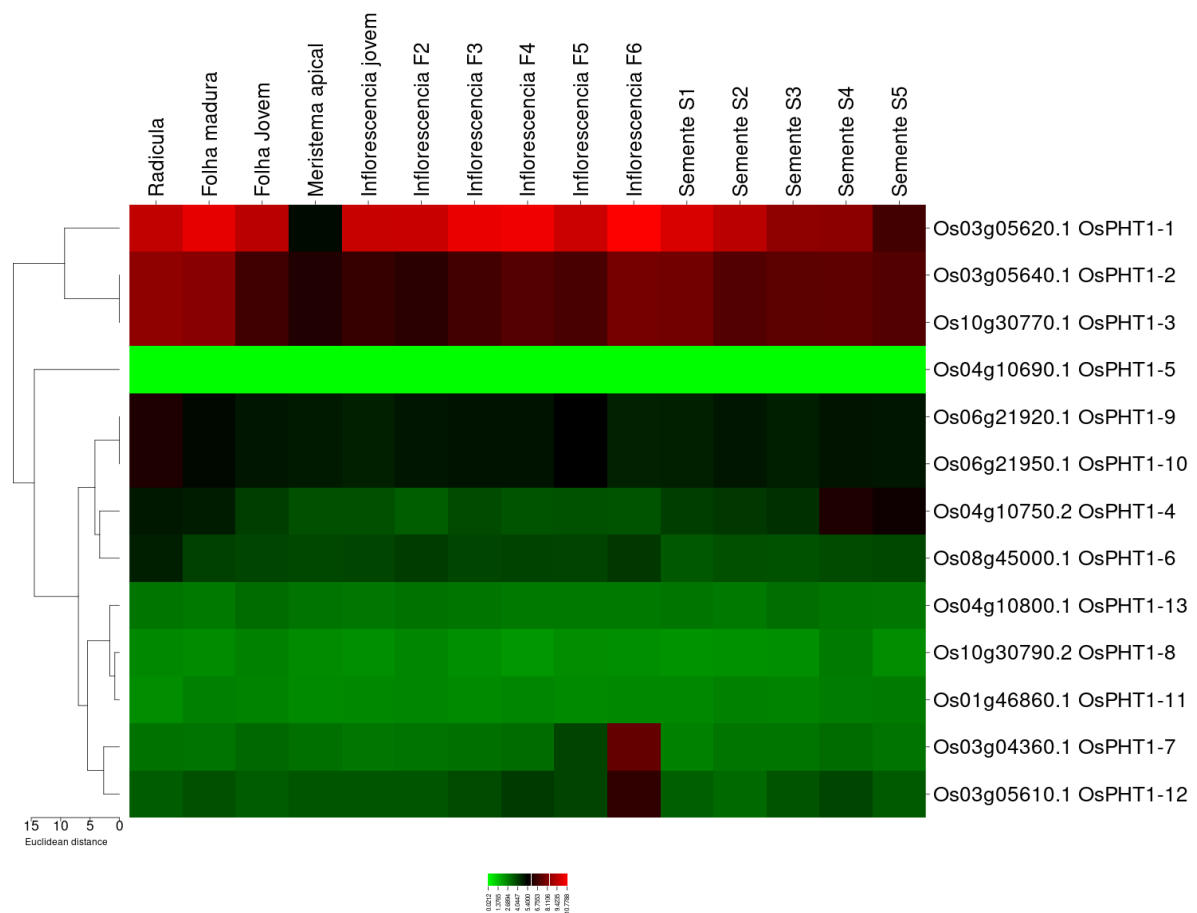


Fonte: A autora.

O padrão de expressão foi baseado em valores normalizados pelo método RMA. A escala de cores verde, preto e vermelho representam baixa, média e alta expressão, respectivamente.

O perfil transcricional *in silico* dos genes *PHT1* mostrou que os genes *OsPHT1;1*, *OsPHT1;2* e *OsPHT1;3* apresentaram maior expressão nas raízes, folhas, meristema apical, inflorescência e semente (Figura 13). Com exceção da sequência *Os04g10690.1* (*OsPHT1;5*), que não foi detectada no banco de informações Rice eFP Browser (BAR), os demais genes foram relativamente menos expressos nos tecidos vegetativos do arroz (Figura 13).

Figura 13 – Mapa de calor da expressão de genes da família *PHT1* em diferentes tecidos de *O. sativa*.

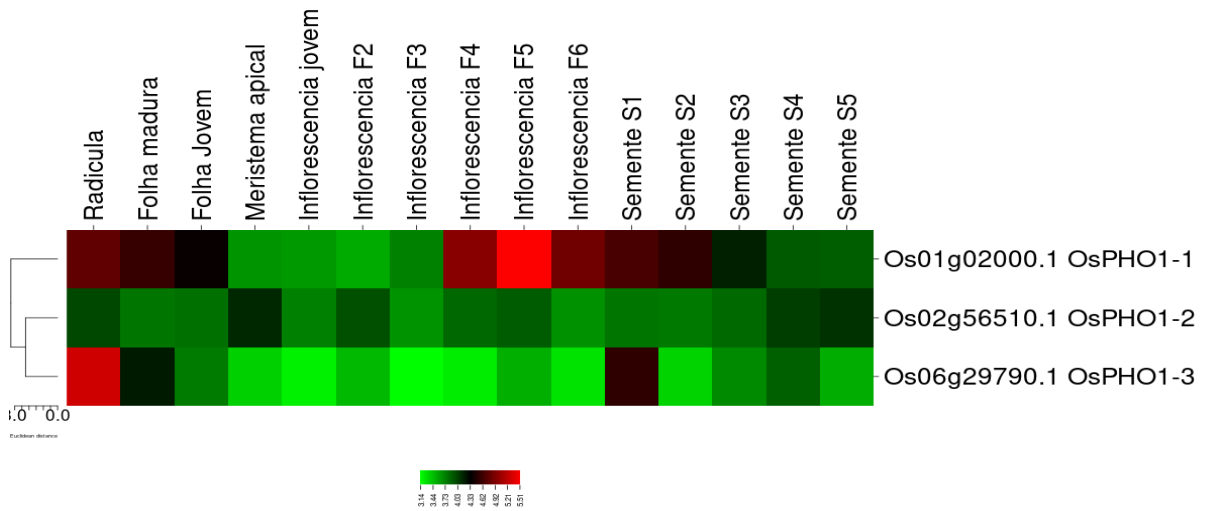


Fonte: A autora.

O padrão de expressão foi baseado em valores normalizados pelo método RMA. A escala de cores verde, preto e vermelho representam baixa, média e alta expressão, respectivamente.

O gene *OsPHO1;3* apresentou maior nível transcricional na radícula e foi menos expresso nos demais tecidos analisados (Figura 14). Nas folhas e na inflorescência, os maiores níveis de expressão foram do gene *OsPHO1;1*, enquanto, *OsPHO1;2* mostrou expressão estável em arroz.

Figura 14 – Mapa de calor da expressão de genes *PHO1* em diferentes tecidos de *O. sativa*.



Fonte: A autora.

O padrão de expressão foi baseado em valores normalizados pelo método RMA. A escala de cores verde, preto e vermelho representam baixa, média e alta expressão, respectivamente.

3.5 DISCUSSÃO

As famílias de genes *VHP*, *PHT1* e *PHO1* foram identificadas e caracterizadas em plantas modelo como *Arabidopsis* e arroz, porém, até o momento as informações genômicas desses genes foram pouco exploradas em *Panicum* spp., o que limita a compreensão dos mecanismos moleculares e a regulação de Pi nessas espécies. No presente estudo, foi encontrado maior número de genes homólogos *VHP*, *PHT1* e *PHO1* na espécie tetraploide *P. virgatum* ($2n=4x=36$ cromossomos), em relação a espécie diploide *P. hallii* ($2n=18$ cromossomos). A quantidade de genes pode ser variável entre as gramíneas, uma vez que durante o processo evolutivo, os genomas podem sofrer rearranjos genômicos, eventos de duplicação, deleção e poliploidização, que resultam em alterações no número de cópias do gene, tamanho do genoma, nível de ploidia e número de cromossomos (GRUN *et al.*, 2017).

Foram identificados oito membros da família *VHP* em *P. hallii* e 14 membros em *P. virgatum*, os quais foram classificados filogeneticamente em dois grupos distintos: tipo I e tipo II, assim como em *Arabidopsis* (DROZDOWICZ; KISSINGER, REA, 2001). Em estudos anteriores, foi relatado menor número de genes *VHP* em

outras espécies, como três genes em *A. thaliana*, seis e sete genes em algodão (*Gossypium arboreum* e *Gossypium raimondii*) (ZHAO *et al.*, 2016), quatro em uva (*Vitis vinífera*) (SUN *et al.*, 2017), três em citros (*Citrus sinensis*) (HUSSAIN *et al.*, 2020), três em trigo (*Triticum aestivum*) (WANG *et al.*, 2009) e seis genes do tipo I em arroz (*O. sativa*) (LIU *et al.*, 2009; MUTO *et al.*, 2011). O maior número de genes VHP em *P. hallii* e *P. virgatum* pode ser atribuído a aspectos evolutivos e a natureza selvagem dessas espécies, em relação as plantas domesticadas.

O número de membros da família VHP que codificam enzimas H⁺-PPase do tipo I foi superior a quantidade de membros do tipo II em *Panicum* spp. (Tabela 1). Isso pode estar correlacionado com a função desses genes em diferentes organelas subcelulares. A atividade enzimática da H⁺-PPase do tipo I é descrita como dependente da concentração de K⁺ no citoplasma e está predominantemente localizada na membrana vacuolar. Enquanto, a atividade da H⁺-PPase do tipo II é independente de K⁺ e pode ser encontrada no complexo de Golgi (ZHOU *et al.*, 2020). Da mesma forma, os genes que *PhVHP1* e *PvVHP1* do tipo I foram localizados no vacúolo, no entanto, somente o gene *PvVHP2;1* pertencente ao grupo do tipo II foi detectado no complexo de Golgi (Tabela 1).

Os genes que codificam a H⁺-PPase do tipo I e II em *Arabidopsis* regulam o pH celular através da hidrólise do PPI. No entanto, o gene *AtVHP2* do tipo II, localizado no complexo de Golgi corresponde a menos de 0,2% da expressão do gene *AtVHP1* do tipo I, localizado nas membranas do vacúolo (SEGAMI *et al.*, 2010). Apesar da menor contribuição fisiológica na função vacuolar, o gene *AtVHP2* tem maior expressão em tricomas e filamentos do estame, em comparação ao gene *AtVHP1* (MITSUDA *et al.*, 2001).

As propriedades físico-químicas das proteínas H⁺-PPases do tipo I em *Panicum* spp. foram semelhantes a outras espécies de plantas (*Arabidopsis*, cevada, beterraba, tabaco, arroz, feijão mungo e abóbora), as quais apresentam de 761 a 771 aminoácidos, pI de aproximadamente 5,0 e massas moleculares que variando de 79,84 a 80,80 KDa (MAESHIMA, 2000). Além disso, as proteínas H⁺-PPases são hidrofóbicas e funcionam no bombeamento ativo de prótons através das membranas, por meio da hidrólise de moléculas de PPI (GAXIOLA; REGMI; HIRSCHI, 2016). As sequências de aminoácidos H⁺-PPases do tipo I e II, em ambas as espécies de *Panicum* spp., alinhadas pelo programa *ClustalW* compartilham em média 36% de identidade, assim, como foi relatado em *A. thaliana* (DROZDOWICZ;

KISSINGER; REA, 2001). Portanto, as diferenças entre as sequências de aminoácidos e a localização subcelular sugerem papéis biológicos distintos entre os dois tipos de *VHP* (SUN *et al.*, 2017).

Os membros da família *VHP* em *Panicum* spp. exibiram estruturas gênicas significativamente diferentes entre os grupos do tipo I e II (Figura 3). Além disso, os genes do tipo I apresentaram menor número de íntrons (2 a 7 íntrons), em relação aos genes do tipo II (8 a 13 íntrons) (Figura 3). Em diferentes espécies de plantas, os membros da família de genes H^+ -PPase pertencentes ao mesmo grupo filogenético também tiveram estruturas genéticas semelhantes (ZHAO *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2020).

As sequências de genes que apresentam múltiplos íntrons e variações de tamanho de íntrons favorecem a diversidade funcional das proteínas, por meio de *splicing* alternativo. No entanto, genes não interrompidos por íntrons exibem uma preferência transcricional e, portanto, codificam proteínas com restrita funcionalidade celular (YANG; WANG; KANG *et al.*, 2021). Então, a presença de íntrons nos genes H^+ -PPase do tipo I e II em *Panicum* spp. possibilita a geração de diferentes proteínas a partir de um único gene, o que pode ser vantajoso para essas espécies em condições de estresse.

Os motivos são curtas sequências de aminoácidos com propriedades altamente conservadas, encontrados nas estruturas das proteínas, que podem ter importantes funções biológicas (GOLOVIN; HENRICK, 2008). As sequências de proteínas H^+ -PPase do tipo I em *Panicum* spp. compartilharam motivos conservados (Figura 4). A dependência das proteínas H^+ -PPase do tipo I por íons de K^+ é determinada pelo motivo GNxxAAIG (ZHANG *et al.*, 2020). Nesse estudo, todas as sequências H^+ -PPase do tipo I previstas em *P. hallii* e *P. virgatum* apresentaram esse motivo (Figura 5). Além disso, outros dois motivos putativos foram sugeridos para ativação das H^+ -PPases: uma sequência (DVGADLVGKVE) de ligação ao PPI (MAESHIMA, 2000) e uma sequência (RQFNTIP) de ligação a 14-3-3, relacionada a condições de estresse abiótico (VENTER *et al.*, 2006).

A maioria das proteínas H^+ -PPase em *Panicum* spp. apresentaram o domínio de ligação ao PPI, exceto *PvVHP1;12* e *PvVHP2;1*. A ausência desse domínio pode ser resultado de uma anotação incompleta da estrutura gênica no banco de dados, pois um número menor de aminoácidos foi detectado nessas duas proteínas. As proteínas *PhVHP1;3/1;6* e *PvVHP1;5/1;6/1;11/1;12* não apresentaram

o domínio de ligação a 14-3-3 (Figura 5), portanto, essas proteínas podem ser menos responsivas ao estresse abiótico.

A análise *in silico* do perfil transcricional dos genes *VHP* em arroz mostrou que o gene *OsVHP1;1* é mais expresso nas folhas, enquanto, o gene *OsVHP1;2* tem maior expressão na radícula e meristema apical. Da mesma forma, esses genes foram descritos como altamente expressos entre os genes H⁺-PPases do tipo I em *O. sativa* (MUTO *et al.*, 2011). O nível de transcrição do gene *OsVHP1;1* é maior em folhas jovens, enquanto, *OsVHP1;2* é mais expresso em tecidos da bainha e raiz (LIU *et al.*, 2009). Portanto, supõem-se que os membros *VHP1* em *Panicum* spp. filogeneticamente relacionados a esses genes podem apresentar comportamento semelhante de expressão.

Os transportadores de fosfato foram identificados em diversas plantas e a família *PHT1* é a mais estudada por conter transportadores envolvidos na absorção de Pi da solução do solo, bem como na translocação de Pi da raiz para a parte aérea das plantas (MLODZINSKA; ZBOINSKA, 2016). Nesse estudo, foram identificados 12 genes em *P. hallii* e 23 genes em *P. virgatum* pertencentes a família de transportadores *PHT1*. O número de membros *PHT1* está relacionado ao nível de ploidia das gramíneas. Em espécies diploides foram relatados 12 membros *PHT1* em sorgo (*Sorghum bicolor*) (WANG *et al.*, 2019), em *Setaria italica* (CEASAR *et al.*, 2014), e em *Setaria viridis* (CEASAR, 2019), 13 membros em arroz (PASZKOWSKI *et al.*, 2002), em milho (*Zea mays*) (LIU *et al.*, 2016), e em *Brachypodium distachyon* (HONG *et al.*, 2012) e 17 membros em cevada (*Hordeum vulgare*) (SRIVASTAVA *et al.*, 2021), enquanto em trigo (*Triticum aestivum*) hexaploide foram detectados 36 membros *PHT1* (TENG *et al.*, 2017).

Em relação às propriedades físico-químicas, as proteínas *PHT1* das espécies de *Panicum* spp. tiveram valores próximos aos observados em *A. thaliana* e *O. sativa*. Com base na identidade das sequências e localizações subcelulares, os transportadores de fosfato são classificados em cinco famílias principais (*PHT1-5*). Em geral, as proteínas da família *PHT1* têm natureza hidrofóbica (NUSSAUME *et al.*, 2011) e ficam localizadas na membrana plasmática das plantas (WANG *et al.*, 2017). As proteínas *PHT1* em *Panicum* spp. foram caracterizadas como hidrofóbicas por apresentarem valor de GRAVY positivo (Tabela 2) e foram encontradas na membrana plasmática, o que é consistente com a funcionalidade de seus homólogos nas espécies *Arabidopsis* e arroz.

