

**JOSÉ FRANCISCO DE CARVALHO GONÇALVES**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E TOLERÂNCIA DE  
SORGO À TOXICIDADE DO ALUMÍNIO**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
SETEMBRO - 1998**

**JOSÉ FRANCISCO DE CARVALHO GONÇALVES**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E TOLERÂNCIA DE  
SORGO À TOXICIDADE DO ALUMÍNIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “*Doctor Scientiae*”.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
SETEMBRO - 1998**

**JOSÉ FRANCISCO DE CARVALHO GONÇALVES**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E TOLERÂNCIA DE  
SORGO À TOXICIDADE DO ALUMÍNIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “*Doctor Scientiae*”.

APROVADA: 29 de julho de 1998.

---

Renato Sant’Anna

---

Elza Fernandes de Araújo  
(Conselheira)

---

Marco Antonio Oliva Cano

---

Marco Aurélio Pedron e Silva

---

José Cambraia  
(Orientador)

A Deus, pela plenitude do seu amor.

Aos meus pais, José Gonçalves e Maria de Lourdes .

Às minhas irmãs, Gertrudes, Iracema, Verônica e Márcia.

Ao meu irmão Luciano,

Dedico este trabalho.

## AGRADECIMENTO

Esta tese não seria escrita sem a colaboração, o incentivo e o apoio de muitas pessoas e instituições. Citar todas seria impossível. Mencionarei apenas algumas que, de diferentes formas, contribuíram diretamente para esta realização.

- À Universidade Federal de Viçosa - UFV, pelo Curso oferecido.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.
- À Comissão Orientadora da Tese:
  - Prof. José Cambraia, meu orientador, com respeito, admiração e gratidão.
  - Prof. Paulo Roberto Mosquim, e Prof<sup>a</sup> Elza Fernandes de Araújo, meus conselheiros, pela colaboração e pelas precisas correções.
  - Aos meus Professores, pelos ensinamentos, pelas orientações e pela agradável convivência:
    - Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva,
    - Prof. Marco Antonio Oliva Cano,
    - Prof. Moacyr Maestri,
    - Prof. Raimundo Santos Barros,
    - Prof. Renato Sant'Anna,
    - Prof. Rolf Puschmann,
    - Prof. Eldo Monteiro da Silva,
    - Prof. Wagner Campos Otoni,

- Prof. Gulab Newandram Jham,
- Prof. Paulo César Fontes.
- A Andreia, flor de rara beleza, por sua dedicação e carinho.
- Aos meus cunhados, Rogério, Marcus, Lúcio e Dênio; e aos meus sobrinhos, Daniel, Esther, André, Isabela, Samyla, Ruth, Isadora, Lucas e Matheus.
- Aos meus amigos, Paulo Henrique P. Peixoto, Romeu Fávaro, Ricardo Frederico Euclides, Cândido Alves da Costa, Cícero Antônio de Sousa, Césio Humberto.
- A todos os colegas de Curso, de modo especial, a Juraci, Jamil, Claudivam, Marco Antônio Aguilar, Marcelo Mielke.
- A todos os funcionários e professores do Departamento de Biologia Vegetal e do Laboratório de Biofísica.
- Ao técnico José Antônio Bhering e ao estudante de iniciação científica Roberto de Carvalho Cambraia.

Recebam meus sinceros agradecimentos.

## **BIOGRAFIA**

JOSÉ FRANCISCO DE CARVALHO GONÇALVES, filho de José Gonçalves Sobrinho e de Maria de Lourdes de Carvalho Gonçalves, nasceu em 25 de outubro de 1967, em Natal, Rio Grande do Norte.

Ingressou no Curso de Agronomia, na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), em março de 1986. Em abril de 1988, iniciou trabalhos de iniciação científica na área de Nutrição de Plantas e, em maio de 1990, defendeu dissertação de graduação, diplomando-se Engenheiro-Agrônomo.

Em março de 1991, iniciou o Curso de Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), concluindo-o em dezembro de 1993.

Em março de 1994, iniciou o Curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo tese em julho de 1998.

## CONTEÚDO

EXTRATO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
CAPÍTULO 1	
EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE O CRESCIMENTO DE PLANTAS DE SORGO, OS TEORES DE P, K, Ca E Mg E A AMENIZAÇÃO DA TOXICIDADE VIA APLICAÇÃO DE ÁCIDO MÁLICO .....	10
1. INTRODUÇÃO .....	10
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
2.1. Obtenção e cultivo das plântulas.....	12
2.2. Efeito do Al sobre o crescimento e os teores dos elementos minerais nas plantas .....	13
2.3. Distribuição do Al nos ápices radiculares.....	13
2.4. Amenização da toxicidade do Al pela aplicação de ácido málico.....	14
2.5. Delineamento experimental .....	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
3.1. Efeito do Al sobre o crescimento e os teores dos elementos minerais nas plantas .....	15

3.1.1. Efeito do Al sobre o peso da matéria seca .....	15
3.1.2. Efeito do Al sobre o comprimento da maior raiz (CMR) .....	17
3.1.3. Efeito do Al sobre os teores de Al e a sua distribuição nos ápices radiculares.....	20
3.1.4. Efeito do Al sobre os teores de P, K, Ca e Mg .....	23
3.2. Amenização da toxicidade do Al .....	32
4. CONCLUSÕES .....	35
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE OS TEORES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NO TECIDO VEGETAL E NA SEIVA XILEMÁTICA E O EFLUXO DE ÁCIDO MÁLICO PARA A SOLUÇÃO NUTRITIVA.....</b>	
	36
1. INTRODUÇÃO .....	36
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	39
2.1. Obtenção e cultivo das plântulas.....	39
2.2. Efeito do Al sobre os teores de ácidos orgânicos no tecido vegetal.....	40
2.3. Efeito do Al sobre os teores de ácidos orgânicos na seiva xilemática.....	41
2.4. Efeito do Al sobre o efluxo do malato para a solução nutritiva .....	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
3.1. Efeito do Al sobre os teores de ácidos orgânicos nos tecidos .....	44
3.2. Efeito do Al sobre os teores de ácidos orgânicos na seiva xilemática.....	47
3.3. Efluxo de malato para a solução nutritiva.....	50
4. CONCLUSÕES .....	52
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS.....</b>	
	53
1. INTRODUÇÃO .....	53
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	56
2.1. Obtenção e cultivo das plântulas.....	56
2.2. Determinação da atividade de enzimas do metabolismo do ácido málico ...	57
2.3. Determinação da atividade de enzimas do metabolismo do ácido t-aconítico.....	59

2.4. Delineamento experimental .....	60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	61
3.1. Efeito do Al sobre a atividade de enzimas do metabolismo do ácido málico .....	61
3.1.1. Efeito do Al sobre a atividade da carboxilase do fosfoenolpiruvato .....	61
3.1.2. Efeito do Al sobre a atividade da fumarase .....	63
3.1.3. Efeito do Al sobre a atividade da enzima málica (NAD <sup>+</sup> ) .....	64
3.1.4. Efeito do Al sobre a atividade da desidrogenase do malato .....	65
3.1.5. Efeito do Al sobre a atividade da enzima málica (NADP <sup>+</sup> ) .....	66
3.2. Efeito do Al sobre a atividade de enzimas do metabolismo do ácido t-aconítico .....	68
3.2.1. Efeito do Al sobre a atividade da isomerase do aconitato .....	68
3.2.2. Efeito do Al sobre a atividade da desidrogenase do isocitrato .....	69
3.2.3. Efeito do Al sobre a atividade da desidratase do citrato .....	70
3.3. Atividade das enzimas do metabolismo de ácidos orgânicos e a tolerância de plantas de sorgo ao Al .....	72
4. CONCLUSÕES .....	73
3. RESUMO E CONCLUSÕES .....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	77
APÊNDICE .....	85

## EXTRATO

GONÇALVES, José Francisco de Carvalho, D.S., Universidade Federal de Viçosa, setembro, 1998. **Produção de ácidos orgânicos e tolerância de sorgo à toxicidade do alumínio.** Orientador: José Cambraia. Conselheiros: Paulo Roberto Mosquim e Elza Fernandes de Araújo.

Este estudo objetivou analisar os efeitos do alumínio (Al), em nível tóxico, sobre o crescimento de plantas de sorgo, os teores e a exsudação de ácidos orgânicos, e a atividade de enzimas ligadas à síntese e à degradação destes ácidos, em plantas de dois cultivares de sorgo, um sensível (BR007A) e outro tolerante (BR006R) ao Al. Os pesos da matéria seca das duas partes das plantas dos dois cultivares e o comprimento da maior raiz diminuíram com o aumento das concentrações de Al na solução, tendo o cultivar sensível sido mais severamente afetado que o tolerante. Os teores de Al, tanto nas raízes quanto na parte aérea, aumentaram com os aumentos nas concentrações de Al na solução nutritiva e o cultivar sensível acumulou mais Al nas duas partes da planta. O Al acumulou-se principalmente no ápice radicular (0-5 mm). Este segmento da raiz, além de apresentar maior teor de Al que os demais segmentos analisados, no cultivar sensível, apresentou cerca de 25,0% mais Al que o cultivar tolerante. Os teores de P, K, Ca e Mg diminuíram com o aumento das concentrações de Al na solução

nutritiva, nas duas partes da planta, mas os cultivares não diferiram entre si, exceto quanto ao teor de Ca na parte aérea. A aplicação de ácido málico resultou em amenização do efeito inibitório do Al sobre o alongamento radicular, mas não houve eliminação completa da toxicidade do Al, mesmo na concentração mais alta. Os teores dos principais ácidos orgânicos, encontrados nas raízes e na parte aérea, aumentaram com a exposição das plantas ao Al. Os dois ácidos orgânicos mais abundantes em sorgo e, provavelmente, os mais importantes do ponto de vista da tolerância ao Al foram os ácidos málico e t-aconítico. Dentre todos os ácidos orgânicos, o ácido málico foi aquele que, na presença de Al, sofreu o maior aumento absoluto no seu teor, sempre mais pronunciado no cultivar tolerante, sugerindo um papel importante deste ácido no mecanismo de tolerância das plantas à toxicidade de Al. O Al promoveu aumento no teor do ácido cítrico transportado na seiva xilemática, principalmente no cultivar tolerante, no qual foi cerca de 26,0% maior que no cultivar sensível. O Al, de modo geral, influenciou a atividade das enzimas estudadas, no sentido de estimular a síntese e, ou, inibir a degradação do ácido málico. Nos casos dos ácidos cítrico e t-aconítico, isto nem sempre aconteceu. No cultivar tolerante, as enzimas de síntese dos ácidos orgânicos mostraram-se mais sensíveis ao estímulo, enquanto as enzimas de degradação foram mais sensíveis ao efeito inibitório do Al tóxico. As enzimas importantes no controle da produção de ácidos orgânicos e determinantes do comportamento diferencial dos cultivares de sorgo frente ao estresse de Al parecem ser a carboxilase do fosfoenolpiruvato e, principalmente, a fumarase.

## ABSTRACT

GONÇALVES, José Francisco de Carvalho, D.S., Universidade Federal de Viçosa, September, 1998. **Production of organic acids and sorghum tolerance to aluminum toxicity.** Adviser: José Cambraia. Committee members: Paulo Roberto Mosquim and Elza Fernandes de Araújo.

This work aimed to study effects of aluminum (Al) at a toxic level, on sorghum growth, the contents and exudation of the organic acids as well as the activities of the enzymes related to synthesis and degradation of those acids in sorghum cultivars, one of them being sensible (BR007A) and another tolerant (BR006R). The dry matter weight in both parts of the plants and the longest root length reduced with the Al concentration increases, being the sensible cultivar more severely affected than the tolerant one. The Al contents either in the roots and the aerial part increased with the increasing Al concentrations in the nutritive solution while the sensible cultivar cumulated more Al in both plant parts; Al cumulated mainly at root apex (0-5 mm). Besides presenting a higher Al content than the other segments in the sensible cultivar, the root apex showed about 25% more Al than in the tolerant cultivar. The P, K, Ca and Mg contents diminished with the increase in Al concentrations in both plant parts, although the cultivars did not differ from each other, except for Ca content in the aerial part. Application of the malic acid caused the Al inhibitory effects on the elongation of root to soften,

but Al toxicity was not completely eliminated even at a higher concentration. The contents of the main organic acids found in the roots and the aerial part increased with plant exposure to Al. The malic and t-aconitic acids showed to be mostly abundant and probably the most important under the tolerance point of view. In Al presence the malic acid suffered the greatest absolute increase always more accentuated in the tolerant cultivar suggesting its important role on plant tolerance mechanism to Al toxicity. Al promoted an increase in the content of the citric acid transported in the xylem sap mainly in the tolerant cultivar which was 26.0% higher than the sensible cultivar. In general the Al influenced the enzyme activities by stimulating the synthesis and, or, inhibiting the malic acid degradation, which did not always occur for the citric and t-aconitic acids. In the tolerant cultivar the enzymes related to the organic acid synthesis showed to be more sensible to stimulus, whereas the ones of degradation were more sensible to the inhibitory effects from toxic Al. Those enzymes which are important in controlling the production of the organic acids and in determining the differential behavior of sorghum cultivars under Al stress appear to be a phosphoenolpyruvate carboxylase and mainly the fumarase.

## 1. INTRODUÇÃO

A toxicidade causada pelo alumínio é um dos mais importantes fatores que limita o crescimento das plantas, especialmente em solos com pH abaixo de 5,0. Estimativas revelam que aproximadamente 40% dos solos aráveis e, talvez 70% da terra potencialmente utilizável para produção de alimentos e de biomassa do planeta, são ácidos e, portanto, sujeitos à toxicidade de Al. No Brasil, em solos sob vegetação de “cerrado”, existe uma área de 1,8 milhões de km<sup>2</sup> ou cerca de 20% da área territorial do país apresentando não somente acidez, mas, também, baixos teores de P, Ca, Mg e K e elevados teores de Al trocável. No Estado de Minas Gerais a situação não é melhor, existindo o problema de toxicidade de Al na maior parte de seu território.

Além da acidez natural dos solos, as chuvas ácidas, bem como o uso indiscriminado de certos fertilizantes, têm contribuído para a acidificação de áreas agricultáveis, que anteriormente não estavam sofrendo o problema de toxicidade de Al.

Após ser absorvido pelas plantas, o Al, em níveis tóxicos, age nas células modificando a estrutura e a função das membranas celulares, inibindo a síntese de ácidos nucléicos e de proteínas, e prejudicando todo o metabolismo da planta, levando-a a manifestar uma sintomatologia de toxicidade característica. Há, em

conseqüência, inibição do crescimento das raízes e da parte aérea, reduzindo de forma drástica a produção das culturas.

Dentre outras, a prática da calagem tem sido uma das mais utilizadas para solucionar o problema da elevada acidez de certos solos. A sua aplicação quase sempre se restringe às camadas superficiais do solo, além de requerer grande quantidade de corretivos e de mão-de-obra, diminuindo significativamente os lucros dos produtores. Esses problemas, de certo modo, inviabilizam a utilização intensiva e exclusiva dessa técnica. Como alternativa, os melhoristas de plantas, utilizando técnicas convencionais ou de biotecnologia, procuram obter novas variedades tolerantes e, ou, aumentar a tolerância das plantas ao Al.

Qualquer que seja a técnica adotada, há, e sempre houve, muito interesse em se conhecer o(s) mecanismo(s) bioquímico(s) e, ou fisiológico(s) da tolerância das plantas ao Al. A expectativa é de que, conhecendo-se estes mecanismos de tolerância, fique mais fácil e mais rápido obterem-se, por meio da engenharia genética, variedades ou cultivares que sejam ao mesmo tempo mais tolerantes e mais produtivas. Existe, atualmente, grande número de publicações na literatura, abordando os mais variados aspectos da toxicidade de Al e da tolerância das plantas a este elemento. As bases fisiológicas e bioquímicas da ação tóxica e da tolerância ao Al, contudo, permanecem essencialmente obscuras.

Este trabalho teve como objetivo analisar uma das principais hipóteses explicativas da tolerância ao Al, em plantas, sugerindo uma possível participação dos ácidos orgânicos na amenização dos efeitos fitotóxicos deste elemento. Para tal, estudou-se o efeito do Al sobre a síntese, a degradação, o transporte e a exsudação de ácidos orgânicos em dois cultivares de sorgo com tolerância diferencial ao Al, na tentativa de esclarecer e, conseqüentemente, estabelecer um modelo explicativo da ação tóxica do Al em plantas de sorgo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O alumínio (Al) é o terceiro elemento químico em abundância na litosfera, vindo logo após o oxigênio e o silício. Em alguns tipos de solos de regiões tropicais, o Al pode ser mais abundante que o silício. Sob condições naturais, várias reações bióticas ou abióticas do solo, como também as chuvas ácidas intensificadas pela poluição industrial, acidificam os solos, provocando a decomposição dos aluminossilicatos e, conseqüentemente, liberando o Al em forma trocável (MARSCHNER, 1995). A concentração de Al na solução de solos minerais normalmente encontra-se na faixa de 10 a 100  $\mu\text{M}$  (JONES et al., 1998).

O Al liberado da dissolução das argilas, por efeito de vários fatores do solo, pode tornar-se disponível para as raízes em concentrações elevadas que resultam em injúrias para as plantas (RINCÓN e GONZALES, 1992 e KOCHIAN, 1995).

Um dos mais importantes efeitos do Al sobre as plantas parece ser a inibição do crescimento radicular (KOCHIAN, 1995), sendo o meristema apical o sítio principal desta ação (BENNET e BREEN, 1991 e MARSCHNER, 1991). Plantas não-adaptadas, sob níveis tóxicos de Al, têm o desenvolvimento de seus sistemas radiculares prejudicados. As raízes tornam-se grossas, curtas e funcionalmente ineficientes. O maior acúmulo de Al no ápice radicular sugere que esta região da raiz é o sítio principal da sua ação inibitória sobre o crescimento

(BENNET et al., 1985 e DELHAIZE et al., 1993b). RYAN et al.(1992) mostraram que somente o ápice da raiz, aproximadamente 2 a 3 mm, incluindo o meristema e a coifa, necessitam ser expostos ao Al para promover a inibição no crescimento das raízes.

Em solução nutritiva, concentrações micromolares de Al são suficientes para inibir o crescimento radicular em apenas 60 min (DELHAIZE e RYAN, 1995). BENNET et al. (1987) sugerem que a coifa seja o sítio de percepção da injúria induzida pelo Al. Estes autores postulam, também, que o Al possa inibir indiretamente o crescimento das raízes via um desconhecido caminho de transdução de sinais, envolvendo a coifa, o meristema apical, as substâncias de crescimento e outros sinais como íons-cálcio, calmodulina, etc.

Os mecanismos de tolerância desenvolvidos por plantas superiores face às injúrias causadas pelo Al em níveis tóxicos podem ser separados basicamente em duas categorias: os de exclusão e os de tolerância (TAYLOR, 1988).

Nos mecanismos de exclusão, o Al seria impedido de interagir com os sítios metabólicos sensíveis, ao ser imobilizado às cargas negativas de ácidos carboxílicos constituintes da parede celular ou ao ser precipitado em razão de aumento do pH da rizosfera, ou ao ser complexado por compostos orgânicos produzidos e exsudados pelas plantas, antes deste elemento penetrar no simplasma. Nos mecanismos de tolerância, acredita-se que o Al penetre no simplasma, mas possa ser desintoxicado, imobilizado, compartimentalizado ou que a planta modifique seu metabolismo para desenvolver uma tolerância diferencial a este íon (TAYLOR, 1988).

Apesar do grande número de pesquisas realizadas no sentido de entender melhor a ação fitotóxica do Al, alguns aspectos de sua toxicidade ainda são motivos de controvérsias ou são simplesmente subentendidos. Mais recentemente, algumas evidências têm recebido considerável atenção, como é o caso do efluxo de Al através da plasmalema (HAUG e SHI, 1991), da exsudação de ácidos orgânicos (MIYASAKA et al., 1991; DELHAIZE et al., 1993a; PELLET et al., 1995; RYAN et al., 1995; FUENTE et al., 1997, LARSEN et al., 1998), e do efluxo de fosfato inorgânico (PELLET et al., 1996), considerados componentes

importantes do mecanismo de exclusão. Todavia, a hipótese que envolve a participação dos ácidos orgânicos sugere a formação de um sistema de proteção mais completo. Esses ácidos poderiam imobilizar o Al em nível celular ou, por ação preventiva, complexá-lo na superfície da raiz e, ou, no apoplasma (BENNET et al., 1985 e TAYLOR, 1988).

Genótipos sensíveis de trigo acumularam cerca de três a oito vezes mais Al que genótipos tolerantes (TICE et al., 1992). No entanto, este dado é conflitante com outros trabalhos que indicam não existir diferença no teor de Al entre cultivares de trigo sensível e tolerante, nas primeiras 12 h de exposição ao Al, ou até mesmo o cultivar tolerante acumular mais Al quando as plantas são expostas a tratamentos prolongados (WALLACE et al., 1982 e ZHANG e TAYLOR, 1989). Independentemente de haver ou não diferença no acúmulo de Al entre cultivares com tolerância diferencial, os meristemas radiculares tornam-se sítios críticos (RINCÓN e GONZALES, 1992). Nesse aspecto, o mecanismo de exclusão assume grande relevância, pois as plantas tolerantes parecem excluir o Al, tanto do apoplasma quanto do simplasma. Além disso, muito comumente nessa condição, observa-se a liberação de substâncias, que podem formar complexos de coordenação com o Al de baixa ou nenhuma toxicidade TAYLOR (1988).

Evidências bastante antigas já sugeriam a possibilidade de os ácidos orgânicos estarem envolvidos no mecanismo de tolerância ao Al. Talvez, WRIGHT (1948) tenha sido o primeiro a observar que diferentes sistemas tampões ou concentrações diferenciadas de ácidos orgânicos podiam influenciar na maior ou menor atividade do Al. No entanto, as pesquisas referentes à produção de ácidos orgânicos nas plantas sob condições de estresse de Al somente receberam maior atenção nas últimas duas décadas (HORST et al., 1982; CAMBRAIA et al., 1983; SUHAYDA e HAUG, 1986; TAYLOR, 1988; MIYASAKA et al., 1991; DELHAIZE et al., 1993a; RYAN et al., 1995; FUENTE et al., 1997, LARSEN, et al., 1998). MIYASAKA et al. (1991), trabalhando com cultivares de feijão de corda, em cultivo asséptico contendo Al, observaram que o sistema radicular do cultivar tolerante liberou setenta vezes mais citrato que as raízes do cultivar sensível. KOCHIAN (1995) aponta a

liberação de ácidos orgânicos pelos ápices radiculares, induzida por Al, como um dos mais importantes componentes do mecanismo de tolerância ao Al em genótipos de trigo. A produção desses compostos orgânicos sugere uma possível imobilização do Al na rizosfera, no apoplasto, com a participação de componentes estruturais da parede celular, como também no simplasma. A formação de complexos estáveis desses exsudatos com o Al ainda apresenta outra característica importante que é a diminuição da atividade do Al monomérico, inibindo sua absorção através da membrana plasmática (TAYLOR, 1991).