A maioria das sequências *PHT1* em *Panicum* spp. não tiveram mais que um íntron e foram localizados em grande parte nos cromossomos 7 e 9 (Figura 7 e Tabela 2). Comparado ao genoma de outras espécies de plantas, esses resultados foram compatíveis ao número de éxons e íntrons observados em genes *PHT1* de *Arabidopsis*, arroz, trigo (ZHANG *et al.*, 2019), *S. italica* (CEASAR *et al.*, 2014), sorgo (*Sorghum bicolor*) (WANG *et al.*, 2019), algodão (CAI; LIU; ZHOU, 2020), *Brassica napus* (LI *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2020) e maçã (*Malus domestica*) (SUN *et al.*, 2017), mostrando que a estrutura desses genes é altamente conservada em plantas.

Os membros *PHT1* identificados em *P. hallii* e *P. virgatum* foram agrupados e distribuídos por análise filogenética em quatro grupos, com base em sua homologia com as sequências e a classificação da espécie *O. sativa* (PASZKOWSKI *et al.*, 2002). O grupo I concentrou a maioria das proteínas *PHT1* das espécies analisadas, porém, as proteínas da *Arabidopsis* (eudicotiledônea), foram agrupadas separadamente das espécies gramíneas (monocotiledôneas) (Figura 6). A composição dos motivos nas sequências *PHT1* das espécies de *Panicum* spp. foi semelhante dentro do mesmo grupo filogenético. Dentre os 15 motivos, somente seis foram comuns entre as proteínas *PHT1* em *Panicum* spp.

O domínio conservado GGDYPLSATIxSE, típico das proteínas *PHT1* (KARANDASHOV; BUCHER, 2005), está localizado no motivo 1. A presença do motivo 1 foi observada em todas as proteínas *PHT1* de *Panicum* spp. O motivo 15 foi detectado apenas nos grupos I e IV, porém, a sua posição nas sequências proteicas foi diferente (Figura 8). O motivo é uma estrutura secundária da proteína e unidade constituinte do domínio, que estabelece a função de cada proteína. Portanto, diferentes motivos podem resultar na formação de domínios distintos, alterando assim a função da proteína (CAI; LIU; ZHOU, 2020). Isso significa que os membros agrupados nos grupos I e IV podem exercer funções diferentes dos demais membros da família *PHT1*.

A família de genes *PHT1* contém vários membros com sequência de aminoácidos conservados, mas que apresentam padrões de expressão específicos, que refletem em funções fisiológicas muitas vezes sobrepostas ou diferentes (NUSSAUME *et al.*, 2011). Com base na relação filogenética, seis membros da família *PHT1* em *P. hallii* e 12 membros em *P. virgatum* agruparam-se no grupo I, com seis proteínas da *Arabidopsis* e nove do arroz (Figura 6), que foram

funcionalmente caracterizadas e são preferencialmente expressas nas raízes e reguladas por concentrações de Pi (MLODZINSKA; ZBOINSKA, 2016).

Os genes *AtPHT1;1/1;2/1;3/1;4*, no grupo I, foram descritos como responsáveis pela aquisição direta de Pi em *Arabidopsis*, e são expressos em células da epiderme, raízes laterais, pelos radiculares e coifa (SHIN *et al.*, 2004; AYADI *et al.*, 2015). Em contraste a esses genes, os transportadores *AtPHT1;5/1;7*, também agrupados no grupo I, demonstram maior nível de transcrição em folhas e grãos de pólen, respectivamente (MUDGE *et al.*, 2002; NAGARAJAN *et al.*, 2011).

Os genes *OsPHT1;1* (SUN *et al.*, 2012), *OsPHT1;2* (AI *et al.*, 2009), *OsPHT1;3* (CHANG *et al.*, 2019), *OsPHT1;4* (ZHANG *et al.*, 2015), *OsPHT1;6* (AI *et al.*, 2009) e *OsPHT1;8* (JIA *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2015) em arroz, desempenham um amplo papel tanto na aquisição de Pi pelas raízes, quanto na translocação de Pi na parte aérea. Enquanto, os transportadores *OsPHT1;5/1;7/1;12* são os únicos membros do arroz, agrupados no grupo I, que foram relatados com maior nível de expressão em outros órgãos do que nas raízes (GU *et al.*, 2016).

Os membros *PHT1* em *Panicum* spp., assim como o arroz, não possuem homólogos ao gene *AtPHT1;6*. Resultados de análises transcricionais do genoma da *A. thaliana* indicam que oito dos nove genes *PHT1*, são predominantemente expressos nos tecidos radiculares e brotações, enquanto os transcritos *AtPHT1;6* são mais abundantes em flores (REMY *et al.*, 2012, LAPIS-GAZA; JOST; FINNEGAN, 2014). Os genes *PHT1* em gramíneas podem ter sofrido divergência funcional durante a evolução, pois a inflorescência de plantas monocotiledôneas é diferente de plantas eudicotiledôneas como a *Arabidopsis*, em vez de flores, as gramíneas apresentam uma inflorescência composta por espigas, racemos ou panículas (KELLOGG, 2022).

Os genes *PHT1* pertencentes ao mesmo grupo filogenético podem desempenhar funções semelhantes em resposta à deficiência de fósforo (WANG *et al.* 2017). Neste estudo, a análise *in silico* de dados de microarranjo de genes *PHT1* em arroz, mostrou que os genes *OsPHT1;1*, *OsPHT1;2* e *OsPHT1;3* agrupados no grupo I tiveram maior nível de expressão na maioria dos tecidos analisados (Figura 13). Os membros da família *PHT1* em *S. italica* (*SiPHT1;4*) e em trigo (*TaPHT1;1/1;2/1;9/1;10*), mais próximos filogeneticamente das sequências *OsPHT1;1/1;2/1;3*, foram regulados positivamente nas raízes, sob condições de baixo Pi (CEASAR *et al.*, 2014, TENG *et al.*, 2017). Da mesma forma, o

transportador *SbPHT1;2* em sorgo, homólogo as proteínas *OsPHT1;1* e *OsPHT1;3*, foi significativamente mais expresso nas raízes sob privação de P, enquanto, o transportador *SbPHT1;3*, homólogo a *OsPHT1;2*, teve maior expressão sob condições normais de P (WANG *et al.*, 2019). Portanto, as proteínas *PhPHT1;8/1;9/1;10* em *P. hallii* e *PvPHT1;14/1;17/1;18/1;20/1;23* em *P. virgatum* reunidas no grupo I e mais próximas filogeneticamente dos genes induzidos pela privação de Pi em arroz, também podem mediar a aquisição e a translocação de Pi nas raízes e na parte aérea das plantas.

Na análise filogenética, as proteínas *PHT1* de *Panicum* spp. incluídas nos grupos II e III apresentaram homologia com os transportadores *OsPHT1;11* e *OsPHT1;13*. Estudos demonstram que esses genes são induzidos pela colonização de fungos micorrízicos arbusculares (PASZKOWSKI *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2012). A absorção de Pi pelas raízes através da associação com fungos micorrízicos foi relatada em várias plantas, como batata (*Solanum tuberosum*) (RAUSCH *et al.*, 2001), tomate (*Solanum lycopersicum*) (CHEN *et al.*, 2014), soja (*Glycine max*) (TAMURA *et al.*, 2012), *S. italica* (CEASAR *et al.*, 2014), *B. distachyon* (HONG *et al.*, 2012), cevada (*Hordeum vulgare*) (SRIVASTAVA *et al.*, 2021), milho (*Zea mays*) (LIU *et al.*, 2016) e trigo (ZHANG *et al.*, 2019). No entanto, a *Arabidopsis* pertence à uma minoria de plantas que são incapazes de formar simbiose com fungos micorrízicos arbusculares (WANG *et al.*, 2017). Por esse motivo nenhuma proteína *PHT1* prevista em *Arabidopsis*, foi observada nos grupos II e III na análise filogenética com as espécies estudadas (Figura 6).

As espécies *Panicum* spp. apresentaram mais de um gene homólogo a única cópia de *OsPHT1;11*, sendo observados dois genes em *P. hallii* e cinco genes em *P. virgatum*. A ativação do gene *OsPHT1;11* por meio de simbiose foi relatada como independente da disponibilidade de fósforo na rizosfera (PASZKOWSKI *et al.*, 2002). Enquanto, o gene *OsPHT1;13* é conservado em espécies Poaceae e atua na sinalização e associação com micorrizas, sugerindo que as gramíneas adquiriram uma estratégia específica para a aquisição de Pi através da simbiose. Além disso, as gramíneas, com exceção do arroz, costumam apresentar duplicação de genes homólogos ao *OsPHT1;13*, resultando em uma pequena subfamília de genes de dois a quatro membros (YANG *et al.*, 2012). Os resultados desse trabalho corroboram com essa afirmação, sendo encontrados três genes em *P. hallii* e quatro genes em *P. virgatum* correspondentes a *OsPHT1;13*. Portanto, os genes *PHT1* em

Panicum spp. pertencentes aos grupos II e III podem exibir a mesma função biológica em sistemas de captação de Pi por simbiose.

Os transportadores *PHT1* em *Panicum* spp. no grupo IV, podem atuar na captação e na translocação de Pi da raiz à parte aérea, por estarem agrupados na árvore filogenética com os transportadores *AtPHT1;8/1;9* e *OsPHT1;9/1;10*. Os genes *AtPHT1;8* e *AtPHT1;9*, em *Arabidopsis*, são expressos nas raízes sob condições deficientes de Pi, porém, a principal função dessas proteínas está na translocação de Pi da raiz para a parte aérea e não na absorção de Pi da solução do solo pela raiz (REMY *et al.*, 2012; LAPIS-GAZA; JOST; FINNEGAN, 2014). Por outro lado, os genes *OsPHT1;9* e *OsPHT1;10* demonstram papéis na absorção de Pi, sendo induzidos pela falta de Pi, em raízes e folhas de arroz (WANG *et al.*, 2014).

A família de genes *PHO1* também desempenha um papel importante no transporte de Pi das raízes para a parte aérea e, é responsável pela regulação da exportação de Pi das células epidérmicas e corticais da raiz para o xilema (WANG *et al.*, 2018). Nesse estudo, foram identificados três membros da família *PHO1* em *P. hallii* e seis membros em *P. virgatum*. Em espécies monocotiledôneas diploides como arroz, milho, sorgo e *B. distachyon* o número de dois a três membros *PHO1* foram relatados (SECCO; BAUMANN; POIRIER, 2010). Comparado com essas espécies, *P. hallii* por ser gramínea diploide apresenta número de genes semelhante, enquanto, *P. virgatum* por apresentar evento de duplicação do genoma e ser tetraploide tem o dobro de genes *PHO1*. Por isso, um homólogo *PHO1* em *P. hallii* foi correspondente a cada gene *PHO1* em arroz, enquanto, dois homólogos foram encontrados em *P. virgatum* (Figura 9).

A análise filogenética entre as proteínas *PHO1* revelou a formação de dois grupos principais, onde as espécies gramíneas apresentaram membros *PHO1* somente no grupo I, enquanto, a *Arabidopsis* possui membros nos grupos I e II (Figura 9). No grupo I, as proteínas *PHO1* identificadas em *P. hallii* e *P. virgatum* agruparam-se com as proteínas *AtPHO1* e *AtPHO1;H1* da *Arabidopsis* e *OsPHO1;1/1;2/1;3* do arroz, que são conhecidas por estarem envolvidas na transferência de Pi das raízes para a parte aérea das plantas, em condições de deficiência de Pi (STEFANOVIC *et al.*, 2007; SECCO; BAUMANN; POIRIER, 2010). Além disso, a distribuição dos membros *PHO1* em diferentes subgrupos foi semelhante nas espécies gramíneas (Figura 9).

Os demais membros da família *PHO1* em *Arabidopsis* (*AtPHO1;H2* a *H10*) formaram o grupo II, cuja as funções ainda são pouco conhecidas (GU *et al.*, 2016). O gene *AtPHO1;H3* está envolvido na supressão do transporte de Pi da raiz para a parte aérea sob condições deficientes de zinco (KHAN *et al.*, 2014), *AtPHO1;H4* desempenha um papel no crescimento de hipocótilos à luz azul, no tamanho da semente e na floração (NEZAMIVAND-CHEGINI *et al.*, 2021), enquanto, o gene *AtPHO1;10* foi descrito recentemente na modulação de antocianina em folhas de *Arabidopsis* sob estresse por alta luminosidade (SHENG *et al.*, 2022). De acordo com essas informações, os membros do grupo II, exclusivos da espécie *Arabidopsis*, podem desempenhar funções que são bastante distintas do grupo I.

Os genes *PHO1* em *P. hallii* e *P. virgatum* codificam longas proteínas que variam entre 769 e 853 aminoácidos e estão localizadas na membrana celular, e *PhPHO1;1* e *PvPHO1;2* também estão presentes no vacúolo. A localização putativa dessas proteínas na membrana e a propriedade hidrofílica reforça a sua atividade de transporte de Pi entre as células. A metade N-terminal das proteínas PHO1 é principalmente hidrofílica e contém um domínio SPX tripartido, enquanto, a metade C-terminal tem domínio EXS hidrofóbico e seis potenciais domínios de transmembrana (WANG *et al.*, 2004).

O número de íntrons e os motivos conservados das proteínas PHO1 em *Panicum* spp. foram semelhantes em subgrupos formados por genes homólogos ao arroz (Figura 10 e 11). A estrutura gênica da família *PHO1* pode variar entre 7 e 14 íntrons em plantas, no entanto, dentro de cada subgrupo filogenético essa característica não parece sofrer muitas variações (HE *et al.*, 2013). Portanto, as sequências de genes *PHO1* com múltiplos íntrons e motivos específicos distribuídos em subgrupos favorece a diversidade de proteínas, o que pode contribuir para uma divergência funcional desses genes em gramíneas.

De acordo com os dados de microarranjos disponíveis no *Rice – eFP Browser*, a maioria dos membros da família *PHO1* em arroz apresentam baixa expressão em diferentes tecidos em condições normais de crescimento. No entanto, o gene *OsPHO1;1* é expresso principalmente na inflorescência, enquanto o nível de expressão do gene *OsPHO1;3* é maior na radícula. Em estudo realizado por Secco; Baumann; Poirier (2010), o nível de expressão do gene *OsPHO1;2* senso nas raízes do arroz, foi superior aos genes *OsPHO1;1* e *OsPHO1;3*. No entanto, os autores

observaram que o transcrito *OsPHO1;2* senso é relativamente estável, enquanto, o transcrito anti-senso é altamente induzido pela deficiência Pi.

Os genes *AtPHO1* e *AtPHO1;H1* em *Arabidopsis*, agrupados no grupo I nesse trabalho, estão envolvidos no transporte de Pi nos vasos do xilema (HAMBURGER *et al.*, 2002) e também são regulados pela deficiência de Pi (STEFANOVIC *et al.*, 2007). Portanto, os membros da família *PHO1* em *Panicum* spp. pertencentes ao grupo I podem estar envolvidos no transporte de Pi através do xilema e contribuir para a adaptação e a sobrevivência de plantas em condições deficientes de Pi.

3. 6 CONCLUSÃO

As proteínas VHP, PHT1 e PHO1 dentro de cada subfamília são muito semelhantes nas duas espécies de *Panicum* spp. Portanto, a caracterização *in silico* de espécies da subfamília Panicoideae, como o *P. hallii* e *P. virgatum* pode servir como base para a seleção de genes candidatos a validação em relação ao transporte e metabolismo de fósforo em espécies relacionadas. Experimentos adicionais são necessários para a compreensão das funções biológicas e de mecanismos regulatórios desses genes em plantas, sob deficiência de fósforo.

4 CAPITULO 2

Expressão relativa de genes transportadores de fosfato e desempenho de *Megathyrsus maximus* cv. Mombaça e cv. Aruana sob baixo fósforo

RESUMO

Em solos tropicais, a baixa disponibilidade de P é um fator limitante para o aumento da produtividade de gramíneas forrageiras. Compreender os mecanismos envolvidos na absorção e transporte de P pelas plantas é essencial para aumentar a eficiência de uso de P em pastagens e reduzir a aplicação de fertilizantes fosfatados. O objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil de transcrição de genes transportadores de P e o desempenho de *Megathyrsus maximus*, sob baixo P. Foram utilizadas duas cultivares de *M. maximus* (Mombaça e Aruana), em sistema hidropônico, com baixa e adequada disponibilidade de P. A análise transcricional foi realizada em membros das famílias gênicas *VHP1*, *PHT1* e *PHO1* relacionadas ao transporte de P. A seleção dos genes foi baseada em análises *in silico* nos genomas das espécies *Panicum* spp. disponíveis no *Phytozome* v 13 e dados de transcrição em arroz pelo banco eFP *Browser*. O desempenho das cultivares foi avaliado após 21 dias de crescimento nas doses de P, por meio de parâmetros produtivos, composição nutricional e análise bromatológica. Com base na comparação filogenética entre as espécies *Panicum* spp. e o perfil de expressão do arroz, foram desenhados iniciadores para quatro genes *MmVHP1*, *MmPHT1*, e *MmPHO1b*, *MmPHO1c*, que foram analisados em folhas e raízes de *M. maximus*. Nas folhas das cultivares de *M. maximus*, houve menor expressão do gene *MmVHP1* e maior expressão dos genes *MmPHT1* e *MmPHO1b*, em resposta à baixo P. Nas raízes, a expressão do gene *MmPHT1* foi regulada positivamente. *MmPHO1c* apresentou baixa expressão e não foi induzido pelos tratamentos. A baixa disponibilidade de P reduziu o número de folhas, o perfilhamento, a biomassa da parte aérea e a qualidade bromatológica de ambas as cultivares, no entanto, essas plantas apresentaram maior comprimento, área de superfície e ramificações de raízes com diâmetro inferior a 0,5 mm. A cv. Aruana apresentou maior teor de P nos tecidos, porém, a produção de biomassa foliar não se diferiu da cv. Mombaça. A qualidade da cv. Mombaça foi afetada pelo aumento de lignina e diminuição de hemicelulose em baixo P.

Palavras-chave: Pastagens. Estresse abiótico. RT-qPCR. Eficiência do uso de fósforo.

ABSTRACT

Relative expression of phosphate transporter genes and performance of *Megathyrsus maximus* cv. Mombaça and cv. Aruana under low phosphorus

In tropical soils, the low availability of P is a limiting factor for increasing the productivity of forage grasses. Understanding the mechanisms involved in P uptake and transport by plants is essential to increase the efficiency of P use in pastures and reduce the application of phosphate fertilizers. The objective of this work was to evaluate the transcription profile of P transporter genes and the performance of *Megathyrsus maximus* under low P. Two *M. maximus* cultivars (Mombaça and Aruana) were used in a hydroponic system, with low and adequate P availability. Transcriptional analysis was performed on members of the *VHP1*, *PHT1* and *PHO1* gene families related to P transport. was based on in silico analyzes on the genomes of *Panicum* spp. available in *Phytozome* v 13 and rice transcription data from the eFP *Browser* database. The performance of the cultivars was evaluated after 21 days of growth in the doses of P, through productive parameters, nutritional composition and bromatological analysis. Based on the phylogenetic comparison between *Panicum* spp. and the rice expression profile, primers were designed for four genes *MmVHP1*, *MmPHT1*, and *MmPHO1b*, *MmPHO1c*, which were analyzed in leaves and roots of *M. maximus*. In the leaves of *M. maximus* cultivars, there was lower expression of the *MmVHP1* gene and higher expression of the *MmPHT1* and *MmPHO1b* genes, in response to low P. In the roots, the expression of the *MmPHT1* gene was upregulated. *MmPHO1c* showed low expression and was not induced by the treatments. Low P availability reduced the number of leaves, tillering, shoot biomass and bromatological quality of both cultivars, however, these plants showed greater length, surface area and forks of roots with diameter less than 0.5 mm. The cv. Aruana showed higher P content in the tissues, however, the production of leaf biomass did not differ from cv. Mombaça. The quality of cv. Mombaça was affected by increased lignin and decreased hemicellulose at low P.

Keywords: Pastures. Abiotic stress. RT-qPCR. Efficiency of phosphorus use.

4.1 INTRODUÇÃO

As gramíneas forrageiras são a principal fonte de alimento na produção pecuária e podem ser utilizadas como plantas de cobertura de solo em sistemas integrados de produção agrícola. Dentre as gramíneas mais cultivadas em áreas de pastagens, a espécie *Megathyrus maximus* se destaca por apresentar alta produtividade de matéria seca, qualidade nutricional, capacidade de suportar o pastoreio intensivo e sistema radicular bem desenvolvido e profundo que conferem resistência à seca. No entanto, essa espécie é exigente em nutrientes e, a deficiência de fósforo é uma das principais barreiras para o seu desenvolvimento, impedindo a sua expansão em regiões tropicais.

Os solos brasileiros naturalmente possuem baixa disponibilidade de P e alta capacidade de adsorção desse nutriente, devido ao material de origem pobre em P, à acidez e a altos teores de óxidos de ferro e alumínio, não atendendo às necessidades nutricionais de *M. maximus*. Nesses solos, o uso de corretivos e fertilizantes fosfatados de acordo com a demanda da gramínea é essencial para o estabelecimento e a manutenção das pastagens.

Os fertilizantes fosfatados são provenientes de rochas minerais não renováveis, o que vem tornando esse recurso oneroso para a reposição de P extraído pelas plantas forrageiras. Portanto, para alcançar um equilíbrio entre o fornecimento de P via adubação e a demanda exigida pelas gramíneas, a detecção de cultivares com maior eficiência de uso de P (EUP) é fundamental para evitar a degradação dos solos e manter a produtividade das pastagens de maneira sustentável.

As cultivares de gramíneas forrageiras, até o momento, foram selecionadas sob condições não limitantes de P. Portanto, reduzir o aporte de fertilizantes sem afetar a produtividade requer um conhecimento aprofundado das respostas adaptativas dessas cultivares à baixa disponibilidade de P. Os mecanismos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos envolvidos na absorção, transporte, assimilação e remobilização de P, bem como, as informações à nível molecular em culturas e plantas modelo, têm sido amplamente estudados para identificar as alterações associadas a EUP.

A identificação de genes envolvidos na absorção e no transporte interno de P, cuja expressão é alterada em resposta a deficiência de P pode contribuir para o

melhoramento genético das culturas em relação ao uso de P e reduzir a necessidade de aplicação de fertilizantes fosfatados. A regulação da expressão dos genes *VHP1*, *PHT1* e *PHO1*, responsáveis pelo bombeamento de prótons para o vacúolo, absorção, translocação e transporte de Pi pelo xilema da raiz para a parte aérea, respectivamente, podem promover o crescimento de plantas e a adaptação à deficiência de P. Assim, a seleção de cultivares com base em características que melhorem a absorção e o uso interno de P pode reduzir os custos de produção e aumentar a produtividade das pastagens.

4.2 OBJETIVO

O objetivo deste capítulo foi avaliar o perfil transcricional de genes transportadores de fósforo e o desempenho de duas cultivares de *Megathyrsus maximus*, sob deficiência de fósforo.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Material vegetal e condições de crescimento

O experimento foi realizado em casa de vegetação, no Campus 2 da Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), no município de Presidente Prudente – SP, no período da primavera de 2021. As sementes de duas cultivares diferentes de *M. maximus* (cv. Mombaça e cv. Aruana), foram germinadas em bandejas plásticas contendo substrato (Carolina soil[®]) autoclavado, composto pela mistura de turfa e vermiculita. As mudas com 15 dias de idade, foram transferidas para vasos de plástico, contendo 8 L de solução de *Hoagland* padrão (HOAGLAND; ARNON, 1950), com meia força de concentração. Cada vaso continha duas plantas que foram fixadas no topo do vaso pelo uso de espuma sintética.

Após cinco dias de crescimento em hidroponia as plantas foram transferidas para os tratamentos compostos por duas concentrações de fósforo 0,05 mM e 1 mM de KH_2PO_4 , equivalentes a baixa e adequada disponibilidade de P no solo (1,56 e 31,25 mg dm³) para o cultivo de *M. maximus* (PEREIRA *et al.*, 2018). A solução nutritiva de *Hoagland* foi composta por: 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 5 mM de KNO_3 ; 2 mM

MgSO₄; 0,1 mM Fe-EDTA (Na); 46 µM H₃BO₃; 9,15 µM MnCl₂·4H₂O; 0,734 µM ZnCl₂, 0,298 µM CuCl₂ e 0,1 µM NaMoO₄·H₂O. Para equilibrar a concentração de K⁺ no tratamento com baixo nível de P foi usado 0,95 mM de KCl. O pH foi ajustado para 5,8 com a adição de soluções de ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH). As soluções nutritivas foram continuamente aeradas e renovadas uma vez por semana.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação sob luz natural (1800 µmol fótons m⁻² s⁻¹), temperatura média de 26°C ± 4°C e umidade relativa de 70%. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram dispostos em arranjo fatorial 2 x 2, sendo duas cultivares e dois níveis de fósforo, com 6 repetições. Após 21 dias de crescimento nos tratamentos com P, as plantas foram coletadas separando-se a parte aérea das raízes para a determinação de parâmetros produtivos, teor de P, características morfológicas da raiz e bromatológicas foliares. Além disso, uma parte das amostras foliares e radiculares foi congelada imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para extração de RNA total.

4.3.2 PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)

4.3.2.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de folhas e raízes utilizando o reagente Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) conforme protocolo da empresa fabricante. As amostras foram tratadas com a enzima Turbo DNase (Ambion) para eliminar contaminação com DNA genômico, seguindo o protocolo do fabricante. A concentração do RNA total extraído foi mensurada por espectrofotometria a 260 nm, a qualidade foi estimada pela razão 260/280 nm, a integridade e a ausência de DNA genômico foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v).

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada de acordo com as instruções do EasyScript® First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (TransGen Biotech, China). O cDNA foi submetido a reação de PCR com os iniciadores específicos de cada gene para verificar a amplificação do fragmento esperado. Para

a reação de PCR foi utilizado o protocolo Platinum™ PCR SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguida de amplificação nas condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 min, e 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, hibridização a 60°C por 30 s, extensão a 72°C por 45 s e extensão final a 72°C por 5 min. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v).

4.3.2.2 Seleção de genes

Para a análise dos níveis de expressão dos genes *VHP1*, *PHT1* e *PHO1* em *M. maximus* em resposta a deficiência de fósforo, devido à ausência de genoma sequenciado dessa espécie, foram realizadas buscas de genes candidatos nas espécies já sequenciadas de *Panicum* spp. As sequências Pahal.4G069800.1 (*PhVHP1;4*), Pahal.9G602700.1 (*PhPHT1;10*), Pahal.5G445000.1 (*PhPHO1;3*), Pahal.1G440700.1 (*PhPHO1;1*) e Pahal.4G246400.1 (*PhPHO1;2*) da espécie diploide *P. hallii*, homólogas aos genes com maior nível de expressão na raiz e na parte aérea do arroz (Capítulo 1), foram escolhidas para o desenho de iniciadores utilizados na análise de expressão de genes ortólogos em *M. maximus*, os quais foram referidos como *MmVHP1*, *MmPHT1*, *MmPHO1;a*, *MmPHO1;b* e *MmPHO1;c* respectivamente.

As sequências de codificação (CDS) dos genes selecionados, juntamente com as sequências das gramíneas *P. virgatum* e *O. sativa* pertencentes ao mesmo grupo filogenético, foram alinhadas através da plataforma *ClustalW* (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) para identificação de regiões conservadas e escolha de iniciadores específicos para *Panicum* spp.

4.3.2.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

O desenho dos iniciadores foi realizado no programa *Primer3* (versão 4.1.0) (<https://primer3.ut.ee/>) (KORESSAAR *et al.*, 2018). Os parâmetros estabelecidos foram: iniciadores com temperatura de anelamento de 58 a 60°C, “*amplicons*” de 80 a 120 pares de bases, comprimento de 18 a 24 pares de bases e conteúdo GC de 30 a 80%. Os iniciadores, também, foram avaliados utilizando o *Multiple Primer Analyzer* (ThermoFisher) (<https://www.thermofisher.com/multiple-primer-analyzer.html>) para verificar a formação de dímeros e de grampos. A confirmação da

especificidade dos iniciadores foi realizada no site *Primer-BLAST* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

4.3.2.4 RT-qPCR

As reações da PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas com 1 µL de cDNA, 5 µL de SYBR™ Green, 0,4 µL de cada um dos iniciadores específicos senso e antisenso (5 µM) e água Milli-Q autoclavada para o volume final de 10 µL. Três repetições biológicas e três repetições técnicas foram testadas para cada amostra. A amplificação por PCR foi realizada pelo equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), seguindo as condições: 95°C por 2 min, 95°C por 30 s e extensão a 60°C por 30 s, com ciclo repetido por 40 vezes. A curva de dissociação foi determinada no final das reações de RT-qPCR para cada par de iniciadores e a eficiência de amplificação foi calculada utilizando o programa *LinRegPCR* (RAMAKERS *et al.*, 2003). Além disso, foi realizada a reação da PCR convencional, usando os pares de iniciadores, seguida de eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v). *Eukaryotic initiation factor 4 A (eIF4a)* foi utilizado como gene de referência para normalizar os níveis de expressão (TAKAMORI *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2021). A quantificação relativa da expressão de cada gene foi calculada pelo método $2^{-\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.3.3 Características morfogênicas e estruturais

Para a avaliação das características morfogênicas, foram medidos no início e após 21 dias de crescimento das plantas nos tratamentos com P o comprimento da lâmina das folhas expandidas e feita a contagem do número de novas folhas e perfilhos surgidos em cada tratamento. A partir dos dados coletados, foram realizados cálculos para determinação das seguintes variáveis: taxa de aparecimento foliar (TApF), em folhas planta⁻¹ dia⁻¹; taxa de alongamento foliar (TAIF), em cm planta⁻¹ dia⁻¹; taxa de aparecimento de perfilhos (TApP), em perfilho planta⁻¹ dia⁻¹ e filocrono, em dias folha⁻¹ (SANTOS *et al.*, 2011).

4.3.4 Parâmetros produtivos e nutricionais

A massa fresca da parte aérea e do sistema radicular foram determinadas após os tecidos serem lavados e secos em temperatura ambiente. A massa seca foi determinada após secagem em estufa de circulação de ar a 60°C, até a obtenção de peso constante. Amostras foliares e radiculares, após a secagem, foram trituradas separadamente e submetidas a análise nutricional para determinação dos teores de fósforo, conforme metodologia descrita por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997).

4.3.5 Características morfológicas radiculares

As raízes frescas após a pesagem foram cortadas em aproximadamente 1,5 cm e armazenadas em álcool 70%, à 4°C, até serem analisadas. As raízes foram colocadas individualmente em uma bandeja de acrílico transparente, com uma lâmina de água de aproximadamente um centímetro e espalhadas para que não houvesse sobreposição. As características morfológicas radiculares foram obtidas por meio da análise de imagens pelo *software WinRhizo* (Regent Instruments Canadá INC., versão 2016), acoplado a um *scanner*, Epson XL 10000. Foram mensurados o comprimento linear total (cm), a área de superfície (cm²), o diâmetro médio (mm) e o volume (cm³) das raízes. As raízes também foram classificadas em classes por diâmetro: ($\leq 0,5$ mm), ($0,5 \leq 1,0$ mm), ($1 \leq 1,5$ mm) e ($> 1,5$ mm).

4.3.6 Análises bromatológicas

Amostras da parte aérea, após a secagem definitiva em estufa a 105°C, foram moídas em moinho do tipo *Willey*, com peneira de crivo 0,85 mm e submetidas às análises bromatológicas. A proteína bruta (PB) foi determinada pelo método micro-Kjehldal, multiplicando-se o nitrogênio total pelo fator de conversão 6,25. Os teores de matéria mineral, nutrientes digestíveis totais (NDT), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina foram determinados segundo Silva; Queiroz (2002). Os teores de celulose e hemicelulose foram calculados pelas diferenças entre FDA e lignina, e entre FDN e FDA, respectivamente. Os resultados foram expressos em porcentagem com base na matéria seca (% MS).