O aumento no teor de ácidos orgânicos tem sido observado sob condições de estresse de Al em várias espécies que apresentam tolerância diferencial a este elemento, como *Sorghum bicolor* (CAMBRAIA et al., 1983), *Zea mays* L. (SUHAYDA e HAUG, 1986), *Phaseolus vulgaris* (MIYASAKA et al., 1991) e *Triticum aestivum* (DELHAIZE et al., 1993a e BASU et al., 1994). Em sorgo, CAMBRAIA et al. (1983) observaram maior acúmulo de ácido t-aconítico e malato no cultivar tolerante, quando comparado com o cultivar sensível. Em trigo, o malato foi o ácido orgânico predominante no exsudato, e o aumento na exsudação do malato ocorreu consistentemente no cultivar tolerante (DELHAIZE et al., 1993a). Esse incremento foi atribuído à maior síntese e exportação desse ácido orgânico (BASU et al., 1994).

DELHAIZE et al. (1993a) encontraram fortes evidências de que o Al pode agir como sinalizador da liberação de malato. Segundo esses autores, a produção e exsudação de malato só é disparada por  $Al^{3+}$ , não sendo influenciada por outros cátions polivalentes como  $La^{3+}$ ,  $Sc^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ . Além disso, o efluxo de malato é observado somente nos ápices radiculares, tecidos reconhecidos como sítios primários da toxicidade do Al. Corroborando tais evidências, as taxas mais altas de exsudação de malato foram consistentemente observadas em cultivares tolerantes ao Al, e a adição do ácido málico à solução nutritiva contendo Al protegeu as raízes do cultivar sensível da toxicidade deste elemento.

No citoplasma, o malato existe primariamente como ânion divalente e seu transporte para fora das células é compensado por uma absorção equivalente de ânions, ou pelo efluxo de cátions. DURIEUX et al. (1993 e 1995) observaram que

a absorção de nitrato por plântulas de milho diminuiu após 30 min de exposição ao Al, sugerindo que o nitrato estaria sendo trocado pelo malato. Todavia, não se pode descartar a possibilidade de outros ânions orgânicos ou inorgânicos estarem envolvidos nesse processo. O malato sintetizado no citoplasma é exsudado para o apoplasto por meio de canais. Nesse sentido, RYAN et al. (1995) sugerem que o Al possa influenciar de três formas a abertura de canais na membrana plasmática: 1) O Al interagiria diretamente com a proteína que forma o canal, causando uma mudança conformacional e aumentando seu tempo de abertura ou condutância; 2) O Al interagiria com receptores específicos na superfície da membrana induzindo a formação de mensageiros secundários que mudariam a atividade dos canais; e 3) O Al no citoplasma alteraria a atividade do canal, diretamente, por ligação com a proteína canal ou indiretamente via transdução de sinais.

O efluxo de malato por ápices radiculares, através de canais ou por outro sistema de transporte transmembrana, atualmente tem sido considerado como uma das principais vias de tolerância e, talvez, um mecanismo geral de tolerância contra a ação tóxica do Al em plantas de trigo (TICE et al., 1992; DELHAIZE et al., 1993b; RYAN et al., 1995).

Com relação à complexação organo-metálica, alguns trabalhos têm mostrado que esta reação diminui o efeito tóxico do Al sobre as plantas (TAN e BINGER, 1986 e HUE et al., 1986). De acordo com HUE et al. (1986), o grau de amenização da toxicidade do Al depende principalmente da concentração e da estabilidade do complexo formado. Os ácidos orgânicos: cítrico, málico, oxálico, etc. formam complexos estáveis com o Al, ao contrário dos ácidos fórmico, maléico e succínico. Estes, por formarem complexos de baixa estabilidade, são considerados como pouco eficientes na amenização da toxicidade de Al. Na verdade, os ácidos que possuem grupos  $\text{RCOCOO}^-$ ,  $\text{RCOCH}_2\text{COO}^-$ ,  $\text{RCO-HCOO}^-$  e  $\text{RCOHCH}_2\text{COO}^-$  podem formar complexos fortes com Al, por meio de ligações do tipo anel, envolvendo cinco a seis átomos de carbono. O complexo Al-ligante será tanto mais estável quanto maior for o número desse tipo de ligação.

Em plantas, ainda existem muitas contradições e desinformações relativas à biossíntese e ao acúmulo de ácidos orgânicos. Há necessidade de melhor entendimento dos processos de síntese, da atividade e da regulação das principais enzimas envolvidas nas rotas bioquímicas ligadas ao metabolismo destes ácidos, de modo especial, no caso de plantas sob estresse de Al. RYAN et al. (1995) observaram que ápices radiculares de plântulas de trigo tolerantes ao Al sintetizaram mais malato que os ápices das plantas sensíveis. No entanto, encontraram apenas pequeno efeito do Al sobre as atividades das principais enzimas relacionadas com o metabolismo do malato, a carboxilase do fosfoenolpiruvato e a desidrogenase do malato. Os autores sugerem que, tendo esses cultivares a mesma capacidade de produzir malato, a diferença em termos de tolerância à toxicidade do Al estaria na capacidade para transportar o malato através da membrana plasmática.

Na maioria das plantas dicotiledôneas, o ácido orgânico encontrado em maior quantidade é o cítrico. MIYASAKA et al. (1991), trabalhando com cultivares de feijão de corda em cultivo asséptico contendo Al, observaram que o sistema radicular do cultivar tolerante liberou setenta vezes mais citrato que as raízes do cultivar sensível. Com base em informações dessa natureza, FUENTE et al. (1997) produziram plantas transformadas de fumo e de mamão para superexpressar genes que codificam para a enzima sintase do citrato. Estes autores concluíram que a super produção de citrato resultou em maior tolerância das plantas ao estresse do Al.

Outros relatos sugerem que as enzimas cinases do  $\text{NAD}^+$ , reguladas ou não por calmodulina, e enzimas que catalisam reações bioquímicas de síntese de  $\text{NADP}^+$  estão envolvidas nas respostas à toxicidade do Al em trigo (SLASKI, 1989). Dessa forma, pela regulação da produção de  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$ , pode ocorrer limitação de várias outras reações dependentes destes co-fatores.

As rotas metabólicas de biossíntese e, ou, de degradação de ácidos orgânicos são complexas e bastante variadas, e ainda não estão perfeitamente esclarecidas. Hoje, sabe-se que as enzimas málicas dependentes de  $\text{NAD}^+$  e de  $\text{NADP}^+$ , a desidratase do citrato, a isomerase do aconitato, a desidrogenase do

isocitrato, além da carboxilase do fosfoenolpiruvato, da desidrogenase do malato e da fumarase, estão diretamente ligadas à síntese, à degradação e, conseqüentemente, à manutenção dos níveis dos ácidos málico, cítrico e aconítico, supostamente os mais importantes ácidos orgânicos para o mecanismo de tolerância ao Al em plantas. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos do Al sobre a atividade destas enzimas.

Qualquer que seja o mecanismo de tolerância das plantas ao Al, envolvendo a participação dos ácidos orgânicos: exclusão (MIYASAKA et al., 1991; DELHAIZE et al., 1993a; RYAN et al., 1995, FUENTE et al., 1997; LARSEN, et al., 1998), ou tolerância (HORST et al., 1982; CAMBRAIA et al., 1983; SUHAYDA e HAUG, 1986; TAYLOR, 1988) ou ambos, um estudo minucioso das rotas bioquímicas de biossíntese e de degradação, modo de transporte e de exsudação dos principais ácidos orgânicos contribuirá para o esclarecimento do(s) mecanismo(s) de tolerância ao Al em plantas de sorgo.

## **CAPÍTULO 1**

### **EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE O CRESCIMENTO DE PLANTAS DE SORGO, OS TEORES DE P, K, Ca E Mg E A AMENIZAÇÃO DA TOXICIDADE VIA APLICAÇÃO DE ÁCIDO MÁLICO**

#### **1. INTRODUÇÃO**

A toxicidade do Al tem sido identificada como um dos principais fatores limitantes do crescimento das plantas em solos ácidos (KOCHIAN, 1995). Esses solos são considerados agrônomicamente e economicamente mais difíceis de serem aproveitados para o cultivo agrícola, não somente pela alta concentração de  $H^+$ , mas, também, por possuírem baixos teores de P, Ca, Mg e K e elevados teores de Al trocável. Plantas não-adaptadas, sob níveis tóxicos de Al, têm grande limitação no crescimento dos seus sistemas radiculares (DELHAIZE e RYAN, 1995). As raízes tornam-se grossas, curtas e funcionalmente ineficientes para desenvolverem suas funções essenciais de absorção de água e de elementos minerais.

Deficiências de elementos minerais nas plantas são comumente associadas a alterações no metabolismo dos ácidos orgânicos que, por sua vez, no caso de plantas cultivadas em solos ácidos, apresentam tanto deficiências minerais quanto

mudanças no metabolismo dos ácidos orgânicos, quase sempre associadas à presença de Al em níveis tóxicos (POPP e KINZEL, 1981 e KOCHIAN, 1995).

Aumentos na produção, no acúmulo e na exsudação de ácidos orgânicos têm sido freqüentemente citados na literatura, para explicar a tolerância de certas plantas ao estresse causado pelo Al (KOCHIAN, 1995). Nesse sentido, existem várias publicações sugerindo a participação de ácidos orgânicos tanto nos mecanismos de exclusão (MIYASAKA et al., 1991; DELHAIZE et al., 1993a; BASU et al., 1994; FUENTE, et al., 1997), quanto de tolerância interna (CAMBRAIA et al., 1983 e SUHAYDA e HAUG, 1986).

Os ápices radiculares, de maneira geral, envolvidos por compostos orgânicos, acumulam quantidades de Al quase sempre maiores que outras partes do tecido vegetal maduro (BENNET e BREEN, 1991; RINCÓN e GONZALES, 1992). Estes resultados sugerem que as plantas capazes de produzirem e exsudarem mais ácidos orgânicos promovem a formação de uma barreira para inibir ou pelo menos amenizar a livre ação do Al tóxico.

O grau de amenização da toxicidade do Al, associado à exsudação de ácidos orgânicos e, ou, de outros compostos orgânicos ou inorgânicos depende principalmente da concentração e da estabilidade do complexo formado. Os ácidos orgânicos di e tri-carboxílicos, em geral, formam complexos estáveis com o Al, sendo considerados os mais importantes ácidos orgânicos na amenização da toxicidade de Al (HUE et al., 1986). A estabilidade do complexo será tanto maior quanto maior for o número de ligações estabelecida entre o(s) ligante(s) e o Al (TAN e BINGER, 1986 e HUE et al., 1986).

Neste trabalho, estudaram-se os efeitos do Al sobre o crescimento de plantas, os teores e a distribuição do Al na planta e em diferentes porções de segmentos radiculares, e os teores de P, K, Ca e Mg no tecido vegetal, utilizando-se dois cultivares de sorgo com tolerância diferencial ao Al. Adicionalmente, tentou-se amenizar o efeito do Al com a aplicação de ácido málico à solução nutritiva.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção e cultivo das plântulas

Nos experimentos, foram utilizados dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), com tolerância diferencial ao Al, sendo o BR007A o cultivar sensível e o BR006R o cultivar tolerante ao Al, fornecidos pelo Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, em Sete Lagoas - MG, Brasil.

As sementes, selecionadas quanto ao tamanho e à forma, após esterilização superficial com hipoclorito de sódio a 2%, durante 20 min, lavagem em água corrente e, em seguida, em água desmineralizada, foram colocadas em cartuchos de papel-substrato para germinação (pH neutro). Depois de preparados, os cartuchos foram transferidos para vasos com capacidade para 1,6 L, contendo solução nutritiva de Clark (CLARK, 1975), com um quinto da força iônica, sob aeração contínua, e cobertos com sacos plásticos para criar uma câmara úmida. Após três dias, os sacos plásticos foram retirados e as plântulas ficaram por mais quatro dias nos cartuchos. Completados sete dias, as plântulas foram uniformizadas quanto ao tamanho da raiz e da parte aérea e utilizadas nos diversos ensaios.

A obtenção das plântulas e todos os experimentos foram conduzidos em sala de crescimento com temperatura controlada ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ), fluxo de radiação fotossinteticamente ativa de  $230 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 h.

## **2.2. Efeito do Al sobre o crescimento e os teores dos elementos minerais nas plantas**

As plântulas foram transferidas em número de quatro para vasos plásticos de 1,6 L, contendo solução nutritiva de Clark completa (CLARK, 1975), pH 4,0, contendo os tratamentos com Al nas seguintes concentrações: 0, 50, 100, 200 e 400  $\mu\text{M}$ , na forma de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ , sendo o pH corrigido diariamente. Após sete dias, o cultivo foi interrompido, as plantas colhidas, lavadas em água corrente, em HCl 0,1 N e, em seguida, lavadas novamente em água corrente e enxaguadas em água desmineralizada e, então, divididas em raízes e parte aérea. Determinou-se o comprimento da maior raiz, no início e final do experimento, e o peso da matéria seca após secagem em estufa a  $70^\circ\text{C}$ , até peso constante. Após a mineralização das amostras com uma mistura nítrico-perclórica (ALLAN, 1969), os teores de Al e P, foram determinados por espectrofotometria do visível, pelo método de aluminona (WANG e WOOD, 1973) e pelo método de LINDEMAN (1958), respectivamente, e os demais elementos minerais, K, Ca e Mg por espectrofotometria de absorção atômica.

## **2.3. Distribuição do Al nos ápices radiculares**

Nesse experimento, as plântulas obtidas, conforme descrito no item 2.1., foram submetidas ou não ao tratamento com Al (185  $\mu\text{M}$ ), durante sete dias e, então, as plantas foram colhidas e as raízes foram seccionadas em segmentos de

5,0 mm, a partir da ponta da raiz até 20 mm (0-5, 5-10, 10-15 e 15-20). Após secados e mineralizados, os segmentos foram submetidos à análise de Al, como mencionado no item anterior.

#### **2.4. Amenização da toxicidade do Al pela aplicação de ácido málico**

Plântulas de sete dias, dos cultivares sensível e tolerante, obtidas conforme descrito anteriormente, selecionadas quanto à uniformidade de tamanho, foram expostas ou não ao Al na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , na presença de ácido málico nas concentrações de 0, 50, 100, 200 e 400  $\mu\text{M}$ , em solução de Clark, pH 4,0. Após cinco dias, as plântulas foram colhidas e mediu-se o comprimento da maior raiz (CMR), DELHAIZE et al. (1993a)

#### **2.5. Delineamento experimental**

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial (2 x 5) constituídos dos seguintes fatores: dois cultivares de sorgo (sensível e tolerante) e cinco doses de Al, no delineamento de blocos casualizados. Os resultados foram submetidos às análises de variância e de regressão. A significância dos coeficientes das equações de regressão ajustadas foi avaliada pelo teste F, a 5 e 1% de significância.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Efeito do Al sobre o crescimento e os teores dos elementos minerais nas plantas**

##### **3.1.1. Efeito do Al sobre o peso da matéria seca**

Os pesos da matéria seca das raízes e da parte aérea decresceram com o aumento dos níveis de Al na solução nutritiva (Figura 1). O cultivar sensível produziu menor quantidade de matéria seca que o tolerante, tanto nas raízes quanto na parte aérea. Nas raízes, a redução no peso da matéria seca causada pelo Al foi em média 30,7% maior no cultivar sensível, quando comparada com o cultivar tolerante. Na parte aérea, o cultivar sensível sofreu maior redução no peso da matéria seca que o cultivar tolerante, mas a diferença entre os cultivares decresceu com o aumento da concentração de Al na solução nutritiva até não mais existir diferença entre eles na concentração de 400  $\mu\text{M}$ . Nas concentrações mais baixas, como por exemplo 50  $\mu\text{M}$  de Al na solução nutritiva, as reduções no peso da matéria seca de raízes causadas pelo Al foram de 11,5% e 27,3% e na parte aérea de 17,8% e 22,7%, nos cultivares tolerante e sensível, respectivamente.

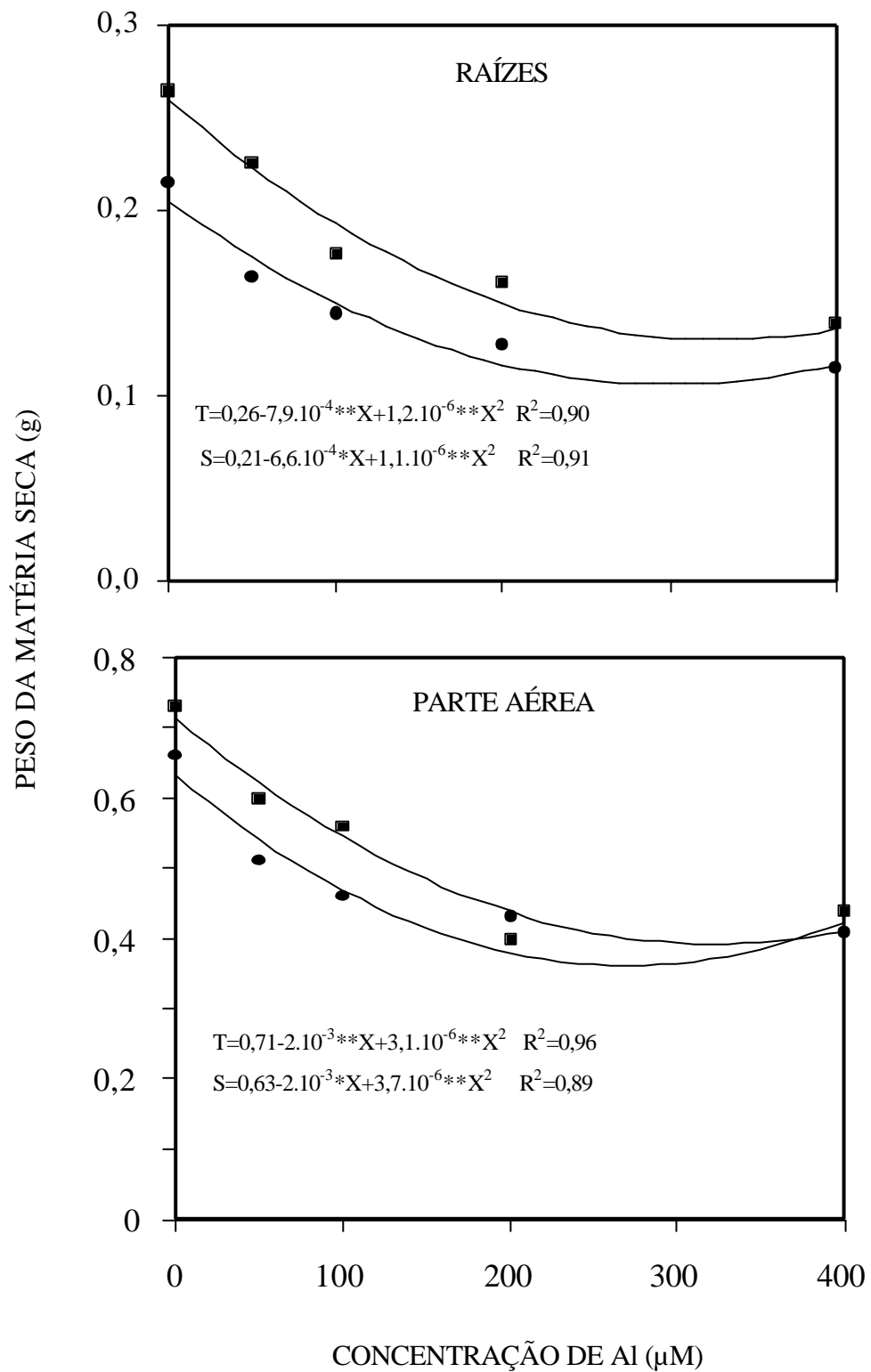


Figura 1 – Efeito de concentrações de Al sobre os pesos da matéria seca das raízes e da parte aérea de dois cultivares (S = sensível λ e T = tolerante v) de sorgo.

Assim sendo, o peso da matéria seca das raízes mostra mais claramente o diferencial de tolerância ao Al desses cultivares que o peso da matéria seca da parte aérea, fato este já bem relatado na literatura (TAYLOR, 1988; RENGEL, 1992; HAUG et al., 1994, DELHAIZE e RYAN, 1995). No entanto, observa-se que nas raízes e, principalmente, na parte aérea, as diferenças entre os cultivares diminuem e até desaparecem com o aumento na concentração de Al na solução nutritiva. CAMBRAIA et al. (1991) observaram resultados semelhantes a estes, também trabalhando com plantas de sorgo, e CAMBRAIA e CAMBRAIA (1995) confirmaram estas respostas a concentrações crescentes de Al em diferentes genótipos de milho. A inibição do crescimento da parte aérea, segundo MOUSTAKAS et al. (1995), é uma resposta secundária ao Al e, portanto, provavelmente inadequada para indicar diferenças entre os cultivares. Apesar disso, estes autores observaram que o Al provoca inibição parcial no transporte de elétrons na fotossíntese, levando a um decréscimo na eficiência de utilização da luz durante o estresse causado pelo Al, de modo mais intenso no cultivar sensível. Para LAZIC-JANCIC et al. (1991), diferenças no peso da matéria seca das raízes e da parte aérea não auxiliam na distinção de genótipos de milho para tolerância ao Al.

### **3.1.2. Efeito do Al sobre o comprimento da maior raiz (CMR)**

O efeito inibitório do Al sobre o comprimento da maior raiz (CMR) foi mais intenso nas concentrações mais baixas, até cerca de 100  $\mu\text{M}$  de Al na solução nutritiva. Em seguida, mesmo com o aumento nas concentrações de Al, não se observaram alterações no CMR (Figura 2). O cultivar sensível apresentou redução do CMR significativamente maior que o cultivar tolerante.

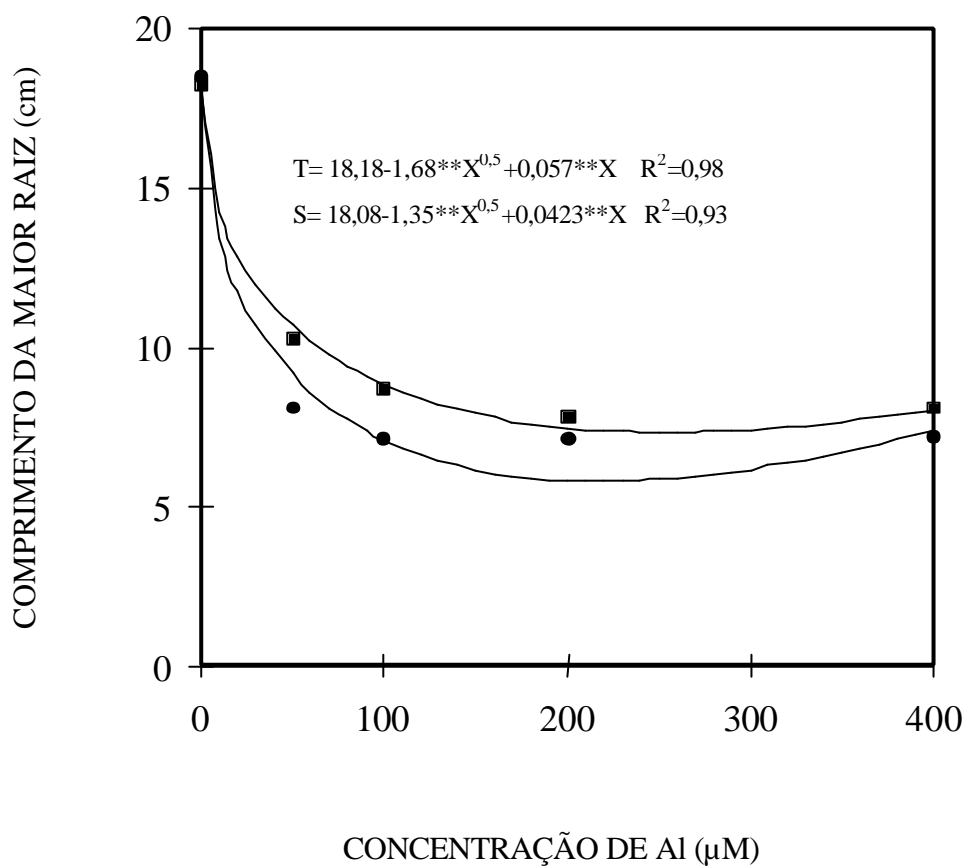


Figura 2 – Efeito de concentrações de Al sobre o comprimento da maior raiz (CMR) de dois cultivares (S = sensível λ e T = tolerante v) de sorgo.