4.3.7 Análise estatística

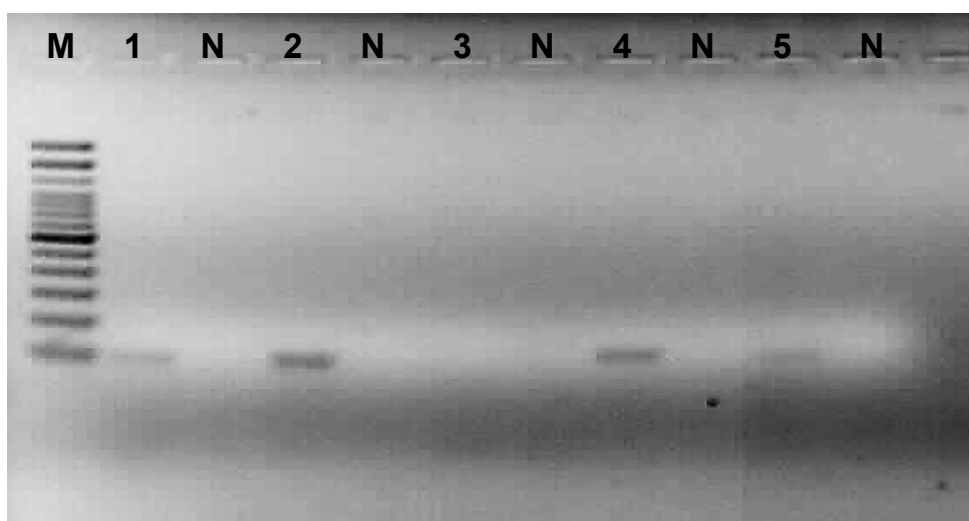
A análise estatística dos dados foi realizada no software R versão 4.1.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2021). Para atender aos pressupostos da análise de variância de duas vias (ANOVA), primeiramente, os dados foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk para a normalidade dos resíduos e de Levene para verificação da homogeneidade das variâncias ($P > 0,05$). Os dados foram transformados quando necessário, via $\ln(x)$ para satisfazer os pré-requisitos da ANOVA. O teste post hoc de Tukey foi aplicado para a comparação entre as médias com diferença significativa ($P \leq 0,05$), usando o pacote R/emmeans.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Seleção de iniciadores

A especificidade de amplificação dos iniciadores foi confirmada por PCR convencional e curva de dissociação de RT-qPCR utilizando um *bulk* das amostras de *M. maximus*. Com exceção do gene *MmPHO1;a*, houve amplificação de uma única banda corresponde a cada gene candidato pela reação da PCR, seguida de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Figura 15).

Figura 15 – Amplificação de genes candidatos utilizando cDNA de *M. maximus* por PCR convencional e coloração com brometo de etídio, em gel de agarose (1,5%).



M – Marcador, Iniciadores: 1 – *MnPHT1*, 2 – *MmVHP1*, 3 – *MmPHO1;a*, 4 – *MmPHO1;b*, 5 – *MmPHO1;c* e N – Negativo com os respectivos iniciadores sem a aplicação de amostra de cDNA.

As curvas de dissociação geradas na amplificação por RT-qPCR mostraram um único pico, exceto para o gene *MmPHO1;a*, confirmando a especificidade da maioria dos iniciadores. As sequências de iniciadores, tamanho de amplicons e valores de eficiência de amplificação foram determinadas para cada par de iniciador (Tabela 4). A eficiência média de amplificação dos genes candidatos variou de 86,33 a 94,88. (Tabela 4). A eficiência do gene *MmPHO1;a* não foi calculada por apresentar múltiplos picos na reação de RT-qPCR.

Tabela 4 – Sequências de iniciadores utilizados para análise quantitativa de transcriptase reversa RT-qPCR em *M. maximus*.

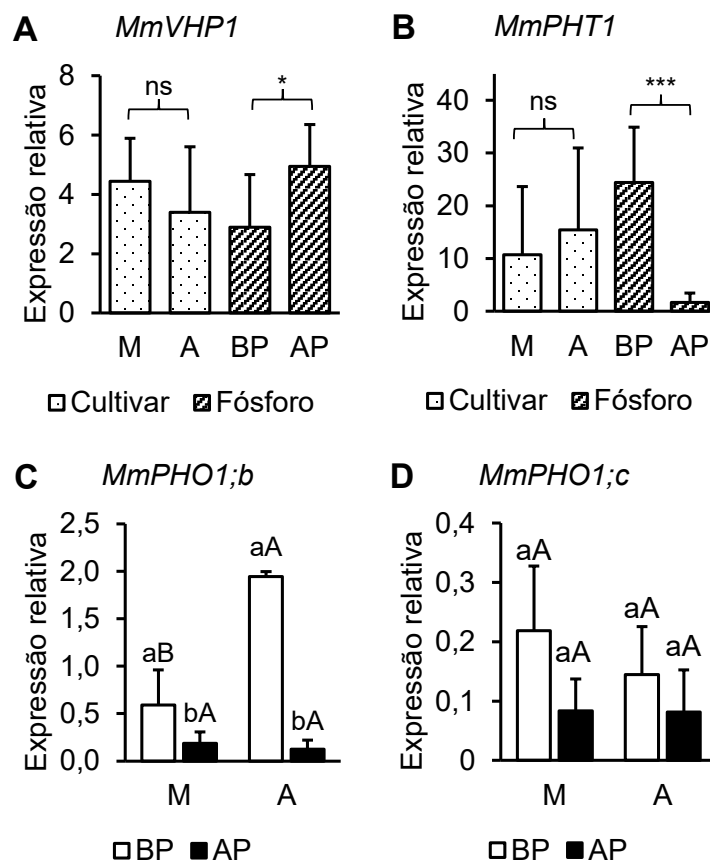
Gene	Descrição	ID Sequência <i>P. hallii</i>	Iniciador senso (5'-3')	Iniciador antisenso (5'-3')	Amplicon (pb)	Eficiência (%)
<i>MmVHP1</i>	Vacuolar H ⁺ - Pirofosfatase	Pahal.4G069800.1	ACCACCAAGCCTGACTATGC	AGGGGTGAGCATGACAAGTG	96	89,55
<i>MmPHT1</i>	<i>Phosphate transporter 1</i>	Pahal.9G602700.1	TCTGCTTCTTCCGCTTCTGG	CGGGTCTTCTTGTGGCGTA	94	86,33
<i>MmPHO1;b</i>	<i>Phosphate 1</i>	Pahal.1G440700.1	AGGAGAGCTTGGAGTCGGAT	GCGTCGCGTAGAACTTGTTTC	117	90,25
<i>MmPHO1;c</i>	<i>Phosphate 1</i>	Pahal.4G246400.1	TCAACATCCCAGTCACCACG	GCTACCATGTGTGCCAGTCT	104	94,88
<i>eIF4a</i>	Eukaryotic initiation factor 4 A	Gene Normalizador	CAGGTGTCCCTGGTCATCAACTAT	GAAACGACCTCTACGACCAATGC	81	100,50

Para a análise de expressão relativa foi descartado o gene *MmPHO1;a* por não demonstrar amplificação específica. Os iniciadores dos genes *MmVHP1*, *MmPHT1*, *MmPHO1;b* e *MmPHO1;c* por apresentarem especificidade de amplificação e foram selecionados para a expressão gênica em *M. maximus*.

4.4.2. Expressão de genes de *M. maximus*

A expressão relativa dos genes *MmVHP1* e *MmPHT1* nas folhas das plantas foi afetada pelos níveis de P na solução nutritiva, porém a expressão desses genes não se diferenciou entre as cultivares (Figura 16A e B). A expressão média do gene *MmVHP1* foi menor nas folhas de plantas cultivadas em baixo P, em comparação as plantas sob P adequado (Figura 16A). Por outro lado, a expressão média do gene *MmPHT1* foi 14 vezes maior nas folhas de plantas cultivadas em baixo P (Figura 16B). A interação entre as cultivares e os níveis de P teve efeito significativo na expressão do gene *MmPHO1;b* nas folhas das plantas (Figura 16C).

Figura 16 – Expressão relativa de genes em folhas de duas cultivares de *M. maximus* submetidas a diferentes níveis de fósforo.

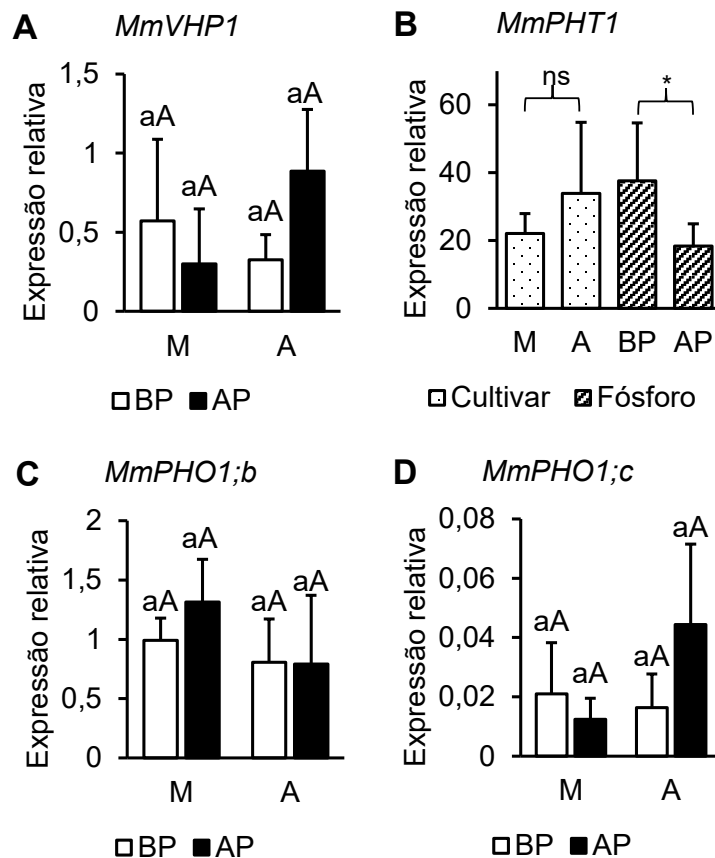


Cultivar Mombaça (M) e Aruana (A), baixa (BP) e adequada (AP) disponibilidade de fósforo. Barras de \pm desvio padrão ($n=6$ para cultivar e fósforo, $n=3$ para interação cultivar*fósforo). Médias seguidas por letras maiúsculas comparam cultivares e letras minúsculas comparam disponibilidade de P. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os asteriscos *** $p \leq 0,001$ e * $p \leq 0,05$ indicam diferenças significativas e ns não significativa, quando não houve interação entre os fatores.

Os transcritos do gene *MmPHO1;b* foram três vezes maiores nas folhas da cv. Aruana, em relação a cv. Mombaça sob condição de baixo fornecimento de P (Figura 16C). Além disso, a cv. Mombaça e a cv. Aruana apresentaram três e 16 vezes maior expressão do transportador *MmPHO1;b* nas folhas, quando o fornecimento de P foi reduzido, em comparação as plantas sob adequado P (Figura 16C). A expressão do gene *MmPHO1;c* nas folhas não diferiu entre as cultivares e as doses de P (Figura 16D).

A interação entre as cultivares e os níveis de P não teve efeito significativo para a expressão dos genes *MmVHP1*, *MmPHO1;b* e *MmPHO1;c* nas raízes das plantas (Figura 17A, C e D). No entanto, a disponibilidade de P na solução afetou significativamente a expressão do gene *MmPHT1* nas raízes das plantas (Figura 17 B), cuja expressão média foi duas vezes maior nas raízes sob baixo fornecimento de P, em comparação com a média de plantas em adequado P (Figura 17B).

Figura 17 – Expressão relativa de genes em raízes de duas cultivares de *M. maximus* submetidas a diferentes níveis de fósforo.



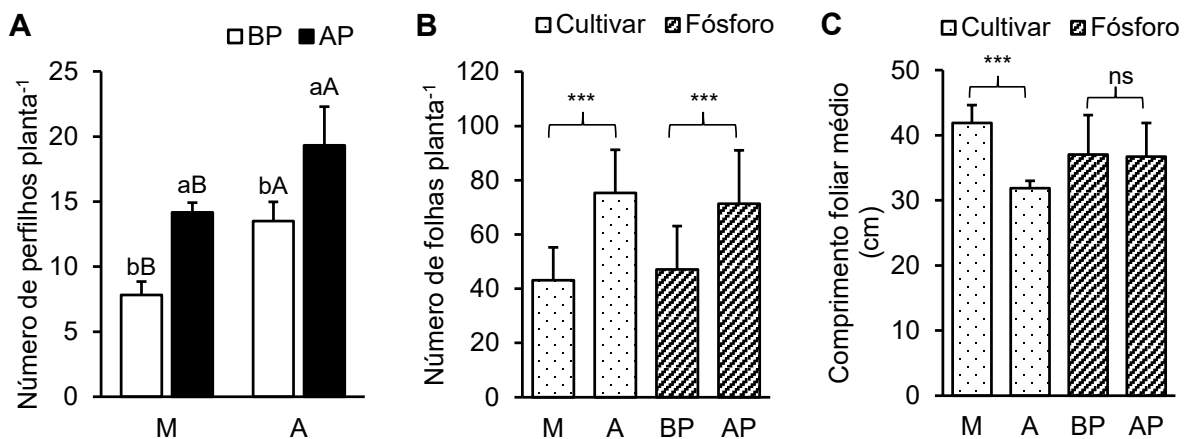
Cultivar Mombaça (M) e Aruana (A), baixa (BP) e adequada (AP) disponibilidade de fósforo. Barras de \pm desvio padrão (n=6 para cultivar e fósforo, n=3 para interação cultivar*fósforo). Médias seguidas

por letras maiúsculas comparam cultivares e letras minúsculas comparam disponibilidade de P. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os asteriscos *** $p \leq 0,001$ e * $p \leq 0,05$ indicam diferenças significativas e ns não significativa, quando não houve interação entre os fatores.

4.4.3 Características morfogênicas de cultivares de *M. maximus*

As concentrações de fósforo avaliadas afetaram o crescimento das cultivares de *M. maximus* (Figura 18). A cv. Aruana apresentou maior número de perfilhos por planta, quando comparada com a cv. Mombaça, em ambas as doses de P. As cultivares demonstraram maior perfilhamento quando o fornecimento de P foi adequado, sendo observado acréscimos de 80,84% no número de perfilhos planta⁻¹ para cv. Mombaça e 43,19% para cv. Aruana, em relação ao tratamento com baixo P (Figura 18A).

Figura 18 – Características estruturais vegetativas de duas cultivares de *M. maximus* cultivadas em solução nutritiva sob baixa e adequada disponibilidade de fósforo.



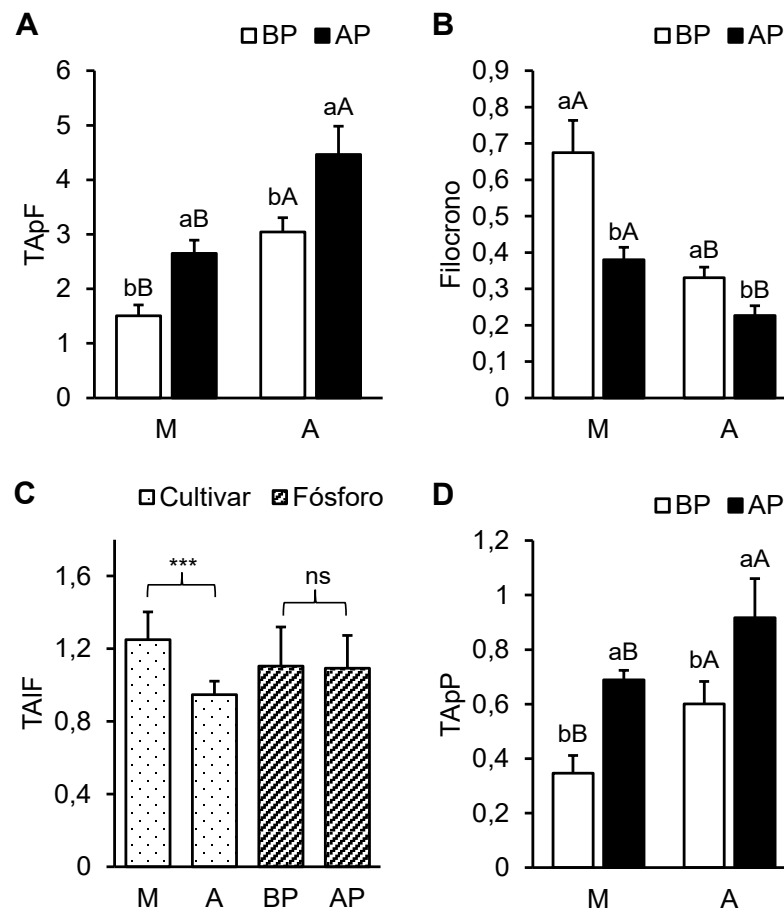
Cultivar Mombaça (M) e Aruana (A), baixa (BP) e adequada (AP) disponibilidade de fósforo. As médias e as barras de \pm desvio padrão são referentes aos dados não transformados ($n=12$ para cultivar e fósforo, $n=6$ para interação cultivar*fósforo). Para análise estatística e separação das médias, o número de perfilhos e folhas por planta foram transformados por $\ln(x)$. Médias seguidas por letras maiúsculas comparam cultivares e letras minúsculas comparam disponibilidade de P. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os asteriscos *** $p \leq 0,001$ indicam diferenças significativas e ns não significativa, quando não houve interação entre os fatores.

Não houve interação significativa entre os fatores estudados para as variáveis número de folhas e comprimento foliar, porém, o teste de médias discriminou diferenças para cada fator (Figura 18B e C). Verificou-se maior número de folhas na cv. Aruana (Figura 18B). Comparando-se os tratamentos com P, foi observado redução de 33,98% no número de folhas de plantas cultivadas em baixo

P. O maior comprimento médio foliar foi observado na cv. Mombaça, porém, não foi influenciado pelas doses de P testadas (Figura 18C).