As reduções do CMR foram da ordem de 56 e 43%, para os cultivares sensível e tolerante, respectivamente, quando as plantas foram tratadas com apenas 50  $\mu\text{M}$  de Al. Nas concentrações mais elevadas, o CMR não foi alterado de forma substancial, e as diferenças entre os cultivares foram diminuindo até quase não mais existirem.

O alongamento da raiz seminal, medido pelo comprimento da maior raiz, tem sido considerado um dos melhores parâmetros para selecionar plantas de milho quanto à tolerância ao Al (MAGNAVACA et al., 1987, CAMBRAIA e CAMBRAIA, 1995) e de sorgo (CAMBRAIA et al., 1991). Estes autores mostraram que a discriminação entre linhagens endogâmicas, cultivares, híbridos ou variedades, com base no crescimento da maior raiz, é relativamente fácil, desde que se escolha uma concentração de Al e um tempo de exposição adequados. Ensaio desse tipo, geralmente, indicam com melhor precisão as diferenças entre plantas quanto a tolerância ao Al, quando comparados com aqueles ensaios baseados na diferença de peso de matéria seca, pelo fato de, quase sempre, existir diferença de vigor entre as plantas produzidas. Como a avaliação do CMR pode ser feita antes e depois da aplicação do tratamento com Al é possível fazer-se uma correção para as eventuais diferenças de vigor das plântulas. Esse fator é conseguido por meio da seleção inicial e das medições iniciais e finais do crescimento das raízes, submetidas ao estresse do Al. Além do mais, a análise do efeito do Al sobre o crescimento da maior raiz destaca outro aspecto importante da tolerância das plantas às injúrias causadas pelo Al no sistema radicular, conforme sugerido por ANDERSSON (1988). Este autor ressalta que as raízes sob condições de estresse de Al diminuem o alongamento embora o peso da matéria seca, às vezes, permaneça inalterado pelo tratamento com Al. Isto pode ocorrer porque a redução no comprimento geralmente é acompanhada por aumento no diâmetro das raízes, engrossamento este, que, de certo modo, pode compensar perdas de peso por efeito da redução no comprimento. Há, paralelamente, perda na área superficial da raiz, mudança que funcionalmente é mais importante que a variação de massa.

### **3.1.3. Efeito do Al sobre os teores de Al e a sua distribuição nos ápices radiculares**

Os teores de Al, tanto nas raízes quanto na parte aérea, aumentaram com o aumento dos níveis de Al na solução nutritiva, nos dois cultivares, sendo que o cultivar sensível acumulou mais Al que o cultivar tolerante (Figura 3). Nas raízes dos dois cultivares, os teores de Al aumentaram lentamente até concentrações próximas a 100  $\mu\text{M}$  de Al na solução nutritiva. Nas concentrações superiores a esta, observou-se aumento linear nos teores de Al no tecido radicular dos dois cultivares até cerca de 300  $\mu\text{M}$ . A partir dessa concentração, os cultivares passaram a acumular diferencialmente o Al, chegando o cultivar sensível a apresentar 12,5% mais Al que o cultivar tolerante na concentração mais elevada. De maneira geral, os teores de Al encontrados nos tecidos vegetais foram menores que aqueles encontrados em plantas de sorgo por GONÇALVES et al. (1996). Deve-se ressaltar, entretanto, que estes autores trabalharam com plantas mais velhas, expostas ao Al durante um período maior de tempo, aspecto que, de certo modo, torna essas plantas capazes de acumular mais Al nos seus tecidos. O tecido vegetal maduro apresenta maior superfície de adsorção e, ou, absorção do Al e, também, potencialmente, maior capacidade para transportar o Al para a parte aérea. Diferenças no acúmulo do Al entre cultivares são normalmente conflitantes, conforme observaram RINCÓN e GONZALES (1992), em cultivares de trigo sensíveis e tolerantes ao Al. Alguns estudos mostram que genótipos sensíveis acumulam cerca de três a oito vezes mais Al que genótipos tolerantes (TICE et al., 1992). Isto, contudo, nem sempre acontece. Outros trabalhos indicam não haver diferença entre cultivares de trigo sensível e tolerante, pelo menos nas primeiras 12 h de exposição ao Al (WALLACE et al., 1982 e ZHANG e TAYLOR, 1989), ou, às vezes, os cultivares tolerantes acumulam mais Al, em tratamentos durante 24 h ou mais de exposição ao Al (ANIOL, 1984 e ZHANG e TAYLOR, 1989).

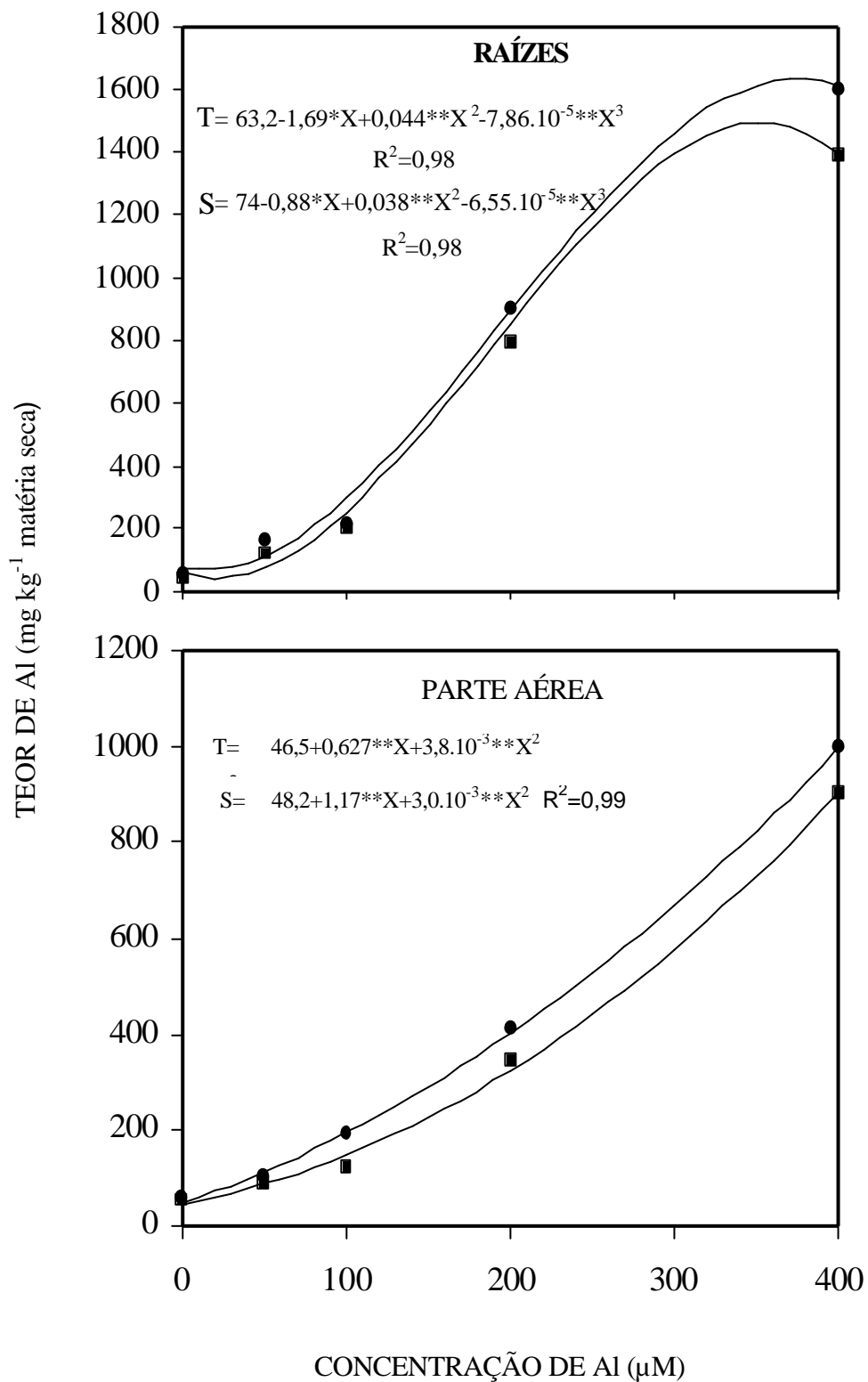


Figura 3 – Efeito de concentrações de Al sobre os teores de Al nas raízes e na parte aérea de dois cultivares (S = sensível λ e T = tolerante v) de sorgo.

fatores associados. RINCÓN e GONZALES (1992), em face disto, sugerem que, nos casos de seleção de plantas para tolerância ao Al, o acúmulo deste elemento, em amostra resultante das raízes como um todo, pode não ser um bom indicador. O comportamento diferencial pode ser mais bem avaliado pela análise de Al nos tecidos meristemáticos dos ápices radiculares.

Na ausência de Al, não foram observadas diferenças na distribuição do Al nos segmentos radiculares de plantas de sorgo e os cultivares também não diferiram entre si (Quadro 1). Por outro lado, na presença do Al, o ápice radicular, isto é, o segmento 0-5 mm, apresentou a maior concentração de Al, que diferiu significativamente dos demais segmentos nos dois cultivares.

Quadro 1 - Distribuição de Al em segmentos de ápices radiculares de dois cultivares de sorgo, na ausência e na presença de Al

Al	Segmento da raiz	Sensível	Tolerante
( $\mu\text{M}$ )	(mm)	( $\text{mg kg}^{-1}$ MS )	
0	5	47,6 Aa	42,9 Aa
	10	47,5 Aa	41,2 Aa
	15	49,2 Aa	44,4 Aa
	20	47,6 Aa	49,2 Aa
185	5	876,8 Aa	699,1 Ba
	10	576,3 Bb	535,5 Bb
	15	555,3 Bb	532,0 Bb
	20	531,9 Bb	513,9 Bb

\* Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e pelas mesmas letras minúsculas nas colunas, de cada nível de Al, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Nesse segmento das raízes, o cultivar sensível apresentou teor de Al 25,4% maior que o cultivar tolerante. Estes resultados, de certo modo, confirmam aqueles encontrados por (BENNET e BREEN,1991; RINCÓN e GONZALES,

1992), e sugerem que o meristema apical é, realmente, o principal sítio acumulador ou de ligação de Al nas raízes.

Em ápices radiculares de trigo (coifa, meristema e zona de alongamento), além de ter sido observado maior acúmulo de Al, os danos físicos também foram mais intensos quando comparados com os demais tecidos das raízes (DELHAIZE e RYAN, 1995). WHEELER et al. (1992), em estudos citológicos de ápices radiculares, por meio de microscopia óptica e eletrônica, não observaram nenhuma evidência de dano causado pelo Al em ápices de cultivares tolerantes de trigo, quando os mesmos foram expostos ao Al. Já nos cultivares sensíveis, após três dias de exposição ao Al, observaram-se o enrubescimento, a vacuolização e a degeneração das células do ápice radicular. O tecido radicular parece desorganizar-se e degenerar, particularmente nas células da epiderme e nas células mais externas do córtex. Estes autores citados, utilizando microscopia eletrônica e espectroscopia secundária de massa iônica (SIMS), observaram ainda espaçamento da parede celular que fora severamente danificada na epiderme dos ápices radiculares.

Recentemente, SIVAGURU e HORST (1998) encontraram que, em milho, a parte distal da zona de transição do ápice radicular, especialmente o segmento entre 1-2 mm, desenvolvendo uma fase preparatória de rápido alongamento, foi o local de maior sensibilidade ao Al, corroborando o resultado encontrado neste experimento.

#### **3.1.4. Efeito do Al sobre os teores de P, K, Ca e Mg**

Concentrações crescentes de Al na solução nutritiva promoveram decréscimo nos teores de P, K, Ca e Mg, tanto nas raízes quanto na parte aérea (Figuras 4 a 7). Nas concentrações de 50 a 100  $\mu\text{M}$  de Al na solução nutritiva, de modo geral, foram observadas as maiores diminuições nos teores desses elementos minerais. A partir destas concentrações, as reduções nos teores desses elementos tornaram-se cada vez menores e, praticamente, não se observaram mais mudanças apreciáveis. Entretanto, é interessante observar que na concentração mais elevada de Al na solução nutritiva, nas raízes do cultivar tolerante, o teor de P foi 21,8% maior que no cultivar sensível, e apenas 16,5% menor que os teores de P nas plantas-controle, enquanto, nesta situação, o cultivar sensível apresentava redução da ordem de 30,4% (Figura 4). É provável que nesta concentração de Al esteja ocorrendo sua precipitação na forma de fosfato de Al, o que reduziria a atividade química desse elemento na solução nutritiva e, portanto, seu efeito fitotóxico, permitindo recuperação na absorção de P pelas raízes do cultivar tolerante. Corroborando esta hipótese, existem algumas evidências sugerindo que a tolerância de certas plantas ao Al pode estar relacionada à sua maior capacidade de absorverem e metabolizarem P, sob estresse de Al. PELLET et al. (1996) sugerem ainda que cultivares tolerantes são capazes de exsudarem fosfato pelos ápices radiculares, podendo reduzir o efeito fitotóxico do Al na rizosfera. Na presença do Al, parte do P é adsorvido e, ou, precipitado na forma de fosfato de alumínio, no espaço livre aparente. A absorção de P e sua translocação para a parte aérea são, pois, reduzidas (CALBO e CAMBRAIA, 1980), observando-se o aparecimento de sintomas de deficiência de P nestas plantas, de modo particular nas folhas que, geralmente, apresentam menores teores desse elemento sob estresse de Al.

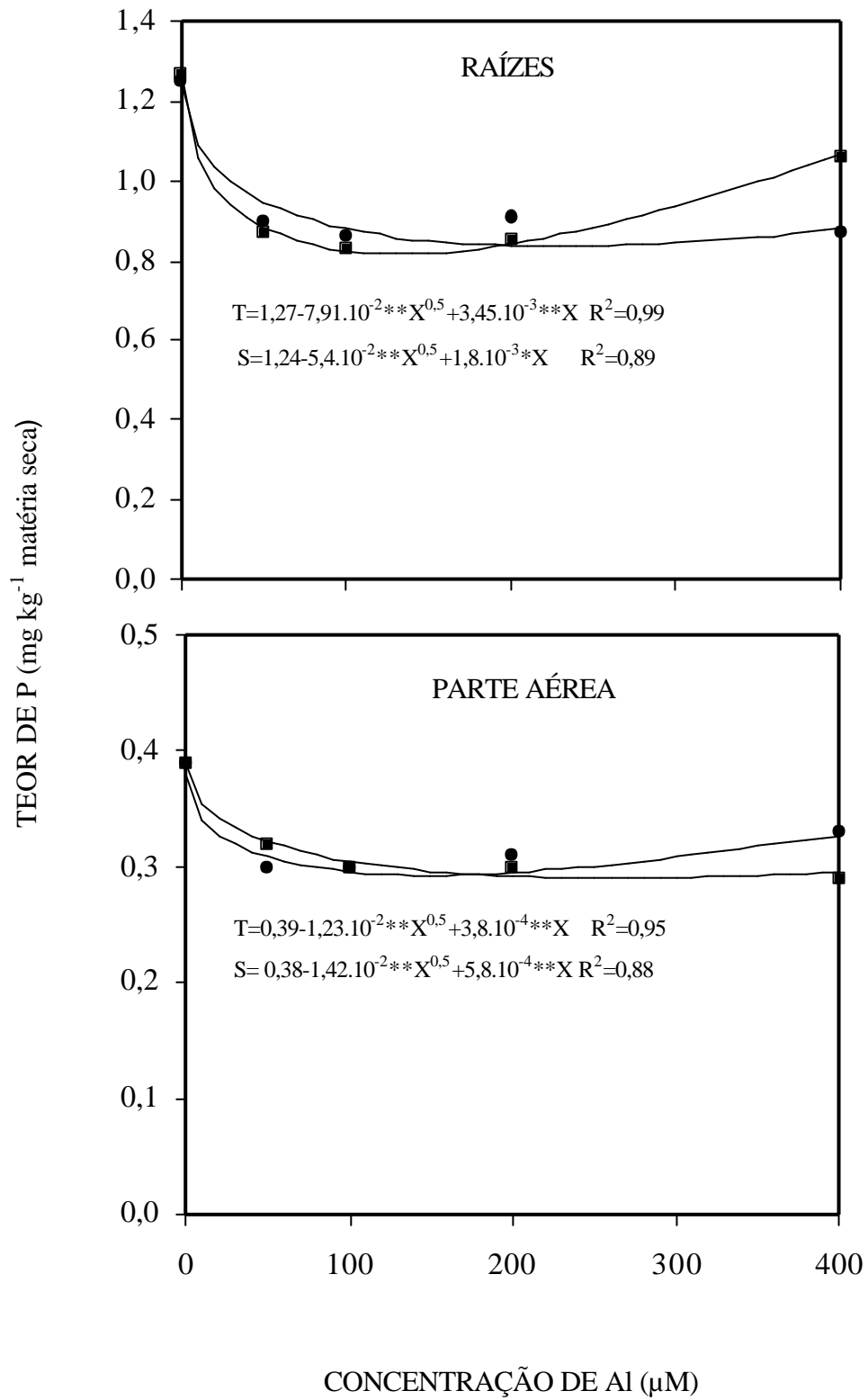


Figura 4 – Efeito de concentrações de Al sobre os teores de P nas raízes e na parte aérea de dois cultivares (S = sensível e T = tolerante) de sorgo.

O Al promoveu diminuição nos teores de K, nas raízes e na parte aérea dos dois cultivares, mas não se observou diferença entre os cultivares (Figura 5). Os teores de K, nas raízes, decresceram em média 20%, após exposição à concentração de 100  $\mu\text{M}$  de Al na solução nutritiva, mas nas concentrações mais elevadas praticamente não houve mais variação nos teores desse elemento. Na parte aérea, os teores de K decresceram continuamente com o incremento das concentrações de Al na solução nutritiva. O teor de K no cultivar tolerante, na concentração mais elevada de Al na solução nutritiva, foi 16,0% menor que o teor de K no cultivar sensível. Este resultado sugere que no cultivar tolerante pode estar ocorrendo maior transferência do K da parte aérea para as raízes, na forma de complexo ligado com o ânion malato, favorecendo o acúmulo desse ácido orgânico no sistema radicular desse cultivar. O Al, reconhecidamente um inibidor da absorção de cátions (CALBO e CAMBRAIA, 1980; MATSUMOTO e YAMAYA, 1986; MYASAKA et al., 1989; GASSMANN e SCHROEDER, 1994; JONES et al., 1998), provavelmente, está determinando as reduções nos teores de K, no tecido vegetal, pelo bloqueio dos canais de influxo de  $\text{K}^+$  (GASSMANN e SCHROEDER, 1994). Segundo esses autores, o Al, em concentrações de 8  $\mu\text{M}$ , reduz o influxo do  $\text{K}^+$  pela metade. KASAI et al. (1992) afirmam que o Al não apenas inibe o influxo, mas também estimula o efluxo de  $\text{K}^+$  em raízes de aveia, o que, em parte, pode justificar as diminuições nos teores de K observados nos tecidos de plantas sob estresse de Al.

A maioria dos trabalhos nesta área, utilizando amostra representativa do sistema radicular como um todo, demonstra que o Al inibe a absorção de K e, por conseqüência, diminui o teor deste elemento nos tecidos vegetais. Mas, tais análises não são feitas no tecido considerado sítio primário da toxicidade do Al, isto é, nos ápices radiculares. Dessa forma, acredita-se que não existam ainda evidências suficientes para afirmar que a inibição da absorção de K promovida pelo Al seja uma das causas determinantes da fitotoxicidade desse elemento.

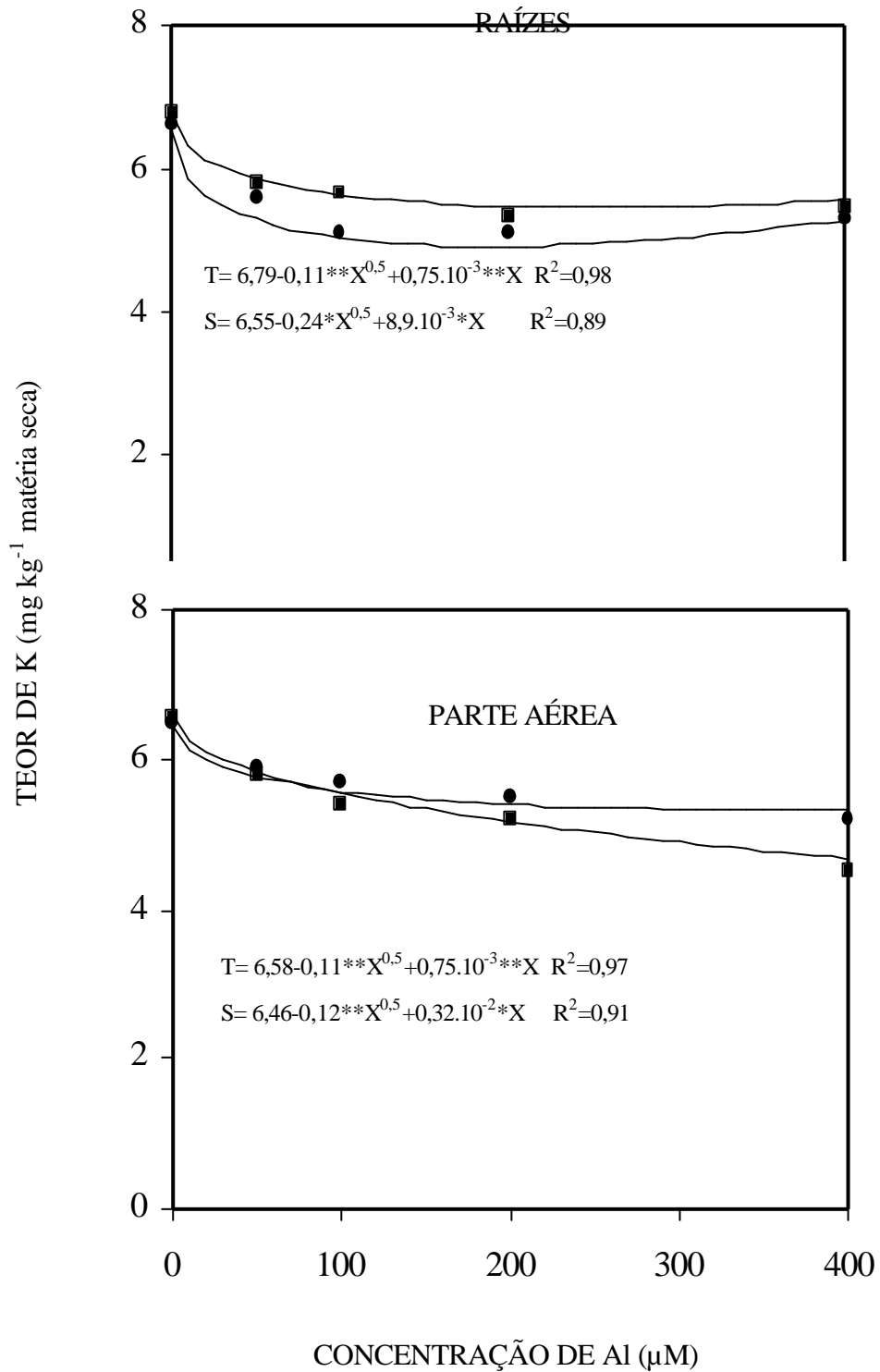


Figura 5 – Efeito de concentrações de Al sobre os teores de K nas raízes e na parte aérea de dois cultivares (S = sensível e T = tolerante) de sorgo.

Os teores de Ca diminuíram significativamente com o aumento das concentrações de Al na solução nutritiva, nos dois cultivares, tanto nas raízes quanto na parte aérea, e os cultivares diferiram entre si para o teor de Ca na parte aérea (Figura 6). Nas raízes, as reduções nos teores de Ca ocorreram de forma mais acentuada no cultivar sensível. Na concentração de aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ , observaram-se reduções nos teores de Ca de 6,3% e 23,3% nos cultivares tolerante e sensível, respectivamente, quando comparados com as plantas controle, mas essas reduções foram diminuindo, até não mais existirem na concentração mais elevada. Na parte aérea, o efeito do Al sobre os teores de Ca manteve a mesma resposta observada nas raízes, mas de modo mais intenso, sendo que na concentração de 50  $\mu\text{M}$  as reduções nos teores de Ca foram de 16,1% no cultivar tolerante e 39,3% no cultivar sensível. Na concentração mais elevada de Al na solução nutritiva, a redução no teor de Ca foi de 42,9% no cultivar sensível e de 33,9% no tolerante. Em média, na presença do Al, estes valores percentuais deixam clara a diferença entre os cultivares, observando-se reduções nos teores de Ca da ordem de 43,5 e de 22,6% nos cultivares sensível e tolerante, respectivamente.

A redução mais acentuada no teor de Ca na parte aérea, quando comparada à redução nas raízes, pode provavelmente estar associada à baixa disponibilidade de Ca no xilema das plantas sob estresse de Al, comprometendo o transporte a longa distância desse elemento entre as raízes e a parte aérea.

Somando-se a este fato, o baixo carregamento do Ca no floema pode limitar naturalmente a redistribuição do Ca na planta (MARSCHNER, 1995).

Os cultivares de sorgo analisados neste experimento diferiram pouco entre si com relação à composição mineral, exceto quanto ao teor de Ca na parte aérea. Neste caso, conforme já mencionado anteriormente, na presença do Al, o cultivar tolerante sempre apresentou teores de Ca mais elevados que o cultivar sensível, independente da concentração de Al na solução nutritiva.

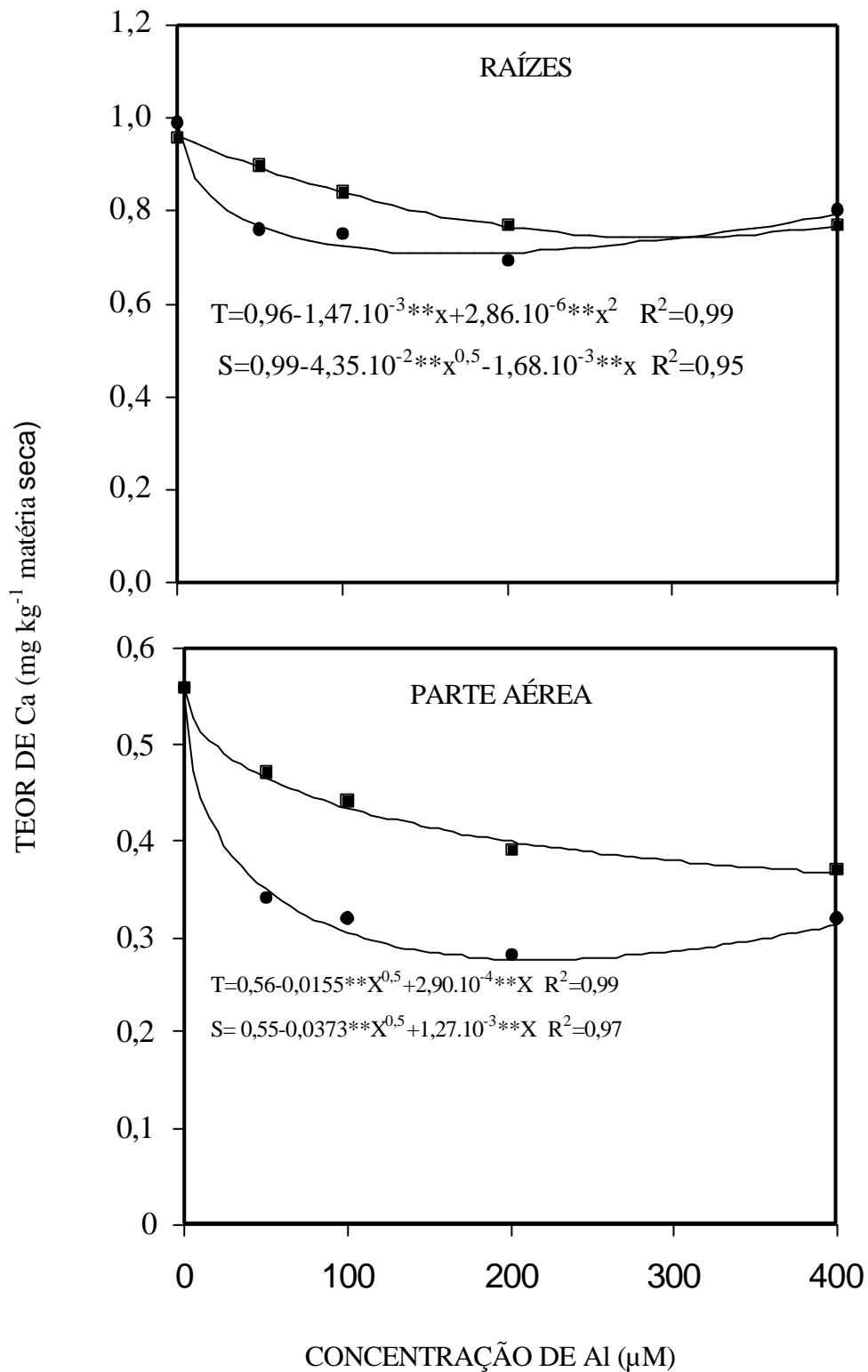


Figura 6 – Efeito de concentrações de Al sobre os teores de Ca nas raízes e na parte aérea de dois cultivares (S = sensível  $\lambda$  e T = tolerante  $\nu$ ) de sorgo.

Portanto, a tolerância do cultivar BR006R (Al-tolerante) pode, em parte, decorrer da sua capacidade de manter a absorção e o transporte de Ca para a parte aérea em níveis mais adequados para o metabolismo celular que no cultivar BR007A (Al-sensível).

Os teores de Mg decresceram com o aumento da concentração de Al na solução nutritiva, nas duas partes das plantas, tanto do cultivar sensível quanto do tolerante. Os cultivares, entretanto, não diferiram entre si em nenhuma das partes analisadas (Figura 7). O efeito do Al diminuindo os teores de Mg foi mais intenso até concentrações por volta de 200  $\mu\text{M}$  de Al na solução nutritiva, nos dois cultivares. A partir desta concentração, os teores de Mg do cultivar tolerante no sistema radicular e do cultivar sensível na parte aérea tenderam para uma estabilização. Os teores de Mg no sistema radicular do cultivar sensível e na parte aérea do cultivar tolerante, por outro lado, decresceram continuamente com o aumento nas concentrações de Al na solução nutritiva.

O Al parece inibir competitivamente a absorção de Mg, resultando na diminuição nos teores de Mg nos tecidos vegetais (KOCHIAN, 1995). Segundo este autor, a inibição da absorção de Mg promovida pelo Al decorre, provavelmente, da competição entre estes cátions pelos sítios de absorção nas raízes.

No entanto, ainda não se tem certeza de como se processa esta inibição. MARTIN (1992) sugere que parte do efeito do Al sobre os teores de Mg decorrem da capacidade de o Al interagir com sítios regulados pelo  $\text{Mg}^{2+}$ , uma vez que estes dois elementos possuem raios iônicos semelhantes e nos sistemas biológicos parece ser comum o deslocamento do  $\text{Mg}^{2+}$  pelo  $\text{Al}^{3+}$ .

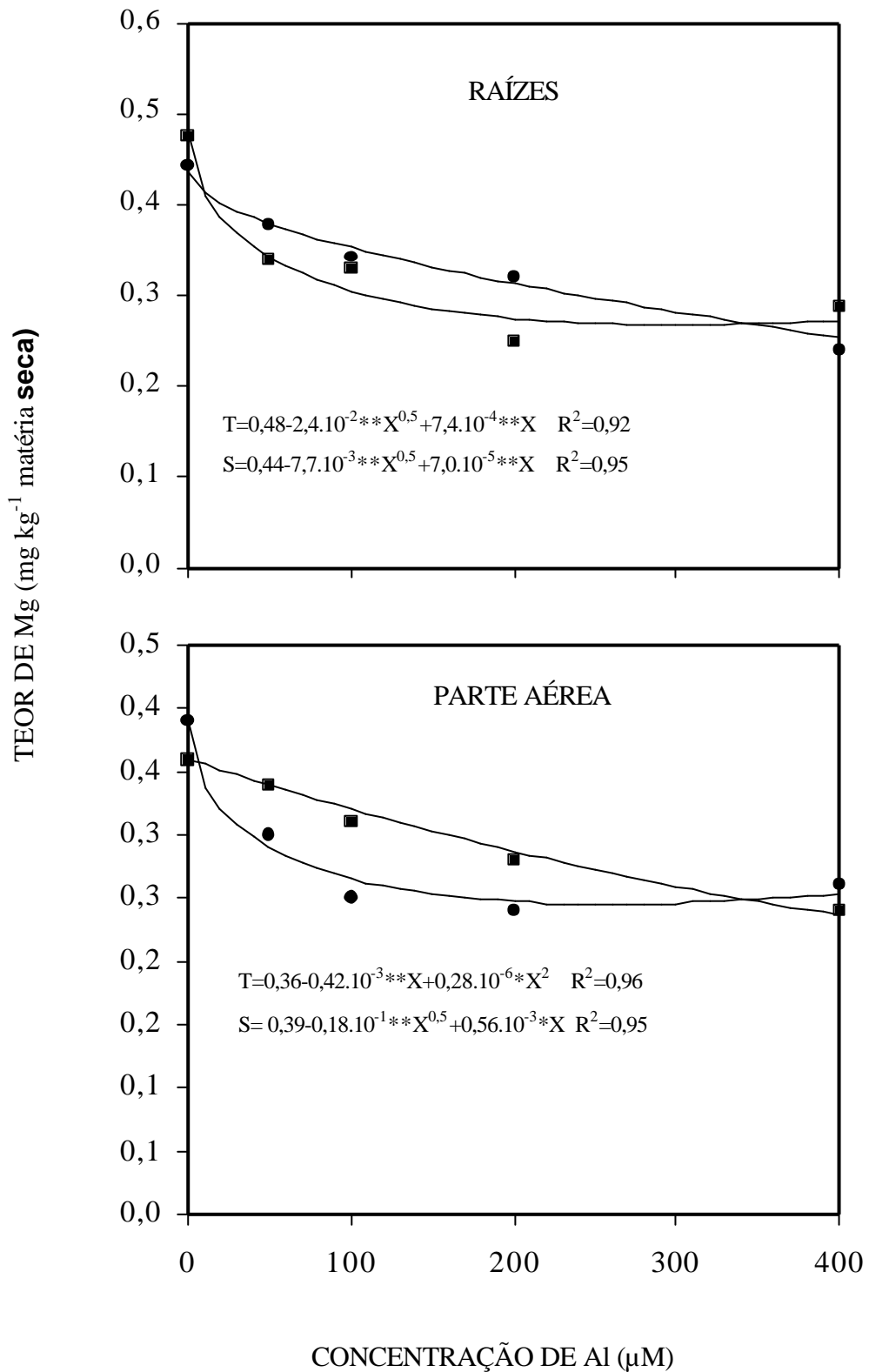


Figura 7 – Efeito de concentrações de Al sobre os teores de Mg nas raízes e na parte aérea de dois cultivares (S = sensível λ e T = tolerante v) de sorgo.

A inibição por  $\text{Al}^{3+}$ , dos processos dependentes de  $\text{Mg}^{2+}$ , por sua vez, pode alterar grande número de processos celulares, incluindo a ação de enzimas transferidoras de grupos fosfatos, a formação de ésteres de carboidratos, as interações com o citoesqueleto e os eventos de transdução de sinais nas células (KOCHIAN, 1995). Estas evidências podem ser reforçadas pelas observações de MacDONALD e MARTIN (1988) de que o  $\text{Al}^{3+}$  em concentrações nanomolares compete efetivamente com o  $\text{Mg}^{2+}$  em concentrações milimolares por sítios receptores de GTP e GDP, e a taxa de hidrólise do GTP que é importante na regulação dos microtúbulos “in vivo” é bastante reduzida pela ligação do  $\text{Al}^{3+}$ . Os mesmos autores sugerem que pequenas mudanças na concentração citossólica do  $\text{Al}^{3+}$  são suficientes para alterar a dinâmica de formação e degradação dos microtúbulos, gerando uma disfunção celular.

### **3.2. Amenização da toxicidade do Al**

O Al na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , na ausência de ácido málico, provocou reduções de cerca de 56 e 29% no comprimento da maior raiz dos cultivares sensível e tolerante, respectivamente, quando comparadas às plantas-controle (Figura 8). A redução no comprimento da maior raiz causada pelo Al diminuiu gradativamente com o incremento de ácido málico à solução nutritiva. No nível mais elevado de ácido málico, a maior raiz tinha um comprimento 24 e 8% menor que o controle, para os cultivares sensível e tolerante, respectivamente. Esse ácido, portanto, mesmo na concentração de 400  $\mu\text{M}$ , conseguiu amenizar apenas parte dos efeitos tóxicos do Al, principalmente no cultivar tolerante.

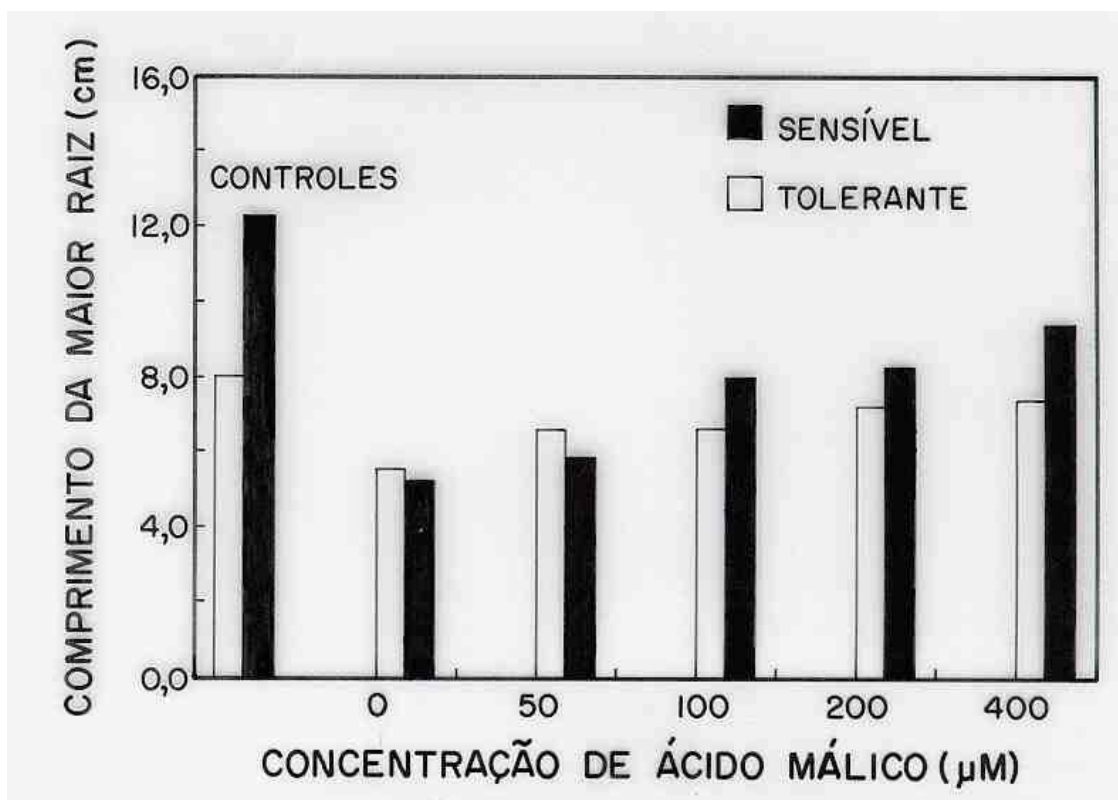


Figura 8 – Efeito de concentrações de ácido málico (AM), na presença de Al (50 µM), sobre o comprimento da maior raiz de dois cultivares de sorgo com tolerância diferencial ao Al (controles = -Al e -AM).

Resultados semelhantes foram obtidos por DELHAIZE et al. (1993a), com plântulas de trigo sensíveis ao Al. Estes autores observaram que, mesmo quando a concentração do ácido málico foi oito vezes maior que a do Al em solução, as plântulas não foram completamente protegidas, isto é, não se observou completa reversão da inibição do crescimento das raízes causada pelo Al. Os autores, contudo, acreditam que a razão ácido málico/Al requerida para a amenização total dos efeitos inibidores do Al em seu experimento pode não estar refletindo a realidade. Como as plântulas foram crescidas em volumes muito pequenos (50 mL) de solução, durante cinco dias, não tendo sido mudada a solução, pode ter ocorrido absorção do ácido málico no decorrer do ensaio, reduzindo assim sua concentração na solução nutritiva. Contudo, essa interpretação pode não ser a mais adequada para este ensaio. Talvez, em volumes maiores e com constante homogeneização da solução nutritiva pelo sistema de aeração, esses fatores favoreçam a distribuição uniforme do ácido málico na

solução nutritiva, o que impediria um acúmulo maior do ácido apenas nas circunvizinhanças da raiz e, considerando ainda que o coeficiente de difusão do ácido málico é muito baixo ( $0,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-2}$ ), a ação completa do ácido sobre o Al, mesmo nas camadas mais próximas às raízes, ficaria prejudicada. Isto, em parte, pode justificar a amenização apenas parcial do ácido málico.

#### 4. CONCLUSÕES

Os pesos da matéria seca dos cultivares e o comprimento da maior raiz (CMR) diminuíram com o aumento das concentrações de Al na solução, e o cultivar sensível foi mais severamente afetado. O CMR mostrou ser melhor indicador da tolerância diferencial ao Al entre os cultivares.

Os teores de Al no tecido vegetal, tanto nas raízes quanto na parte aérea, aumentaram com os níveis de Al na solução nutritiva, havendo diferença entre os cultivares. O Al acumulou-se predominantemente no ápice radicular (0-5 mm). Nesse segmento da raiz, o cultivar sensível acumulou 25,4% mais Al que o cultivar tolerante.

Os teores dos elementos minerais P, K, Ca e Mg no tecido vegetal diminuíram com o aumento dos níveis do Al na solução nutritiva, mas não houve diferenças entre os cultivares, exceto quanto ao teor de Ca, na parte aérea, em que o cultivar sensível foi mais afetado.

A aplicação de ácido málico resultou em amenização do efeito inibitório do Al sobre o alongamento radicular, mas não houve eliminação completa da toxicidade do Al, mesmo na concentração mais alta utilizada.

## **CAPÍTULO 2**

### **EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE OS TEORES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NO TECIDO VEGETAL E NA SEIVA XILEMÁTICA E O EFLUXO DE ÁCIDO MÁLICO PARA A SOLUÇÃO NUTRITIVA**

#### **1. INTRODUÇÃO**

Os ácidos orgânicos podem-se acumular nas plantas, ou em determinadas partes destas, sob diversos tipos de estresse, apresentando variações em suas quantidades para diferentes espécies e, ou, dentro da mesma espécie. Os padrões de acúmulo desses ácidos orgânicos podem até mesmo auxiliar na diferenciação do tipo e do modo de metabolismo de determinada espécie, como também podem indicar alterações metabólicas relacionadas a estresses (TRIPLETT et al., 1980; POPP e KINZEL, 1981).

Vários autores têm sugerido a possibilidade de ácidos orgânicos estarem envolvidos no(s) mecanismo(s) de tolerância das plantas ao Al (CAMBRAIA et al., 1983; SUHAYDA e HAUG, 1986; MIYASAKA et al., 1991; DELHAIZE et al., 1993a; BASU et al., 1994; RYAN et al., 1995; FUENTE et al., 1997; LARSEN et al., 1998). O modo como esses ácidos orgânicos conferem tolerância ao Al não é totalmente conhecido. Alguns autores acreditam que os ácidos

orgânicos possam complexar o Al citoplasmático, eliminando sua toxicidade (CAMBRAIA et al., 1983; SUHAYDA e HAUG, 1986). Outros sugerem que os ácidos orgânicos exsudados pelas plantas promoveriam a complexação do Al na superfície das raízes e no apoplasma, eliminando sua toxicidade (DELHAIZE et al., 1993a; BASU et al., 1994; RYAN et al., 1995; FUENTE et al., 1997; LARSEN et al., 1998).

O aumento no teor de ácidos orgânicos tem sido observado sob condições de estresse de Al, em várias espécies que apresentam tolerância diferencial ao Al, como *Sorghum bicolor* (CAMBRAIA et al., 1983); *Zea mays* L. (SUHAYDA e HAUG, 1986; PELLET et al., 1995); *Phaseolus vulgaris* (MIYASAKA et al., 1991); e *Triticum aestivum* (DELHAIZE et al., 1993a; BASU et al., 1994). Estes aumentos têm sido atribuídos à maior síntese e exportação desses ácidos (BASU et al., 1994).

Em sorgo, CAMBRAIA et al. (1983) observaram maior acúmulo de ácido t-aconítico e de ácido málico no tecido vegetal do cultivar tolerante, quando comparado com o cultivar sensível. SUHAYDA e HAUG (1986) encontraram maiores teores de ácido málico e de t-aconítico em plântulas híbridas de milho tolerantes ao Al.

Em plântulas intactas de trigo, crescendo sob condições estéreis na presença de Al, DELHAIZE et al. (1993a) observaram estímulo à secreção de ácido málico e de ácido succínico nas plântulas tratadas com Al. Estes autores mostraram que os genótipos tolerantes exsudavam cerca de 10 vezes mais ácido málico e cerca de três a cinco vezes mais ácido succínico que os genótipos sensíveis. Os autores observaram, também, que a exsudação do malato foi consistentemente expressa no cultivar tolerante.