Houve interações significativas para as variáveis TApF, TApP e filocrono. A TApF foi maior para ambas as cultivares sob adequado P. A cv. Aruana apresentou aumento de 46,68%, em comparação aos valores observados em baixo P (Figura 19A). O menor valor de TApF foi observado na cv. Mombaça em baixo P, com 1,50 folha planta⁻¹ dia⁻¹ (Figura 19A).

Figura 19 – Características morfogênicas de cultivares de *M. maximus* cultivadas em solução nutritiva sob baixa e adequada disponibilidade de fósforo.



A) Taxa de aparecimento foliar (TApF), em folhas planta⁻¹ dia⁻¹; B) filocrono, em dias folha⁻¹; C) taxa de alongamento foliar (TAlF), em cm planta⁻¹ dia⁻¹ e D) taxa de aparecimento de perfilhos (TApP), em perfilho planta⁻¹ dia⁻¹. As médias e as barras de \pm desvio padrão são referentes aos dados não transformados (n=12 para cultivar e fósforo, n=6 para interação cultivar*fósforo). Cultivar Mombaça (M) e Aruana (A), baixa (BP) e adequada (AP) disponibilidade de fósforo. Para análise estatística e separação das médias, com exceção para TAlF, as demais variáveis foram transformadas por $\ln(x)$. Médias seguidas por letras maiúsculas comparam cultivares e letras minúsculas comparam disponibilidade de P. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os asteriscos *** $p \leq 0,001$ indicam diferenças significativas e (ns) não significativa, quando não houve interação entre os fatores.

O filocrono apresentado pelas cultivares foi significativamente afetado pela disponibilidade de P (Figura 19B), sendo observada resposta inversa aos resultados de TApF. A cv. Mombaça apresentou o maior valor de filocrono ($0,67 \text{ dia folha}^{-1}$), quando comparada a cv. Aruana e em ambas as doses de P. Em baixo P, as cultivares apresentaram aumento do filocrono, ou seja, necessitaram de maior número de dias para o aparecimento de folhas. Em contrapartida, as plantas cultivadas em adequado P, tiveram menor filocrono, o que confere maior capacidade de brotação no período de tempo avaliado (Figura 19B).

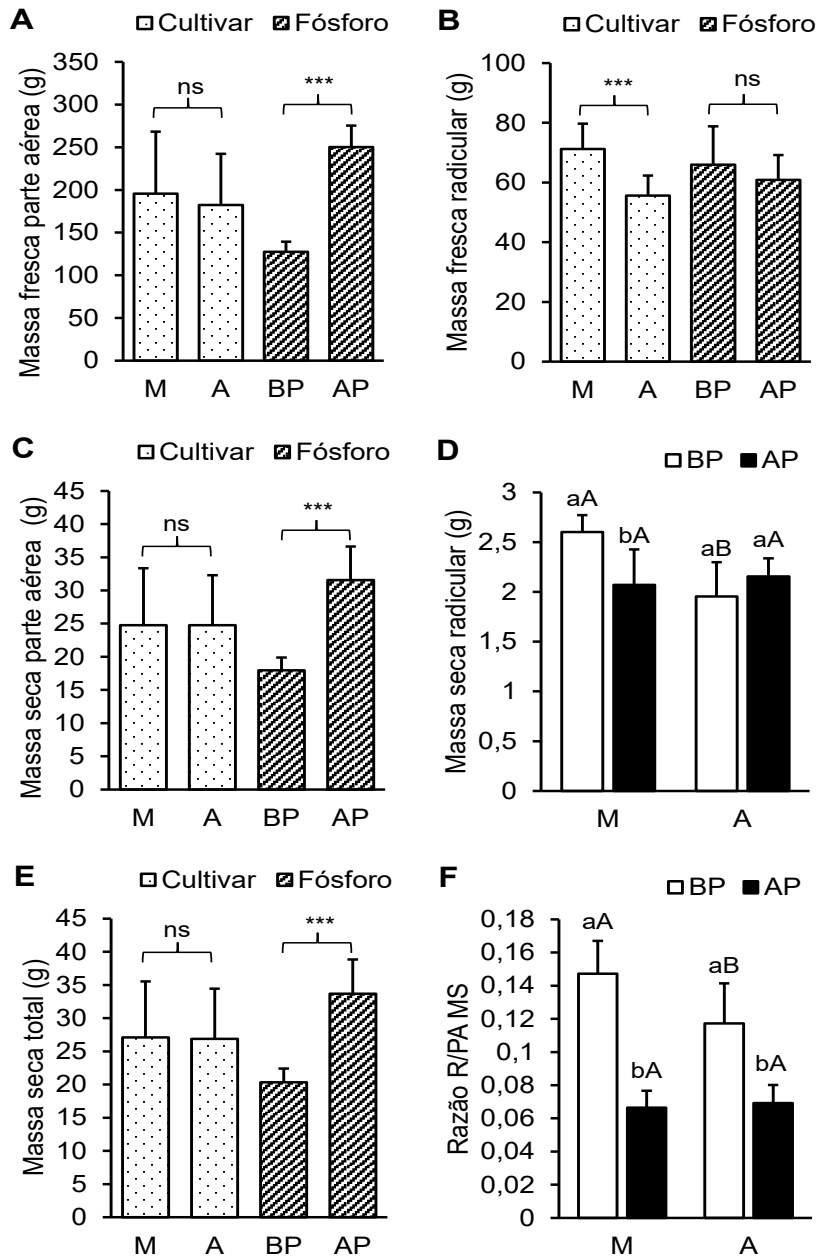
A taxa de alongamento foliar (TAIF) da cv. Mombaça foi de $1,25 \text{ cm planta}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, sendo 32% superior ao alongamento foliar observado na cv. Aruana (Figura 19 C). A TAIF não diferiu entre as doses de P, no entanto, a taxa de aparecimento de perfilhos (TApP) apresentou interação. A maior TApP foi obtida pela cv. Aruana em adequado P, com $0,92 \text{ perfilho planta}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, e a menor formação de perfilhos foi da cv. Mombaça sob baixo P, com $0,35 \text{ perfilho planta}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (Figura 19D). Além disso, a TApP da cv. Aruana foi superior a cv. Mombaça, em ambas as doses de P.

4.4.4 Biomassa e absorção de P por cultivares de *M. maximus*

A produção de biomassa fresca da parte aérea foi significativamente afetada pelo fósforo (Figura 20A), no entanto, entre as cultivares não houve diferença significativa. As plantas cultivadas em baixo P tiveram diminuição de 49,03% da massa fresca da parte aérea, em comparação com o fornecimento adequado de P (Figura 20A). Pela análise individual entre os fatores, verificou-se que a massa fresca radicular da cv. Mombaça foi aproximadamente 28% superior em relação a cv. Aruana (Figura 20B). Por outro lado, os diferentes níveis de P na solução nutritiva não influenciaram o peso fresco radicular das plantas.

As cultivares não apresentaram diferença significativa para a massa seca da parte aérea (Figura 20C). Porém, quando as plantas foram cultivadas em solução com baixo P, houve uma redução de 43,09% da massa seca da parte aérea (Figura 20C). A cv. Mombaça apresentou maior massa seca radicular em solução com baixo nível de P, sendo o valor observado superior a cv. Aruana (Figura 20D). Não houve diferença entre as cultivares sob adequado P (Figura 20D).

Figura 20 – Produção de biomassa da parte aérea e radicular de cultivares de *M. maximus* cultivadas em solução nutritiva sob baixa e adequada disponibilidade de fósforo.



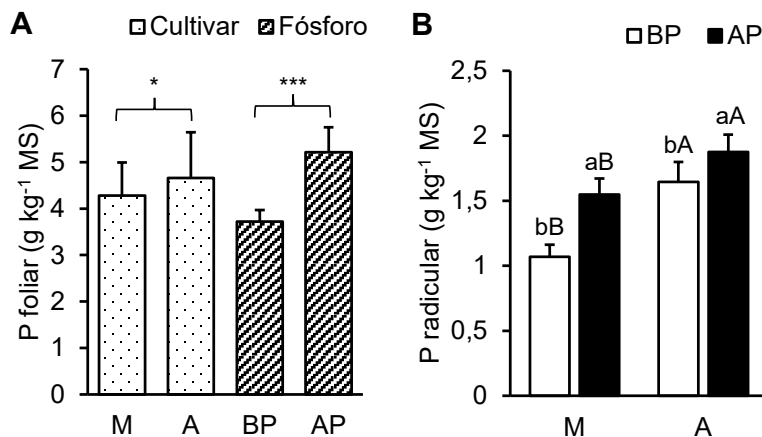
Cultivar Mombaça (M) e Aruana (A), baixa (BP) e adequada (AP) disponibilidade de fósforo. As médias e as barras de \pm desvio padrão são referentes aos dados não transformados ($n=12$ para cultivar e fósforo, $n=6$ para interação cultivar*fósforo). Para análise estatística e separação das médias, a massa seca da parte aérea e a massa seca total foram transformadas por $\ln(x)$. Médias seguidas por letras maiúsculas comparam cultivares e letras minúsculas comparam disponibilidade de P. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os asteriscos *** $p \leq 0,001$ indicam diferenças significativas e ns não significativa, quando não houve interação entre os fatores.

A disponibilidade de P não teve efeito sobre o peso radicular da cv. Aruana (Figura 20D). A produção de biomassa seca total foi superior em plantas sob nível adequado de P, no entanto, essa variável não diferiu significativamente entre as

cultivares (Figura 20E). A baixa disponibilidade de P na solução causou redução da razão raiz/parte aérea em ambas as cultivares, como pode ser observado pela interação significativa entre os fatores (Figura 20F).

Para o teor de fósforo foliar não houve interação significativa entre os fatores analisados (Figura 21A). No entanto, comparando-se as cultivares, a Aruana apresentou maior valor de fósforo nas folhas, em relação a Mombaça. Comparando-se os tratamentos com P, as plantas cultivadas em baixo P tiveram redução de 28,62% no teor de fósforo foliar, em relação as plantas sob adequado P. Nas raízes, houve maior concentração de fósforo nas plantas que receberam suprimento adequado de P na solução nutritiva, com aumentos de 44,86% na cv. Mombaça e 13,94% na cv. Aruana (Figura 21B). A cv. Aruana apresentou maior teor de fósforo nas raízes, em comparação a cv. Mombaça em ambos os níveis de P.

Figura 21 – Teor de fósforo de cultivares de *M. maximus* cultivadas em solução nutritiva sob baixa e adequada disponibilidade de fósforo.



Cultivar Mombaça (M) e Aruana (A), baixa (BP) e adequada (AP) disponibilidade de fósforo. Barras de \pm desvio padrão (n=12 para cultivar e fósforo, n=6 para interação cultivar*fósforo). Médias seguidas por letras maiúsculas comparam as cultivares e letras minúsculas comparam disponibilidade de P. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os asteriscos *** $p \leq 0,001$ e * $p \leq 0,05$ indicam diferenças significativas e ns não significativa, quando não houve interação entre os fatores.

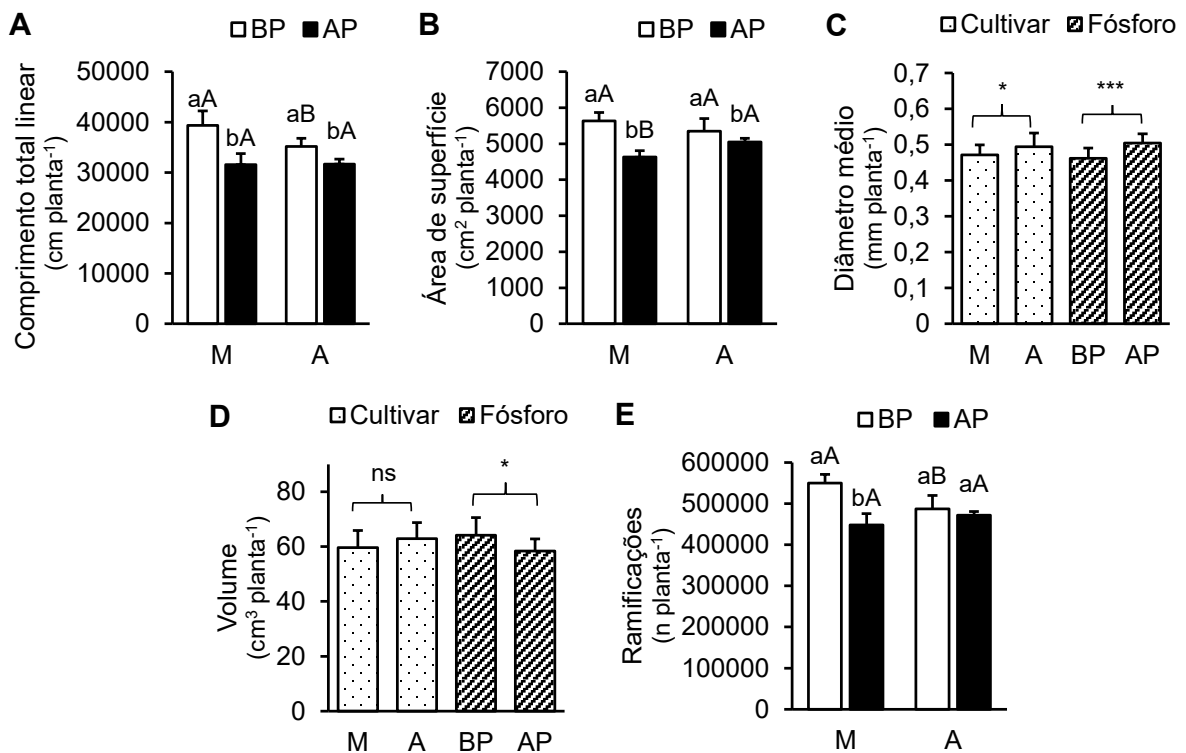
4.4.5 Características morfológicas das raízes sob deficiência de P

A interação entre as cultivares e a disponibilidade de P para as características morfológicas da raiz foi significativa para as variáveis comprimento total linear, área de superfície e ramificações radiculares (Figura 22). A baixa disponibilidade de P na solução nutritiva aumentou o comprimento linear total e a

área de superfície radicular de ambas as cultivares (Figura 22A e B). No entanto, a cv. Mombaça apresentou maior comprimento radicular em baixo P, enquanto, a cv. Aruana teve maior área de superfície radicular em adequado P.

O diâmetro médio das raízes da cv. Aruana foi superior ao observado na cv. Mombaça (Figura 22C). Além disso, verificou-se maior diâmetro das raízes quando as plantas tiveram fornecimento adequado de P. Não houve diferença significativa entre as cultivares para o volume radicular, porém, as plantas quando cultivadas em baixo P apresentaram aumento de 10% no volume das raízes (Figura 22D). A cv. Mombaça sob baixo P apresentou aumento de 22,75% no número de ramificações radiculares, em comparação ao fornecimento adequado de P (Figura 22E).

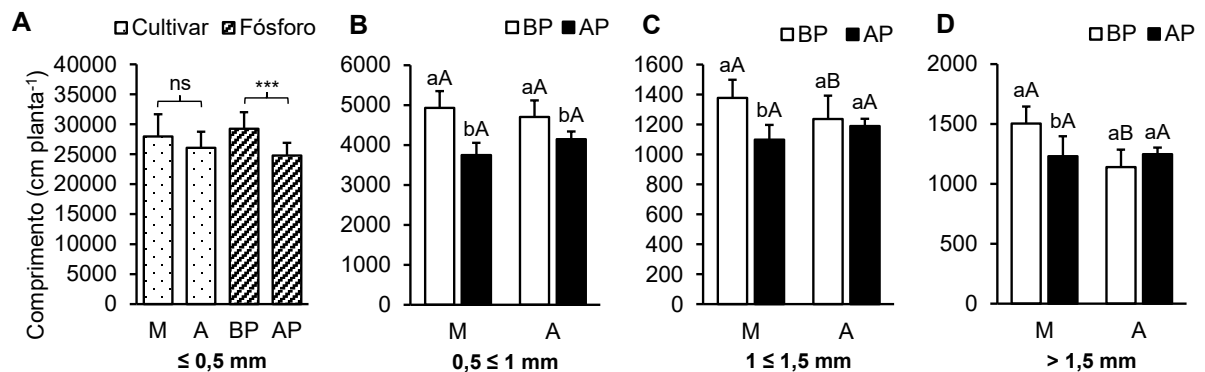
Figura 22 – Características morfológicas radiculares de cultivares de *M. maximus* cultivadas em solução nutritiva contendo baixa e adequada disponibilidade de fósforo.



Cultivar Mombaça (M) e Aruana (A), baixa (BP) e adequada (AP) disponibilidade de fósforo. Barras de \pm desvio padrão (n=12 para cultivar e fósforo, n=6 para interação cultivar*fósforo). Médias seguidas por letras maiúsculas comparam cultivares e letras minúsculas comparam disponibilidade de P. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os asteriscos *** $p \leq 0,001$ e * $p \leq 0,05$ indicam diferenças significativas e ns não significativa, quando não houve interação entre os fatores.