DELHAIZE et al. (1993a) encontraram fortes evidências de o Al estar agindo como sinalizador para abertura de um canal para malato, resultando na liberação de malato para o meio externo. Segundo estes autores, a liberação só é realizada na presença de  $Al^{3+}$  e outros elementos como  $La^{3+}$ ,  $Sc^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  não conseguem fazê-la. DELHAIZE e RYAN (1995) sugerem que o Al possa influenciar a abertura desses canais, interagindo diretamente com a proteína que

forma o canal, causando uma mudança conformacional e aumentando seu tempo de abertura ou condutância. Pode ainda interagir com receptores específicos na superfície da membrana, induzindo à formação de mensageiros secundários que mudariam a atividade dos canais ou ainda por meio de uma ação combinada dos dois mecanismos.

O efluxo de malato por ápices radiculares, e sua possível reação com o Al, transformando-o num complexo não-tóxico, tem sido considerado um importante componente do sistema de tolerância das plantas ao Al e talvez um mecanismo geral de tolerância contra a ação tóxica do Al em trigo (DELHAIZE et al., 1993a; RYAN et al., 1995; KOCHIAN, 1995).

O ácido málico é o principal ácido orgânico implicado no mecanismo de tolerância de certas gramíneas ao Al (SUHAYDA e HAUG, 1986 e KOCHIAN, 1995). Vários aspectos de seu metabolismo, de sua compartimentalização e de sua exsudação têm sido bastante estudados em diversas espécies como trigo (DELHAIZE et al., 1993a e RYAN et al., 1995) e milho (SUHAYDA e HAUG, 1986) entre outras. No entanto, dentre outros ácidos orgânicos, o ácido t-aconítico também tem sido apontado como um dos mais importantes ácidos orgânicos em gramíneas (POPP e KINZEL, 1981). CAMBRAIA et al. (1983) e SUHAYDA e HAUG (1986) encontraram que, sob condições de estresse de Al, os ácidos málico e t-aconítico foram os mais abundantes em plantas de milho e de sorgo tolerantes ao Al, respectivamente. A determinação qualitativa e quantitativa de ácidos orgânicos em plantas cultivadas sob estresse de Al poderá trazer importantes informações sobre sua participação no(s) mecanismo(s) de tolerância das plantas ao Al.

Neste trabalho, estudaram-se os efeitos do Al sobre os teores de ácidos orgânicos no tecido vegetal, o transporte desses ácidos na seiva xilemática e o efluxo de malato para solução nutritiva, em dois cultivares de sorgo com tolerância diferencial ao Al.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Obtenção e cultivo das plântulas**

Foram utilizados dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), sendo o BR007A considerado o cultivar sensível e o BR006R o cultivar tolerante ao Al, fornecidos pelo Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, em Sete Lagoas - MG, Brasil.

As sementes, selecionadas quanto ao tamanho e à forma, após esterilização superficial com hipoclorito de sódio a 2%, durante 20 min, lavagem em água corrente e, em seguida, em água desmineralizada, foram colocadas em cartuchos de papel-substrato para germinação (pH neutro). Esses cartuchos, depois de preparados, foram transferidos para vasos contendo solução nutritiva de Clark (CLARK, 1975), com um quinto da força iônica sob aeração contínua e cobertos com sacos plásticos para criar uma câmara úmida. Após três dias, os sacos plásticos foram retirados e as plântulas ficaram por mais quatro dias nos cartuchos. Completados sete dias, as plântulas dos dois cultivares foram removidas dos cartuchos, lavadas e selecionadas quanto ao tamanho das raízes e da parte aérea e utilizadas no ensaio.

Todos os experimentos foram conduzidos em sala de crescimento com temperatura controlada ( $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ), fluxo de radiação fotossinteticamente ativa de  $230 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 h.

## **2.2. Efeito do Al sobre os teores de ácidos orgânicos no tecido vegetal**

As plântulas selecionadas foram transferidas em número de quatro para vasos plásticos com capacidade para 1,6 L, contendo solução nutritiva de Clark completa (CLARK, 1975), pH 4,0, em tratamentos com ausência e presença do Al na concentração de  $185 \mu\text{M}$  na forma de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$ , sendo o pH corrigido diariamente. Após sete dias, o cultivo foi interrompido, as plantas colhidas, lavadas em água corrente e em água desmineralizada, divididas em raízes e parte aérea e submetidas às diversas análises. Após exposição das plantas ao Al, conforme descrito anteriormente, amostras de matéria fresca das raízes e da parte aérea foram homogeneizadas em etanol 80% (p/v), na relação de 1g de tecido vegetal/10 mL de etanol, filtradas através de quatro camadas de gaze e centrifugadas a  $3.000\text{g}$  durante 10 min. Depois de eliminados os lipídios e os pigmentos por extração em clorofórmio, os extratos foram aplicados em coluna trocadora de cátion (Dowex 50WX8, 200-400 mesh na forma sódica) e, em seguida, em coluna trocadora de ânion (Dowex AG1X8, 200-400 mesh na forma de formato). As frações de ácidos orgânicos foram eluídas da última coluna mencionada, com ácido fórmico 6,0 N em acetona, evaporadas e ressuspendidas em volumes conhecidos de etanol 80%. Alíquotas foram evaporadas até secura, em blocos de alumínio em temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$  com auxílio de jato de ar. O resíduo foi ressuspendido em piridina e, então, os ácidos orgânicos presentes foram transformados em derivados de trimetilsilil, por tratamento com N,O-Bis trimetil silil-acetamida. Para separação e determinação dos ácidos orgânicos, utilizou-se cromatógrafo a gás, com detector de ionização de chama, utilizando

uma coluna capilar SE-30. As demais condições de operação foram: nitrogênio ultrapuro como gás carreador (fluxo 30 mL/min); temperatura do detector e do injetor, 280°C e 200°C, respectivamente; programa de temperatura: 100-200°C (10°C/min). A todas as amostras e à mistura padrão foi adicionada uma quantidade conhecida de ácido tartárico (padrão interno), para corrigir os tempos de retenção e calcular a área dos picos (CAMBRAIA et al., 1983).

### **2.3. Efeito do Al sobre os teores de ácidos orgânicos na seiva xilemática**

Plântulas dos cultivares sensível e tolerante, de sete dias de idade, obtidas conforme descrito no item 2.1., foram submetidas aos tratamentos, na ausência ou na presença de Al (185 µM), na forma de  $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18 H_2O$  em solução nutritiva de Clark (CLARK, 1975), pH 4,0, durante sete dias. Completado este prazo, as plântulas, em número de quatro por tratamento, foram retiradas da solução nutritiva, sendo, em seguida, seccionadas com lâmina afiada, na altura do coleto da planta, colocadas em uma bomba de pressão (Scholander), aplicando-se pressão suficiente para manter o fluxo de saída da seiva. O exsudato foi coletado durante 10 min, com auxílio de microcapilar de vidro. As amostras foram armazenadas em “Eppendorfs” de 0,2 mL e armazenadas a -15°C, para análises cromatográficas posteriores. Alíquotas de 100 µL do exsudato foram evaporadas até secura, ressuspendidas em 25 µL de piridina e, depois, transformadas em derivados de trimetilsilil, por tratamento com 25 µL de N,O-Bis trimetil silil-acetamida. A separação e determinação dos ácidos orgânicos no exsudato foi feita de forma idêntica ao procedimento usado para a análise desses mesmos ácidos no tecido vegetal e na solução nutritiva, em cromatógrafo a gás, com detector de ionização de chama, utilizando uma coluna de vidro de SE-30 em varaport (100-200 mesh). As demais condições de operação foram: nitrogênio ultrapuro como gás carreador (fluxo 30 mL/min); temperatura do detector e do injetor, 240°C e

230°C, respectivamente, e programa de temperatura 80-200°C (4°C/min) (CAMBRAIA et al., 1983).

#### **2.4. Efeito do Al sobre o efluxo do malato para a solução nutritiva**

Plântulas dos cultivares sensível e tolerante de sete dias, obtidas conforme descrito no item 2.1., foram submetidas aos tratamentos, na ausência e presença do Al (185 µM), em solução nutritiva de Clark (CLARK, 1975), pH 4,0, durante sete dias. Completado este prazo, alíquotas de 200 mL da solução nutritiva, em que as plântulas estavam sendo cultivadas, foram coletadas e evaporadas em evaporador rotativo a vácuo a 50°C. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 25 mL de etanol 80%, evaporadas novamente, e ajustado o volume final em balão volumétrico para 5 mL em etanol 80% e os teores de ácido málico foram determinados por cromatografia gasosa, conforme metodologia descrita por CAMBRAIA et al. (1983). O ácido málico foi também analisado por meio de ensaio enzimático (DELHAIZE et al., 1993a). Neste caso, amostras de 1,35 mL da solução nutritiva, coletadas de cada tratamento, foram pré-incubadas em 1,5 mL de tampão (glicina 0,5 M e hidrazina 0,4 M, pH 9,0) e 0,1 mL de NAD<sup>+</sup> 40 mM por 60 min, à temperatura ambiente, até obter-se leitura estável da absorvância a 340 nm. Adicionou-se, então, 5 µL de desidrogenase do malato e mediu-se o aumento da absorvância a 340 nm.

#### **2.5. Delineamento experimental**

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial (2 x 2), constituídos dos seguintes fatores: dois cultivares de sorgo (sensível e tolerante) na presença

(185  $\mu\text{M}$ ) ou na ausência de Al, no delineamento de blocos casualizados. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Efeito do Al sobre os teores de ácidos orgânicos nos tecidos**

Al promoveu aumento significativo nos teores de todos os ácidos orgânicos analisados, exceto no teor do ácido fumárico na parte aérea do cultivar sensível. Os demais ácidos aumentaram nos dois cultivares, tanto nas raízes quanto na parte aérea e os cultivares diferiram entre si (Quadro 1). Os ácidos málico e t-aconítico foram os dois ácidos orgânicos mais abundantes, nas duas partes das plantas de sorgo, independente da presença ou não de Al. O ácido málico, sozinho, constituiu, em média, 39,5% do total de ácidos orgânicos presentes nas duas partes das plantas e, quando junto ao t-aconítico, o percentual aumentou para cerca de 65,7%. Os ácidos orgânicos que sofreram os maiores aumentos percentuais, quando as plantas foram expostas ao Al, foram: succínico, cítrico, químico, málico, fumárico e o t-aconítico. Entretanto, a análise individual de todos os ácidos orgânicos aponta para o ácido málico como aquele que, na presença de Al, sofreu o maior aumento absoluto no seu teor, tendo este aumento sido sempre mais pronunciado no cultivar tolerante.

Quadro 1 - Efeito do Al sobre os teores de ácidos orgânicos nas raízes e na parte aérea de dois cultivares de sorgo

Ácidos orgânicos	Raízes				Parte aérea			
	Sensível		Tolerante		Sensível		Tolerante	
	-Al	+Al	-Al	+Al	-Al	+Al	-Al	+Al
	(µmol g <sup>-1</sup> MF)							
Ácido Málico	a 1,20Ba	a 4,41Ab	a 1,36Ba	a 5,36Aa	a 0,78Bb	a 1,78Ab	a 1,22Bb	a 4,18Aa
Ácido t-aconítico	a 1,31Ba	b 2,66Ab	a 1,43Ba	b 3,69Aa	ab 0,53Ba	b 0,96Aa	b 0,77Ba	b 1,35Aa
Ácido Fumárico	b 0,42Ba	c 1,22Aa	b 0,41Ba	c 1,51Aa	bc 0,37Aa	d 0,35Ab	c 0,33Ba	c 0,67Aa
Ácido Succínico	b 0,22Ba	c 1,12Ab	b 0,23Ba	cd 1,40Aa	bc 0,33Ba	bc 0,75Aa	c 0,22Bb	c 0,69Ab
Ácido Quínico	b 0,21Bb	c 1,11Ab	b 0,23Ba	d 1,04Aa	c 0,22Ba	c 0,65Aa	c 0,16Bb	c 0,53Ab
Ácido Cítrico	b 0,19Ba	c 0,89Aa	b 0,19Ba	d 0,95Aa	c 0,19Ba	cd 0,55Aa	c 0,14Bb	c 0,49Ab
Ácido málico (%)	33,8	38,7	40,5	39,4	32,3	35,3	43,0	52,9
<u>Ác.málico+Ác.T-aconítico</u> (%)								
Ác. Orgânicos Totais	70,7	62,0	72,5	66,6	54,1	54,4	70,1	69,9
Ác. Orgânicos Totais (%) de aumento	3,55	11,41 (221,4)	3,85	13,59 (252,0)	2,42	5,04 (108,3)	2,84	7,91 (178,5)

\* Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas e minúsculas, para Al e cultivar, respectivamente, em cada parte da planta (raiz ou parte aérea), e pelas mesmas letras minúsculas à esquerda, entre os ácidos, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Nas raízes, na presença do Al, os aumentos nos teores do ácido málico foram de 267,5 e 294%, nos cultivares sensível e tolerante, respectivamente. Na parte aérea, observaram-se aumentos da ordem de 128% no cultivar sensível e de 243% no cultivar tolerante. Nestes resultados, destaca-se o maior aumento no teor do ácido málico na parte aérea no cultivar tolerante, comparado ao cultivar sensível.

Os teores dos ácidos orgânicos encontrados nos cultivares de sorgo BR006R e BR007A são inferiores àqueles encontrados nos cultivares CMSXS-106 e CMSXS-903, também sensíveis e tolerantes, respectivamente, utilizados por CAMBRAIA et al. (1983). Neste caso é importante ressaltar que estes autores trabalharam com plantas mais velhas, o pH na solução nutritiva era mais baixo (3,8), as plantas foram expostas ao Al por um período de tempo maior, e as concentrações de P foram modificadas durante o experimento. O conjunto desses fatores, associado às diferenças interespecíficas, como, também, modificações no procedimento analítico podem, provavelmente, responder por essas diferenças. Em plântulas híbridas de milho de sete dias de idade, submetidas a 150  $\mu\text{M}$  de Al, SUHAYDA e HAUG (1986) encontraram teores de ácido málico de duas a três vezes maiores que os teores desse ácido encontrados nos cultivares de sorgo, neste experimento. Plântulas de trigo de oito dias idade, tratadas com 200  $\mu\text{M}$  de Al, por outro lado, exibiram teores de ácido málico de 633 e 1.752  $\mu\text{g/g}$  de peso fresco nos cultivares sensível e tolerante, respectivamente (SCOTT et al., 1991). Resultados estes semelhantes aos encontrados nos cultivares de sorgo analisados nesse experimento.

Os teores de ácidos orgânicos podem ser alterados por vários fatores intrínsecos da espécie, como também por modificações nas condições do meio ambiente, como por exemplo, deficiências minerais. Como o Al, reconhecidamente, em níveis tóxicos, reduz os teores de quase todos os elementos minerais, parte dos seus efeitos sobre a produção e o acúmulo de ácidos orgânicos pode ser indireto. Por outro lado, também é possível que o Al

atue diretamente, alterando a atividade de certas enzimas que controlam o metabolismo desses ácidos.

A deficiência de K é reconhecidamente um fator que promove alterações tanto na quantidade quanto na composição dos ácidos orgânicos em espécies de plantas cultivadas (POPP e KINZEL, 1981). A diminuição nos teores de K observada na presença de Al ( Figura 5 do Capítulo 1) e o aumento nos teores dos ácidos orgânicos totais (Quadro 1), principalmente do ácido málico, sugerem a interação entre a deficiência de K e o aumento no teor dos ácidos orgânicos e de certa forma confirmam os resultados obtidos por POPP e KINZEL (1981). Entretanto, este efeito parece ser indireto e, provavelmente, não deve ter importância no mecanismo de tolerância ao Al, uma vez que, nem nas raízes nem na parte aérea, foram observadas diferenças significativas nos teores de K entre cultivares. Por outro lado, para os teores dos ácidos orgânicos, especialmente do málico e do t-aconítico, além de terem seus teores aumentados com o tratamento com o Al, estes aumentos foram sempre maiores no cultivar tolerante. Há, portanto, grande possibilidade de que o acúmulo dos ácidos orgânicos, principalmente do ácido málico, tenha sido resultante do funcionamento do mecanismo de tolerância das plantas ao Al.

### **3.2. Efeito do Al sobre os teores de ácidos orgânicos na seiva xilemática**

Na seiva xilemática das plantas de sorgo, expostas ou não ao Al, o único ácido orgânico, dentre todos aqueles encontrados nos tecidos, tanto das raízes quanto da parte aérea, que pôde ser identificado foi o ácido cítrico (Quadro 2). Outros compostos, provavelmente de maior peso molecular e com tempo de retenção mais elevados, foram também detectados, mas não puderam ser identificados por falta de padrões confiáveis. Os teores do ácido cítrico, na seiva xilemática das plantas de sorgo sensível e tolerante, na ausência do Al, variaram de 1,68 a 1,75  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  e na presença do Al, de 1,87 a 2,36  $\mu\text{mol mL}^{-1}$  ,

observando-se, portanto, aumento médio de 23,3%. Os cultivares sensível e tolerante tiveram os teores do ácido cítrico na seiva xilemática aumentados em 11,3 e 34,9%, respectivamente. Este resultado ressalta a tolerância diferencial dos cultivares quanto à produção desse ácido orgânico.

Quadro 2 - Efeito do Al sobre os teores de ácidos orgânicos na seiva xilemática de plantas de sorgo na ausência ou na presença de Al (185  $\mu\text{M}$ )

Ácidos orgânicos	Tempo de retenção (min)	Área total dos picos	Sensível		Tolerante	
			-Al	+Al	-Al	+Al
			$\mu\text{mol mL}^{-1}$			
Ácido cítrico (%)	25	11,0	1,68Ab (21,9)**	1,87Ba (24,4)	1,75Ab (22,8)	2,36Aa (30,8)
Não-identificado 1 (%)	27	10,5	(17,9)	(29,7)	(18,8)	(33,6)
Não-identificado 2 (%)	28	7,2	(11,0)	(17,8)	(31,2)	(40,0)

\* Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para cultivar, e pelas mesmas letras minúsculas para Al não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

\*\* Os números entre parênteses representam a percentagem relativa dos compostos orgânicos.

WELCH (1995) relata que a complexação de metais na seiva xilemática constitui geralmente uma análise complicada, face a interação de fatores envolvidos nos processos de absorção e de transporte dos elementos minerais pelas raízes. WHITE et al. (1981) observaram que em plantas de soja e de tomate concentrações fitotóxicas de Zn alteraram o padrão dos ácidos orgânicos na seiva xilemática. As maiores concentrações de ácido cítrico (1.700  $\mu\text{M}$ ) foram encontradas nas seivas de plantas com nível adequado de Zn, na solução nutritiva, enquanto as plantas tratadas com alta concentração de Zn apresentaram menor teor de ácido cítrico no exsudato xilemático (1.100  $\mu\text{M}$ ), na primeira hora

de análise. Em plantas de sorgo submetidas ao estresse de Al, ao contrário, observou-se aumento no teor do ácido cítrico na seiva xilemática, tanto no cultivar sensível quanto no tolerante. Estes resultados podem provavelmente estar relacionados à capacidade de o Al promover a síntese de ácidos orgânicos nos tecidos vegetais, podendo esses ácidos serem acumulados em sítios específicos como os vacúolos ou serem exsudados pelos ápices radiculares.

O ácido cítrico tem sido apresentado como um dos principais compostos orgânicos capazes de quelar e desintoxicar as plantas do Al (HUE et al., 1986; SUHAYDA e HAUG, 1986; MIYASAKA et al., 1991). Assim, o aumento no teor do ácido cítrico, nas duas partes das plantas tratadas com Al (Quadro 1), pode estar favorecendo um aumento na redistribuição desse ácido entre a parte aérea e as raízes, especialmente no cultivar tolerante. Os teores desse ácido na seiva xilemática parecem sustentar esta hipótese, embora o aumento não tenha ocorrido na mesma intensidade dos aumentos nos teores do mesmo observados nos tecidos radiculares e foliares. Infelizmente, não se conseguiu uma quantidade suficiente de seiva xilemática para avaliar se o teor de Al também aumentou na seiva. Se isto aconteceu, a maior quantidade de Al transportado na forma de complexo com o citrato não resultou em maior acúmulo desse íon na parte aérea das plantas do cultivar tolerante, conforme se vê na Figura 3.

Os compostos não-identificados (Quadro 2) que apresentaram maiores tempos de retenção na coluna do cromatógrafo que o ácido cítrico devem ser compostos mais complexos. Embora não tenha sido possível identificá-los, estes compostos poderiam ser aminoácidos ou fitosideróforos, isto é, ácidos orgânicos derivados de nicotianamina, muito comuns nas seivas tanto do floema quanto do xilema de gramíneas (WELCH, 1995). Esses ácidos normalmente estão envolvidos em reações de complexação com metais, principalmente  $Fe^{3+}$  (MARSCHNER, 1995). Dessa forma, não se descarta a possibilidade de os mesmos participarem do transporte de Al para a parte aérea.

### 3.3. Efluxo de malato para a solução nutritiva

Conforme se observa no Quadro 3, a concentração de ácido málico exsudada para a solução nutritiva, após o cultivo das plantas durante sete dias, na ausência ou na presença de Al, aumentou em média 17,7 e 50,3%, nos cultivares sensível e tolerante, respectivamente. Na ausência de Al, não se observou diferença entre os cultivares, mas na presença desse elemento o cultivar tolerante exsudou 42,5% mais ácido málico que o sensível. Os resultados obtidos pelas duas metodologias utilizadas foram bastante semelhantes em todos os tratamentos. RYAN et al. (1995), trabalhando com plântulas de trigo, também observaram maior exsudação de malato nas plantas tolerantes ao Al. Entretanto, o incremento na quantidade de malato exsudado, encontrada por esses autores, foi bem maior que a encontrada em plantas de sorgo neste experimento.

Quadro 3 - Efeito do Al sobre o efluxo de malato para a solução nutritiva cultivada com plantas de sorgo

Al ( $\mu\text{M}$ )	Sensível		Tolerante	
	Cromatografia Gasosa	Método Enzimático	Cromatografia Gasosa	Método Enzimático
	$\mu\text{mol L}^{-1}$			
<b>0</b>	0,66 Ab	0,64 Ab	0,74 Ab	0,71 Ab
<b>185</b>	0,74 Ba	0,79 Ba	1,09 Aa	1,09 Aa

\* Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e pelas mesmas letras minúsculas nas colunas, para cada nível de Al, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O efluxo de malato por ápices radiculares de plantas de trigo tem sido considerado uma das principais vias de tolerância, e talvez um mecanismo geral

de tolerância contra a ação tóxica do Al (TICE et al., 1992; DELHAIZE et al., 1993b; RYAN et al., 1995). No entanto, para plantas de sorgo e nas condições estabelecidas neste trabalho, os teores de malato encontrados na solução de crescimento parecem não ser suficientes para amenizarem os efeitos do estresse causado pelo Al. Com os cultivares de sorgo, observou-se reversão da inibição de cerca 76 e 92% nos cultivares sensível e tolerante, respectivamente, quando as plantas expostas a 50  $\mu\text{M}$  de Al foram tratadas com 400  $\mu\text{M}$  de ácido málico (Figura 8, Capítulo 1). Neste tratamento, o ácido málico estava numa concentração 400 vezes maior que aquela observada na solução nutritiva após o cultivo das plantas expostas ao Al na concentração de 185  $\mu\text{M}$ .

Nesse sentido, BASU et al. (1994) parecem ter chegado a uma conclusão semelhante e admitem que somente concentrações elevadas de ácidos orgânicos exógenos, da ordem de 25 a 50 vezes maiores que as concentrações exsudadas, são capazes de proteger as raízes, restituindo seu crescimento normal. Os autores sugerem, ainda, a possibilidade de na região próxima à raiz ou no apoplasto existir uma camada sem agitação de exsudatos, de volume muito pequeno, em relação à solução externa, onde a concentração do ácido málico e, ou, de outros ácidos orgânicos poderia atingir concentrações mais elevadas que na média do meio nutritivo adjacente. Isso permitiria o estabelecimento de um microambiente com características tais que representaria uma barreira efetiva à ação direta do Al, amenizando, pelo menos neste local, os efeitos tóxicos do Al.

#### 4. CONCLUSÕES

Os teores dos principais ácidos orgânicos, encontrados nas raízes e na parte aérea, aumentaram com a exposição das plantas ao Al. Os dois ácidos orgânicos mais abundantes em sorgo e, talvez, os mais importantes do ponto de vista da tolerância ao Al foram os ácidos málico e t-aconítico. Em termos quantitativos e em valores absolutos, estes foram também os ácidos que mais aumentaram após exposição de plantas ao Al, que também promoveu aumento no teor do ácido cítrico na seiva xilemática, tanto no cultivar sensível quanto no tolerante. Entretanto, o aumento no cultivar tolerante foi mais pronunciado, da ordem de 35%, enquanto no cultivar sensível foi de 11,5%.

Os teores dos ácidos málico e t-aconítico somados aos teores do ácido cítrico, na seiva xilemática das plantas, e incrementos mais pronunciados no cultivar tolerante, quando exposto ao Al, sugerem um papel importante desses ácidos no(s) mecanismo(s) de tolerância de plantas de sorgo quanto à toxicidade do Al.

## **CAPÍTULO 3**

### **EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS**

#### **1. INTRODUÇÃO**

A biossíntese e o acúmulo de ácidos orgânicos em plantas submetidas a níveis tóxicos de Al ainda são etapas metabólicas pouco entendidas. Embora existam muitos trabalhos mostrando o efeito do Al sobre a produção e a exsudação de ácidos orgânicos, pouco se sabe a respeito da influência deste elemento sobre a síntese, a atividade e a regulação de enzimas ligadas ao metabolismo desses ácidos. É possível que a maior ou menor alteração das rotas bioquímicas pelo Al indique a sensibilidade e, ou, a tolerância das plantas ao Al e, eventualmente, venha a ser utilizada como indicador dessa tolerância em programas de melhoramento para obtenção de plantas tolerantes ao Al.

Plantas de sorgo e de milho, sob estresse de Al, apresentam aumento nos níveis dos ácidos málico e t-aconítico (CAMBRAIA et al., 1983, SUHAYDA e HAUG, 1986). Os aumentos nos teores desses ácidos, quase sempre, são resultantes de modificações nas atividades das enzimas de síntese e, ou, de degradação dos mesmos.

As principais enzimas relacionadas com a síntese e, ou, degradação do ácido málico são: a carboxilase do fosfoenolpiruvato, a fumarase, a desidrogenase do malato e as enzimas málicas dependente de  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$ . A carboxilase do

fosfoenolpiruvato é citossólica e adiciona o  $\text{HCO}_3^-$  ao ácido fosfoenolpirúvico, formando ácido oxaloacético, que pode ser convertido para malato no citossol ou na mitocôndria (DENNIS e TURPIN, 1990). A fumarase é uma carbono-oxigênio hidrolíase e catalisa a reação de hidratação do fumarato, formando malato na mitocôndria. A desidrogenase do malato pode ser encontrada no citossol, na mitocôndria e nos glioxissomos, em várias formas isoenzimáticas, e catalisa a desidrogenação da forma L-ácido málico, formando ácido oxaloacético na mitocôndria (DENNIS e TURPIN, 1990). A enzima málica, dependente de  $\text{NAD}^+$ , localiza-se na matriz mitocondrial e catalisa a descarboxilação oxidativa do malato formando piruvato. Esta enzima requer um cátion divalente como co-fator, sendo ativada por CoA, fumarato e sulfato, na mitocôndria (DENNIS e TURPIN, 1990). A enzima málica dependente de  $\text{NADP}^+$ , que também catalisa reação de descarboxilação oxidativa do malato, é uma enzima citossólica e cloroplastídica, requerendo o  $\text{NADP}^+$  como co-fator específico (DENNIS e TURPIN, 1990). As atividades dessas enzimas, certamente, constituem importantes controles internos dos níveis de ácido málico no tecido vegetal. Por outro lado, as principais enzimas ligadas à síntese e à degradação do ácido t-aconítico são: a desidratase do citrato que converte ácido cítrico para ácido t-aconítico por desidratação (BRAUER e TEEL, 1981); a isomerase do aconitato que intermedia a interconversão entre os ácidos cis-aconítico e t-aconítico (KATSUHARA et al., 1993); a desidrogenase do isocitrato que catalisa a oxidação do isocitrato a 2-oxoglutarato na mitocôndria (DENNIS e TURPIN, 1990); e, também, no citossol (WEITING et al., 1987).

Em ápices radiculares de plântulas de trigo, tratadas com Al, RYAN et al. (1995) observaram pequeno aumento nas atividades da carboxilase do fosfoenolpiruvato e da desidrogenase do malato. O metabolismo do ácido málico, entretanto, requer a participação de outras enzimas como a fumarase e as enzimas málicas dependentes de  $\text{NAD}^+$  ou de  $\text{NADP}^+$ . COPELAND e LIMA (1992), por exemplo, observaram em plântulas de trigo, tratadas com Al, aumento na atividade da fumarase. SLASKI (1995) acredita que a enzima cinase do  $\text{NAD}^+$ ,

dependente ou não de calmodulina e, principalmente, enzimas que catalisam a reação de síntese de  $\text{NADP}^+$  estejam envolvidas na resposta do trigo à toxicidade do Al. Assim, a produção de  $\text{NADP}^+$  sendo alterada na presença de Al, outras enzimas que usam o  $\text{NADP}^+$  como co-fator poderiam ter suas atividades também alteradas.

Em muitas gramíneas, sob condições normais ou sob estresse de Al, o ácido t-aconítico tem sido apontado como o principal ácido orgânico acumulado (POPP e KINZEL, 1981; CAMBRAIA et al., 1983, SUHAYDA e HAUG, 1986). O acúmulo deste ácido provavelmente está associado à maior atividade das enzimas ligadas à sua síntese (BRAUER e TELL, 1981). As principais enzimas que catalisam reações de síntese do ácido t-aconítico são a desidratase do citrato e a isomerase do aconitato. A desidrogenase do isocitrato, ao contrário, oxida o ácido isocítrico a 2-oxoglutarato, deslocando as reações iniciais do ciclo dos ácidos tri-carboxílicos e, portanto, retirando substrato da biossíntese do ácido t-aconítico, evitando acúmulo efetivo desse ácido, pela ação da desidratase do citrato e, ou, ação da isomerase do aconitato.

Todas as enzimas acima relacionadas estão diretamente ligadas à síntese, à degradação e, conseqüentemente, à manutenção dos níveis de “Steady State” dos ácidos málico e t-aconítico. Estes ácidos são supostamente os mais importantes para o mecanismo de tolerância ao Al de várias gramíneas (CAMBRAIA et al., 1983; SUHAYDA e HAUG, 1986). Considerando que plantas de sorgo acumulam basicamente os ácidos málico e t-aconítico (CAMBRAIA et al., 1983, Quadro 1 do Capítulo 2), resolveu-se verificar o efeito do Al sobre a atividade das principais enzimas ligadas ao metabolismo desses dois ácidos, implicados na tolerância das plantas ao Al.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção e cultivo das plântulas

Foram utilizados dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), com tolerância diferencial ao Al, sendo o BR007A o cultivar sensível e o BR006R o cultivar tolerante ao Al, fornecidos pelo Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo de Sete Lagoas - MG, Brasil.

As sementes, selecionadas quanto ao tamanho e à forma, após esterilização superficial com hipoclorito de sódio a 2%, durante 20 min, lavagem em água corrente e, em seguida, em água desmineralizada, foram colocadas em cartuchos de papel-substrato para germinação (pH neutro). Depois de preparados, os cartuchos foram transferidos para vasos com capacidade para 1,6 L, contendo solução nutritiva de Clark (CLARK, 1975), pH 4,0, com um quinto da força iônica, sob aeração contínua, e cobertos com sacos plásticos para criar uma câmara úmida. Após três dias, os sacos plásticos foram retirados e as plântulas ficaram por mais quatro dias nos cartuchos. Completados sete dias, as plântulas foram uniformizadas, quanto ao tamanho das raízes e da parte aérea, e transferidas em número de quatro para vasos plásticos com capacidade para 1,6 L, contendo solução nutritiva de Clark completa, pH 4,0, contendo os tratamentos, ausência e presença de Al (185 $\mu$ M), na forma de Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 18.H<sub>2</sub>O, corrigindo-se o pH diariamente. Após sete dias de tratamento com Al, o cultivo foi interrompido, as plantas colhidas, lavadas em água corrente e enxaguadas em água

desmineralizada, divididas em raízes e folhas e submetidas aos diversos ensaios enzimáticos.

Os experimentos foram todos conduzidos em sala de crescimento com temperatura controlada ( $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ), fluxo de radiação fotossinteticamente ativa de  $230 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 h.

Em todos os ensaios enzimáticos, os tecidos vegetais foram congelados em nitrogênio líquido, homogeneizados em almofariz de porcelana sobre banho de gelo até obtenção de pó fino. Todas as soluções, utensílios e equipamentos foram mantidos em temperatura de 0 a  $4^{\circ}\text{C}$ .

## **2.2. Determinação da atividade de enzimas do metabolismo do ácido málico**

A atividade da **carboxilase do fosfoenolpiruvato (EC 4.1.1.31)** foi determinada com base na metodologia descrita por MANICOL e JACOBSEN (1992), com algumas modificações. Amostras de 0,1 g de tecido vegetal foram homogeneizadas em 10 mL de um meio de extração, constituído de HEPES-KOH 100 mM pH 7,5,  $\text{MnCl}_2$  1 mM e DTT (ditiotreitól) 10 mM. Após filtração, através de quatro camadas de gaze, os homogeneizados foram centrifugados a 20.000 g, durante 15 min, e o sobrenadante recolhido. A atividade da enzima foi determinada após adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto, a 2,9 mL de um meio de reação constituído de Tris-HCl 50 mM pH 8,3, PEP (fosfoenolpiruvato) 2,5 mM,  $\text{NaHCO}_3$  5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, glicose-6-fosfato 1,0 mM, DTT 4 mM e NADH 0,2 mM. A atividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente pelo decréscimo da absorvância a 340 nm, à temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ .

A atividade da **fumarase (EC 4.2.1.2)** foi determinada segundo metodologia de COPELAND e LIMA (1992). Amostras de 0,1 g de tecido vegetal foram homogeneizadas em 5,0 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, sal

dissódico do ácido etileno diaminotetracético (EDTA) 1 mM e DTT 2 mM. Após filtração, através de quatro camadas de gaze, o homogeneizado foi centrifugado a 20.000g, durante 20 min, e o sobrenadante usado como fonte da enzima. A 2,0 mL do meio de reação, constituído de L-malato 0,2 mM em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4, adicionou-se 0,1 mL do extrato enzimático. Após incubação a 30°C, durante 10 min, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de ácido tricloroacético 20%, e a atividade enzimática estimada pela variação na absorvância a 240 nm.

A atividade da **enzima málica dependente de NAD<sup>+</sup> (EC 1.1.1.39)** foi determinada em amostra de 0,5 g de tecido vegetal, homogeneizado em 10 mL de tampão HEPES 25 mM pH 7,2, contendo 40 mg de PVP (polivinilpirrolidona), MnCl<sub>2</sub> 1,0 mM, DTT 10 mM, triton X-100 0,1% (v/v). Após filtração, através de quatro camadas de gaze, o homogeneizado foi centrifugado a 20.000g, durante 30 min. Uma alíquota de 0,1 mL do sobrenadante foi adicionada a 2,9 mL do meio de reação, constituído de tampão MOPS (ácido 3[N-morfolino] propanosulfônico) 43 mM, pH 6,9, malato 20 mM, NAD<sup>+</sup> 15 mM, EDTA 0,3 mM, CoA (coenzima A) 0,15 mM, MnCl<sub>2</sub> 20 mM e a atividade da enzima determinada espectrofotometricamente pelo aumento na absorvância a 340 nm (BRYCE e REES, 1985).

A atividade da **desidrogenase do malato (EC 1.1.1.37)** foi determinada no mesmo extrato enzimático bruto utilizado para a carboxilase do fosfoenolpiruvato. Após a adição de 0,1 mL do extrato enzimático, a 2,9 mL do meio de reação, constituído de uma mistura de HEPES-KOH 50 mM, pH 7,5, EDTA 0,5 mM, NADH 0,2 mM e oxaloacetato 1,0 mM, a atividade enzimática foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 340 nm, à temperatura de 25°C (MANICOL e JACOBSEN, 1992).

A atividade da **enzima málica dependente de NADP<sup>+</sup> (EC 1.1.1.40)** foi determinada em amostras de 0,5 g de tecido vegetal, homogeneizadas em 5,0 mL de tampão MOPS 0,1 M e BICINA, pH 8,5, contendo mercaptoetanol 50 mM, EDTA 5 mM e PVP 1,0%. Em seguida, o homogeneizado foi filtrado através de

quatro camadas de gaze, e centrifugado a 20.000g durante 15 min. Alíquotas de 0,1 mL do sobrenadante foram adicionadas a 2,9 mL do meio de reação, constituído de tampão MOPS 100 mM pH 7,0, NADP<sup>+</sup> 0,5 mM, MnSO<sub>4</sub> 5 mM e malato 10 mM a 25°C, sendo medido o aumento da absorvância a 340 nm (GOODENOUGH et al., 1985).

### **2.3. Determinação da atividade de enzimas do metabolismo do ácido t-aconítico**

Para a determinação da atividade da **isomerase do aconitato (EC 5.3.3.7)**, amostras de 0,5 g de tecido vegetal foram homogeneizadas em 10 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, contendo cisteína 5,0 mM, EDTA 2,0 mM e polivinilpirrolidina (PVP) 1,0% (p/v). Em seguida, filtrou-se através de quatro camadas de gaze e centrifugou-se o extrato a 20.000g durante 15 min. Alíquotas de 0,1 mL do sobrenadante foram adicionadas a 2,9 mL do meio de reação, constituído de tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,6, DTT 1,0 mM, NaCl 0,5 M e ácido cis-aconítico 10 mM como substrato, medindo-se o decréscimo da absorvância, a 240 nm, de acordo com metodologia descrita por KATSUHARA et al. (1993), com algumas modificações.

A atividade da **desidrogenase do isocitrato (EC 1.1.1.42)** foi determinada no mesmo extrato enzimático utilizado para fumarase, de acordo com COPELAND e LIMA (1992). Alíquota de 0,1 mL do extrato enzimático bruto foi adicionada a 2,9 mL do meio de reação, constituído de tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4, D-isocitrato 0,3 mM, MnCl<sub>2</sub> 1,5 mM e NADP<sup>+</sup> 1 mM. A atividade foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm, à temperatura de 25°C.

A atividade da **desidratase do citrato (EC 4.2.1.4)** foi determinada em amostras de 0,5 g de tecido vegetal, homogeneizadas em 5,0 mL de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,2, contendo KCl 0,1 M, EDTA 0,1 mM. Em seguida, o homogeneizado foi filtrado através de quatro camadas de gaze e centrifugado a

20.000g durante 15 min. Alíquotas de 0,1 mL do sobrenadante foram adicionadas a 2,9 mL do meio de reação, constituído de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,2, KCl 0,1 M e citrato 20 mM a 27°C, medindo-se o aumento na absorvância a 240 nm, pela formação do ácido t-aconítico (BRAUER e TEEL, 1981).

#### **2.4. Delineamento experimental**

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial (2 x 2) constituídos dos seguintes fatores: dois cultivares de sorgo (sensível e tolerante) na presença (185 µM) ou na ausência de Al, no delineamento de blocos casualizados. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade .

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Efeito do Al sobre a atividade de enzimas do metabolismo do ácido málico**

##### **3.1.1. Efeito do Al sobre a atividade da carboxilase do fosfoenolpiruvato**

Na ausência de Al, a atividade da carboxilase do fosfoenolpiruvato nas raízes do cultivar sensível foi cerca de 2,2 vezes maior que no cultivar tolerante (Quadro 1). Nessa parte das plantas, na presença do Al, observou-se aumento na atividade da carboxilase do fosfoenolpiruvato, nos dois cultivares. Este aumento, embora em valor absoluto tenha sido maior no cultivar sensível, em termos percentuais foi muito maior no tolerante. Os aumentos foram de 125 e 241,8% na atividade da carboxilase do fosfoenolpiruvato, nos cultivares sensível e tolerante, respectivamente. Nas folhas, não se observou efeito do Al sobre a atividade dessa enzima, mas o cultivar tolerante apresentou uma atividade da carboxilase do fosfoenolpiruvato, em média, cerca de 2,8 vezes maior que no cultivar sensível. A atividade desta enzima nas folhas não foi alterada, provavelmente, pelo fato de o Al não ter atingido uma concentração suficientemente alta nessa parte da planta, capaz de promover aumento na síntese ou modificação na atividade da enzima, ou aumento nos teores dos ácidos orgânicos, particularmente, o ácido málico e succínico, que são reconhecidamente inibidores da atividade desta enzima (LAW e PLAXTON, 1995).

Quadro 1 - Efeito do Al sobre a atividade da carboxilase do fosfoenolpiruvato em plantas de sorgo

Al ( $\mu\text{M}$ )	Raízes		Folhas	
	Sensível	Tolerante	Sensível	Tolerante
	$\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$			
0	65,6 Ab	29,9 Bb	90,7 Ba	252,7 Aa
185	147,6 Aa	102,2 Ba	86,8 Ba	252,7 Aa

\* As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e pelas mesmas letras minúsculas nas colunas, para cada nível de Al, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Nas raízes, apesar do aumento nos teores dos ácidos málico e succínico, observou-se aumento na atividade desta enzima. Neste caso, em particular, o ácido málico estaria, provavelmente, participando de reações de complexação do Al em escala superior àquela ocorrida nas folhas, não estando livre para interagir com a enzima e alostericamente inibir sua atividade. RYAN et al. (1995) encontraram pequeno aumento na atividade da carboxilase do fosfoenolpiruvato em raízes de plântulas de trigo tratadas com Al por duas horas. Este aumento, entretanto, em termos relativos, corresponde a aproximadamente 50%. Talvez, com maior tempo de exposição, este aumento na atividade da carboxilase do fosfoenolpiruvato poderia ser significativamente ampliado. Com plântulas de sorgo, neste experimento, tratadas com Al (185 $\mu\text{M}$ ) durante sete dias, observaram-se aumentos de 125% e de 241,8% na atividade da carboxilase do fosfoenolpiruvato nas raízes, dos cultivares sensível e tolerante, respectivamente, (Quadro 1). Isto sugere que esta enzima, em plantas de sorgo, sob estresse de Al, possa ter participação direta no aumento da síntese do ácido málico e, indiretamente, na biossíntese dos ácidos cítrico e aconítico, provendo substrato para a síntese dos mesmos.

### 3.1.2. Efeito do Al sobre a atividade da fumarase

Nas raízes, na ausência de Al, os dois cultivares não diferiram quanto à atividade da enzima fumarase (Quadro 2). Na presença de Al, a atividade da fumarase aumentou cerca de 2,0 e 9,5 vezes nos cultivares sensível e tolerante, respectivamente. Nas folhas, na ausência de Al, não se observou diferença entre os cultivares. Na presença do Al, ao contrário, observou-se decréscimo de 39,2% na atividade da fumarase, no cultivar sensível, mas aumentou cerca de 120,7% no cultivar tolerante. Estes resultados sugerem que, pelo menos em parte, a maior síntese do ácido málico, pelo cultivar tolerante (Quadro 1 do Capítulo 2), possa ser decorrente de um aumento na atividade desta enzima. COPELAND e LIMA (1992) também encontraram aumento na atividade da fumarase em raízes de trigo, da ordem de 143%, quando tratadas com 75 $\mu$ M de Al.

Os aumentos expressivos na atividade da fumarase na presença de níveis tóxicos de Al, tanto nas raízes quanto nas folhas, sugerem que esta enzima pode ter grande importância na síntese do malato em plantas de sorgo sob estresse de Al, especialmente no cultivar tolerante. Nas folhas, o aumento na atividade da fumarase foi menor que nas raízes. Este resultado deve provavelmente ser decorrente da inibição na oxidação de algum intermediário do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, reduzindo a formação de fumarato nas folhas.

Quadro 2 - Efeito do Al sobre a atividade da fumarase em plantas de dois cultivares de sorgo

Al ( $\mu$ M)	Raízes		Folhas	
	Sensível	Tolerante	Sensível	Tolerante

	$\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$			
<b>0</b>	26,8 Ab	18,6 Ab	140,1Aa	102,7 Ab
<b>185</b>	54,9 Ba	177,2 Aa	85,2Bb	226,7 Aa

\* As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e pelas mesmas letras minúsculas nas colunas, para cada nível de Al, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

### 3.1.3. Efeito do Al sobre a atividade da enzima málica (NAD<sup>+</sup>)

Nas raízes, o Al não alterou a atividade da enzima málica (NAD<sup>+</sup>) e nem os cultivares diferiram entre si (Quadro 3). Nas folhas, na ausência de Al, a atividade desta enzima foi cerca de 10 vezes maior que nas raízes, mas os cultivares também não diferiram entre si. Na presença do Al, observou-se diminuição na atividade da enzima málica de 34,6 e 73,1% nos cultivares sensível e tolerante, respectivamente.

Sendo a redução maior no cultivar tolerante, o nível mitocondrial de malato, nesse cultivar, pode ter sido favorecido, mantendo o funcionamento normal do ciclo de Krebs, ou aumentando o transporte de malato para o citossol. Apesar de o Al ter influenciado a atividade dessa enzima nas folhas, esta forma de enzima málica, por sua baixa atividade, parece ter uma importância secundária no mecanismo de tolerância das plantas de sorgo ao Al.

Quadro 3 - Efeito do Al sobre a atividade da enzima málica (NAD<sup>+</sup>) em plantas de dois cultivares de sorgo

Al ( $\mu\text{M}$ )	Raízes		Folhas	
	Sensível	Tolerante	Sensível	Tolerante

	$\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$			
<b>0</b>	3,6 Aa	4,4 Aa	37,3 Aa	43,1 Aa
<b>185</b>	3,7 Aa	4,2 Aa	24,4 Ab	11,6 Bb

\* As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e pelas mesmas letras minúsculas nas colunas, para cada nível de Al, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

### 3.1.4. Efeito do Al sobre a atividade da desidrogenase do malato

Na ausência de Al, a atividade da desidrogenase do malato (MDH) foi mais elevada nas raízes do cultivar tolerante, mas nas folhas não se observou diferença significativa entre os cultivares (Quadro 4). Na presença de Al, observou-se redução na atividade enzimática nas raízes do cultivar tolerante, mas no cultivar sensível observou-se aumento na atividade da desidrogenase do malato. Nas folhas, a atividade dessa enzima, na presença de Al, diminuiu nos dois cultivares, aproximadamente na mesma intensidade. Como esta enzima catalisa, na mitocôndria, a oxidação do ácido málico a oxaloacético, a diminuição da sua atividade favorece a elevação dos níveis do ácido málico.