A disponibilidade de P provocou mudanças significativas nas diferentes classes de diâmetro das raízes, afetando o comprimento radicular das cultivares de *M. maximus* (Figura 23). As cultivares apresentaram maior comprimento radicular na classe de diâmetro inferior a 0,5 mm, o que representou em média 79,68%, enquanto, as demais classes de diâmetro foram responsáveis por apenas 20,32% do total do comprimento radicular. No entanto, o comprimento das raízes nessa faixa de diâmetro não se diferiu entre as cultivares (Figura 23A). Em contrapartida, a baixa disponibilidade de P aumentou em média 18% o comprimento de raízes com diâmetro inferior a 0,5 mm, em relação ao fornecimento adequado de P as plantas.

Figura 23 – Comprimento radicular por classe de diâmetro de cultivares de *M. maximus* cultivadas em solução nutritiva sob baixa e adequada disponibilidade de fósforo.



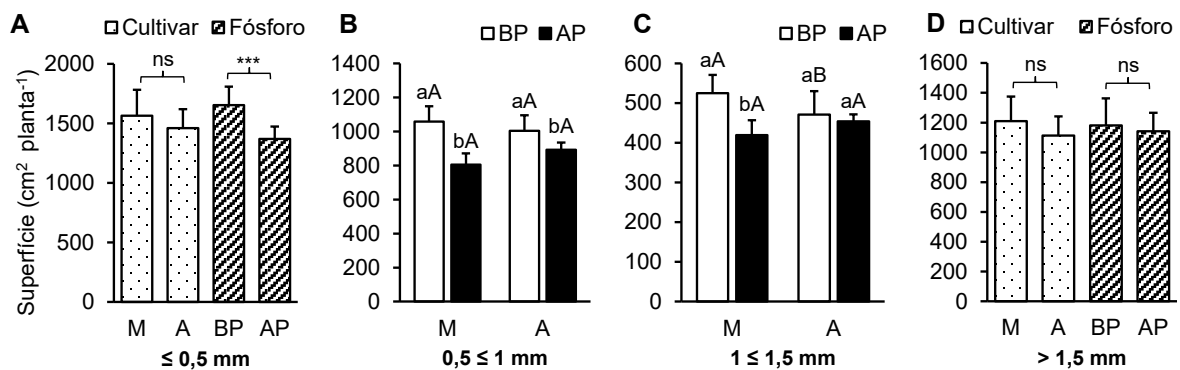
Cultivar Mombaça (M) e Aruana (A), baixa (BP) e adequada (AP) disponibilidade de fósforo. Barras de \pm desvio padrão (n=12 para cultivar e fósforo, n=6 para interação cultivar*fósforo). Médias seguidas por letras maiúsculas comparam cultivares e letras minúsculas comparam disponibilidade de P. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os asteriscos *** $p \leq 0,001$ indicam diferenças significativas e ns não significativa, quando não houve interação entre os fatores.

O efeito da interação entre as cultivares e os tratamentos de P foi significativo para o comprimento das raízes nas demais classes de diâmetro (Figura 23B, C e D). O comprimento de raízes com diâmetro entre 0,5 a 1 mm foi maior em ambas as cultivares, sob baixo P (Figura 23B). A cv. Mombaça apresentou maior comprimento de raízes com diâmetro superior a 1 mm, em baixo P (Figura 23C e D). Enquanto, a cv. Aruana não apresentou mudanças significativas no comprimento de raízes maiores que 1 mm (Figura 23C e D).

A área de superfície de raízes com até 0,5 mm de diâmetro, foi em média 20,72% maior no tratamento com baixo fósforo, em comparação ao adequado

fornecimento de P (Figura 24A). A baixa disponibilidade de P na solução teve efeito significativo sobre a área de superfície de raízes de menor diâmetro (0,5 a 1,5 mm) (Figura 24B e C). Para a faixa de diâmetro radicular entre 0,5 e 1 mm, a área de superfície aumentou em 31,51% na cv. Mombaça e 12,38% na cv. Aruana, em baixo P (Figura 24B). Enquanto, a maior porção de raízes com diâmetro entre 1 e 1,5 mm foi encontrada apenas na cv. Mombaça, em baixo P (Figura 24C). As raízes com diâmetro >1,5 mm não foram afetadas pelos tratamentos (Figura 24D).

Figura 24 – Área de superfície radicular por classe de diâmetro de cultivares de *M. maximus* cultivadas em solução nutritiva sob baixa e adequada disponibilidade de fósforo.

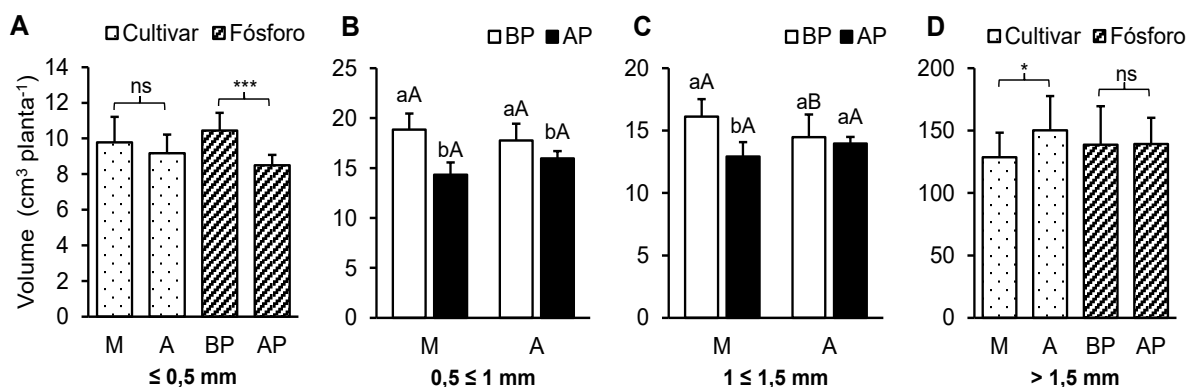


Cultivar Mombaça (M) e Aruana (A), baixa (BP) e adequada (AP) disponibilidade de fósforo. Barras de \pm desvio padrão (n=12 para cultivar e fósforo, n=6 para interação cultivar*fósforo). Médias seguidas por letras maiúsculas comparam cultivares e letras minúsculas comparam disponibilidade de P. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os asteriscos *** $p \leq 0,001$ indicam diferenças significativas e ns não significativa, quando não houve interação entre os fatores.

As plantas cultivadas em baixo P apresentaram aumentos no volume de raízes mais finas (<0,5 mm) de até 23%, em comparação com as plantas em adequado P (Figura 25A). A interação das cultivares e as concentrações de P foi significativa para o volume de raízes com diâmetro entre 0,5 a 1,5 mm (Figura 25B e C). Em ambas as cultivares, a baixa disponibilidade de P na solução aumentou o volume de raízes com diâmetro entre 0,5 a 1 mm (Figura 25B). O tratamento com baixo P aumentou em 25% o volume de raízes com diâmetro entre 1 a 1,5 mm da cv. Mombaça, mas não influenciou as raízes da cv. Aruana (Figura 25C). Por outro lado, o volume radicular da cv. Aruana foi superior a cv. Mombaça para a classe de

diâmetro > 1,5 mm. Não houve efeito dos tratamentos de P na classe de diâmetro > 1,5 mm (Figura 25D).

Figura 25 – Volume radicular por classe de diâmetro de cultivares de *M. maximum* cultivadas em solução nutritiva sob baixa e adequada disponibilidade de fósforo.



Cultivar Mombança (M) e Aruana (A), baixa (BP) e adequada (AP) disponibilidade de fósforo. Barras de \pm desvio padrão (n=12 para cultivar e fósforo, n=6 para interação cultivar*fósforo). Médias seguidas por letras maiúsculas comparam cultivares e letras minúsculas comparam disponibilidade de P. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os asteriscos *** $p \leq 0,001$ e * $p \leq 0,05$ indicam diferenças significativas e ns não significativa, quando não houve interação entre os fatores.

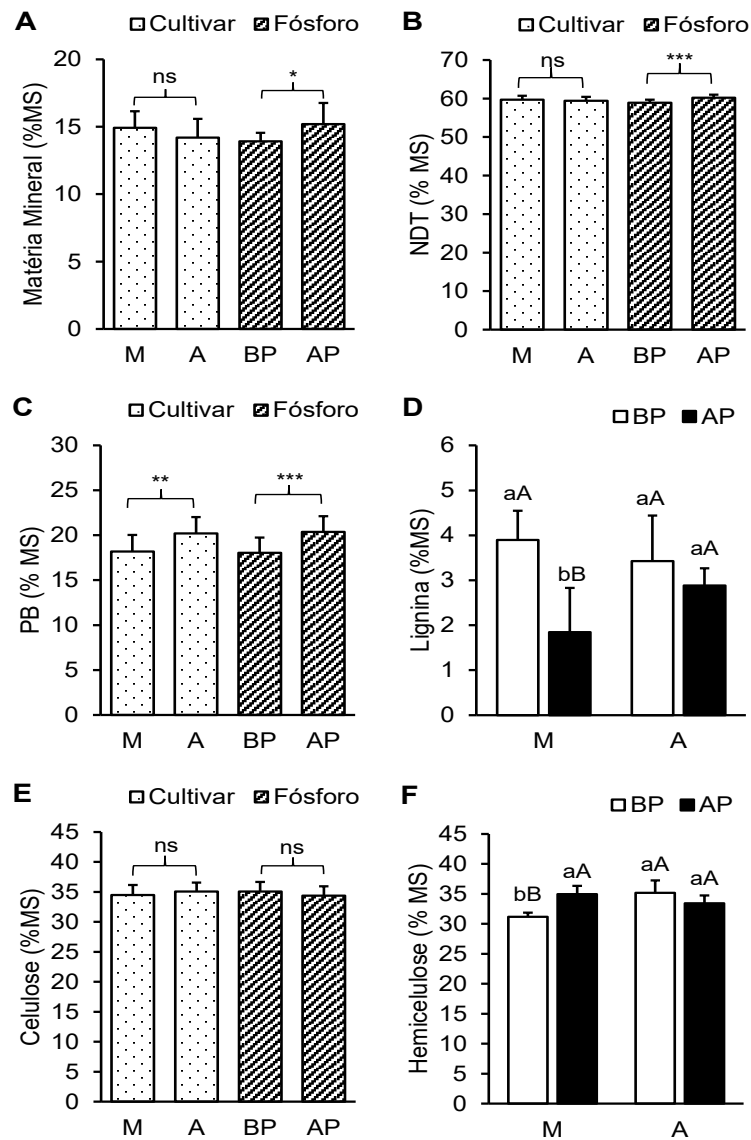
4.4.6 Composição bromatológica

Para as variáveis bromatológicas matéria mineral, nutrientes digestíveis totais (NDT), proteína bruta (PB) e celulose não houve interação das cultivares e a disponibilidade de P (Figura 26). Os teores de matéria mineral e NDT não diferiram entre as cultivares, porém, foi observado aumento desses parâmetros em plantas sob adequado P na solução nutritiva (Figura 26A e B). O teor de PB da cv. Aruana foi superior a cv. Mombança, enquanto, para os tratamentos de P, a proteína bruta das plantas em baixo P foi inferior ao encontrado em plantas em adequado de P (Figura 26C).

Houve interação significativa para o teor de lignina (Figura 26D). O teor de lignina na cv. Mombança aumentou com a redução de P na solução nutritiva. Além disso, a cv. Mombança apresentou valor inferior a cv. Aruana, sob adequado P. O teor de lignina da cv. Aruana não variou com as concentrações de P (Figura 26D). Não houve diferença significativa para o teor de celulose (Figura 26E). Houve interação significativa para a hemicelulose (Figura 26F). A cv. Mombança apresentou

o menor valor de hemicelulose, quando comparada a cv. Aruana sob baixo P (Figura 26F).

Figura 26 – Composição bromatológica de cultivares de *M. maximus* cultivadas em solução nutritiva sob baixa e adequada disponibilidade de fósforo.



Cultivar Mombaça (M) e Aruana (A), baixa (BP) e adequada (AP) disponibilidade de fósforo. Barras de \pm desvio padrão (n=12 para cultivar e fósforo, n=6 para interação cultivar*fósforo). Médias seguidas por letras maiúsculas comparam cultivares e letras minúsculas comparam disponibilidade de P. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os asteriscos *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$ e * $p \leq 0,05$ indicam diferenças significativas e ns não significativa, quando não houve interação entre os fatores.

4.5 DISCUSSÃO

O perfil transcricional dos genes *MmVHP1*, *MmPHT1* e *MmPHO1b* foi regulado sob condições deficientes de P (Figura 16 e 17), enquanto, nenhuma diferença foi observada na expressão do gene *MmPHO1c* em folhas e raízes, após 21 dias de tratamento (Figura 16 e 17).

O nível de expressão do gene *MmVHP1*, a produção de biomassa e a concentração de P na parte aérea foi maior em plantas sob condições adequadas de P. O conteúdo de H⁺-PPase pode ser regulado de acordo com a demanda da acidificação dos vacúolos, o transporte ativo de íons e metabólitos em tecidos jovens em crescimento (MAESHIMA, 2000). Em estudo com plantas de milho transgênicas, a superexpressão do gene *H⁺-pirofosfatase vacuolar* de *Thellungiella halophila* (*TsVP*) aumentou o desenvolvimento radicular, o crescimento da parte aérea, a absorção e o acúmulo de fósforo, o desempenho fotossintético e o rendimento de grãos em comparação com plantas selvagens, tanto sob condições suficientes, quanto deficientes de Pi (PEI *et al.*, 2012).

A superexpressão da *H⁺-pirofosfatase* do tipo I (*AVP1*) em *Arabidopsis*, tomate e arroz aumentou o sistema radicular e melhorou o desempenho das plantas, em comparação as plantas selvagens (YANG *et al.*, 2007). Além disso, esses autores verificaram que as plântulas de arroz transgênicas (*OsAVP1D OX*) cultivadas sob condições suficientes de Pi acumularam 18% mais P. Os sistemas radiculares mais robustos desenvolvidos por plantas que superexpressam o gene *AVP1* demonstram maior acidificação da rizosfera em condições normais ou deficientes em nitrato, fosfato e ferro, tornando a aquisição desses nutrientes mais eficiente pelas plantas (PAEZ-VALÊNCIA *et al.*, 2013; PIZZIO *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2014; FAN *et al.*, 2017).

O gene *MmPHT1* foi mais expresso na parte aérea e nas raízes das plantas sob baixo fornecimento de P. Os membros da família *PHT1* são preferencialmente expressos nos tecidos radiculares e regulados positivamente para melhorar a absorção de Pi pelas plantas em resposta ao baixo fornecimento de P (BAKER *et al.*, 2015). No entanto, os genes *PHT1* também são detectados na parte aérea, incluindo brotos, folhas e flores, sugerindo seu envolvimento tanto no transporte, quanto na remobilização de Pi (SRIVASTAVA *et al.*, 2018). Devido à alta

similaridade entre as sequências *PHT1* em *P. hallii* não foi possível gerar iniciadores com a capacidade de diferenciar membros dessa família, portanto, o nível de expressão de *MmPHT1* pode representar mais que um gene ortólogo em *M. maximus*. Isso significa que a maior expressão desse gene em *M. maximus* pode envolver vários mecanismos ligados a absorção e ao transporte de P nas raízes e na parte aérea, em resposta a condições deficientes de P.

Os transportadores *PHT1* foram caracterizados em várias espécies de plantas. A regulação positiva da expressão do gene *PHT1* normalmente é interpretada como uma resposta a privação de P (LAMBERS, 2022). Em *A. thaliana* os genes *AtPHT1;8* e *AtPHT1;9* são induzidos nas raízes pela deficiência de P e estão envolvidos no transporte de Pi da raiz para a parte aérea das plantas (REMY *et al.* 2012). Em arroz, a expressão dos genes *OsPHT1;2*, *OsPHT1;4*, *OsPHT1;8*, *OsPHT1;9* e *OsPHT1;10* foi significativamente maior sob baixo fornecimento de P (AI *et al.*, 2009; JIA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2014; YE *et al.*, 2015). Em tomate, os níveis de expressão de alguns genes *PHT1* em folhas e raízes aumentaram em baixo P (CHEN *et al.*, 2014).