Quadro 4 - Efeito do Al sobre a atividade da desidrogenase do malato em plantas de sorgo

Al ( $\mu\text{M}$ )	Raízes		Folhas	
	Sensível	Tolerante	Sensível	Tolerante

	$\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$			
<b>0</b>	534,9 Bb	743,7 Aa	684,7 Aa	640,3 Aa
<b>185</b>	668,1 Aa	565,7 Bb	563,8 Ab	563,9 Ab

\* As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e pelas mesmas letras minúsculas nas colunas, para cada nível de Al, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Observou-se que, no cultivar tolerante, isto aconteceu tanto nas raízes quanto nas folhas. Já, o Al, nas raízes do cultivar sensível, promoveu aumento na atividade da desidrogenase do malato e, conseqüentemente, aumentou a oxidação do ácido málico na mitocôndria, resultando na formação do ácido oxaloacético, substrato para formação do ácido cítrico. Isto parece ter acontecido, uma vez que se observou nas raízes do cultivar sensível, na presença do Al, um aumento de cerca de 368% no teor do ácido cítrico (Quadro 1 do Capítulo 2). Este resultado pode indicar a ocorrência de síntese preferencial de ácidos tricarboxílicos, como o cítrico, em detrimento do ácido málico, principalmente no cultivar sensível. Nas folhas, na presença do Al, o aumento no teor do ácido cítrico, significativamente maior no cultivar sensível, reforça esta hipótese. RYAN et al. (1995), por outro lado, trabalhando com ápices radiculares de linhagens isogênicas de trigo, sensíveis e tolerantes, não observaram alteração na atividade da desidrogenase do malato. Estes autores acreditam que as linhagens sensíveis e tolerantes ao Al têm capacidades semelhantes para oxidar o malato.

### 3.1.5. Efeito do Al sobre a atividade da enzima málica (NADP<sup>+</sup>)

Na ausência de Al, a atividade da enzima málica dependente de NADP<sup>+</sup> não diferiu nem nas raízes nem nas folhas dos dois cultivares (Quadro 5). Na presença do Al, a atividade dessa enzima aumentou nos dois cultivares. Nessa condição, o cultivar sensível apresentou maior atividade da enzima málica dependente de NADP<sup>+</sup>. Nas folhas, o cultivar sensível sofreu uma redução de 33,6% na atividade da enzima málica dependente de NADP<sup>+</sup> enquanto o cultivar tolerante não foi influenciado.

Quadro 5 - Efeito do Al sobre a atividade da enzima málica (NADP<sup>+</sup>) em plantas de sorgo

Al ( $\mu\text{M}$ )	Raízes		Folhas	
	Sensível	Tolerante	Sensível	Tolerante
	$\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$			
0	39,4Ab	38,0Ab	83,7Aa	95,8Aa
185	61,5Aa	44,9Ba	55,6Bb	81,3Aa

\* As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e pelas mesmas letras minúsculas nas colunas, para cada nível de Al, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

À semelhança da enzima málica dependente de NAD<sup>+</sup>, a enzima málica dependente de NADP<sup>+</sup> também catalisa a descarboxilação oxidativa do ácido málico, diferindo apenas na localização espacial e no tipo de co-fator requerido (LANCE e RUSTIN, 1984). Por participar da regulação dos níveis de ácido málico no citossol e por apresentar atividade bem maior que a da enzima málica dependente de NAD<sup>+</sup>, é provável que a enzima málica dependente de NADP<sup>+</sup> tenha maior importância no(s) mecanismo (s) de tolerância das plantas ao Al. Nas raízes, na presença de Al, os aumentos nas atividades da enzima málica dependente de NADP<sup>+</sup> foram de 56,1 e 18,1%, nos cultivares sensível e tolerante, respectivamente. Estes resultados favorecem a manutenção de concentrações

mais elevadas de ácido málico no cultivar tolerante, pela menor atividade dessa enzima oxidativa. Nas folhas, a redução na atividade da enzima málica dependente de  $\text{NADP}^+$  nas plantas tratadas com Al foi de 33,6% no cultivar sensível, enquanto no cultivar tolerante não se observou diferença significativa. No entanto, o menor acúmulo do ácido málico (134,8%) nas folhas do cultivar sensível (Quadro 1 do Capítulo 2), relativamente ao observado no cultivar tolerante, na presença do Al, pode provavelmente não ter sido determinado apenas pela atividade oxidativa da enzima málica dependente de  $\text{NADP}^+$ , mas sim pela baixa atividade e, ou, diminuição na atividade de enzimas de síntese como a carboxilase do fosfoenolpiruvato e a fumarase.

### **3.2. Efeito do Al sobre a atividade de enzimas do metabolismo do ácido t-aconítico**

#### **3.2.1. Efeito do Al sobre a atividade da isomerase do aconitato**

Na ausência de Al, nas raízes, a atividade da isomerase do aconitato foi maior no cultivar sensível, enquanto nas folhas a atividade desta enzima foi maior no tolerante (Quadro 6). Nas raízes, após exposição ao Al, observou-se aumento na atividade desta enzima apenas no cultivar tolerante, a qual se tornou essencialmente igual à do cultivar sensível. Estes resultados podem explicar pelo menos parte do aumento observado no teor do ácido t-aconítico neste cultivar. Por outro lado, o teor do ácido t-aconítico também aumentou nas raízes do cultivar sensível, na presença do Al, sem aumento correspondente na atividade dessa enzima, sugerindo que, pelo menos neste cultivar, parte deste ácido seja resultante de sua translocação das folhas para as raízes. Nas folhas, as plantas expostas ao Al apresentaram reduções na atividade da isomerase do aconitato nos dois cultivares. No entanto, a atividade dessa enzima no cultivar tolerante,

embora baixa, manteve-se duas vezes maior que no cultivar sensível. Assim, o acúmulo do ácido t-aconítico nas folhas do cultivar sensível pode provavelmente ter ocorrido em virtude da inibição na atividade da desidrogenase do isocitrato, bloqueando a oxidação do isocitrato e acumulando os ácidos tricarboxílicos imediatamente anteriores do ciclo. Todavia, a isomerase do aconitato parece não ser importante na diferenciação entre os cultivares, em termos do acúmulo do ácido t-aconítico, em virtude das rápidas interconversões entre os ácidos cítrico, isocítrico, c-aconítico e t-aconítico. Além disso, o ácido t-aconítico pode sofrer conversão para cítrico e, ou, c-aconítico pelas reações inversas da desidratase do citrato e da isomerase do aconitato, respectivamente, ou pela ação da aconitase.

Quadro 6 - Efeito do Al sobre a atividade da isomerase do aconitato em plantas de sorgo

Al ( $\mu\text{M}$ )	Raízes		Folhas	
	Sensível	Tolerante	Sensível	Tolerante
	$\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{MF}$			
<b>0</b>	35,9Aa	18,8Bb	36,0Ba	73,5Aa
<b>185</b>	39,7Aa	38,6Aa	5,8Bb	11,7Ab

\* As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e pelas mesmas letras minúsculas nas colunas, para cada nível de Al, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

### 3.2.2. Efeito do Al sobre a atividade da desidrogenase do isocitrato

Na ausência de Al, não se observou diferença entre os cultivares quanto à atividade da desidrogenase do isocitrato, tanto nas raízes quanto nas folhas (Quadro 7). Na presença do Al, não se observou alteração na atividade da desidrogenase do isocitrato nas raízes e os cultivares também não diferiram entre si. Nas folhas, porém, o Al causou redução significativa na atividade da desidrogenase do isocitrato, nos dois cultivares, passando o cultivar tolerante a ter uma atividade enzimática 42,1% maior que o cultivar sensível. Estes resultados sugerem que o Al, ao diminuir a atividade da desidrogenase do isocitrato, possa, pelo menos em parte, reduzir a oxidação do isocitrato a 2-oxoglutarato, favorecendo o acúmulo dos ácido tricarbóxicos. O acúmulo do ácido isocítrico, por sua baixa oxidação e seu equilíbrio dinâmico com os ácidos c-acotínico e cítrico poderia favorecer o desvio da rota normal, para a síntese do ácido t-acotínico, de forma mais pronunciada no cultivar sensível. Esta inibição da oxidação do isocitrato poderia também limitar a utilização do 2-oxoglutarato para a síntese dos ácidos glutâmico e aspártico, limitando a síntese de aminoácidos e de proteínas e, conseqüentemente, comprometendo todo o crescimento das plantas.

Quadro 7 - Efeito do Al sobre a atividade da desidrogenase do isocitrato em plantas de sorgo

Al ( $\mu\text{M}$ )	Raízes		Folhas	
	Sensível	Tolerante	Sensível	Tolerante
	$\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$			
0	11,7Aa	12,7Aa	13,9Aa	12,3Aa
185	11,7Aa	14,1Aa	5,7Bb	8,1Ab

\* As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e pelas mesmas letras minúsculas nas colunas, para cada nível de Al, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

### 3.2.3. Efeito do Al sobre a atividade da desidratase do citrato

Na ausência de Al, a atividade da desidratase do citrato nas raízes do cultivar tolerante foi significativamente maior que a atividade dessa enzima no cultivar sensível (Quadro 8). Na presença do Al, observaram-se reduções de 50,4 e 29% na atividade da desidratase do citrato, nas raízes do cultivar sensível e tolerante, respectivamente. Nas folhas, na ausência de Al, não houve diferença entre os cultivares para a atividade dessa enzima. Na presença de Al, a atividade da desidratase do citrato não foi alterada no cultivar tolerante, mas decresceu 31,1% no cultivar sensível.

Quadro 8 - Efeito do Al sobre a atividade da desidratase do citrato em plantas de sorgo

Al ( $\mu\text{M}$ )	Raízes		Folhas	
	Sensível	Tolerante	Sensível	Tolerante
	$\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$			
<b>0</b>	193,3Ba	317,7Aa	139,1Aa	144,6 Aa
<b>185</b>	95,8Bb	225,7Ab	95,8 Bb	150,0 Aa

\* As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e pelas mesmas letras minúsculas nas colunas, para cada nível de Al, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Estes resultados sugerem a ocorrência de menor síntese do ácido t-aconítico, a partir do ácido cítrico, com maior intensidade no cultivar sensível. Segundo BRAUER e TELL (1981), em plantas de milho, o ácido t-aconítico é sintetizado rapidamente a partir do ácido cítrico, em reação catalisada pela desidratase do citrato. Sob condições em que a enzima seja inibida, como por exemplo estresse com Al, espera-se que o ácido cítrico se acumule em maior quantidade (Quadro 1, Capítulo 2). Este fato pode provavelmente ter ocorrido nas folhas do cultivar sensível.

### **3.3. Atividade das enzimas do metabolismo de ácidos orgânicos e a tolerância de plantas de sorgo ao Al**

O Al altera a atividade de enzimas de síntese e de degradação do ácido málico, de modo diferencial. No cultivar tolerante ao Al, sob estresse de Al, as enzimas envolvidas na síntese como a carboxilase do fosfoenolpiruvato e, principalmente, a fumarase aumentaram suas atividades, enquanto a principal enzima de degradação, a desidrogenase do malato, diminuiu. Já nas plantas do cultivar sensível, as enzimas do metabolismo do ácido málico responderam à presença do Al de forma diferente. A atividade da fumarase nas folhas das plantas tratadas com Al diminuiu, enquanto a atividade da desidrogenase do malato aumentou nas raízes dessas plantas sob estresse de Al. O balanço das atividades das enzimas de síntese e de degradação do ácido málico, portanto, favorecem ao maior acúmulo de ácido málico no cultivar tolerante.

No caso do metabolismo do ácido t-aconítico, apesar de este ácido ser quantitativamente bastante importante em sorgo, as atividades enzimáticas não mostraram de modo claro o que levou ao acúmulo desse ácido. Todavia, seu aumento expressivo, especialmente nas raízes do cultivar tolerante sob estresse de Al, sugere o envolvimento do ácido t-aconítico no mecanismo de tolerância. De modo geral, considerando principalmente o metabolismo dos ácidos málico e t-aconítico, assume-se que o cultivar tolerante, sob estresse de Al, desencadeia um estímulo à biossíntese desses ácidos orgânicos de forma mais acentuada que o cultivar sensível, podendo ser este um importante componente do mecanismo de tolerância de sorgo em níveis tóxicos de Al.

#### 4. CONCLUSÕES

Na presença do Al, ocorreram reduções nas atividades das enzimas desidrogenase do malato e enzima málica, dependente de  $\text{NAD}^+$ , nas folhas dos dois cultivares. Entretanto, o efeito desse elemento nas raízes praticamente inexistiu. O Al estimulou o aumento na atividade da carboxilase do fosfoenolpiruvato e da fumarase, nas raízes dos dois cultivares, especialmente no tolerante. Nas folhas, a atividade da carboxilase do fosfoenolpiruvato não se modificou nos dois cultivares e a da fumarase aumentou no tolerante, mas decresceu no sensível. Nas raízes, o Al promoveu o aumento na atividade da enzima málica dependente de  $\text{NADP}^+$ , que foi menor no cultivar tolerante. Nas folhas, a atividade dessa enzima diminuiu nos dois cultivares. Na presença do Al, a atividade da isomerase do aconitato aumentou nas raízes, mas diminuiu nas folhas. Não houve alteração na atividade da desidrogenase do isocitrato, nas raízes dos dois cultivares, na presença do Al. Já nas folhas, o Al, provocou diminuição da atividade da desidrogenase do isocitrato nos dois cultivares. A desidratase do citrato teve sua atividade diminuída, nas raízes dos dois cultivares, na presença do Al. Entretanto, nas folhas, a atividade desta enzima diminuiu no cultivar sensível, não sendo alterada no cultivar tolerante.

As enzimas testadas, que se mostraram importantes no controle da produção de ácidos orgânicos e determinantes no comportamento diferencial dos cultivares de sorgo frente ao estresse de Al, foram a carboxilase do fosfoenolpiruvato e, principalmente, a fumarase. As demais enzimas estudadas parecem ser secundárias, no que concerne à manutenção dos níveis dos ácidos orgânicos.

O Al, de modo geral, influenciou a atividade das enzimas estudadas, no sentido de estimular a síntese e, ou, inibir a degradação do ácido málico. Nos casos dos ácidos cítrico e t-aconítico, isto nem sempre aconteceu. No cultivar tolerante, as enzimas de síntese dos ácidos orgânicos mostraram-se mais sensíveis ao estímulo, enquanto as enzimas de degradação foram mais sensíveis ao efeito inibitório do Al tóxico.

Os aumentos nas concentrações de ácido málico, nas plantas de sorgo sensíveis e tolerantes, tratadas com Al, podem ser explicados pela resultante das atividades das enzimas de síntese e de degradação desse ácido. No caso do ácido t-aconítico, contudo, isto não ficou claro. Parece que os níveis desse ácido são alterados por reações de interconversão rápida dos ácidos c-aconítico e cítrico para t-aconítico, como também pelo seu transporte e pela sua redistribuição.

### 3. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho, estudaram-se os efeitos do Al sobre o teor e a distribuição do Al, o crescimento de plantas de sorgo e os teores de P, K, Ca e Mg, os teores e a exsudação de ácidos orgânicos e a atividade de enzimas ligadas à síntese e à degradação desses ácidos, em dois cultivares de sorgo com tolerância diferencial, o tolerante (BR006R) e o sensível (BR007A), em níveis tóxicos de Al.

O crescimento das plantas, particularmente o das raízes, diminuiu acentuadamente com o aumento das concentrações de Al na solução nutritiva.

Os teores de Al, tanto nas raízes quanto na parte aérea, aumentaram com os aumentos nas concentrações de Al na solução nutritiva, e o cultivar sensível acumulou mais Al nas duas partes da planta.

O Al acumulou-se principalmente no ápice radicular (0-5 mm). Este segmento da raiz, além de apresentar maior teor de Al que os demais segmentos analisados, no cultivar sensível, apresentou cerca de 25,0% mais Al que o cultivar tolerante.

Os teores dos elementos minerais P, K, Ca e Mg, tanto nas raízes quanto na parte aérea, diminuiram com o aumento dos níveis de Al na solução nutritiva, mas os cultivares não diferiram entre si, exceto para os teores de Ca na parte aérea.

A aplicação de ácido málico à solução nutritiva resultou em amenização do efeito inibitório do Al sobre o alongamento radicular, mas não houve eliminação completa da toxicidade do Al, mesmo na concentração mais alta.

Os teores dos principais ácidos orgânicos, encontrados nas raízes e na parte aérea, aumentaram com a exposição das plantas ao Al. Os dois ácidos orgânicos mais abundantes em sorgo e, talvez, os mais importantes do ponto de vista da tolerância dessa planta ao Al foram os ácidos málico e t-aconítico.

Dentre todos os ácidos orgânicos, o ácido málico foi aquele que, na presença de Al, apresentou o maior aumento absoluto no seu teor, sempre mais pronunciado no cultivar tolerante, sugerindo um papel deste ácido no mecanismo de tolerância das plantas à toxicidade de Al.

O Al promoveu aumento no teor de ácido cítrico na seiva xilemática, tanto no cultivar sensível quanto no tolerante, sendo, entretanto, mais pronunciado (cerca de 35%) no cultivar tolerante que no cultivar sensível (11,5%).

O Al, de modo geral, influenciou a atividade das enzimas estudadas, no sentido de estimular a síntese e, ou, inibir a degradação do ácido málico. Nos casos dos ácidos cítrico e t-aconítico, isto nem sempre aconteceu. No cultivar tolerante, as enzimas de síntese dos ácidos orgânicos mostraram-se mais sensíveis ao estímulo, enquanto as enzimas de degradação foram mais sensíveis ao efeito inibitório do Al tóxico.

As enzimas que se mostraram potencialmente mais importantes no controle da produção de ácidos orgânicos e do comportamento diferencial dos cultivares de sorgo, frente ao estresse de Al, parecem ser a carboxilase do fosfoenolpiruvato e, principalmente, a fumarase. As demais enzimas estudadas mostraram ter papel secundário nos processos de manutenção dos níveis de ácidos orgânicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAN, J.E. **The preparation of agricultural samples for analysis by atomic absorption spectroscopy.** Varian Techtron, 1969. 15 p. (Boletim 12/69)
- ANDERSSON, M. Toxicity and tolerance of aluminium in vascular plants. **Water, Air and Soil Pollut.**, v. 39, n. (3-4), p. 439-462, 1988.
- ANIOL A. Induction of aluminum tolerance in wheat seedlings by low doses of aluminum in the nutrient solution. **Plant Physiol.**, v. 76, n. 3, p. 551-555, 1984.
- BASU, U., GODBOLD, D., TAYLOR, G.J. Aluminum resistance in *Triticum aestivum* associated with enhanced exudation of malate. **J. Plant Physiol.**, v. 144, n. 6, p. 747-753, 1994.
- BENNET, R.J., BREEN, C.M., FEY, M.V. The primary site of aluminium injury in the root of *Zea mays* L. **South Afr. J. Plant Soil**, v. 2, n. 1, p 8-17, 1985.
- BENNET, R.J., BREEN, C.M., FEY, M.V. The effects of aluminium on root cap function and root development in *Zea mays* L. **Environ. Exp. Bot.** , v. 27, n. 1, p. 91-104, 1987.
- BENNET, R.J., BREEN, C.M. The aluminium signal: new dimensions to mechanisms of aluminium tolerance. **Dev-Plant-Soil-Sci.**, v. 45, p. 703-716 1991.
- BRAUER, D., TEEL, R. Metabolism of trans-aconitic acid in maize. **Plant Physiol.**, v. 68, n. 6 , p. 1406-1408, 1981.
- BRYCE, J.H., AP REES, T. Rapid decarboxylation of the products of dark fixation of CO<sub>2</sub> in roots of *Pisum* and *Plantago*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 8, p.1635-1638, 1985.
- CALBO, A . G., CAMBRAIA, J. Efeito do alumínio sobre a composição mineral de cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L Moench) **Rev. Ceres**, v. 27, n. 152, p. 369-378, 1980.

- CAMBRAIA, J., GALVANI, F. R., ESTEVÃO, M.M. Effects of aluminum on organic acid, sugar and amino acid composition of the root system of sorghum (*Sorghum bicolor* L Moench). **J. Plant Nut.**, v. 6, n. 4 , p. 313- 322, 1983.
- CAMBRAIA, J., SILVA, M.A., CANO, M.A.O., SANT'ANNA, R. Método simples para a avaliação de cultivares de sorgo quanto a tolerância ao alumínio. **Rev. Brasil. Fisiol. Veg.**, v. 3, n. 2 , p. 87-95, 1991.
- CAMBRAIA , J., CAMBRAIA, M.C. Avaliação de híbridos de milho quanto à tolerância ao alumínio, em solução nutritiva. **Rev. Ceres**, v. 42, n. 241, p. 297-307, 1995.
- CLARK, R.B, Characterization of phosphatase of intact maize roots. **J. Agric. Food Chem.**, v. 23, n. 3, p. 458-460, 1975.
- COPELAND, L., LIMA, M.L, The effect of aluminum on enzymes activities in wheat roots. **J. Plant Physiol.**, v. 140, n. 3, p. 641-645, 1992.
- DELHAIZE, E, RYAN, P.R., RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II - Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. **Plant Physiol.**, v. 103, n. 3 , p. 695-702 1993a.
- DELHAIZE, E. , CRAIG. S., BEATON, C.D., BENNET, R.J., JAGADISH, V.C., RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiol.**, v.103, n. 3, p. 685-693, 1993b.
- DELHAIZE, E, RYAN, P.R., Update: aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiol.**, v.107, n. 2 , p. 315- 321, 1995.
- DENNIS, D.T., TURPIN, D.H. **Plant physiology, biochemistry and molecular biology**. London: Longman Scientific e Technical., 1990. 581 p.
- DURIEUX, R.P., JACKSON, W. A., KANPRATH E.J., MOLL, R. H. Inhibition of nitrate uptake by aluminium in maize. **Plant Soil**, v.151, n.1, p. 97-104, 1993.
- DURIEUX, R.P., BARTLETT, R.J., MAGDOFF, F.R. Separate mechanisms of aluminium toxicity for nitrate uptake and root elongation. **Plant Soil**, v.172, n. 2 , p. 229-234, 1995.

- FUENTE, J. M., RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, V., CABRERA-PONCE, J. L., HERRERA-ESTRELLA, L. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. **Science**, v. 276, n. 5318, p. 1566-1568, 1997.
- GASSMANN, W., SCHROEDER, J.I. Inward-rectifying K<sup>+</sup> channels in root hairs of wheat. A mechanism for aluminum-sensitive low affinity K<sup>+</sup> uptake. **Plant Physiol.**, v.105, n. 4 , p. 1399-1408, 1994.
- GONÇALVES J.F.C., CAMBRAIA, J., SANT'ANNA, R., PACHECO, S. Aluminum and zinc effects on the metabolism of ribonucleic acid in two sorghum cultivars. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 8, n. 2 , p. 81-86, 1996.
- GOODENOUGH, P.W., PROSSER, I.M., YOUNG, K. NADP-linked malic enzyme and malate metabolism in ageing tomato fruit. **Phytochemistry**, v. 24, n.6, p. 1157-1162, 1985.
- HAUG, A., SHI, B. Biochemical basis of aluminium tolerance in plant cells. In: WRIGHT, R.J, BALIGAR, V.C., MURRMANN, R.P. (Eds.). **Plant Soil interactions at low pH**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 839-850.
- HAUG, A., SHI, B., VITORELLO, V. Aluminum interaction with phosphoinositide-associated signal transduction. **Arch. Toxicol.**, v. 68, n. 1, p. 1-7, 1994.
- HORST, W.J., WAGNER, A., MARSCHNER, H. Mucilage protects root meristems from aluminium injury. **Z. Pflanzenphysiol.**, v.105, n. 5, p. 435-444, 1982.
- HUE, N.V., CRADDOCK, G.R., ADAMS, F. Effects of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. **Soil Sci. Soc. Amer. J.** , v. 50, n. 1, p. 28-34, 1986.
- JONES, D.L., KOCHIAN, L.V., GILROY, S. Aluminum induces a decrease in cytosolic calcium concentration in BY-2 tobacco cell cultures. **Plant Physiol.**, v.116, n. 1, p. 81-89, 1998.
- KASAI, M., SASAKI, M., YAMAMOTO, Y. Aluminum stress increases K<sup>+</sup> efflux and activities of ATP- and PPi-dependent H<sup>+</sup> pumps of tonoplast-enriched membrane vesicles from barley roots. **Plant Cell Physiol.**, v. 33, n. 7, p.1035-1039, 1992.

- KATSUHARA, M., SAKANO, K., SATO, M., KAWAKITA, H. E KAWABE, S.  
Distribution and production of *trans*-aconitic acid in barnyard grass  
(*Echinochloa crus. galli* var. *oryzicola*) as putative antifeedant against brown  
planthoppers. **Plant Cell Physiol.**, v. 34, n. 2 , p. 251-254, 1993.
- KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in  
plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 46, p. 237-60, 1995.
- LANCE, C., RUSTIN, P. The central role of malate in plant metabolism. **Physiol.**  
**Veg.**, v. 22, n.3, p. 625-641, 1984.
- LARSEN, P.B., DEGENHARDT, J., TAI, CHIN-YIN., STENZLER, L.M.,  
HOWELL, H.S., KOCHIAN, V.L. Aluminum-resistant arabidopsis mutants  
that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid  
release from roots. **Plant Physiol.**, v. 117, n. 1 , p. 9-17, 1998.
- LAZIC-JANCIC, V., SUKALOVIC, V. H., VULETIC, M., DENIC, M.,  
NEYRA, C. Genetic variability of aluminium stress tolerance in mayse.  
**Genetika**,  
v. 23, n.1, p. 1-14, 1991.
- LAW, R.D., PLAXTON, W.C. Purification and characterization of a novel  
phosphoenolpyruvate carboxylase from banana fruit. **Biochemical Journal**  
**London**, v. 307, n.3, p. 807-816, 1995.
- LINDEMAN, W. Observations on the behaviour of phosphate compounds in  
*Clorella* at transition from dark to light. In: UNITED NATIONS  
INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE PEACEFUL USES OF  
ATOMIC ENERGY, 2, 1958, Geneva. **Proceedings...**Geneva: [s.n], 1958..  
v.24, pt. 1, p. 8-15: (Isotopes in Biochemistry and Physiology).
- MacDONALD, T. L., MARTIN, R. B. Aluminum ion in biological systems.  
**Trends Biol Sci.** v. 13, n.1, p. 15-19, 1988.
- MAGNAVACA , R., GARDNER, C. O., CLARK, R. B. Comparisons of maize  
lines for aluminum tolerance in nutrient solution. In: GABELMAN H. W. and

- Loughman, B.C (Eds), **Genetic aspects of plant mineral nutrition**, 1987, p. 189-199.
- MANICOL, P.K., JACOBSEN, J.V. Endosperm acidification and related metabolic changes in the developing barley grain. **Plant Physiol.**, v. 98, n.3, p. 1098- 1104, 1992.
- MARTIN, R.B. Aluminum speciation in biology. In: CHADWICK, D.J., WHELAN, J. (eds.). **Aluminium in biology and medicine**. New York: 1992. p. 2-25.
- MARSCHNER, H. Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. **Plant Soil**, v.131, n. 1 , p. 1-20, 1991.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd. ed. London: Academic Press, 1995. 889 p.
- MATSUMOTO, H., YAMAYA, T. Inhibition of potassium uptake and regulation of membrane-associated  $Mg^{2+}$ - ATPase activity of pea roots by aluminum. **Soil Science Plant Nutrition**. v.32, n. 2, p.179-188, 1986.
- MIYASAKA, S. C., KOCHIAN, L.V., SHAFF, J. E., FOY, C.D. Mechanisms of aluminum tolerance in wheat. An investigation of genotypic differences in rhizosphere pH,  $K^+$  and  $H^+$  transport, and root-cell membrane potentials. **Plant Physiol.**, v. 91, n. 3 , p. 1188-1196, 1989.
- MIYASAKA, S. C., BUTA, J.G., HOWELL, R.K., FOY, C.D. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. **Plant Physiol.**, v. 96, n. 3 , p. 737- 743, 1991.
- MOUSTAKAS, M., OUZOUNIDOU, G., LANNOYE, R. Aluminum effects on photosynthesis and elemental uptake in an aluminum-tolerant and non-tolerant wheat cultivar. **J. Plant Nut.** , v. 18, n. 4 , p. 669-683, 1995.
- PELLET, D. M., GRUMES, D.L., KOCHIAN, L.V. Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). **Planta**, v. 196, n. 4, p. 788-795, 1995.
- PELLET, D.M., PAPERNIC, L.A., KOCHIAN, L.V. Multiple aluminum-resistance mechanism in wheat. **Plant Physiol.**, v. 112, n. 2, p. 591-597, 1996.

- POPP, M., KINZEL, H. Changes in the organic acid content of some cultivated plants induced by mineral ion deficiency. **J. Exp. Bot.**, v. 32, n. 126, p. 1-8, 1981.
- RENGEL, Z. Role of calcium in aluminum toxicity. **New Phytol.**, v. 121, n. 4, p. 499-513, 1992.
- RINCÓN, M., GONZALES, R.A. Aluminum partitioning in intact roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L) cultivars. **Plant Physiol.**, v. 99, n. 3, p. 1021-1028, 1992.
- RYAN, P.R., SHAFF, J.E., KOCHIAN, L.V. Aluminum toxicity in roots. Correlation among ionic currents, ion fluxes, and root elongation in aluminum-sensitive and aluminum-tolerant wheat cultivars. **Plant Physiol.**, v. 99, n. 3, p. 1193-1200, 1992.
- RYAN, P.R., DITOMASO, J. M., KOCHIAN, L.V. Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of root cap. **J. Exp. Bot.**, v. 44, n. 259, p. 437-46, 1993.
- RYAN, P.R., DELHAIZE, E., RANDALL, P.J. Characterization of Al-stimulated malate efflux from the apices of Al-tolerant wheat roots. **Planta**, v.196, n. 1, p. 103-110, 1995 .
- SCOTT, R., HODDINOTT, J., TAYLOR, G.J. The influence of aluminum on growth, carbohydrate, and organic acid content of an aluminum tolerant and an aluminum sensitive cultivar of wheat. **Can. J. Bot.**, v. 69, n. 4, p. 711-716, 1991.
- SLASKI, J.J. Effects of aluminum on calmodulin-dependent and calmodulin independent NAD kinase activity in wheat (*Triticum aestivum* L.) root tips. **J. Plant Physiol.**, v. 133, n. 6, p. 696-701, 1989.
- SLASKI, J.J. NAD<sup>+</sup> Kinase activity in root tips of nearly isogenic lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) that differ in their tolerance to aluminum. **J. Plant Physiol.**, v.145, n. (1/2), p. 143-147, 1995.

- SIVAGURU, M., HORST, W. J. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiol.**, v. 116, n. 1, p. 155, 1998.
- SUHAYDA, C.G., HAUG, A. Organic acids reduce aluminum toxicity in maize root membranes. **Physiol. Plant.**, v. 68, n. 2, p. 189-195, 1986.
- TAN, K.H., BINGER, A. Effect of humic acid on aluminum toxicity in corn plants. **Soil Sci.**, v. 141, n. 1, p. 20-25, 1986.
- TAYLOR, G. J. The physiology of aluminum tolerance in higher plants. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v.19, n. (7/12), p. 1179-1194, 1988.
- TAYLOR, G. J. Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance . **Curr. top. plant biochem. physiol.**, v.10, n.1, p. 57-93, 1991.
- TICE, K.R., PARKER, D.R., DE MASON, D.A Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root tips of aluminum-intoxicated wheat. **Plant Physiol.**, v. 100, n. 1, p. 309-319, 1992.
- TRIPLETT, E., BARNETT, N.M., BLEVINS, D.G. Organic acids and ionic balance in xylem exudate of wheat during nitrate or sulfate absorption. **Plant Physiol.**, v. 65, n. 4, p. 610-613, 1980.
- WANG, C., WOOD, F.A. A modified aluminon reagent for the determination of aluminum after HNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> digestion. **Can. J. Soil Sci.**, v. 53, n.2, p. 237-239, 1973.
- WALLACE, S., HENNING, S.J., ANDERSON, I. C. Elongation, Al concentration, and hemotoxin staining of aluminum-treated wheat roots. **Iowa State J. Res.**, v. 57, n. 1, p. 97-106, 1982.
- WELCH, R.M. Micronutrient nutrition of plants. **Critical reviews in plant sciences**, v. 14, n.1, p. 49-82, 1995.
- WHEELER, D. M., WILD, D. J.C., EDMEADES, D. C. Preliminary results from a microscopic examination on the effects of aluminium on the roots tips of wheat. **Plant Soil**, v. 146, n. (1-2), p. 83-87, 1992.

WHITE, M. C., DECKER, A.M., CHANEY, R. L. Metal complexation in xylem fluid. I. Chemical composition of tomato and soybean stem exudate. **Plant Physiol.**, v. 67, n. 2, p. 292-300, 1981.

WRIGHT, K. E. Effects of phosphorus and lime in reducing aluminum toxicity of acid soils. **Plant Physiol.**, v. 12, n.1, p. 173-181, 1948.

WEITING, NI., ROBERTSON, F. E., REEVES, H. C., Purification and characterization of cytosolic NADP specific isocitrate dehydrogenase from *Pisum sativum*. **Plant Physiol.**, v. 83, n. 4, p. 785-788, 1987.

ZHANG, G., TAYLOR G. J. Kinetics of aluminum uptake by excised roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. **Plant Physiol.**, v. 91, n. 3, p. 1094-1099, 1989.

## **APÊNDICE**

## APÊNDICE

Quadro 1A – Resumo da análise de variância do efeito do Al sobre o peso da matéria seca das raízes e da parte aérea de plantas de sorgo

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	
		Raízes	Parte Aérea
Cultivar	1	$0,124.10^{-1**}$	$0,186.10^{-1*}$
Doses de alumínio	4	$0,121.10^{-1**}$	$0,770.10^{-1**}$
Cultivar x Doses	4	$0,339.10^{-3}$	$0,395.10^{-2}$
Blocos	2	$0,383.10^{-2**}$	$0,855.10^{-2}$
Resíduos	18	$0,489.10^{-3}$	$0,403.10^{-2}$
CV (%)		12,8	12,2

\* Significativo pelo teste F a 5%.

\*\* Significativo pelo teste F a 1%.

Quadro 2A – Resumo da análise de variância do efeito do Al sobre o comprimento da maior raiz de plantas de sorgo

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio
Cultivar	1	7,9**
Doses de alumínio	4	130,9**
Cultivar x Doses	4	1,29**
Blocos	2	0,29
Resíduos	18	0,15
CV (%)		3,9

\* Significativo pelo teste F a 5%.

\*\* Significativo pelo teste F a 1%.

Quadro 3A – Resumo da análise de variância do teor do Al nas raízes e na parte aérea de plantas de sorgo

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	
		Raízes	Parte Aérea
Cultivar	1	31952,0**	18160,2**
Alumínio	4	2234366,0**	823327,2**
Cultivar x Alumínio	4	8547,4	2212,3
Blocos	2	17437,1	2823,5
Resíduos	18	5093,5	1270,7
CV (%)		12,8	10,9

\* Significativo pelo teste F a 5%.

\*\* Significativo pelo teste F a 1%.

Quadro 4A – Resumo da análise de variância do efeito do Al sobre a distribuição de Al em segmentos radiculares de plantas de sorgo

Fontes de variação	GL	Quadrado Médio
Cultivar	1	3350,6**
Alumínio	1	1220,7**
Segmento	4	41,9**
Segmento x cultivar	4	42,6**
Segmento x alumínio	4	114,3**
Cultivar x alumínio	1	381,9**
Cultivar x alumínio x segmentos	4	92,1**
Blocos	2	13,5
Resíduos	38	4,6
CV (%)		10,3

\* Significativo pelo teste F a 5%.

\*\* Significativo pelo teste F a 1%.

Quadro 5A – Resumo da análise de variância do efeito do Al sobre os teores de P, K, Ca e Mg na raiz e na parte aérea de plantas de sorgo

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio							
		P		K		Ca		Mg	
		Raiz	P.A	Raiz	P.A	Raiz	P.A	Raiz	P.A
Cultivar	1	0,26.10 <sup>-2</sup>	0,27.10 <sup>-3</sup>	0,8.10 <sup>-3</sup>	0,17	0,1.10 <sup>-1</sup>	0,5.10 <sup>-1*</sup>	0,8.10 <sup>-3</sup>	0,8.10 <sup>-4</sup>
Doses de Al	4	0,17**	0,83.10 <sup>-2**</sup>	1,8**	1,3*	0,6.10 <sup>-1**</sup>	0,5.10 <sup>-1**</sup>	0,3.10 <sup>-1**</sup>	0,1.10 <sup>-1**</sup>
Cultivar x Doses	4	0,15.10 <sup>-1</sup>	0,54.10 <sup>-3</sup>	0,1	0,4	0,1.10 <sup>-1</sup>	0,4.10 <sup>-2</sup>	0,4.10 <sup>-2</sup>	0,1.10 <sup>-2</sup>
Blocos	2	0,99.10 <sup>-2</sup>	0,28.10 <sup>-3</sup>	0,8**	5,0**	0,9.10 <sup>-1**</sup>	0,6.10 <sup>-2</sup>	0,3.10 <sup>-1**</sup>	0,1.10 <sup>-1</sup>
Resíduos	18	0,2.10 <sup>-1</sup>	0,83.10 <sup>-2</sup>	0,15	0,4	0,8.10 <sup>-2</sup>	0,8.10 <sup>-2</sup>	0,7.10 <sup>-2</sup>	0,2.10 <sup>-2</sup>
CV (%)		14,6	6,1	6,8	12,1	11,2	21,9	25,4	17,0

\* Significativo pelo teste F a 5% .

\*\* Significativo pelo teste F a 1%.

Quadro 6A – Resumo da análise de variância da amenização da toxicidade do Al pela aplicação do ácido málico

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio
Cultivar	1	0,021
Ácido málico	4	8,06**
Cultivar x Ácido málico	4	4,51**
Blocos	2	0,08
Resíduos	18	0,40
CV (%)		8,6

\* Significativo pelo teste F a 5%.

\*\* Significativo pelo teste F a 1%.

Quadro 7A – Resumo da análise de variância do efeito do Al sobre o teor dos ácidos orgânicos nas raízes de plantas de sorgo

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio					
		ÁCIDOS					
		MÁLICO	CÍTRICO	T-ACONÍTICO	FUMÁRICO	SUCCÍNICO	QUÍNICO
Cultivar	1	1,26**	0,33.10 <sup>-2</sup>	0,99**	0,57.10 <sup>-1</sup>	0,49.10 <sup>-1*</sup>	0,24.10 <sup>-1**</sup>
Alumínio	1	36,8**	1,58**	9,8**	2,7**	3,33**	0,47**
Cultivar x Al	1	0,26	0,27.10 <sup>-2</sup>	0,63*	0,72.10 <sup>-1</sup>	0,23.10 <sup>-1</sup>	0,27.10 <sup>-2*</sup>
Blocos	2	0,25	0,17.10 <sup>-1</sup>	0,46.10 <sup>-1</sup>	0,34.10 <sup>-1</sup>	0,62.10 <sup>-2</sup>	0,32.10 <sup>-3</sup>
Resíduos	6	0,6.10 <sup>-1</sup>	0,14.10 <sup>-1</sup>	0,83.10 <sup>-1</sup>	0,28.10 <sup>-1</sup>	0,43.10 <sup>-2</sup>	0,22.10 <sup>-3</sup>
CV (%)		7,8	21,6	12,7	19,1	8,6	3,8

\* Significativo pelo teste F a 5% .

\*\* Significativo pelo teste F a 1%.

Quadro 8A – Resumo da análise de variância do efeito do Al sobre o teor dos ácidos orgânicos na parte aérea de plantas de sorgo

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio					
		ÁCIDOS					
		MÁLICO	CÍTRICO	T-ACONÍTICO	FUMÁRICO	SUCCÍNICO	QUÍNICO
Cultivar	1	6,0**	0,90.10 <sup>-2**</sup>	0,3	0,54.10 <sup>-1**</sup>	0,21.10 <sup>-1**</sup>	0,24.10 <sup>-1**</sup>
Alumínio	1	11,7**	0,37**	0,77**	0,78.10 <sup>-1**</sup>	0,60**	0,48**
Cultivar x Al	1	2,88**	0,74.10 <sup>-4</sup>	0,17.10 <sup>-1</sup>	0,10**	0,24.10 <sup>-2</sup>	0,27.10 <sup>-2**</sup>
Blocos	2	0,14.10 <sup>-1</sup>	0,40.10 <sup>-3</sup>	0,80.10 <sup>-1</sup>	0,43.10 <sup>-3</sup>	0,89.10 <sup>-3</sup>	0,32.10 <sup>-3</sup>
Resíduos	6	0,10.10 <sup>-1</sup>	0,55.10 <sup>-3</sup>	0,74.10 <sup>-1</sup>	0,15.10 <sup>-2</sup>	0,95.10 <sup>-3</sup>	0,22.10 <sup>-3</sup>
CV (%)		5,0	6,9	30,0	9,2	6,2	3,8

\* Significativo pelo teste F a 5% .

\*\* Significativo pelo teste F a 1% .

Quadro 9A – Resumo da análise de variância do efeito Al sobre o efluxo do malato (CG = cromatografia gasosa e EE = ensaio enzimático)

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	
		CG	EE
Cultivar	1	0,14**	0,99.10 <sup>-1**</sup>
Alumínio	1	0,13**	0,21**
Cultivar x Alumínio	1	0,53.10 <sup>-1**</sup>	0,39.10 <sup>-1**</sup>
Blocos	2	0,10.10 <sup>-3</sup>	0,83.10 <sup>-3</sup>
Resíduos	6	0,25.10 <sup>-2</sup>	0,16.10 <sup>-2</sup>
CV (%)		6,2	5,1

\* Significativo pelo teste F a 5% .

\*\* Significativo pelo teste F a 1% .

Quadro 10A – Resumo da análise de variância do efeito do Al sobre o teor de ácidos orgânicos na seiva xilemática de plantas de sorgo

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	
Cultivar	1		0,22**
Alumínio	1		0,46**
Cultivar x Alumínio	1		0,14**
Blocos	2		0,64.10 <sup>-2</sup>
Resíduos	6		0,56.10 <sup>-2</sup>
CV (%)			3,9

\* Significativo pelo teste F a 5%.

\*\* Significativo pelo teste F a 1%.

Quadro 11A – Resumo da análise de variância do efeito do Al sobre a atividade da carboxilase do fosfoenolpiruvato em plantas de sorgo

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	
		Raízes	Folhas
Cultivar	1	4924,4**	80676,5**
Alumínio	1	17864,8**	11,2
Cultivar x Alumínio	1	69,8	11,2
Blocos	2	168,3	165,5
Resíduos	6	248,3	321,6
CV (%)		18,2	10,5

\* Significativo pelo teste F a 5%.

\*\* Significativo pelo teste F a 1%.

Quadro 12A – Resumo da análise de variância do efeito do Al sobre a atividade da fumarase em plantas de sorgo

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	
		Raízes	Folhas
Cultivar	1	9746,9**	8112,5**
Alumínio	1	26135,1**	3575,9*
Cultivar x Alumínio	1	12758,3**	23997,6**
Blocos	2	53,49	564,2
Resíduos	6	114,0	452,8
CV (%)		15,4	15,3

\* Significativo pelo teste F a 5%.

\*\* Significativo pelo teste F a 1%.

Quadro 13A – Resumo da análise de variância do efeito do Al sobre a atividade da enzima málica dependente de NAD<sup>+</sup> em plantas de sorgo

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	
		Raízes	Folhas
Cultivar	1	1,00	37,5
Alumínio	1	0,12.10 <sup>-1</sup>	1476,7**
Cultivar x Alumínio	1	0,14.10 <sup>-1</sup>	260,9**
Blocos	2	0,93	38,43
Resíduos	6	0,1	19,42
CV (%)		18,2	15,1

\* Significativo pelo teste F a 5%.

\*\* Significativo pelo teste F a 1%.

Quadro 14A – Resumo da análise de variância do efeito do Al sobre a atividade da desidrogenase do malato em plantas de sorgo

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	
		Raízes	Folhas
Cultivar	1	101674,8*	1469,7
Alumínio	1	5489,5	124807,1**
Cultivar x Alumínio	1	163688,2**	1535,5
Blocos	2	26498,8	7326,6
Resíduos	6	11425,5	7620,1
CV (%)		8,5	7,1

\* Significativo pelo teste F a 5%.

\*\* Significativo pelo teste F a 1%.

Quadro 15A – Resumo da análise de variância do efeito do Al sobre a atividade da enzima málica dependente de NADP<sup>+</sup> em plantas de sorgo

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	
		Raízes	Folhas
Cultivar	1	242,19**	1065,6*
Alumínio	1	632,1**	1363,2**
Cultivar x Alumínio	1	173,5**	138,6
Blocos	2	22,9	111,1
Resíduos	6	9,54	96,1
CV (%)		6,7	12,4

\* Significativo pelo teste F a 5%.

\*\* Significativo pelo teste F a 1%.

Quadro 16A – Resumo da análise de variância do efeito do Al sobre a atividade da isomerase do aconitato em plantas de sorgo

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	
		Raízes	Folhas
Cultivar	1	249,8*	1405,3**
Alumínio	1	420,2**	6354,4**
Cultivar x Alumínio	1	192,9*	746,1**
Blocos	2	19,5	2,5
Resíduos	6	24,5	8,1
CV (%)		14,9	8,9

\* Significativo pelo teste F a 5%.

\*\* Significativo pelo teste F a 1%.

Quadro 17A – Resumo da análise de variância do efeito do Al sobre a atividade da desidrogenase do isocitrato em plantas de sorgo

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	
		Raízes	Folhas
Cultivar	1	8,3	0,9
Alumínio	1	1,5	122,8**
Cultivar x Alumínio	1	1,5	14,7**
Blocos	2	3,1	0,33
Resíduos	6	2,6	1,0
CV (%)		12,8	10,3

\* Significativo pelo teste F a 5%.

\*\* Significativo pelo teste F a 1%.

Quadro 18A – Resumo da análise de variância do efeito do Al sobre a atividade da desidratase do citrato em plantas de sorgo

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	
		Raízes	Folhas
Cultivar	1	48512,8**	2657,8**
Alumínio	1	26903,3**	1076,3
Cultivar x Alumínio	1	22,0	1779,1*
Blocos	2	856,7	21,9
Resíduos	6	153,76	256,2
CV (%)		5,9	12,0

\* Significativo pelo teste F a 5%.

\*\* Significativo pelo teste F a 1%.