Em *Urochloa ruziziensis*, a expressão dos transportadores *UPHT1;1b* e *UPHT1;1c*, assim como a biomassa e a exsudação de metabólitos pelas raízes aumentaram com a baixa disponibilidade de P (BAPTISTELLA *et al.*, 2021). Em gramíneas como trigo, sorgo, cevada, milho e milhetos (*Setaria italica*, *Cenchrus americanus*, *Eleusine coracana*, *Paspalum scrobiculatum*, *Panicum sumatrense*, *Panicum miliaceum*, *Echinochloa esculenta*), os transportadores da família *PHT1* em tecidos da raiz e da parte aérea também foram regulados positivamente pela deficiência de P (CEASAR *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2016; TENG *et al.*, 2017; GRUN *et al.*, 2017; MAHARAJAN *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019; SRIVASTAVA *et al.*, 2021). Esses resultados indicam que o aumento da expressão do gene *MmPHT1* pode ser um mecanismo importante para aumentar a captação de Pi pelas raízes e melhorar a translocação de Pi na parte aérea, sob condições deficientes de P.

A baixa disponibilidade de P aumentou significativamente a expressão do gene *MmPHO1;b* nas folhas de ambas as cultivares de *M. maximus*. No entanto, esse aumento foi relativamente maior na cv. Aruana em comparação a cv. Mombaça. Além disso, a cv. Aruana teve maior concentração de P na parte aérea e nas raízes do que a cv. Mombaça. Os níveis de expressão de genes *PHO1* estão ligados ao teor de P no interior da planta, portanto, a expressão desses genes pode

ser mais acentuada na parte aérea, em comparação com as raízes, após a deficiência de Pi (SECCO; BAUMANN; POIRIER, 2010). Além disso, o Pi pode ser redistribuído das folhas mais velhas e totalmente expandidas, para as folhas mais jovens e em crescimento, por meio da exportação de Pi pelos vasos do floema (WANG *et al.*, 2004).

A expressão dos genes *AtPHO1* e *AtPHO1;H1* em *Arabidopsis* é extremamente baixa sob fornecimento suficiente de P, porém, esses genes são induzidos positivamente sob condição deficiente de P (STEFANOVIC *et al.*, 2007). A superexpressão de *PHO1* nas folhas de *A. thaliana* transgênica chegou a aumentar em até três vezes o teor de Pi na parte aérea (STEFANOVIC *et al.*, 2011). A expressão do gene *AtPHO1;H1* é maior em folhas em relação a raízes e caules, sob estresse de Pi (WANG *et al.*, 2004).

Em estudo com mutante *pho1* em *Arabidopsis*, a deficiência na transferência de Pi das raízes para a parte aérea demonstrou que o silenciamento do gene transportador não afeta a absorção de Pi pelas células epidérmicas das raízes, mas compromete o transporte de Pi pelos vasos do xilema, e conseqüentemente, resulta em plantas com níveis normais de Pi nas raízes e baixas concentrações Pi na parte aérea (POIRIER *et al.*, 1991). As cultivares de *M. maximus* apresentaram maior teor de P na parte aérea do que nas raízes, portanto, em condições deficientes de P, o gene *MmPHO1;b* pode ser fundamental para garantir os teores de P na parte aérea.

A expressão relativa do gene *MmPHO1;c*, ortólogo ao gene *OsPHO1;3*, não foi induzida pelo baixo fornecimento de P e foi mais baixa nos tecidos de *M. maximus*, em comparação ao gene *MmPHO1;b*, ortólogo ao gene *OsPHO1;2*. Esses resultados corroboram com estudo anterior em arroz, onde os transcritos de *OsPHO1;3* antisense também permaneceram estáveis, enquanto os níveis de *OsPHO1;1* e *OsPHO1;2* antisense foram fortemente regulados em brotos e raízes pela deficiência de P (SECCO; BAUMANN; POIRIER, 2010). Portanto, a indução positiva de *MmPHO1;b* na parte aérea das plantas sugere a participação desse gene no transporte de Pi à longa distância em condições deficientes de P.

As características morfogênicas das cultivares foram afetadas após 21 dias de crescimento em solução de baixo P. O número de folhas e o perfilhamento foram reduzidos em ambas as cultivares sob baixo P. No entanto, o desempenho da cv. Mombaça foi inferior a cv. Aruana, desde que, as taxas de aparecimento foliar (TApF) e aparecimento de perfilhos (TApP) foram maiores na cv. Aruana, em ambos

os níveis de P (Figura 19). A cv. Aruana tem como característica porte baixo de crescimento, folhas estreitas e curtas, além de colmos mais finos, que permitem uma maior rapidez de brotação, quando comparada a cv. Mombaça (MACHADO *et al.*, 2010).

Em gramíneas, a formação de folhas e perfilhos é uma característica importante para a produção de biomassa (COSTA *et al.*, 2022). A deficiência de fósforo reduz a divisão e a expansão celular, causando menor crescimento das plantas (KAVANOVÁ *et al.*, 2006). Nesse trabalho, as plantas cultivadas em baixo P apresentaram menor acúmulo de matéria seca na parte aérea (Figura 19C) e, conseqüentemente, essa redução pode ter contribuído para o aumento da razão raiz/parte aérea. Portanto, a produção de biomassa da parte aérea foi comprometida, enquanto, a produção de biomassa radicular foi aumentada sob baixo P.

Da mesma forma, mudas de milho (*Setaria italica*), cultivadas por 16 dias em condições deficientes de P (10 μM) tiveram maior proporção de raiz/parte aérea, em comparação as mudas cultivadas em P suficiente (300 μM) (CEASAR *et al.*, 2014). A deficiência de fósforo geralmente leva a uma maior proporção das raízes em relação a parte aérea, pois a planta estimula o crescimento radicular em busca de Pi no solo (VANCE; UHDE-STONE; ALLAN, 2003; RAMEKERS *et al.*, 2010; SHEN *et al.*, 2011).

As plantas desenvolveram uma série de adaptações morfológicas e metabólicas que visam aumentar a absorção e a disponibilidade de Pi na rizosfera para sobreviver em condições deficientes de Pi no solo, como a rápida distribuição do sistema radicular em maior área de superfície, o aumento do número e comprimento de raízes laterais e pelos radiculares, a liberação de fosfatase ácida e ácidos orgânicos e a associação simbiótica com microrganismos (HE *et al.*, 2019). O maior crescimento do sistema radicular, que permite maior exploração do solo pelas plantas, está associado ao aumento da expressão de genes que codificam os transportadores de Pi da subfamília *PHT1* (HAMMOND; BROADLEY; WHITE, 2004). Em ambas as cultivares, foi observado maior crescimento radicular e expressão do gene *MmPHT1* nas raízes, o que pode ser uma tentativa dessas plantas de aumentar a capacidade de absorção de P, sob baixa disponibilidade deste nutriente.

Em condições deficientes de Pi no solo, as plantas reduzem o crescimento de raízes primárias, e passam a promover o crescimento de pelos radiculares,

ramificações e alongamento de raízes laterais, resultando em maior razão entre a raiz/parte aérea (LAPIS-GAZA; JOST; FINNEGAN, 2014). Além disso, as raízes com menor diâmetro permitem maior densidade radicular nas partes superiores do solo, favorecendo a eficiência de absorção de P (WIEL *et al.*, 2016). Portanto, as modificações na arquitetura radicular, que aumentam a capacidade das raízes em explorar maior área superficial e volume de solo, são fundamentais para tornar a absorção de Pi mais eficiente (HASAN *et al.*, 2016).

A composição bromatológica das gramíneas forrageiras pode variar de acordo com a disponibilidade de água e nutrientes, características genotípicas, estágio de desenvolvimento e densidade populacional de plantas (UR REHMAN *et al.*, 2022). A baixa qualidade nutricional das forrageiras está associada a baixos teores de proteína bruta e minerais e, ao alto conteúdo de fibras menos digeríveis (PATÊS *et al.*, 2008). Nossos resultados, mostram que os teores de minerais e nutrientes digeríveis totais foram maiores em plantas sob adequado P. Além disso, foram observados aumentos significativos no teor de proteína bruta das plantas, que podem estar relacionados a diferenças genéticas das cultivares e à maior disponibilidade de P (Figura 26C). O fósforo é um componente estrutural de DNA e RNA e desempenha papel importante em muitos processos metabólicos celulares como a síntese de proteínas (VANCE; UHDE - STONE; ALLAN, 2003).

A composição química da parede celular das espécies forrageiras é fundamental para a digestibilidade e produtividade de animais ruminantes. A parede celular tem uma parede primária constituída basicamente por polissacarídeos, como celulose, hemicelulose e pectinas, além de algumas proteínas estruturais (COSGROVE, 2000). As células vegetais após a fase final de crescimento e expansão formam uma parede secundária pela deposição de lignina hidrofóbica (FUKUDA, 2014).

A parede primária é produzida por todas as células vegetais, enquanto, a parede secundária é formada apenas em células específicas que requerem maior rigidez, como bainhas e fibras que envolvem feixes vasculares em caules e lâminas de folhas de gramíneas C4 (FIGUEIREDO *et al.*, 2019). O menor teor de lignina observado na cv. Mombaça, em relação a cv. Aruana sob condições adequadas de P (Figura 26), pode estar relacionado ao maior comprimento e a taxa de alongamento foliar dessa cultivar (Figura 18 e 19), pois esses tecidos por estarem em plena divisão e expansão celular possuem menor deposição de lignina.

A microflora dos animais ruminantes é capaz de hidrolisar a celulose e a hemicelulose das paredes celulares das plantas, no entanto, a lignina é pouco digerida e compromete a digestibilidade das forrageiras (FIGUEIREDO *et al.*, 2019). Nesse sentido, o baixo nível de P reduziu significativamente a qualidade nutricional da cv. Mombaça, devido ao aumento de lignina e a redução de hemicelulose na biomassa foliar dessa forrageira. Além disso, a cv. Mombaça apresentou o menor teor de lignina quando o fornecimento de P foi adequado e, portanto, a digestibilidade dessa cultivar pode ser superior a cv. Aruana.

O aumento na concentração de lignina também foi observado em outras culturas sob condições de deficiência nutricional, como trigo e *Panicum virgatum* sob deficiência de fósforo (PONTIGO *et al.*, 2018; HAO *et al.*, 2022), arroz sob deficiência de nitrogênio (SHAO *et al.*, 2020), *Citrus sinensis* sob deficiência de boro (ZHOU *et al.*, 2022) e videira (*Vitis vinifera*) sob deficiência de cálcio (DUAN *et al.*, 2022). De acordo com Pontigo *et al.* (2018), a biossíntese de lignina em condições de baixo P pode estar associada ao acúmulo de compostos fenólicos, como flavonoides e antocianinas, que são metabólitos secundários envolvidos no desenvolvimento de resistência de plantas ao estresse.

4.6 CONCLUSÃO

Os níveis de expressão dos genes *MmVHP1*, *MmPHT1* e *MmPHO1b* foram regulados pela baixa disponibilidade de P. A deficiência de P, reduziu o crescimento, a produção de biomassa, a qualidade nutricional e a expressão do gene *MmVHP1* na parte aérea, em ambas as cultivares. Enquanto, os níveis de expressão do gene *MmPHT1* nas folhas e nas raízes foram aumentados e o crescimento de raízes de menor diâmetro foram favorecidos. A cv. Aruana apresentou maior expressão do gene *MmPHO1b* na parte aérea e maiores taxas de crescimento e absorção de P, em condições de baixo P. Com base nas respostas adaptativas dessas cultivares à baixa disponibilidade de P, a superexpressão dos genes *MmPHT1* e *MmPHO1b*, por meio de manipulação genética, pode ser uma estratégia para o aumento da absorção ou eficiência de uso do P em gramíneas forrageiras, sob condições deficientes em P.

REFERÊNCIAS

- ABIEC. Beef Report - **Perfil da pecuária no Brasil**. 2021. Disponível em: <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2021/>. Acesso em: 10 Ago. 2021.
- AI, P. *et al.* Two rice phosphate transporters, *OsPht1;2* and *OsPht1;6*, have different functions and kinetic properties in uptake and translocation. **Plant Journal**, v. 57, p. 798–809, 2009.
- AYADI, A. *et al.* Reducing the genetic redundancy of *Arabidopsis PHOSPHATE TRANSPORTER1* transporters to study phosphate uptake and signaling. **Plant Physiology**, v. 167, p. 1511-1526, 2015.
- BAILEY, T. L. *et al.* Meme Suite: tools for motif discovery and searching. **Nucleic Acids Research**, 37: W202-W208, 2009.
- BAPTISTELLA, J. L. C. *et al.* Differential responses of three *Urochloa* species to low phosphorus availability. **Annals of Applied Biology**, v. 179, n. 2, p. 216–230, 2021.
- CAI, S.; LIU, F.; ZHOU, B. Genome-Wide identification and expression profile analysis of the *PHT1* gene family in *Gossypium hirsutum* and its two close relatives of subgenome donor species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 4905. Jul, 2020.
- CEASAR, S. A. *et al.* Phosphate concentration and arbuscular mycorrhizal colonisation influence the growth, yield and expression of twelve *PHT1* family phosphate transporters in foxtail millet (*Setaria italica*). **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, e108459, 2014.
- CEASAR, S. A. Genome-wide identification and analysis of *PHT1* family genes and proteins in: The best model to study nutrient transport in millets. **The Plant Genome**, v. 12, n. 1, 180019, 2019.
- CHEN, A. *et al.* Genome-wide investigation and expression analysis suggest diverse roles and genetic redundancy of *PHT1* family genes in response to Pi deficiency in tomato. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 61, 2014.
- CHOU, K. C.; SHEN, H. B. Plant-mPLOC: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization. **PLoS ONE**, v. 5, e11335, 2010.
- DIAS-FILHO, M. B. **Diagnóstico das pastagens no Brasil**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2014. 36p. Doc. 402.
- COSGROVE, D. J. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature**, v. 407, p. 321-326, 2000.
- COSTA, N. L. *et al.* Forage productivity and morphogenesis of *Megathyrsus maximus* x *M. infestum* cv. Massai under phosphate fertilization. **PUBVET**, v. 16, n. 06, a1144, p. 1-5, Jun., 2022.

DROZDOWICZ, Y. M.; KISSINGER, J. C.; REA, P. A. AVP2, a sequence-divergent, K⁺-insensitive H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase from Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.123, n. 1, p. 353-362, 2000.

DUAN, S. *et al.* Understanding calcium functionality by examining growth characteristics and structural aspects in calcium-deficient grapevine. **Scientific Reports**, v. 12, n. 3233, 2022.

DUARTE, A. L. M. Pastos de capim aruana para ovinos. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 8, n. 2, 2011.

EMBRAPA. **Pastagens, Portal Embrapa (Versão 3.71.0)**. 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-bovina/producao-de-carne-bovina/pastagem>. Acesso em: 25 Set. 2019.

FAN, W. *et al.* H⁺-pyrophosphatase *lbVP1* promotes efficient iron use in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 6, p. 698-712, 2017.

FAO. **World Food and Agriculture: statistical yearbook 2021**. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/cb4477en>. Acesso em: 07 nov. 2022.

FARAJIA, S.; HASANZADEH S.; HEIDARI P. Comparative *in silico* analysis of phosphate transporter gene family, *PHT*, in *Camelina sativa* genome. **Gene Reports**, v. 25, 101351, 2021.

FIGUEIREDO, R. *et al.* Suberin and hemicellulose in sugarcane cell wall architecture and crop digestibility: A biotechnological perspective. **Food and Energy Security**, e00163, 2019.

FRANCISCO, E. A. B.; BONFIM-SILVA, E. M.; TEIXEIRA, R. A. Aumento da produtividade de carne via adubação de pastagens. **Informações Agrônomicas**, n. 158, p. 6-12, jun. 2017.

FUKUDA, H. **Plant cell wall patterning and cell share**. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell, 2014.

GASTEIGER, E. *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. *In*: WALKER, J. M. (ed). **The proteomics protocols handbook**. Humana Press, 2005. p.571-607.

GAXIOLA, R. A.; REGMI, K.; HIRSCHI, K. D. Moving on Up: H⁺-PPase mediated crop improvement. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 5, p. 347–349, 2016.

GOLOVIN, A.; HENRICK, K. MSDmotif: exploring protein sites and motifs. **BMC Bioinformatics**, v. 9, 312, 2008.

GRÜN, A. *et al.* Identification and expression profiling of *Pht1* phosphate transporters in wheat in controlled environments and in the field. **Plant Biology**, v. 20, n. 2, p. 374–389, 2017.

GU, M. *et al.* Complex regulation of plant phosphate transporters and the gap between molecular mechanisms and practical application: What is missing? **Molecular Plant**, v. 9, n. 3, p. 396–416, 2016.

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

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

HAO, Z. *et al.* Spectroscopic analysis reveals that soil phosphorus availability and plant allocation strategies impact feedstock quality of nutrient-limited switchgrass. **Communications Biology**, v. 5, n. 227, 2022.

HASAN, M. M., *et al.* Regulation of phosphorus uptake and utilization: transitioning from current knowledge to practical strategies. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 21, n. 7, 2016.

HE, Q. *et al.* Molecular control and genetic improvement of phosphorus use efficiency in rice. **Molecular Breeding**, v. 39, n. 162, 2019.

HEUER, S. *et al.* Improving phosphorus use efficiency: a complex trait with emerging opportunities. **Plant Journal**, v. 90, p. 868-885, 2017.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. **California Agricultural Experiment Station**, Circular-347, v. 347 n. 2, 32 p., 1950.

HONG, J. J. *et al.* Diversity of morphology and function in arbuscular mycorrhizal symbioses in *Brachypodium distachyon*. **Planta**, v. 236, n. 3, p. 851–865, 2012.

HU, B. *et al.* GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. **Bioinformatics**, v. 31, n. 8, p. 1296-1297, 2015.

HUNT, H. V. *et al.* Reticulate evolution in *Panicum* (*Poaceae*): the origin of tetraploid broomcorn millet, *P. miliaceum*. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 12, p. 3165-75, 2014.

HUSSAIN, S. B. *et al.* Type I H⁺-pyrophosphatase regulates the vacuolar storage of sucrose in citrus fruit, **Journal of Experimental Botany**, v. 71, n. 19, p. 5935–5947, 2020.

JAIN, M., *et al.* F-box proteins in rice. Genome-wide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed development, and regulation by light and abiotic stress. **Plant Physiology**, v. 143, n. 4, p. 1467–1483, 2007.

JANK, L. *et al.* **Melhoramento genético de *Panicum maximum*. Melhoramento de forrageiras tropicais.** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2008. p. 55-87.

JANK, L. *et al.* O capim-BRS Quênia (*Panicum maximum* Jacq.) na diversificação e intensificação das pastagens. Brasília: Embrapa Gado de Corte, 2017. (Comunicado Técnico; 138).

JANK, L. *et al.* The value of improved pastures to Brazilian beef production. **Crop and Pasture Science**, v. 65, n. 11, p. 1132–1137, 2014.

JIA, H. *et al.* The phosphate transporter gene *OsPht1;8* is involved in phosphate homeostasis in rice. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 1164–1175, 2011.

JOHAN, P. D. *et al.* Phosphorus transformation in soils following co-application of charcoal and wood ash. **Agronomy**, v. 11, n. 10, 2021.

KARANDASHOV, V.; BUCHER, M. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 1, p. 22–29, 2005.

KAVANOVA, M. *et al.* Phosphorus deficiency decreases cell division and elongation in grass leaves. **Plant physiology**, v. 141, n. 2, p. 766–775, 2006.

KELLOGG, E. A. Genetic control of branching patterns in grass inflorescences. **The Plant Cell**, v. 34, n. 7, p. 2518–2533, 2022.

KORESSAAR, T. *et al.* Primer3_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. **Bioinformatics**, v. 34, n. 11, p. 1937–1938, 2018.

LAMBERS, H. Phosphorus Acquisition and Utilization in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 73, n. 1, p. 17–42, 2022.

LAPIS-GAZA, H.R.; JOST, R.; FINNEGAN, P.M. Arabidopsis *PHOSPHATE TRANSPORTER1* genes *PHT1;8* and *PHT1;9* are involved in root-to-shoot translocation of orthophosphate. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 334, p. 1–19, 2014.

LI, J. *et al.* Arabidopsis H⁺-PPase *AVP1* Regulates auxin-mediated organ development. **Science**, v. 310, n. 5745, p. 121–125, 2005.

LI, Y. *et al.* Molecular identification of the *Phosphate Transporter family 1 (PHT1)* genes and their expression profiles in response to phosphorus deprivation and other abiotic stresses in *Brassica napus*. **PLOS ONE**, v. 14, n. 7, e0220374, 2019.

LI, Y. *et al.* Phosphate transporter *OsPht1;8* in rice plays an important role in phosphorus redistribution from source to sink organs and allocation between embryo and endosperm of seeds. **Plant Science**, v. 230, p. 23–32, 2015.

LIU, F. *et al.* Comprehensive sequence and whole-life-cycle expression profile analysis of the phosphate transporter gene family in rice. **Molecular Plant**, v. 4, n. 6, p. 1105–1122, 2011.

LIU, F. *et al.* Systematic identification, evolution and expression analysis of the *Zea mays* *PHT1* gene family reveals several new members involved in root colonization

by arbuscular mycorrhizal fungi. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 930, 2016.

LIU, N. *et al.* Evolution of the *SPX* gene family in plants and its role in the response mechanism to phosphorus stress. **Open Biology**, v. 8, 170231, 2018.

LIU, Q. *et al.* Expression of vacuolar H⁺-pyrophosphatase (*OVP3*) is under control of an anoxia-inducible promoter in rice. **Plant Molecular Biology**, v. 72, n. 1-2, p. 47–60, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, dec. 2001.

MACHADO, L. A. Z. *et al.* Principais espécies forrageiras utilizadas em pastagens para gado de corte. *In*: PIRES, A. V. (ed.). **Bovinocultura de corte**. Piracicaba: FEALQ, 2010. p. 375-417.

MAESHIMA, M. Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1465, n. 1-2, p. 37–51, 2000.

MAHARAJAN, T. *et al.* Phosphate supply influenced the growth, yield and expression of *PHT1* family phosphate transporters in seven millets. **Planta**, 2019.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional de plantas**: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: Potafós, 1997. 304 p.

MITSUDA, N. *et al.* Novel type *Arabidopsis thaliana* H⁺-PPase is localized to the Golgi apparatus. **FEBS Letters**, v. 488, p. 29–33., 2001.

MLODZINSKA, E.; ZBOINSKA, M. Phosphate Uptake and Allocation - A Closer Look at *Arabidopsis thaliana* L. and *Oryza sativa* L. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1198, 2016.

MUTO, Y. *et al.* Vacuolar proton pumps and aquaporins involved in rapid internode elongation of deepwater rice. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 114–122, 2011.

NEZAMIVAND-CHEGINI, M. *et al.* New insights into the evolution of *SPX* gene family from algae to legumes; a focus on soybean. **BMC Genomics**, v. 22, n. 915, 2021.

NUSSAUME, L. *et al.* Phosphate import in plants: Focus on the *PHT1* transporters. **Frontiers in Plant Science**, v. 2, p. 1–8, 2011.

PAEZ-VALENCIA, J. *et al.* Enhanced proton translocating pyrophosphatase activity improves nitrogen use efficiency in Romaine Lettuce. **Plant Physiology**, v. 161, n. 3, p. 1557–1569, 2013.

PALACIO-MEJÍA, J. D. *et al.* Geographic patterns of genomic diversity and structure in the C4 grass *Panicum hallii* across its natural distribution, **AoB PLANTS**, v. 13, n. 2, 2021.

PARSONS, J. J. Spread of African pasture grasses to the American tropics. **Journal of Range Management**, v. 25, p. 12-17, 1972.

PASZKOWSKI, U. *et al.* Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 13324–13329, 2002.

PATÊS, N. M. S. *et al.* Produção e valor nutritivo do capim-tanzânia fertilizado com nitrogênio e fósforo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n.11, p.1934-1939, 2008.

PEI, L. *et al.* Overexpression of *Thellungiella halophila* H⁺-pyrophosphatase gene improves low phosphate tolerance in Maize. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, e43501, 2012.

PEREIRA, L. E. T. *et al.* **Recomendações para correção e adubação de pastagens tropicais**. Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, 2018. 56 p.

PIZZIO, G. A. *et al.* *Arabidopsis* Type I proton-pumping pyrophosphatase expresses strongly in phloem, where it is required for pyrophosphate metabolism and photosynthate partitioning. **Plant Physiology**, v. 167, n. 4, p. 1541–1553, 2015.

POIRIER, Y. *et al.* A Mutant of *arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. **Plant Physiology**, v. 97, p. 1087-1093, 1991.

PONTIGO, S. *et al.* Phosphorus efficiency modulates phenol metabolism in wheat genotypes. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 18, n. 3, p. 904-920, set, 2018.

PRATHAP, V. *et al.* Phosphorus homeostasis: acquisition, sensing, and long-distance signaling in plants. **Molecular Biology Reports**, v. 49, p. 8071–8086, 2022.

PRIMO, C. *et al.* Plant proton pumping pyrophosphatase: the potential for its pyrophosphate synthesis activity to modulate plant growth. **Plant Biology**, 2019.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **A language and environment for statistical computing**: version 4.1.0. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2021. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 19 nov. 2021.

RAMAEKERS, L. *et al.* Strategies for improving phosphorus acquisition efficiency of crop plants. **Field Crops Research**, v. 117, n. 2-3, p. 169-176, 2010.

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

RAUSCH, C. *et al.* A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. **Nature**, v. 414, p. 462–470, 2001.

SANTOS, M. E. R. *et al.* Características morfogênicas e estruturais de perfilhos de capim-braquiária em locais do pasto com alturas variáveis. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 3, p. 535-542, 2011.

SARAFIAN, V. *et al.* Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 5, 1775–1779, 1992.

SATTELMACHER, B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. **New Phytologist**, v. 149, n. 2, p. 167-192, feb. 2001.

SCHILLING, R. K., *et al.* AVP1: One Protein, Many Roles. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 2, p. 154–162. 2017.

SCHUMACHER, K. pH in the plant endomembrane system — an import and export business. **Current opinion in plant biology**, v. 22, p. 71-76, 2014.

SECCO, D; BAUMANN, A.; POIRIER, 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**, v. 152 n. 3, p.1693-1704, mar. 2010.

SEGAMI, S. *et al.* Quantification, organ-specific accumulation and intracellular localization of type II H⁺-pyrophosphatase in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 51, n. 8, p. 1350–1360, 2010.

SEGAMI, S. *et al.* Biochemical, structural and physiological characteristics of vacuolar H⁺-pyrophosphatase, **Plant and Cell Physiology**, v. 59, n. 7, p.1300–1308, 2018.

SHAO, C-H. *et al.* Nitrate deficiency decreased photosynthesis and oxidation-reduction processes, but increased cellular transport, lignin biosynthesis and flavonoid metabolism revealed by RNA-Seq in *Oryza sativa* leaves. **PLoS ONE**, v. 15, n. 7, e0235975, 2020.

SHEN, J. *et al.* Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 997-1005, jul. 2011.

SHENG, M. *et al.* Systems biology-based analysis indicates that *PHO1;H10* positively modulates high light-induced anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* leaves. **Genomics**, v. 114, n. 3, 110363, 2022.

SHIN, H. *et al.* Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. **The Plant Journal**, v. 39, p. 629-642, 2004.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de Alimentos**: métodos químicos e biológicos. 3. ed. Viçosa: UFV, 2002. 235p.

SILVA, F. L. B. *et al.* Validation of reference genes for real-time quantitative PCR in *Brachiaria* grass under salt stress. **Plant Gene**, v. 27, 100319, 2021.

SILVA, J. L. S. da; BORTOLINI, F. **Forrageiras de verão**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2012.

SMITH, F. W. *et al.* Phosphate transport in plants. **Plant and Soil**, v. 248, p. 71–83, 2003.

SOUSA, A. C. B. *et al.* Molecular diversity and genetic structure of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.), a tropical pasture grass. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n. 3-4, p. 185-202, dec. 2011.

SRIVASTAVA, R. *et al.* The enhanced phosphorus use efficiency in phosphate-deficient and mycorrhiza-inoculated barley seedlings involves activation of different sets of *PHT1* transporters in roots. **Planta**, v. 254, n. 2, 2021.

SRIVASTAVA, S. *et al.* Cellular and subcellular phosphate transport machinery in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, 1914, jul. 2018.

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

STEFANOVIC, A. *et al.* Over-expression of *PHO1* in *Arabidopsis* leaves reveals its role in mediating phosphate efflux. **The Plant Journal**, v. 66, p. 689-699, 2011.

SUN, S. *et al.* A constitutive expressed phosphate transporter, *OsPht1;1*, modulates phosphate uptake and translocation in phosphate-replete rice. **Plant Physiology**, v. 159, n. 4, p. 1571–1581, 2012.

SUN, T. *et al.* Comprehensive genomic identification and expression analysis of the phosphate transporter (*PHT*) gene family in apple. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.

TAKAMORI, L. M. *et al.* Identification of endogenous reference genes for RT-qPCR expression analysis in *Urochloa brizantha* under abiotic stresses. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 8502, 2017.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021.

TAMURA, Y. *et al.* Identification and expression analysis of arbuscular mycorrhiza-inducible phosphate transporter genes of soybean. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 76, p. 309–313, 2012.

- TENG, W. *et al.* Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of PHT1 phosphate transporters in wheat. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.
- UR REHMAN, A. *et al.* Phosphorus and potassium application improves fodder yield and quality of *Sorghum* in Aridisol under diverse climatic conditions. **Agriculture**, v. 12, n. 5, p. 593, 2022.
- VALLE, C. B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, p. 460-472, jul./ago. 2009.
- VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, v. 157, p. 423-447, 2003.
- VENTER, M. *et al.* Sequence analysis and transcriptional profiling of two vacuolar H⁺-pyrophosphatase isoforms in *Vitis vinifera*. **Journal of Plant Research**, v. 119, n. 5, p. 469–478, 2006.
- VILELA, L.; MARTHA JÚNIOR, G. B.; MARCHÃO, R. L. Integração Lavoura-Pecuária Floresta: alternativa para intensificação do uso da terra. **Revista UFG**, ano XIII, n. 13, p. 92-99, dez. 2012.
- WANG, D. *et al.* Roles, regulation, and agricultural application of plant phosphate transporters. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.
- WANG, F. *et al.* Molecular mechanisms of phosphate transport and signaling in higher plants. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 74, p. 114-122, feb. 2018.
- WANG, J. *et al.* Genome-Wide identification and functional characterization of the phosphate transporter gene family in sorghum. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 670, 2019.
- WANG, X. *et al.* Phosphate transporters *OsPHT1;9* and *OsPHT1;10* are involved in phosphate uptake in rice. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, n. 5, 2014.
- WANG, Y. *et al.* Structure and expression profile of the *Arabidopsis PHO1* gene family indicates a broad role in inorganic phosphate homeostasis. **Plant Physiology**, v. 135, n. 1, p. 400-411, may. 2004.
- WEGE, S. *et al.* The EXS Domain of *PHO1* Participates in the response of shoots to phosphate deficiency via a root-to-shoot signal. **Plant Physiology**, v. 170, p. 385–400, jan. 2016.

WIEL, C. C. M.; LINDEN, C. G.; SCHOLTEN, O. E. Improving phosphorus use efficiency in agriculture: opportunities for breeding. **Euphytica**, v. 207, n. 1, p. 1-22, jan. 2016.

YANG, H. *et al.* Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H⁺-pyrophosphatase. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, n. 6, p. 735–745, 2007.

YANG, H. *et al.* Over-expression of the Arabidopsis proton-pyrophosphatase AVP1 enhances transplant survival, root mass, and fruit development under limiting phosphorus conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 12, p. 3045-53, 2014.

YANG, J. *et al.* Global survey and expressions of the phosphate transporter gene families in *Brassica napus* and their roles in phosphorus response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1752, 2020.

YANG, P.; WANG, D.; KANG, L. Alternative splicing level related to intron size and organism complexity. **BMC Genomics**, v. 22, 853, 2021.

YANG, S. Y. *et al.* Nonredundant regulation of rice arbuscular mycorrhizal symbiosis by two members of the *PHOSPHATE TRANSPORTER1* gene family. **The Plant Cell** v. 24, n. 10, p. 4236-4251, 2012.

ZHANG, F. *et al.* Involvement of *OsPht1;4* in phosphate acquisition and mobilization facilitates embryo development in rice. **The Plant Journal**, v. 82, n. 4, p. 556–569, 2015.

ZHANG, Y. *et al.* Integrative analysis of the wheat *PHT1* gene family reveals a novel member involved in arbuscular mycorrhizal phosphate transport and immunity. **Cells**, v. 8, n. 5, p. 490, 2019.

ZHANG, Y. *et al.* The structure, functional evolution, and evolutionary trajectories of the H⁺-PPase gene family in plants. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 195, 2020.

ZHANG, Z.; LIAO, H; LUCAS, W. J. Molecular mechanisms underlying phosphate sensing, signaling, and adaptation in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 56, n. 3, p. 192–220, 2014.

ZHAO, X. *et al.* Genome-wide identification and structural analysis of pyrophosphatase gene family in cotton. **Crop Science**, v. 56, n. 4, p.1831, 2016.

ZHOU, G. *et al.* Lignin metabolism plays an essential role in the formation of corky split vein caused by boron deficiency in 'Newhall' navel orange (*Citrus sinensis* Osb.). **Scientia Horticulturae**, v. 294, 110763, 2022.

ZHOU, Y. *et al.* Overexpression of V-type H⁺ pyrophosphatase gene *EdVP1* from *Elymus dahuricus* increases yield and potassium uptake of transgenic wheat under low potassium conditions. **Scientific Reports**, v. 10, n. 5020, 2020.